

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Ivana D. Ćuruvija

**POLNE I SOJNE SPECIFIČNOSTI PROMENA  
CITOKINSKOG PROFILA MAKROFAGA ŽENKI PACOVA  
U REPRODUKTIVNOM STARENJU**

**Doktorska disertacija**

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Ivana D. Ćuruvija

**SEX AND STRAIN-SPECIFIC CHANGES OF  
MACROPHAGE CYTOKINE PROFILE IN FEMALE RATS  
DURING REPRODUCTIVE AGING**

**Doctoral Dissertation**

Belgrade, 2021

**Mentori:**

---

Dr sc. Nevena Arsenović-Ranin, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Vesna Vujić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

**Članovi komisije:**

---

Dr sc. Stanislava Stanojević, naučni savetnik  
Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“  
Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

---

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

---

Dr sc. Marijana Stojanović, naučni savetnik  
Centar za imunološka istraživanja „Branislav Janković“  
Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

U Beogradu, \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

*Eksperimenti prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su urađeni u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu.*

*Zahvaljujem se dr sc. Gordani Leposavić na pruženoj prilici za rad u okviru projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: Imunomodulatorni potencijal estrogena“ (175050), koji je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zahvalna sam dr sc. Gordani Leposavić na osmišljenoj temi kojom se ova doktorska disertacija bavi, na visokim kriterijumima i naučnoj doslednosti kojima se vodila tokom rada našeg istraživačkog tima.*

*Srdačno se zahvaljujem dr sc. Stanislavi Stanojević na velikoj pomoći u svakoj fazi izrade ove doktorske disertacije i bezrezervnom ličnom angažovanju. Veliko hvala što je uspevala da sasluša moje ideje i da mi nesebično pomogne da ih prenesemo na papir i pritom sačuva strpljenje tokom tog stvaralačkog procesa.*

*Veliku zahvalnost ukazujem mentorki, dr sc. Vesni Vujić, koja je svaki korak izrade i pisanja disertacije svojim pristupom učinila prijatnijim i koja je svojom smirenošću i prijateljskim savetima uspevala da me umiri i uveri u konačan uspeh.*

*Mentorki, dr sc. Neveni Arsenović-Ranin izražavam veliku zahvalnost na sveobuhvatnom angažovanju, savetima koji su mi bili izuzetno korisni i stručnoj pomoći tokom izrade, pisanja i prepravljavanja ove disertacije.*

*Dr sc. Marijani Stojanović se zahvaljujem na spremnosti da mi priskoči u pomoć kada je bilo potrebno.*

*Prijatnu atmosferu u kojoj je nastajala ova disertacija dugujem kolegama, Ivani, Raisi i Veljku, koji su ispratili svaku moju nedoumicu i potrudili se da je zajedno otklonimo. Učestvovali su u ispravljanju svake i pravljenju poneke greške tokom eksperimentalnog rada. Neprocenjivu zahvalnost im dugujem za njihovu supermoć da učine veselim stresne trenutke kojih je bilo na ovom truckavom i izazovnom putu ka zvanju doktora nauka, tokom kog smo postali i dobri prijatelji.*

*Želela bih da se zahavlim i ostalim kolegama iz Centra: Dušku, Ivanu, Ireni, Rajni, Dejani, Ivani L., Emiliji, Ani, Radi, Luki, Valentini, Bojanu, kao i koleginicama sa Farmaceutskog fakulteta, Jasmini, Bilji i Mirjani, koji su bili uvek raspoloženi da podele znanje i priteknu u pomoć.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Snežani i Draganu. Doktorsku disertaciju posvećujem njima kao znak zahvalnosti za pruženu bezgraničnu ljubav, razumevanje i podršku u svakom trenutku mog života. Zahvalnost dugujem i svojoj braći, Filipu i Stefanu, koji su se odmalena trudili, pristupom koji samo braća mogu da imaju, da me nauče šta je osećaj odgovornosti, upornosti i strpljenja.*

*Suprugu Sandru hvala za razumevanje i podršku tokom dugotrajnog procesa izrade doktorske disertacije, a posebno mu zahvaljujem na sposobnosti da meni naizgled teške i stresne situacije ublaži svojim praktičnim i racionalnim savetima.*

*I na kraju, želim veliko HVALA da posvetim sinu Andriji, koji je svojom dečačkom radoznalošću uneo humor tokom procesa pisanja disertacije kada je došao do zaključka da “mama stalno kuca po tastaturi da bi napisala najdužu knjigu na svetu o pacovima”.*

## **Polne i sojne specifičnosti promena citokinskog profila makrofaga ženki pacova u reproduktivnom starenju**

### **SAŽETAK**

Starenje se povezuje sa razvojem sistemskog, sterilnog hroničnog zapaljenja (engl. „inflammaging“). Malo je podataka o uticaju genetskih faktora i pola na sposobnost makrofaga (M $\phi$ ), kao ključnih ćelija urođenog imunskog odgovora, da tokom starenja “kontrolišu” rezoluciju akutnog zapaljenja i time razvoj hroničnog zapaljenja. Ciljevi ove disertacije su bili da se ispita 1) uticaj rane faze reproduktivnog starenja na fenotipske osobine (ekspresija markera povezanih sa aktivacijom i poreklom/funkcijom) i funkcijska svojstva (fagocitoza, sinteza inflamatornih medijatora) M $\phi$  “mirne” i inflamirane (delovanjem tioglikolata) peritonealne duplje ženki Albino Oxford (AO) pacova, 2) značaj genetskih faktora za reproduktivnim starenjem uslovljene promene peritonealnih M $\phi$  od značaja za uspešnu rezoluciju akutnog zapaljenja i 3) uloga polnih steroida u nastanku ovih promena uporednom analizom promena kod mužjaka i ženki AO pacova, njihovom analizom kod ženki AO pacova kojima su na kraju reproduktivnog perioda uklonjeni jajnici i ispitivanjem delovanja estradiola na M $\phi$  mladih i sredovečnih ženki AO pacova *in vitro*. Rezultati su pokazali da: 1) se sposobnost M $\phi$  ženki AO pacova da “kontrolišu” rezoluciju akutnog zapaljenja menja već tokom rane faze reproduktivnog starenja, kao i da su ove promene sojno specifične (M $\phi$  sredovečnih ženki AO pacova koje “uspešnije” stare od ženki Dark Agouti pacova pokazuju svojstva koja se mogu povezati sa boljom “kontrolom” inflamacije); 2) su ove promene polno specifične (M $\phi$  sredovečnih ženki imaju svojstva koja ukazuju na veći kapacitet da “kontrolišu” inflamaciju od M $\phi$  mužjaka istog uzrasta) i 3) u nastanku promena relevantnih za sposobnost M $\phi$  ženki AO pacova da “kontrolišu” akutnu inflamaciju važnu ulogu imaju promene u delovanju i estradiola i progesterona. Dodatno, ispitavanja *in vitro* su ukazala da su za uzrasno zavisne promene u sposobnosti M $\phi$  da “kontrolišu” inflamaciju pored promene u koncentraciji estradiola važne i one u samim M $\phi$ , koje menjaju njihov odgovor na delovanje estradiola.

**Ključne reči:** makrofage, fenotip, tioglikolat, citokini, reproduktivno starenje, pol, soj, ovarijektomija, estradiol, estrogenski receptori

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmakologija – Imunofarmakologija

## **Sex and strain-specific changes of macrophage cytokine profile in female rats during reproductive aging**

### **ABSTRACT**

Aging is associated with the development of systemic, sterile chronic inflammation ("inflammaging"). Little is known about the influence of genetic factors and sex on the ability of macrophages (M $\phi$ ), as key innate immune cells, to "control" the resolution of acute inflammation and thus the development of chronic inflammation during aging. The objectives of this dissertation were to examine 1) the influence of the early phase of reproductive aging on phenotypic characteristics (expression of markers associated with activation and origin/function) and functional characteristics (phagocytosis, synthesis of inflammatory mediators) of M $\phi$  isolated from "naive" and inflamed (thioglycollate-induced) peritoneal cavity of females Albino Oxford (AO) rats; 2) the significance of genetic factors for reproductive aging-related changes of peritoneal M $\phi$ , especially those important for successful resolution of acute inflammation and 3) the role of sex steroids in the occurrence of these changes by comparative analysis in males and females of AO rats, their analysis in female AO rats whose ovaries were removed at the end of the reproductive period and by examining *in vitro* effect of estradiol on M $\phi$  from young and middle-aged female AO rats. The results showed that: 1) the ability of M $\phi$  from AO females to "control" the resolution of acute inflammation changes during the early phase of reproductive aging, and these changes are strain-specific (M $\phi$  from middle-aged AO females that "age more successful" than Dark Agouti females, show properties which may be associated with better "control" of inflammation); 2) these changes are sex-specific (M $\phi$  from middle-aged females have a greater capacity to "control" inflammation than M $\phi$  from males of the same age group) and 3) both estradiol and progesterone play important roles in the ability of M $\phi$  from AO females to "control" acute inflammation. *In vitro* studies revealed that, in addition to changes in estradiol concentration, intrinsic changes in M $\phi$  that regulate their response to estradiol action are important for age-dependent changes in M $\phi$  ability to „control“ inflammation.

**Keywords:** macrophages, phenotype, cytokines, reproductive aging, gender, strain, ovariectomy, estradiol, estrogen receptors

**Scientific field:** Pharmacology

**Specific scientific field:** Pharmacology - Immunopharmacology

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. MAKROFAGE .....	1
1.1.1. Aktivacija makrofaga .....	3
1.1.2. Sekretorna aktivnost makrofaga .....	4
1.1.2.1. Citokini .....	4
1.1.2.1.1. Proinflamatorni citokini .....	4
1.1.2.1.1.1. TNF- $\alpha$ .....	4
1.1.2.1.1.2. IL-1 $\beta$ .....	5
1.1.2.1.1.3. IL-6 .....	5
1.1.2.1.2. Antiinflamatorni citokini .....	5
1.1.2.1.2.1. IL-10 .....	5
1.1.2.1.2.2. TGF- $\beta$ .....	6
1.1.2.2. ROS i RNS .....	6
1.1.2.2.1. ROS .....	6
1.1.2.2.2. RNS .....	7
1.2. INFLAMATORNI ODGOVOR U STARENJU: ULOGA MAKROFAGA .....	8
1.2.1. Starenje i makrofage .....	9
1.2.2. Značaj izučavanja promena u inflamaciji u starenju .....	11
1.3. SOJNE RAZLIKE U INFLAMATORNOM ODGOVORU: ULOGA MAKROFAGA .....	12
1.4. POLNE RAZLIKE U INFLAMATORNOM ODGOVORU: ULOGA MAKROFAGA .....	14
1.4.1. Značaj polnih steroida za polne razlike u inflamatornom odgovoru .....	14
1.4.1.1. Uloga estradiola .....	15
1.4.1.1.1. Estradiol .....	15
1.4.1.1.2. Estrogenski receptori .....	16
1.4.1.2. Uloga drugih polnih steroida .....	17
1.4.2. Polne razlike u oksidativno-inflamatornom starenju .....	17
1.4.3. Polne razlike u uticaju starenja na makrofage .....	18
1.4.3.1. Reproktivno starenje .....	19

2. CILJEVI.....	20
3. MATERIJAL I METODE .....	22
3.1. Eksperimentalne životinje .....	22
3.2. Hemikalije, antitela i imunokonjugati .....	22
3.3. Ovarijektomija .....	23
3.4. Određivanje faze estrusnog ciklusa kod ženki pacova.....	23
3.5. Indukcija inflamatornih makrofaga intraperitonealnim ubrizgavanjem tioglikolatnog medijuma .....	23
3.6. Dobijanje seruma i određivanje koncentracije polnih hormona u serumu .....	24
3.7. Izolovanje rezidentnih i TG makrofaga iz peritonealne šupljine .....	24
3.8. Određivanje ekspresije antigena na makrofagama peritonealne šupljine protočnom citofluorimetrijom .....	24
3.8.1. Obeležavanje membranskih antigena.....	24
3.8.2. Obeležavanje unutarćelijskih antigena .....	25
3.8.3. Obeležavanje nuklearnih antigena.....	25
3.8.4. Analiza uzoraka protočnom citofluorimetrijom .....	25
3.9. Određivanje funkcijskih karakteristika makrofaga peritonealne šupljine .....	26
3.9.1. Određivanje fagocitne aktivnosti.....	26
3.9.2. Određivanje aktivnosti enzima mijeloperoksidaze – MPO .....	27
3.10. Određivanje sekretornog profila makrofaga peritonealne šupljine.....	27
3.10.1. Određivanje produkcije azot-monoksida – NO .....	27
3.10.2. Određivanje aktivnosti enzima arginaze .....	27
3.11. Određivanje koncentracije citokina ELISA testovima.....	28
3.11.1.1. Priprema uzoraka za izvođenje ELISA testova .....	28
3.11.1.2. Izvođenje ELISA testova.....	28
3.12. Ispitivanje direktnog modulišućeg delovanja estradiola <i>in vitro</i> na promene u citokinskom profilu TG makrofaga tokom reproduktivnog starenja .....	30
3.13. Statistička evaluacija rezultata .....	30
4. REZULTATI .....	31
4.1. UTICAJ REPRODUKTIVNOG STARENJA NA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE KARAKTERISTIKE REZIDENTNIH I TIOGLIKOLATNIM MEDIJUMOM INDUKOVANIH ĆELIJA PERITONEALNE ŠUPLJINE ŽENKI AO SOJA PACOVA.....	31



4.1.1.	Telesna masa i broj rezidentnih i tioglikolatnim medijumom indukovanih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova .....	31
4.1.2.	Značaj promene odnosa serumskih koncentracija estradiola i progesterona tokom reproduktivnog starenja ženki AO pacova .....	31
4.1.3.	Fenotipski profil rezidentnih i TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova .....	33
4.1.4.	Funkcijske karakteristike rezidentnih i TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova .....	42
4.1.4.1.	Fagocitna aktivnost .....	42
4.1.4.2.	Aktivnost mijeloperoksidaze – MPO .....	43
4.1.5.	Sekretorni profil rezidentnih i TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova .....	44
4.1.5.1.	Produkcija NO i uree .....	44
4.1.5.2.	Produkcija proinflammatoryh citokina .....	46
4.1.5.3.	Produkcija antiinflammatoryh citokina .....	47
4.2.	UTICAJ GENETSKIH FAKTORA NA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE PROMENE PERITONEALNIH TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA .....	48
4.2.1.	Telesna masa i broj TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO i DA soja pacova .....	48
4.2.2.	Fenotipski profil TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO i DA soja pacova .....	49
4.2.3.	Funkcijske karakteristike TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki pacova AO i DA soja .....	55
4.2.3.1.	Fagocitna aktivnost .....	55
4.2.3.2.	Aktivnost MPO .....	56
4.2.4.	Sekretorni profil TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki pacova AO i DA soja .....	57
4.2.4.1.	Produkcija NO i uree .....	57
4.2.4.2.	Produkcija proinflammatoryh citokina .....	59
4.2.4.3.	Produkcija antiinflammatoryh citokina .....	60
4.3.	ZNAČAJ POLA ZA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE KARAKTERISTIKE TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA .....	61

4.3.1.	Telesna masa, broj TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine i serumske koncentracije polnih steroida ženki i mužjaka AO soja pacova .....	61
4.3.2.	Fenotipski profil TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki i mužjaka AO pacova .....	62
4.3.3.	Funkcijske karakteristike TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki i mužjaka AO pacova .....	69
4.3.3.1.	Fagocitna aktivnost .....	69
4.3.3.2.	Aktivnost MPO.....	70
4.3.4.	Sekretorni profil TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki i mužjaka AO pacova .....	71
4.3.4.1.	Produkcija NO i uree .....	71
4.3.4.2.	Produkcija proinflamatornih citokina .....	73
4.3.4.3.	Produkcija antiinflamatornih citokina.....	74
4.4.	UTICAJ OVARIJEKTOMIJE NA SEKRETORNI PROFIL MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA.....	75
4.4.1.	Produkcija NO i uree.....	76
4.4.2.	Produkcija proinflamatornih citokina .....	77
4.4.3.	Produkcija antiinflamatornih citokina .....	79
4.5.	ISPITIVANJE DIREKTOG MODULIŠUĆEG DELOVANJA ESTRADIOLA <i>IN VITRO</i> NA PROMENE U SEKRETORNOM PROFILU TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA .....	80
4.5.1.	Produkcija proinflamatornih citokina .....	80
4.5.2.	Produkcija antiinflamatornog citokina.....	81
5.	DISKUSIJA.....	81
5.1.	UTICAJ REPRODUKTIVNOG STARENJA NA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE KARAKTERISTIKE PERITONEALNIH MAGROFAGA ŽENKI AO SOJA PACOVA.....	82
5.2.	UTICAJ REPRODUKTIVNOG STARENJA NA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE KARAKTERISTIKE TG MAKROFAGA PERITONEALNE ŠUPLJINE ŽENKI AO I DA SOJA PACOVA .....	91
5.3.	ZNAČAJ POLA ZA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE KARAKTERISTIKE TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA.....	96
5.4.	UTICAJ OVARIJEKTOMIJE NA SEKRETORNI PROFIL MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA.....	100

5.5. ISPITIVANJE DIREKTNOG MODULIŠUĆEG DELOVANJA ESTRADIOLA <i>IN VITRO</i> NA PROMENE U SEKRETORNOM PROFILU TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA .....	102
6. ZAKLJUČCI.....	104
7. LITERATURA.....	106
8. BIOGRAFIJA .....	146
9. IZJAVE .....	147

## 1. UVOD

### 1.1. MAKROFAGE

Urođeni imunski odgovor, filogenetski najstariji protektivni mehanizam, omogućava domaćinu da se efikasno odbrani od velikog broja patogena (Müller i sar, 2013). Makrofage imaju ključnu ulogu u urođenom imunskom odgovoru (Müller i sar, 2013). Njih čini heterogena populacija mononuklearnih fagocita, prisutna u svim tkivima organizma (Jenkins i Hume, 2014). Prvi ih je opisao 1882. godine ruski naučnik, Ilja Iljič Mečnikov. Mečnikov je posmatrajući pod mikroskopom larvu morske zvezde, uočio grupu ćelija koje dolaze na mesto uboda da bi uklonile strano telo (ružin trn). Proces kojim uočene ćelije ingestuju strano telo nazvao je fagocitoza, od starogrčkih reči „phagein“, što znači pojesti i „kytos“, što označava ćeliju, dok je ćelije koje ingestuju strani materijal nazvao makrofagama. Značaj ovog otkrića potvrđuje i Nobelova nagrada iz medicine koju je Mečnikov dobio 1908. godine. Naime, ključna uloga makrofaga u odbrani domaćina od infekcija počiva upravo na njihovoj sposobnosti da ingestuju i uništavaju mikroorganizme (Moghaddam i sar, 2018). Makrofage sekretuju različite medijatore, kao što su reaktivni oblici kiseonika (engl. Reactive Oxygen Species, ROS), azot-monoksid, citokini i dr., koji učestvuju u razvoju i kontroli inflamacije - lokalne reakcije vaskularizovanog tkiva na oštećenje, koja ima zadatak da ukloni/ograniči delovanje oštećujućeg agensa i stvori uslove za reparaciju tkiva - i u reparaciji tkiva (Moghaddam i sar, 2018). Ove ćelije imaju i svojstva antigen-prezentujućih ćelija i, kao takve, mogu da aktiviraju adaptivni imunski odgovor, koji onda deluje sinergistički s inflamatornim odgovorom u eliminaciji patogena (Howard i sar, 2004; Plowden i sar, 2004).

Makrofage vode poreklo od prekursora u kostnoj srži (Gordon i Taylor, 2005). Dele se na tkivne-rezidentne ćelije i infiltrišuće ćelije koje vode poreklo od monocita koji prelaze u tkiva tokom inflamacije (Gordon i Taylor, 2005; Hashimoto i sar, 2013). Za tkivne-rezidentne makrofage se dugo smatralo da takođe potiču od krvnih monocita, međutim, usavršavanje tehnika mapiranja gena dovelo je do saznanja da su u uslovima homeostaze makrofage u tkivima embrionalnog porekla (Ginhoux i sar, 2010; Varol i sar, 2015; Yona i sar, 2013), kao i da se obnavljaju proliferacijom *in situ* bez učešća infiltrišućih monocita iz krvi (Ajami i sar, 2007; Ginhoux i sar, 2010; Wang i sar, 2012). Izuzetak čine makrofage creva koje se, s obzirom na veliki broj mikroorganizama i antigena poreklom iz hrane u crevima, konstantno obnavljaju regrutacijom monocita iz cirkulacije (Epelman i sar, 2014).

Tkivne-rezidentne makrofage prisutne su u svim organima i njihova morfologija, ekspresija površinskih molekula i funkcija zavise od organa i tkiva u kojima se nalaze, pa se tako značajno razlikuju makrofage u jetri (Kupferove ćelije), mozgu (mikroglija) i koži (Langerhansove ćelije) (Linehan i Fitzgerald, 2015). Za razliku od tkivnih makrofaga, makrofage peritonealne šupljine nisu vezane za jedno tkivo, već se konstantno kreću kroz peritonealnu tečnost koja obliva unutrašnje organe (jetra, pankreas, želudac, creva) (Avraham-Chakim i sar, 2013). Kod miša, u poređenju sa makrofagama iz slezine, makrofage iz peritonealne šupljine su veće, imaju veći sadržaj lizosomalnih granula, veću ekspresiju MHC II molekula i CD86 molekula, što ukazuje na zreliji fenotip (Wang i sar, 2013). Peritonealne makrofage imaju ključnu ulogu u kontroli infekcije trbušne duplje i retroperitonealnog prostora (peritonitis, pankreatitis) (Machado i Coelho, 2012; Dahdah i sar, 2014; Liu i sar, 2018). Izuzetna migratorna sposobnost omogućava zrelim makrofagama peritonealne šupljine da u roku od jednog sata nakon termalne povrede jetre, prolazeći lako kroz

mezenterijum i ulazeći duboko u parenhim jetre, dođu na mesto povrede i započinu regeneraciju oštećenog tkiva (Wang i Kubes, 2016). Kod žena i ženki pacova, peritonealna šupljina je preko periovarijalnog prostora povezana sa ovarijumima, te su ove ćelije izložene direktnom delovanju steroidnih hormona ovarijuma (Gaytan i sar, 1991).

Sposobnost makrofaga da brzo odgovore na infekciju patogenim mikroorganizmima, ali i na molekule iz oštećenih ili nekrotičnih ćelija domaćina (engl. damage-associated molecular patterns, DAMP), i da eliminacijom patogena i oštećenog tkiva omoguće održavanje homeostaze, počiva na ekspresiji receptora koji su označeni kao receptori za prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena (engl. pattern recognition receptors, PRRs) (Kaufmann i Dorhoi, 2016; Rivera i sar, 2016). Od kada je Polly Matzinger (Matzinger, 1994) predstavio model opasnosti (engl. danger model) spektar molekula koje se mogu označiti akronimom DAMP se stalno povećava (Schaefer, 2014; Vénéreau i sar, 2015). Ovaj spektar uključuje molekule ekstracelularnog (biglikan, tenascin C) i intracelularnog porekla, kao što su HMGB1 (engl. high-mobility group box 1), histoni, S100 proteini, proteini toplotnog šoka (engl. heat-shock proteins; HSPs), koji se oslobađaju posle oštećenja tkiva ili smrti ćelija (Schaefer, 2014). Prepoznavanje ovih molekula od strane makrofaga pokreće inflamatorni odgovor različitim signalnim putevima, uključujući one koji su povezani sa receptorima sličnim Tollu (engl. Toll-like receptors, TLRs) i inflamazomima – citoplazmatskim multiproteinskim kompleksima koji aktiviraju kaspazu-1 dovodeći do sinteze i oslobađanja proinflamatornih citokina, poput interleukina (IL)-1 $\beta$ , IL-18, IL-33 (Schaefer, 2014; Zhang i Mosser, 2008). Iako je inflamatorni odgovor suštinski protektivni odgovor, ako nije dobro kontrolisan i ako se ne završi na vreme može dovesti/učestvovati u razvoju bolesti kao što su autoimunske bolesti, kardiovaskularne bolesti i neurodegenerativne bolesti (Medzhitov, 2010; Scrivo i sar, 2011). U tom kontekstu treba istaći da ne samo patogeni, već i DAMP-ovi, pokrećući razvoj neinfektivne (sterilne) inflamacije mogu imati važnu ulogu u patogenezi humanih inflamatornih bolesti (Land, 2015).

Jedan od često korišćenih modela sterilne inflamacije je tioglikolatom-indukovan peritonitis (Chen i Nuñez, 2010). Ovaj model se zasniva na ubrizgavanju tioglikolatnog medijuma u peritonealnu šupljinu miša ili pacova (Barski, 1955). Kako je tioglikolatni medijum bogat proteinima i šećerima, dolazi do spontane neenzimske glikozilacije proteina, odnosno reakcije između slobodne amino grupe proteina i poluacetalne hidrosilne grupe redukujućih šećera, aldoza ili ketoza (glukoza ili fruktoza). Nizom spontanih reakcija stvaraju se nestabilni proizvodi koji daljom hemijskom degradacijom daju heterogenu grupu modifikovanih krajnjih produkata glikozilacije (engl. advanced glycation endproducts, AGE) (Hayase i sar, 1989; Pongor i sar, 1984). AGE imaju hemotaktične osobine i indukuju produkciju citokina i faktora rasta (Kirstein i sar, 1990; Li i sar, 1997). Treba napomenuti da AGE u dijabetesu melitusu imaju važnu ulogu u nastanku hroničnih komplikacija ove bolesti, kao, i da se njihove koncentracije povećavaju tokom starenja (Turk, 2002). AGE nastale iz komponenti tioglikolatnog medijuma delujući na rezidentne ćelije peritonealne šupljine, prevashodno makrofage, stimulišu sintezu citokina i hemotaktičnih faktora i sledstveno dovode do regrutovanja monocita i neutrofila iz periferne krvi, a delujući na endotelne ćelije povećavaju propustljivost krvno-peritonealne barijere i tako olakšavaju prolazak regrutovanih ćelija iz cirkulacije u peritonealnu šupljinu (Kirstein i sar, 1990). Osim toga, posle intraperitonealnog ubrizgavanja tioglikolatnog medijuma rezidente makrofage ushodno regulišu ekspresiju receptora za AGE (engl. receptors for advanced glycation end product, RAGE) i TLR, što dodatno podstiče razvoj inflamatornog odgovora (Ibrahim i sar, 2013; Xie i sar, 2013). Istovremeno, AGE dovode do povećanja ekspresije adhezivnih molekula na membrani makrofaga što im omogućava da adheriraju na zid peritoneuma ili migriraju van peritonealne

šupljine u ranim fazama zapaljenja, ali i da tokom rezolucije inflamacije ponovo migriraju u peritonealnu šupljinu i ingestiraju apoptotične neutrofile (Li, 2016).

Postoje tri klase PRR-a, posredstvom kojih makrofage prepoznaju evolutivno konzervisane molekule – molekulske obrasce patogena (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) i DAMP (Chen i Nuñez, 2010; Medzhitov i Janeway, 2000). Prva klasa obuhvata TLR-e. Ovi receptori su eksprimirani na plazma membrani i u endozomima makrofaga i predstavljaju dominantnu klasu PRR (Vidya i sar, 2018). Zahvaljujući ovim receptorima makrofage prepoznaju različite produkte mikroorganizama, uključujući i delove ćelijskog zida bakterija (peptidoglikane, lipopeptide, lipoteihoinsku kiselinu, flagelin) i virusne nukleinske kiseline (Vidya i sar, 2018). Vezivanje lipopolisaharida (LPS) Gram-negativnih bakterija za TLR-4/CD14, receptor/koreceptor kompleks na makrofagama, aktivacijom različitih signalnih puteva, dovodi do aktivacije transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B i ekspresije gena koji kodiraju sintezu čitavog spektra proinflamatornih citokina i hemokina (Vidya i sar, 2018). U odgovoru na LPS makrofage ispoljavaju i inducibilnu sintazu azot-monoksida (iNOS) koja konvertuje L-arginin u citrulin i azot-monoksid, ali i arginazu 1, koja metaboliše L-arginin do ornitina i uree, i ograničava produkciju azot-monoksida, koji je u visokoj koncentraciji toksičan (Cederbaum i sar, 2004). Mutacija gena koji kodira TLR4 kod C3H/HeJ miševa dovodi do smanjenog odgovora na LPS, što rezultuje razvojem bakterijske sepse (Poltorak i sar, 1998). Druga klasa PRR obuhvata citoplazmatske receptore slične NOD-u [engl. Nucleotide oligomerization domain (NOD)-Like Receptor, NLR] koji aktiviraju inflamazome (Kufer i sar, 2017). Treća klasa uključuje intracelularne receptore slične RIG-u [engl. Retinoic acid-Inducible Gene-I (RIG)-Like Receptors, RLR] koji prepoznaju virusnu RNK i aktiviraju elemente interferenskog odgovora (Barik, 2016). Postoje i drugi receptori koji su važni za aktivaciju ćelija urođene imunosti, poput različitih receptora za Fc regione  $\gamma$ -teških lanaca (za ostvarivanje efektorskih funkcija antitela), hemokinskih receptora i receptora za komplement (Fülöp i sar, 1985).

Jedno od najvažnijih zapažanja poslednjih godina jeste činjenica da urođeni imunski sistem poseduje neku vrstu memorije koja je nazvana obučena (engl. trained) urođena imunološka memorija (Kleinnijenhuis i sar, 2012; Netea i van der Meer, 2017). Kao što su opisali Franceschi i sar, urođeni imunski sistem se može posmatrati kao da poseduje arhitekturu „leptir mašne“ gde mnogi signali konvergiraju u nekoliko senzora, ali rezultuju u brojnim efektima (Tieri i sar, 2010). Ovi koordinisani procesi omogućavaju postizanje preciznog i efikasnog odgovora.

### **1.1.1. Aktivacija makrofaga**

Makrofage mogu da se aktivišu posredstvom dva različita puta koji su označeni kao klasični i alternativni. Klasični put aktivacije makrofaga pokreću signali koje ove ćelije dobijaju posredstvom PRR-a, uključujući TLR, i citokina, kao što su interferon (IFN)- $\gamma$  i faktor nekroze tumora (TNF)- $\alpha$  (Italiani i sar, 2014; Mills i sar, 2000). Klasično aktivirane makrofage (M1 makrofage) iniciraju aktivaciju pomoćničkih T-limfocita (engl. helper, Th) 1 (Biswas i Mantovani, 2012) i sekretuju proinflamatorne citokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23) (Mantovani i sar, 2013a). Svoju efektorsku funkciju ostvaruju i aktivacijom nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaznog sistema i iNOS, što dovodi do proizvodnje ROS i reaktivnih oblika azota (engl. reactive nitrogen species, RNS) (Mosser i Edwards, 2008). M1 makrofage poseduju snažnu antimikrobnu i antitumorsku aktivnost, ali mogu dovesti i do oštećenja tkiva delovanjem ROS-a, kao i do prekomerne inflamatorne aktivnosti (Sica i Mantovani, 2012), a da bi se ovo sprečilo uključuju se alternativno aktivirane (M2) makrofage (Biswas i sar, 2012; Gordon i Taylor, 2005; Moghaddam i sar, 2018). Aktivaciju M2 makrofaga

pokreću IL-4 i IL-13 i ona dovodi do povećane ekspresije arginaze 1 i sekrecije antiinflamatornih citokina IL-10 i TGF- $\beta$  (Gordon, 2003; Mills i sar, 2000; Stout i Suttles, 2005). U odsustvu bolesti, M2 makrofage su dominantne i održavaju homeostazu uklanjajući ćelijski debris (Mills i sar, 2000). U zavisnosti od toga da li dominiraju M1 ili M2 makrofage aktiviraće se Th1 ili Th2 tip stečenog imunskog odgovora (Mills i sar, 2000).

### 1.1.2. *Sekretorna aktivnost makrofaga*

#### 1.1.2.1. *Citokini*

Citokini su intercelularni glasnici koji deluju na različite tipove ćelija modulišući biološke odgovore. Prvi eksperimentalni dokazi o postojanju ovih solubilnih glasnika objavljeni su 1932. godine (Morley i Baumgartner, 2004; Rich i Lewis, 1932). Posle više od 30 godina, otkriveno je da ih sintetišu limfociti (Dumonde i sar, 1969), a dve godine kasnije izolovani su i iz makrofaga (Gery i sar, 1971). Prvobitno je svaki citokin dobio ime na osnovu funkcije koju obavlja. Po otkriću višestrukih efekata pojedinačnih citokina, 1979. godine odlučeno je da se nazivaju „interleukini“, kako bi se istaklo da ih produkuju leukociti i da na leukocite deluju, i pridodat im je broj u nazivu (di Giovine i Duff, 1990). Postoje i oni interleukini koji su zadržali prvobitna imena, kao npr. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , faktor transformacije rasta- $\beta$  (engl. transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ), adiponektin, leptin. Citokini imaju male molekulske mase, između 8 i 30 kD i ispoljavaju kratkotrajno dejstvo. Receptori za citokine imaju visok afinitet za ligande ( $10^{-12}$  do  $10^{-9}$  M). Postizanje biološkog efekta javlja se već pri vezivanju citokina za 5% prisutnih receptora (Moraga i sar, 2014). Citokini deluju u malim koncentracijama (pikomolarnim ili manjim) (Pugin, 2012). Kao ligandi vezuju se za ćelijske površinske receptore i proizvode promene u transkripciji RNK i sintezi proteina. Mogu delovati autokrino (na ćeliju koja ih luči), parakrino (na susedne ćeliju) i endokrino (na udaljene ćelije). Interakcija između različitih citokina može se dogoditi tako što jedan citokin indukuje drugi, modulacijom receptora drugog citokina ili sinergističkim ili antagonističkim delovanjem dva citokina (Pugin, 2012).

##### 1.1.2.1.1. *Proinflamatorni citokini*

M1 makrofage sekretuju velike količine proinflamatornih citokina, uključujući TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 (Shapouri-Moghaddam i sar, 2018). Sinteza proinflamatornih citokina u ovim makrofagama može biti indukovana LPS-om, virusnim molekulama (RNK), Th1 citokinima (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) ili faktorom stimulacije kolonije granulocita-makrofaga (engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (Duque i Descoteaux, 2014; Mantovani i sar, 2013b).

##### 1.1.2.1.1.1. TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  je potentan proinflamatorni citokin koji proizvode prevažodno aktivirane makrofage i adipociti. Ispoljava plejotropni efekat na preživljavanje, aktivaciju i diferencijaciju imunskih ćelija. Naziv ovog citokina potiče od naziva za serumsku supstancu, faktor, koja dovodi do nekroze ćelija fibrosarkoma usled lokalne inflamacije i tromboze krvnih sudova tumora. Proteolitičkom razgradnjom transmembranskog TNF- $\alpha$  nastaje solubilna, aktivna forma TNF- $\alpha$  (Grell i sar, 1995). Efekti TNF- $\alpha$  ostvaruju se preko dva tipa receptora, TNFR1 (p55 ili p60) i TNFR2 (p75 ili p80). Dok se TNFR1 eksprimira na većini ćelija, TNFR2 se specifično eksprimira na ćelijama imunskog sistema (Parameswaran i Patial, 2010). Solubilne forme ovih receptora inhibiraju aktivnost TNF i deluju kao antagonisti (Rose-John i Heinrich, 1994).

Sinteza TNF- $\alpha$  u makrofagama podstaknuta je inflamatornim stimulusima kao što su PAMP, DAMP, IL-1 i sam TNF- $\alpha$  (Mills i sar, 2000).

Uklanjanje patogena u toku infekcije zavisi od dobro regulisanog oslobađanja TNF- $\alpha$ . Ukoliko produkcija TNF- $\alpha$  nadmaši kapacitete receptora za njegovo vezivanje i ako TNF- $\alpha$  dospe u krvotok u visokoj koncentraciji, može doći do kaheksije, potencijalno letalne mikrovaskularne koagulacije i hipotenzije, a u najgorem slučaju i do septičkog šoka (Cai i sar, 2010). Nekontrolisana sinteza TNF- $\alpha$  je u korelaciji sa brojnim autoimunskim poremećajima, uključujući reumatoidni artritis (RA) i sistemski lupus eritematosus (SLE), koji su mnogo učestaliji kod žena, nego kod muškaraca (Desai i Brinton, 2019).

#### 1.1.2.1.1.2. IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  produkuju i sekretuju različiti tipovi ćelija, najviše aktivirane makrofage. Sintetiše se u neaktivnom obliku od 31 kD označenom kao pro IL-1  $\beta$ , koji se dejstvom kaspaze-1 prevodi u aktivni oblik IL-1  $\beta$  od 17 kD.

IL-1 $\beta$  je proinflamatorni citokin koji indukuje oslobađanje TNF- $\alpha$  i IL-2 tako što aktivira Th ćelije. Tokom inflamacije u tkivima ovaj citokin dovodi do aktiviranja ciklooksigenaze-2 i produkcije prostaglandina (PG)-E2, stimulacije sinteze NO i povećanja ekspresije međućelijskog adhezivnog molekula, ICAM-1 (engl. intercellular adhesion molecules, ICAM-1) (Raeburn i sar, 2002). IL-1 $\beta$  indukuje i sopstveno oslobađanje (Toda i sar, 2002).

#### 1.1.2.1.1.3. IL-6

IL-6 je citokin koji ispoljava proinflamatorna i antiinflamatorna svojstva. Smatra se da antiinflamatorno dejstvo ostvaruje posredstvom membranskog IL-6R, dok proinflamatorno dejstvo ostvaruje preko solubilnog IL-6R (Scheidt-Nave i sar, 2001).

IL-6 je jedan od prvih citokina čije je povećanje povezano sa procesom starenja, pa se za njega može naći i naziv „gerijatrijski citokin“ (Ershler, 2003). Oslobađa se iz makrofaga i T-limfocita. TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  su potentni stimulatori sinteze IL-6 (Merola i sar, 1996; Rea i sar, 2018).

#### 1.1.2.1.2. *Antiinflamatorni citokini*

Antiinflamatorne citokine, IL-10 i TGF- $\beta$ , prevashodno produkuju M2 makrofage (Gordon, 2003; Liu i Yang, 2013). Antiinflamatorne, M2 makrofage, se diferenciraju pod uticajem klasičnih Th2 citokina, IL-4 i IL-13, ali i drugih citokina (IL-10, IL-33 i IL-21) (Shapouri-Moghaddam i sar, 2018).

#### 1.1.2.1.2.1. IL-10

IL-10 je ključni imunosupresivni citokin koji luče gotovo sve ćelije urođenog i stečenog imunskog sistema: B-limfociti, CD4+ i CD8+ T-limfociti, dendritske ćelije, eozinofili, kao i makrofage (Janković i sar, 2010; Maynard i Weaver, 2008; Nguyen i sar, 2012). Svojim dejstvom ograničava imunski odgovor. Deluje preko specifičnog membranskog receptora. Receptor za IL-10 je heterodimer koji se sastoji od po dve subjedinice IL10R1 i IL10R2. Po vezivanju IL-10 za receptor dolazi do aktivacije Janus kinaze (JAK) i aktivacije STAT signalnog puta (Moore i sar, 2001). Aktivacijom prenosnika signala i aktivatora transkripcije (engl. Signal Transducer and Activator of transcription, STAT) ispoljava se inhibitorni efekat na ekspresiju inflamatornih citokina (Akdis i Blaser, 2001). Takeda i saradnici (1999) su pokazali da miševi kojima je mutiran STAT3 gen u makrofagama i neutrofilima imaju povećanu produkciju proinflamatornih citokina IL-6 i TNF- $\alpha$  u odgovoru na stimulaciju LPS-om, a to je



uglavnom zbog ograničenja u produkciji IL-10 (Takeda i sar, 1999). Antiinflamatorno dejstvo IL-10 ostvaruje i smanjenjem ekspresije kako MHC II molekula, tako i kostimulatornih CD80 i CD86 molekula dovodeći do inhibicije antigenske prezentacije (Mosser i Zhang, 2008).

IL-10 može da utiče i na polarizaciju makrofaga. Pokazano je da IL-10 oslobođen iz M2 makrofaga peritonealne šupljine miša sprečava diferencijaciju rezidentnih makrofaga u M1 makrofage, omogućavajući samoregulaciju različitih populacija makrofaga (Katakura i sar, 2004).

Pored antiinflamatornog, IL-10 može da ispolji i proinflamatorno dejstvo. Istovremeni tretman LPS-om i IL-10 kod ljudi dovodi do smanjenja koncentracije TNF- $\alpha$  u serumu, ali i povećanja IFN- $\gamma$  i granzima B (Lauw i sar, 2000).

#### 1.1.2.1.2.2. TGF- $\beta$

Veliki broj različitih ćelija imunskog sistema sekretuje TGF- $\beta$ . Makrofage ga sekretuju i aktiviraju, ali isto i odgovaraju na njega aktivacijom Smad signalnog puta (Gratchev i sar, 2008). Tokom inflamacije, produkcija TGF- $\beta$  predstavlja važan povratni mehanizam za rezoluciju zapaljenja i podsticanje regeneracije tkiva (Vannella i Wynn, 2017). Ovaj proces mora biti strogo regulisan jer prekomerna produkcija TGF- $\beta$  može dovesti do neadekvatne regeneracije i fibroze tkiva (Vannella i Wynn, 2017). U *in vitro* i *in vivo* studijama je pokazano da interakcija makrofaga sa fosfatidil-serinom na površini apoptotičnih ćelija, pored ingestije ćelija, indukuje oslobađanje TGF- $\beta$  (Huynh i sar, 2002). TGF- $\beta$  utiče na smanjeno oslobađanje proinflamatornih, a povećanu produkciju antiinflamatornih citokina. Takođe, utiče na povećanje sinteze PGE<sub>2</sub>, i smanjivanje sinteze proinflamatornog tromboksana (Freire-de-Lima i sar, 2006). Na ovaj način TGF- $\beta$  deluje kao ključni faktor deaktivacije inflamatornih makrofaga i potenciranja procesa regeneracije tkiva. Mnogi patogeni razvili su odbrambeni mehanizam kojim produžavaju period preživljavanja u domaćinu, a koji se zasniva na podsticanju oslobađanja TGF- $\beta$  iz makrofaga (Li i sar, 2006). TGF- $\beta$  utiče na smanjenje antimikrobnog kapaciteta makrofaga usled inhibicije iNOS i indukcije arginaze 1 (Freire-de-Lima i sar, 2006).

#### 1.1.2.2. **ROS i RNS**

##### 1.1.2.2.1. ROS

U aktivisanim fagocitima redukcijom molekulskog kiseonika nastaju visoko reaktivni metaboliti. Uz pomoć NADPH oksidaze ili ksantin oksidaze nastaje visoko reaktivni radikal - superoksidni anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ), iz kojeg uz učešće superoksid dismutaze nastaje vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) (Vignais, 2002).  $H_2O_2$  nije radikal, ali može da prouzrokuje oštećenje ćelije pri relativno niskoj koncentraciji (10 mM), jer poseduje veliku difuzibilnost, lako prolazi kroz različite ćelijske odeljke, a u nukleusu može da intereaguje sa DNK (Breen i Murphy, 1995).  $H_2O_2$  nema direktan uticaj na DNK, ali može da ošteti DNK stvaranjem hidroksilnog radikala ( $HO^{\bullet}$ ) u prisustvu jona prelaznih metala u Fentonovoj ili Haber-Weiss-ovoj reakciji (Collin, 2019).  $HO^{\bullet}$  je izuzetno reaktivan i odmah preuzima elektrone iz drugih molekula, pretvarajući ih u nove radikale (Valko i sar, 2007). Ciljno mesto  $H_2O_2$  mogu biti i cisteinski ostaci u raznim proteinima koji se reverzibilno oksiduju do sulfonskih kiselina  $-RSO_3H$  (Finkel, 2011; Reth, 2002). Međutim, nisu svi cisteinski ostaci podložni oksidaciji pod dejstvom peroksida. Naime, samo oni cisteinski ostaci koji su okruženi pozitivno naelektrisanim ostacima amino kiselina mogu da učestvuju u navedenoj reakciji (Finkel, 2011; Reth, 2002). Pokazano je i da  $HO^{\bullet}$  mogu da dovedu do lipidne peroksidacije, odnosno do oštećenja ćelije (Ayala i sar, 2014).

Kao što je već napomenuto, sinteza ROS je posredovana multiproteinskim kompleksom NADPH oksidaze, čije se formiranje u fagocitima inicira angažovanjem PRR, FcR i receptora za IFN- $\gamma$  (Mosser i Edwards, 2008). NADPH oksidaza kao kofaktor sadrži redukovani oblik NADPH koji se gubitkom vodonikovog atoma (protona i elektrona) prevodi u oksidovani oblik NADP<sup>+</sup>. Molekul kiseonika prima elektron i nastaje vrlo nestabilan O<sub>2</sub><sup>•-</sup> koji spontano prelazi u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Minakami i Sumimoto, 2006). Pod uticajem mijeloperoksidaze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sa hloridnim jonima gradi hipohloritnu kiselinu (HOCl). Nastala HOCl, kao i hloramini dobijeni u reakciji sa aminima, deluju citocidno na patogene. Sama i u reakciji sa drugim biomolekulima HOCl može da dovede do oštećenja ćelija. Kada se stvaranje ROS poveća u tolikoj meri da organizam ne može svojim antioksidativnim odbrambenim mehanizmima da ih ukloni, dolazi do oštećenja ćelija i tkiva koje se jednim imenom naziva oksidativni stres (Fulop i sar, 2018).

#### 1.1.2.2.2. RNS

U makrofagama, zavisno od puta aktivacije, razlikuju se načini metabolisanja L-arginina, što posledično dovodi do različitih bioloških odgovora. M1 makrofage razgrađuju L-arginin do NO i citrulina dejstvom iNOS, dok M2 makrofage proizvode ornitin i ureu dejstvom arginaze 1 na L-arginin (Mills i sar, 2000). NO je kratkoživeći visoko reaktivni molekul koji inhibira ili ubija patogene i tumorske ćelije i poseduje vazodilatorno dejstvo (Bogdan, 2001). Može da difunduje u fagolizozom, gde učestvuje u spontanim ili katalizovanim reakcijama sa ROS pri čemu kao proizvod reakcija nastaju brojna reaktivna jedinjenja azota (RNS, peroksinitrit, azot-dioksid, diazot trioksid, nitrozo tioli, nitroksil) (F. C. Fang, 2004). ROS i RNS i sinergistički stvaraju visoko toksičnu sredinu za fagocitovane mikroorganizme. Sintezu NO povećavaju citokini IL-1, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , tako što snažno indukuju iNOS (Holán i sar, 2006).

Kod M2 makrofaga dominantne su dve izoforme arginaze, hepatična (arginaza 1) (Haraguchi i sar, 1987) i nehepatična (arginaza 2) (Vockley i sar, 1996). Arginaza 1 se nalazi u citosolu, dok je arginaza 2 u mitohondrijama. U LPS-om stimulisanim makrofagama pacova izolovanim iz peritonealne šupljine pronađena je veća aktivnost arginaze 1 od arginaze 2 (Sonoki i sar, 1997). Arginazu 1 indukuju citokini Th2 ćelija (IL-4 i IL-13) (Barksdale i sar, 2004; Munder i sar, 1999) ali i IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , PG (Bansal i sar, 2005). Ornitin, jedan od proizvoda razgradnje L-arginina dejstvom arginaze 1, prekursor je prolina i poliamina, koji su značajni za sintezu kolagena i ćelijsku proliferaciju u procesu zarastanja rana (Efron i sar, 2000).

Aktivnost enzima iNOS i arginaze 1 su međusobno negativno regulisane usled kompeticije prema istom supstratu, argininu. Razgradnjom arginina pod dejstvom arginaze 1 smanjuje se količina arginina kao supstarata za enzimsko dejstvo iNOS-a. Krajnji proizvod aktivnosti iNOS-a je NO, dok dejstvom arginaze 1 nastaje urea (Morris, 2004). Ovakav vid regulacije dovodi do antagonističkog efekta, proinflatarnog vs. antiinflatarnog (Gordon i sar, 1992). Sledstveno, odnos između oslobođenog NO i uree mogao bi da ukaže na polarizaciju makrofaga i fazu inflamatornog procesa.

## 1.2. INFLAMATORNI ODGOVOR U STARENJU: ULOGA MAKROFAGA

Starenje karakteriše opšte i progresivno pogoršanje fizioloških funkcija organizma sa smanjenim kapacitetom za održavanje homeostaze što dovodi do povećanja morbiditeta i mortaliteta (Garrido i sar, 2019). Iako se starenje ne može okarakterisati kao bolest, disbalans fizioloških funkcija koji je zapažen tokom starenja povećava rizik od nastajanja bolesti (Garrido i sar, 2019). Zapravo, pogoršanje funkcije nervnog, endokrinog i imunskog sistema, kao i izmenjena unakrsna komunikacija između njih (neuroimunoendokrina komunikacija), potencira nastajanje morbiditeta (Besedovsky i Rey, 2007). Posebno mesto imaju promene u imunskom sistemu budući da on ima glavnu ulogu u odbrani organizama od različitih spoljašnjih i unutrašnjih agenasa (De Martinis i sar, 2006; Ferguson i sar, 1995; Fulop i sar, 2015; Wayne i sar, 1990). Imunski sistem, sa godinama, trpi brojne promene koje menjaju urođeni imunski odgovor dovodeći do fenomena oksidativno-inflamatornog starenja (engl. oxi-inflamm-aging) (Garrido i sar, 2019) kao i stečeni imunski odgovor dovodeći do imunološkog starenja (eng. immunosenescence) (Fulop i sar, 2015; Fülöp i sar, 2016; Pawelec, 2018). Ove promene su povezane sa povećanim rizikom od infekcija i karcinoma (De Martinis i sar, 2006; Ferguson i sar, 1995; Fülöp i sar, 2016; Wayne i sar, 1990), i povećanim rizikom od mortaliteta (Dewan i sar, 2012; Fulop i sar, 2011, 2018; Wayne i sar, 1990).

Međutim, sve je veći broj naučnika koji dovode u pitanje negativne efekte imunološkog starenja i sugeriše da promene imunskog sistema u evolutivnom smislu zapravo imaju adaptivan ili remodelirajući karakter koji doprinosi produženju života. Nedavno objavljeni podaci ukazuju da bi bez promena i u urođenom i u adaptivnom imunskom sistemu tokom starenja (oxi-inflamm-aging i immunosenescence, predstavljaju dve strane istog novčića) dugovečnost ljudi bila znatno kraća (Fulop i sar, 2018).

Dakle, jedna od odlika procesa starenja je razvoj sistemskog, sterilnog, blagog hroničnog zapaljenja koje se definiše terminom „inflammaging“ (Franceschi i sar, 2006). Aktivnost ćelija koje učestvuju u inflamaciji, kao što su neutrofili, makrofage i dendritske ćelije, se takođe menja starenjem (Bupp i sar, 2018). Inflamatorni odgovor je neophodan za uklanjanje patogena i regeneraciju tkiva, međutim, hroničan inflamatorni odgovor može doprineti oštećenju tkiva i nastanku bolesti, posebno kod starijih osoba (Bupp i sar, 2018).

Blaga, sistemska, hronična inflamacija koja se zapaža kod starih praćena je povišenim vrednostima proinflatornih citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), i smatra se da je uključena u patogenezu različitih bolesti u starijoj populaciji, kao što su dijabetes i hipertenzija (Milan-Mattos i sar, 2019; Xia i sar, 2016). Ćelije urođene imunosti postaju manje funkcionalne, i paradoksalno, više inflamatorne sa starenjem. Teško je precizno reći da li sistemska inflamacija izaziva disfunkciju ćelija urođene imunosti, ili se dešava obrnuto (Bupp i sar, 2018). U tom kontekstu treba napomenuti da nedavni podaci ukazuju da „inflammaging“ može uticati na razvoj i signalni potencijal ćelija urođene imunosti, doprinoseći inflamaciji u odsustvu infekcije i, u isto vreme, smanjujući mogućnost da se ukloni infekcija (Bupp i sar, 2018). Zajedno, povišeni nivoi proinflatornih citokina i smanjena sposobnost da se iskoreni infekcija ili lokalno zapaljenje verovatno doprinose manje funkcionalnom urođenom odgovoru na vakcinaciju (Aw i sar, 2007; Bupp i sar, 2018; Franceschi i sar, 2017; Fulop i sar, 2015; Pawelec, 2017; Shaw i sar, 2013).

Kao što je već prethodno pomenuto, aktivisani fagociti generišu ROS i RNS (Fuente i Miquel, 2009). Iako ROS i RNS imaju važni ulogu u eliminaciji patogena i održavanje homeostaze,

njihovo povećano stvaranje može dovesti do oksidativnog stresa i posledično oksidativnog oštećenja ćelija i tkiva (Bauer i De la Fuente, 2016; De La Fuente, 2014; Fuente i Miquel, 2009). Da bi se izbegli štetni efekti ovih jedinjenja, fagociti uglavnom sintetišu i veće količine antioksidativnih enzima (katalaze, superoksid dizmutaze) i neenzimskih jedinjenja sa antioksidativnim delovanjem (glutation) u odnosu na druge ćelije (Evans i sar, 1982; Knight, 2000). ROS i RNS mogu da aktiviraju i NF- $\kappa$ B, što dovodi do ekspresije gena koji kodiraju proinflatorne medijatore (proinflatorni citokine i hemokine), koji, za uzvrat, mogu da doprinesu razvoju oksidativnog stresa (Arranz i sar, 2010; Vida i sar, 2014). Prema danas relativno široko prihvaćenoj „oksidativno-inflatornoj“ teoriji starenja (Fuente i Miquel, 2009) promene u ćelijama imunskog sistema, pre svega ćelijama urođene imunosti, bi mogle da imaju ključnu ulogu u starenju imunskog sistema i sledstveno u starenju celog organizma (Arranz i sar, 2010; De La Fuente, 2014; Fuente i Miquel, 2009). Naime, ova teorija pretpostavlja i da oksidativno-inflatorni stres koji nastaje starenjem imunskih ćelija utiče ne samo na imunske ćelije, već i na sve ćelije našeg organizma, a posebno na one regulatornih sistema, kao što su nervni i endokrini sistem, kompromitujući njihove funkcije i međusobnu komunikaciju, te sledstveno starenje organizma u celini (Garrido i sar, 2019). U prilog ovoj pretpostavci mogu se navesti podaci koji pokazuju da povećanje oksidativnog stresa (povećano stvaranje superoksidnog anjona, oksidisanog glutaciona) i oksidativnih oštećenja (povećan sadržaj malondialdehida, 8-oksodeoksiguanozina) u peritonealnim makrofagama starih miševa, kao i u neutrofilima periferne krvi starijih ljudi, koreliraju sa oštećenjem njihovih funkcija (fagocitoza, hemotaksija, proliferacija) (De la Fuente, 2008; Fuente i Miquel, 2009).

S druge strane, zdravi stogodišnjaci i dugovečni miševi koji pokazuju „uspešno“ starenje, imaju očuvane imunske funkcije, što je u korelaciji sa nižom ekspresijom gena koji kodiraju sintezu inflamatornih medijatora i dobro kontrolisanim redoks statusom (Alonso-Fernandez i sar, 2008; Arranz i sar, 2010; De La Fuente, 2014; Fuente i Miquel, 2009).

### **1.2.1. Starenje i makrofage**

Dok su ključni mehanizmi koji doprinose promenama u funkciji adaptivnog imunskog odgovora tokom starenja dobro opisani u literaturi, podaci vezani za promene u aktivnosti ćelija urođenog imunskog odgovora, uključujući makrofage, tokom starenja su relativno oskudni.

Prvu liniju odbrane od patogena obezbeđuju epitelne ćelije kože i sluzokože gastrointestinalnog, respiratornog i urogenitalnog sistema. One obezbeđuju fizičku i hemijsku barijeru protiv infekcija (Plowden i sar, 2004). Pored toga, epitelne ćelije ispoljavaju i PRR-e koji im omogućavaju prepoznavanje PAMP-ova, što dovodi do njihove aktivacije i lučenja antimikrobnih peptida, uključujući defenzine i katelicidine (Plowden i sar, 2004). Ako je integritet epitela ugrožen, makrofage su među prvim ćelijama koje reaguju na pretnju koju predstavlja patogen. Postoje istraživanja koja pokazuju da tokom starenja dolazi do niza strukturnih i morfoloških promena u koži koje rezultuje stanjivanjem epidermisa, smanjenjem vaskularizovanosti i većom ćelijskom heterogenosti (Kinn i sar, 2015). Navedene promene utiču na smanjenje zaštitne funkcije kože i omogućavaju povećano prodiranje patogena u tkiva i razvoj infekcije (Kinn i sar, 2015). U tom kontekstu je aktivacija makrofaga tokom starenja od izuzetnog značaja (Lloberas i Celada, 2002). Ispitivanja humanih makrofaga su pokazala da se njihova hemotaktična sposobnost merena migracijom u Boyden-ovoj komori (engl. Boyden chamber assay) smanjuje kod starijih osoba, što može da utiče na

produženo uklanjanje patogena (Fietta i sar, 1993). Takođe, pokazano je da starenje dovodi do smanjenja ekspresije i funkcije TLR4, na makrofagama slezine i aktivisanim peritonealnim makrofagama miša, kao i da je nastalo smanjenje u korelaciji sa manjom sintezom proinflammatoryh citokina (Renshaw i sar, 2002). Ovi nalazi ukazuju da bi povećana osetljivost na infekcije kod starijih miševa mogla biti posledica smanjenja ekspresije i funkcije TLRs. Međutim, postoje i podaci koji govore da se ekspresija TLR4 ne menja na makrofagama miša tokom starenja (Boehmer i sar, 2004). Nekonzistentnost dobijenih rezultata mogla bi se povezati sa činjenicom da su korišćene makrofage koje su poreklom iz različitih tkiva, da su izolovane iz životinja različite starosti i da se moguće njihov aktivacioni status značajno razlikovao.

Dalje, brojne studije ukazuju na smanjenu fagocitnu aktivnost Kupferovih ćelija i makrofaga peritonealne šupljine starih životinja (Izgüt-Uysal i sar, 2004). S druge strane, postoje i podaci da je fagocitna aktivnost makrofaga izolovanih iz kostne srži miševa očuvana (Eimear Linehan i sar, 2014), a da fagocitna aktivnost alveolarnih makrofaga (Mancuso i sar, 2001) i mikroglije pacova (Lynch i sar, 2010) raste starenjem. Nekonzistentnost ovih nalaza se može objasniti različitim ontogenetskim poreklom ispitivanih populacija makrofaga. Međutim, istraživanje u kome su makrofage izolovane iz peritonealne šupljine mladih miševa i transplantirane u peritonealnu šupljinu starih miševa je pokazalo da su makrofage mladih životinja u novoj mikrosredini slabije fagocitovale, što ukazuje na značaj promena u mikrosredini, a ne intrinzično u makrofagama, za promenu fagocitne sposobnosti ovih ćelija (Linehan i sar, 2014). Starenje dovodi i do smanjenja ekspresije MHC II molekula na humanim i makrofagama pacova (Herrero i sar, 2002), što može doprineti njihovoj manjoj sposobnosti da prezentuju peptide T-limfocitima i da ih aktivišu (Herrero i sar, 2002).

Starenje utiče ne samo na fagocitnu sposobnost, već i na sposobnost sekrecije citokina. Citokini su važni medijatori koje sekretuju makrofage i posrednici su u razvoju mnogih bolesti (Aziz, 2015). Mnoge epidemiološke studije potvrdile su povećanu produkciju proinflammatoryh citokina IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 tokom starenja (Rea i sar, 2018). Moguće objašnjenje je preterana aktivacija signalnih mreža koje se aktiviraju tokom inflamacije (Chelvarajan, 2006; Wilson i sar, 2002). Međutim, tokom starenja i bez prisustva inflamatornog agensa, usled akumuliranja endogenog ćelijskog debrisa, prisustva makromolekula koji se oslobađaju iz oštećenih i starih ćelija i usled njihove neadekvatne eliminacije, dolazi do pojačane aktivacije NF- $\kappa$ B, ključnog transkripcionog faktora za ekspresiju svih proinflammatoryh medijatora, pa sledstveno i do pojačane sinteze proinflammatoryh citokina u serumu (Vasto i sar, 2007). Osim toga, povećana aktivnost NF- $\kappa$ B indukuje i povećanu aktivnost iNOS (Davis i sar, 2005; Mizel i sar, 2003).

Međutim, u zavisnosti od životinjske vrste iz koje su makrofage izolovane, tkivne specifičnosti i stepena stimulacije, starenje različito utiče na sposobnost makrofaga da produkuju NO i ureu (Cecílio i sar, 2011). Aktivnost iNOS i produkcija NO u makrofagama miša izolovanim iz slezine i peritonealne šupljine se sa starenjem smanjuje (Kissin i sar, 1997), za razliku od makrofaga poreklom iz kostne srži kod kojih se sinteza NO i uree sa starenjem povećava (Cecílio i sar, 2011).

Kao što je već prethodno pomenuto, u makrofagama peritonealne šupljine starih miševa, kao i u neutrofilima periferne krvi starijih ljudi, zapaženo je povećano stvaranje superoksidnog anjona i oksidisanog glutationa i povećan sadržaj malondialdehida i 8-oksodeoksiguanozina, što je koreliralo sa oštećenjem njihovih funkcija (fagocitoza, hemotaksija, proliferacija) (De la

Fuente, 2008; Fuente i Miquel, 2009). Makrofage starih miševa pokazale su povećanu akumulaciju ROS (Sebastián i sar, 2009). Pretpostavlja se da su ROS glavni uzrok oštećenja proteina, lipida i DNK tokom starenja. Oksidativno oštećenje utiče na funkciju mitohondrija, što zauzvrat dovodi do pojačane proizvodnje ROS i daljeg oksidativnog oštećenja ćelija. Takođe je poznato da ROS menjaju strukturu telomera i skraćuju njihovu dužinu čime ubrzavaju proces starenja (Reichert i Stier, 2017). Promene uočene u makrofagama monocitnog porekla starijih osoba ukazuju da bi ove ćelije mogle da doprinesu razvoju metaboličkih poremećaja poput ateroskleroze i dijabetesa (Suchy i sar, 2014).

### ***1.2.2. Značaj izučavanja promena u inflamaciji u starenju***

Na značaj izučavanja uticaja starenja na inflamatorni odgovor i makrofage ukazuje činjenica da su bolji životni uslovi nakon Drugog svetskog rata i konstantni razvitak medicine doveli do poboljšanja kvaliteta života, produžetka životnog veka i starenja populacije. Sa porastom udela starih ljudi u populaciji doći će i do povećanja morbiditeta i broja osoba kojima će biti potrebna tuđa nega i pomoć, što će sve uticati na smanjenje kvaliteta života pojedinca i društva u celini. Zbog toga starenje, kao neminovni proces u živom svetu, treba što je moguće više odložiti i ublažiti. Da bi se to postiglo potrebno je obezbediti tzv. zdravo starenje, u kom su željeni ishodi koji se javljaju tokom starenja potencirani, dok su neželjeni minimizirani (Warren, 1998).

Blaga hronična inflamacija se generalno smatra markerom biološkog starenja ili jednim od mehanizama putem kojih je proces starenja povezan sa povećanom globalnom osetljivošću na sve bolesti. Kardiovaskularne bolesti, hronične bolesti bubrega, rak, depresija, demencija, osteoporoza, sarkopenija i anemija su samo neke bolesti za koje postoje opsežni dokazi koji ukazuju da inflamacija doprinosi njihovom razvoju tokom starenja (Amdur i sar, 2016; Brandenberger i Mühlfeld, 2017; Ferrucci i sar, 2010; Kohler i sar, 2016; Odegaard i sar, 2016). U skladu sa ovim, povišeni nivoi proinflamatornih markera u krvi (kao što je IL-6) su značajan faktor rizika za multimorbiditet (više bolesti istovremeno) (Calder i sar, 2017). Modulacija inflamacije je verovatno najefikasnija u početnoj fazi, u vreme kada kompenzacioni kapacitet organizma nije potpuno iscrpljen i još uvek može da se suprotstavi fiziološkim i funkcionalnim poremećajima (Calder i sar, 2017). Imajući sve prethodno u vidu, jasan je značaj istraživanja koja treba da obezbede razumevanje promena u oksidativnom kapacitetu i sekretornom profilu i potencijalu makrofaga tokom starenja.

### 1.3. SOJNE RAZLIKE U INFLAMATORNOM ODGOVORU: ULOGA MAKROFAGA

Mnogobrojna istraživanja su pokazala uticaj genetskih faktora na razvoj i ishod inflamatornih bolesti (Becker, 2016; Blagojević i sar, 2018; Jiang i sar, 2010; Miletić i sar, 2007; Miljkovic i sar, 2006; Nacka-Aleksić i sar, 2018; Stanojević i sar, 2016). Pokazano je i postojanje sojnih razlika u neuroinflamatornom odgovoru na ubrizgavanje LPS u mozak mladih miševa (Nikodemova i Watters, 2011). Takođe, uočena je i različita osetljivost BALB/c, C57BL/6 i C3H/HeN miševa na infekciju bakterijom *Neisseria gonorrhoeae* (Packiam i sar, 2010). Ženke miševa BALB/c soja su razvile značajnu infekciju genitalnog trakta uz povećanu produkciju proinflamatornih citokina, hemokina i migraciju polimorfonuklearnih leukocita, dok je kod C57BL/6 miševa utvrđena asimptomatska infekcija, a C3H/HeN miševi su bili rezistentni na izazivanje infekcije ovom bakterijom (Packiam i sar, 2010). U literaturi postoje i podaci koji ukazuju da su miševi soja C57BL/6 rezistentni, dok su miševi soja BALB/c osetljivi na infekciju izazvanu parazitom roda *Leishmania* (Kramnik i Boyartchuk, 2002). Pretpostavlja se da je uzrok različitog odgovora na isti patogen prisustvo različitih subpopulacija makrofaga u ova dva soja miševa. Naime, kod C57BL/6 soja M1 makrofage usmeravaju T-limfocite da sintetišu Th-1 citokine (Mills i sar, 2000). S druge strane, kod BALB/c soja dominantne su M2 makrofage koje stimulišu Th-2 odgovor i sintezu IL-4 i TGF- $\beta$  što dovodi do proliferacije B-limfocita i produkcije antitela (Mills i sar, 2000).

Literaturni podaci ukazuju na postojanje genetske predispozicije prema određenom obrascu aktivacije koji dalje određuje odgovor makrofaga na stimulse i koji je presudan za ishod inflamatornog odgovora (De Maio i sar, 2005). Istraživanje rađeno na inbrednim sojevima miša (A/J, C57BL/cj) pokazalo je da je stopa smrtnosti veća kod C57BL/cj soja u odnosu na A/J soj miša nakon intraperitonealne aplikacije *Escherichia coli* (LPS, 20 mg/kg) (De Maio i sar, 1998). Naime, De Maio i sar su pokazali da su rezidentne makrofage izolovane iz peritonealne šupljine pet inbrednih sojeva miševa (A/J, C57BL/cj, DBA/2j, BALB/cj i AKR/J) nakon stimulacije LPS-om sintetisale različite količine citokina što ukazuje na značaj uticaja genetike na inflamatorni odgovor (De Maio i sar, 2005). Iako upotreba makrofaga u *ex vivo* studijama omogućava da se bolje ispita uticaj genetike na inflamatorni odgovor, potrebno je imati u vidu i ograničenja. Naime, makrofage u kulturi ne oslikavaju u potpunosti *in vivo* uslove, jer citokini koji se luče u kulturi deluju autokrino i to u većim koncentracijama nego u *in vivo* uslovima (De Maio i sar, 2005). Međutim, i pored ovih ograničenja upotreba makrofaga u *ex vivo* uslovima omogućava obezbeđivanje kontrolisanih eksperimentalnih uslova. Prema tome, dobijene koncentracije TNF- $\alpha$  izmerene u studiji De Maio i sar (2005) mogu biti niže usled prisustva supresivnog IL-10 u kulturi, ali je razlika u sintezi citokina između različitih sojeva miševa nesumnjiva.

Takođe, pokazane su i sojne razlike u oksidativnom potencijalu makrofaga pacova Albino Oxford (AO) i Dark Agouti (DA) soja nakon *in vitro* inkubacije sa PMA ili proteinom toplotnog šoka (engl. heat-shock proteins; HSPs)-47 (Miletić i sar, 2007). Rezidentne makrofage peritonealne šupljine neimunizovanih pacova AO soja su nakon *in vitro* stimulacije sa PMA oslobađale veće količine superoksidnog radikala u odnosu na DA soj (Miletić i sar, 2007). Razlike u generisanju superoksida su primećene i nakon *in vitro* stimulacije sa HSP-47 u makrofagama pacova imunizovanih kompletnim Frojndovim adjuvansom (CFA) radi indukcije artritisa (Miletić i sar, 2007). S obzirom da HSP-47 učestvuje u patogenezi reumatoidnog artritisa (Hattori i sar, 1998), kao i da postoje istraživanja koja ukazuju na značaj ROS u kontroli težine bolesti i smanjenju upale zglobova i oštećenja vezivnog tkiva u modelu

artritisa (Van de Loo i sar, 2003), nalazi dobijeni u istraživanju Miletić i sar mogu biti potencijalno objašnjenje za otpornost AO soja na indukciju adjuvantnog artritisa (Miletić i sar, 2007).

Sojne razlike su uočene i u aktivnosti aktiviranih makrofaga. Degranulacija mastocita izazvana intraperitonealnim ubrizgavanjem supstance 48/80 koja izaziva oslobađanje mastocitnih medijatora - histamina, proteaza, proteoglikana i TNF- $\alpha$ , tokom razvoja tioglikolatom indukovano peritonitisa dovodi do jačeg odgovora peritonealnih makrofaga pacova AO soja na *in vitro* stimulaciju LPS-om i povećanja sinteze NO i TNF- $\alpha$  u odnosu na DA soj (Stanojević i sar, 2013). Ovi nalazi ukazuju na veću osetljivost tioglikolatom indukovanih makrofaga (TG makrofaga) pacova AO soja na delovanje medijatora oslobođenih iz mastocita (Stanojević i sar, 2013).

Sojne razlike su uočene i u uticaju starenja na aktivnost rezidentnih makrofaga. Rezidentne makrofage peritonealne šupljine ženki pacova AO soja, za razliku od makrofaga ženki DA soja, tokom starenja zadržavaju sposobnost da na *in vitro* stimulaciju LPS-om odgovore povećanom produkcijom proinflammatoryh (TNF- $\alpha$ , NO), ali i antiinflammatoryh medijatora koji učestvuju u reparaciji tkiva (IL-10) (Dimitrijević i sar, 2014). Ovaj uravnotežen inflamatorni odgovor koji pokazuju stari pacovi AO soja može se dovesti u vezu sa dužim životnim vekom i odsustvom patologije u starijem životnom dobu kod pacova ovog soja u odnosu na DA soj (Dimitrijević i sar, 2014). Naime, ženke pacova AO soja u našem vivarijumu imaju prosečnu dužinu života od 29 meseci, dok ženke DA pacova prosečno žive 24 meseca. Period bez znakova bolesti i patoloških promena vezanih za starenje je duži kod pacova AO soja (Dimitrijević i sar, 2014).

U zaključku, prethodno navedeni podaci dobijeni iz različitih visokosrodnih sojeva životinja jasno ukazuju da je inflamatorni odgovor modulisan genetskom građom. Bolje razumevanje potencijalnog značaja genetskih faktora za inflamatorni odgovor omogućio bi osnovu za razvoj personalizovanih terapijskih pristupa (De Maio i sar, 2005).



## 1.4. POLNE RAZLIKE U INFLAMATORNOM ODGOVORU: ULOGA MAKROFAGA

Polne razlike se javljaju i u urođenom i u adaptivnom imunskom odgovoru kod različitih životinjskih vrsta (Klein i Flanagan, 2016). Generalno, jedinke ženskog pola stvaraju robusniji imunski odgovor nego jedinke muškog pola, zbog čega su manje podložne infekcijama, ali su sklonije razvijanju autoimunskih bolesti (Gubbels Bupp, 2015). Polne razlike u imunskom odgovoru se povezuju sa delovanjem različitih hormonskih, genetskih, epigenetskih i sredinskih faktora (Ngo i sar, 2014).

Jedinke muškog pola su podložnije razvijanju septičkog šoka, što je pokazano i kod životinja (Bindl i sar, 2003; Losonczy i sar, 2000). Uočeno je da se žene bolje oporavljaju od akutnih infekcija, dok one koje boluju od hroničnih inflamatornih bolesti, kao što su cistična fibroza (CF), astma ili hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) imaju lošiju prognoza u odnosu na muškarce (Harness-Brumley i sar, 2014; Sansores i Ramírez-Venegas, 2016; Zein i Erzurum, 2015). U pogledu hirurških operacija na srcu, žene se oporavljaju bolje od muškaraca (Seghaye i sar, 2001), što sugerije efikasniji inflamatorni (i možda sekundarni antiinflamatorni) odgovor u svetlu sličnih nivoa povreda koje su vremenski i po obimu ograničene (npr. one koje su rezultat hirurške traume i ekstrakorporalne/vantelesne cirkulacije). U literaturi postoje radovi koji ukazuju da se ekspresija inflamatornih markera (Casimir i sar, 2010a) i inflamatorni proces (Casimir i sar, 2010b; Casimir i sar, 2010c) jasno razlikuju kod jedinki muškog i ženskog pola. Zapravo, inflamacija je mač sa dve oštrice. Kada su pacijenti dobrog zdravlja, inflamacija je efikasan proces za izbegavanje egzogenih agresora koji mogu sistemski ugroziti život (npr. termičke opekotine ili lokalne infekcije koje zahvataju velike telesne površine). Suprotno tome, dugotrajna inflamacija može dovesti do oštećenja tkiva koja prevazilaze početnu korist inflamatornog odgovora (CF i lupus) (Shaw i sar, 2010).

Jedno od potencijalnih objašnjenja ovih nalaza je da su inflamatorne reakcije uslovljene hormonskim statusom (Giefing-Kröll i sar, 2015; Kovats, 2015). Međutim, klinički podaci dobijeni u istraživanjima rađenim na prepubertetskoj populaciji ukazuju na značaj potencijalnih razlika u ekspresiji gena koje zavise od polnih hromozoma, a ne od hormonskog statusa (Casimir i sar, 2010; Casimir i sar, 2010a). Poslednjih godina pažnja naučnika usmerena je na one gene na X hromozomu koji su deo inflamatorne kaskade. Na X hromozomu se nalaze geni koji kodiraju proteine ključne za urođeni (TLR7 i TLR8 na monocitima) i adaptivni (hemokinski receptor CXCR3 na efektorskim T ćelijama) imunski odgovor (Libert i sar, 2010). S obzirom da su jedinke ženskog pola nosioci duplo više gena koji se nalaze na X hromozomima u odnosu na muškarce, da bi se uspostavio balans između polova, ekspresija gena na X hromozomu je pod kontrolom procesa inaktivacije X hromozoma (engl. X chromosome inactivation, XCI) (Tukiainen i sar, 2017). Međutim, skorija istraživanja su pokazala da je proces XCI tkivno specifičan i da značajno varira među jedinkama (Tukiainen i sar, 2017). Takođe, procenjuje se da 10 % gena na X hromozomu izbegne inaktivaciju, a to dovodi do pojačane ekspresije tih gena kod jedinki ženskog pola, što uzrokuje pozitivne ili negativne efekte u zavisnosti od pogođenih gena (Lockshin, 2010).

### 1.4.1. Značaj polnih steroida za polne razlike u inflamatornom odgovoru

Poznato je da polni hormoni utiču na mnoge aspekte imunskog odgovora (Olsen i Kovacs, 1996). Polni hormoni se vezuju za receptore ispoljene u mnogim ćelijama imunskog sistema,

uključujući makrofage, i utiču na njihov koordinisani odgovor u inflamaciji (Deshpande i sar, 1997; McLaren i sar, 1996; Vegeto i sar, 2001).

#### 1.4.1.1. Uloga estradiola

##### 1.4.1.1.1. Estradiol

Ispitivanje uloge estradiola u regulaciji inflamatornog odgovora je predmet mnogih istraživanja. Skorašnja ispitivanja *in vivo* odgovora makrofaga peritonealne šupljine miša na delovanje estradiola sugerišu da se estradiol direktno vezuje za promotore gena povezane sa proliferacijom (Pepe i sar, 2017). Estradiol pojačava površinsku ekspresiju PRR-a, uključujući TLR4, na peritonealnim makrofagama miša (Rettew i sar, 2009) i time utiču na sekreciju različitih inflamatornih medijatora poput citokina, ROS i RNS.

Postoje istraživanja koja ukazuju da je estradiol uključen u aktivaciju i polarizaciju makrofaga u eksperimentalnim modelima inflamacije (Calippe i sar, 2010; Routley i Ashcroft, 2009; Scotland i sar, 2011). Na rezidentnim makrofagama peritonealne šupljine i mikrogliji miša pokazan je proinflamatorni efekat estradiola tokom *in vivo* tretmana (Calippe i sar, 2008; Soucy i sar, 2005). Dugotrajni *in vivo* tretman estradiolom (koncentracija odgovara fazi estrusa) potencira sintezu proinflamatornih medijatora (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i iNOS iRNF) od strane mišjih peritonealnih TG makrofaga (Calippe i sar, 2010), što je u suprotnosti sa rezultatima istraživanja dobijenim u *in vitro* tretmanima gde je pokazan supresivni uticaj estradiola na sintezu proinflamatornih citokina (Ghisletti i sar, 2005; Vegeto i sar, 2001). Supresivni uticaj *in vitro* tretmana estradiolom na sintezu proinflamatornih citokina ostvaren je i u nestimulisanim i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulisanim makrofagama miša (Huang i sar, 2008). Sumarno, ova zapažanja jasno pokazuju da eksperimentalni rezultati dobijeni kratkotrajnim *in vitro* tretmanom ne predviđaju efekat dugotrajne izloženosti estradiolom *in vivo* na funkcije makrofaga (Calippe i sar, 2010). S druge strane, pokazano je da estradiol ima dozno zavisni efekat na sekretorni kapacitet humanih monocita i makrofaga, tako da niske doze estradiola pojačavaju sintezu proinflamatornih citokina kao što su IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , dok visoke koncentracije dovode do smanjenja sinteze ovih citokina (Bouman i sar, 2005; Kovats, 2015). Takođe, estradiol pokazuje stimulatorni efekat na sintezu TNF- $\alpha$  u makrofagama pacova (Chao i sar, 1995; Espinosa-Heidmann i sar, 2005). Međutim, postoje i studije u kojima je pokazano da estradiol smanjuje LPS-om indukovanu toksičnost pacovske mikroglije inhibišući oslobađanje TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (Smith i sar, 2011). Suprotni efekti estradiola mogu se objasniti različitim stepenom aktivacije i tipom ćelija na koje deluje.

Kao što je ranije pomenuto, aktivirane makrofage značajno doprinose nastajanju oksidativnog stresa usled povećane produkcije ROS i RNS. Da bi se zaštitile od štetnih efekata ovih jedinjenja, makrofage poseduju antioksidativne enzime, poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GSH-Pk) (Harris, 1992). Pokazano je da su aktivnosti ovih enzima regulisane hormonima (Gómez-Zubeldia i sar, 2000; Ventura-Clapier i sar, 2019). Estrogeni doprinose antioksidativnoj zaštiti (Andrade i sar, 2013; De Azevedo i sar, 1997), dok testosteron suprimira aktivnost antioksidativnih enzima (Chainy i sar, 1997). Jedinke muškog pola sintetišu veće količine ROS od jedinki ženskog pola, zbog čega je oksidativno oštećenje mitohondrijske DNK kod njih četverostruko veće nego kod žena (Borras, 2007). Navedene razlike mogu biti jedno od potencijalnih objašnjenja za duži životni vek jedinki ženskog pola (Borras, 2007). Ovarijektomija uzrokuje povećanje sinteze ROS, što rezultira oksidativnim stresom u ćelijama slezine, jetre, srca i bubrega (Baeza i sar, 2010). Međutim,

objavljeni rezultati o uticaju ovarijektomije na aktivnost antioksidativnih enzima su kontradiktorni. Naime, dok su neki istraživači otkrili smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima nakon ovarijektomije (Ha i sar, 2006; Kireev i sar, 2007; Yalin i sar, 2006), drugi nisu uočili promenu aktivnosti ili su čak primetili povećanu aktivnost antioksidativnih enzima (Azevedo i sar, 2001; Kankofer i sar, 2007). Objašnjenje za različite nalaze mogao bi da bude različit eksperimentalni pristup.

#### 1.4.1.1.2. Estrogenski receptori

Estrogeni svoje efekte ispoljavaju posredstvom dva tipa estrogenskih receptora (ER): klasičnih, nuklearnih receptora, ER- $\alpha$  i ER- $\beta$ , i membranskih receptora kao što su G-protein receptor-30 (GPR30) i ER-X (Cui i sar, 2013; Levin, 2009; Maggiolini i Picard, 2010). Navedeni receptori su članovi superfamilije ligand-aktivišućih transkripcionih faktora. Oni imaju 97% poklapanje u redosledu aminokiselina u domenu koji vezuje DNK i oko 56% sličnosti u domenu koji vezuje ligand (Nadal i sar, 2001). Estrogenski receptori poseduju različite funkcionalne domene koji su evolucijski očuvani (Nadal i sar, 2001). Razlike u afinitetu vezivanja ER su dovele do razvoja selektivnih liganada za određeni receptor. Estradiol je agonista oba receptora. S obzirom da je estradiol steroidni hormon koji lako prolazi kroz fosfolipidnu membranu ćelije, estrogenski receptori ne moraju da budu vezani za membranu da bi ostvarili kontakt sa estrogenom. Vezivanje estradiola može dovesti do različitih efekata na transkripciju gena u različitim tipovima ćelija u zavisnosti od koncentracije i forme liganda (estradiol, estriol, estron), nivoa ekspresije ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  kao i dostupnosti koaktivatora ili korepresora (Frasor i sar, 2003). Raznovrsnost efekata estradiola postignuta je različitom distribucijom subtipova ER, kao i njihovih koregulatora (koaktivatora i korepresora).

Signalna transdukcija nakon aktivacije receptora može biti genomska i negenomska. Genomska aktivacija je sporija (30-60 minuta), pokreće se vezivanjem hormona za receptore koji se u velikom broju nalaze u citosolu (Lorenzo, 2003). Nakon vezivanja liganda, receptori migriraju iz citosola u jedro, dimerizuju se i vezuju za ERE (engl. estrogen response elements). Kompleks receptor/DNK zatim regrutuje druge proteine koji započinju transkripciju DNK u iRNK što dovodi do sinteze proteina i do promena u ćelijskoj funkciji (Farooq, 2015; Lorenzo, 2003).

Negenomska aktivacija je brza (nekoliko minuta) i odvija se preko ER u ćelijskoj membrani. Vezivanjem liganda za membranu preko caveolina-1 se formira kompleks sa G proteinima i receptorskim tirozin kinazama (receptor za epidermalni faktor rasta, engl. epidermal growth factor receptor, EGFR i faktor rasta sličan insulinu 1, engl. insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1) (Lorenzo, 2003; Ueda i Karas, 2013). Posredstvom receptorskih tirozin kinaza, signali se prenose do jedra preko mitogenom-aktiviranih protein kinaznih puteva (engl. mitogen-activated protein kinase, MAPK/ERK) i fosfatidilinozitol 3-kinaznih puteva (engl. phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K/AKZ) (Filardo i sar, 2000). Novija istraživanja pokazuju da estradiol može biti ligand za G-protein spregnuti receptor 30 (engl. G protein-coupled receptor, GPR-30), membranski receptor (Wang i sar, 2009). Na osnovu vremena koje je potrebno da bi se ispoljili genomski ili negenomski efekti estradiola, kratkotrajna stimulacija ćelija do 10 minuta će pretežno proizvesti negenomske efekte, dok viščasovna stimulacija koja je korišćena i u našem istraživanju (24 sata), verovatno obezbeđuje uslove da se ostvare i genomski efekti (A. Murphy, 2010).

Pokazano je da se vezivanjem estradiola za ER- $\alpha$  smanjuje sinteza proinflamatornih jedinjenja (Ghisletti i sar, 2005; Lang, 2004), kontroliše funkcije mitohondrija tumorskih ćelija

izolovanih iz grudi (Felty i Roy, 2005; Mattingly i sar, 2008), indukuje degradaciju oštećenih proteina u proteozomu (Reed i sar, 2004) i smanjuje apoptoza monocita (Vegeto i sar, 1999). U istraživanju rađenom na mikrogliji miša, posmatrano na molekulskom nivou, aktivirani ER- $\alpha$  narušava transkripcionu aktivnost NF- $\kappa$ B sprečavajući njegovu nuklearnu translokaciju u prisustvu jakih inflamatornih stimulusa (kao što je LPS) (Ghisletti i sar, 2005). Nalazi Villa i sar ukazuju da estradiol aktivirajući ER- $\alpha$  skraćuje vreme koje makrofage provode u proinflatornom statusu kao M1 makrofage i olakšava prelazak u M2 makrofage (Villa i sar, 2015). Takođe, u svetlu nalaza da M1 makrofage imaju ulogu u napredovanju bolesti koje se povezuju sa menopauzom, kao što su osteoporoza, ateroskleroza i metaboličke bolesti, uključujući dijabetes (Esser i sar, 2014; Peled i Fisher, 2014; Wythe i sar, 2014), sposobnost estradiola da stimuliše polarizaciju M2 makrofaga i promoviše rezoluciju inflamacije može biti važna za zaštitne efekte koje estradiol ima pre menopauze. S druge strane, zbog polarizacije ka M2 makrofagama, incidencija patologija posredovanih M2 makrofagama, kao što su endometrijoza (Hogg i sar, 2021), skleroderma (Higashi-Kuwata i sar, 2009) i astma (Boorsma i sar, 2013), znatno je veća kod mladih žena nego u postmenopauzi (Bonds i Midoro-Horiuti, 2013; Whitacre, 2001).

#### 1.4.1.2. Uloga drugih polnih steroida

Pored estradiola, i drugi polni steroidi, progesteron i testosteron, su značajni za polne razlike u inflamatornom odgovoru. Literaturni podaci ukazuju da progesteron i androgeni suprimišu aktivnost iNOS, kao i sintezu NO i TNF- $\alpha$  u makrofagama miša (D'Agostino i sar, 1999; Miller i Hunt, 1996). Progesteron *in vitro* stimuliše sekreciju proinflatornih citokina IL-1 i TNF- $\alpha$  i hemokina kod nestimuliranih i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliranih TG makrofaga peritonealne šupljine miševa oba pola (Huang i sar, 2008). Različiti efekti progesterona mogu se objasniti različitim poreklom i aktivacionim stanjem makrofaga.

Takođe, pokazano je da testosteron smanjuje aktivnost SOD, katalaze i glutation peroksidaze u testisima pacova što indukuje nastajanje oksidativnog stresa (Chainy i sar, 1997; Hales, 2002). Testosteron *in vitro* indukuje smanjenje ekspresije TLR-4 na makrofagama (Rettew i sar, 2008). Orhidektomisani miševi pokazuju veću osetljivost na endotoksični šok usled ushodne regulacije TLR-4 (Rettew i sar, 2008).

#### 1.4.2. Polne razlike u oksidativno-inflamatornom starenju

Identifikovanje genskih varijacija tokom starenja na različitim tipovima ćelija pokazalo je da starenjem uslovljene polne razlike zavise od tipa ispitivanih ćelija (Márquez i sar, 2020). Promene na genskim lokusima koji determinišu fenotipske i funkcijske karakteristike monocita su bile veće kod muškaraca, što je doprinelo nastajanju polnih razlika (Márquez i sar, 2020). Ispitivanje uticaja hormona su pokazala da žene poseduju veću aktivnost genskih lokusa relevantnih za funkcije adaptivnog imunskog sistema, dok se kod muškaraca povećava aktivnost genskih lokusa odgovornih za funkciju monocita, što bi moglo da se poveže sa ubrzanim oksidativno-inflamatornim starenjem kod muškaraca (Piasecka i sar, 2018). Zanimljivo je da nije otkrivena značajna razlika u broju CD14+ i CD16+ monocita između starijih muškaraca i žena (Piasecka i sar, 2018), dok je u serumu starijih muškaraca zabeležena veća koncentracija proinflatornih citokina (IL-6, IL-18) (Bakker i sar, 2018). Ovi nalazi ukazuju da starenjem uslovljena aktivacija i polne razlike u monocitima mogu da potiču od intrinzičnih promena u ćeliji. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdili

mehanizmi koji stoje u osnovi polnih razlika u inflamatornom starenju, uključujući pored ispitivanja uloge polnih hormona i ulogu transposibilnih elemenata (De Cecco i sar, 2019).

Navedeni nalazi ukazuju da pol igra važnu ulogu u imunološkom starenju i da bi ga trebalo uzeti u obzir prilikom izučavanja molekulskih ciljeva i vremenskih okvira za intervenciju/terapiju bolesti povezanih sa starenjem.

#### 1.4.3. *Polne razlike u uticaju starenja na makrofage*

Uzimajući u obzir da makrofage igraju važnu ulogu u inflamatornom odgovoru tokom celog života, nameće se pitanje da li polni dimorfizam u inflamatornom starenju reflektuje polne razlike u uticaju starenja na makrofage. Poznato je da makrofage peritonealne šupljine doprinose patologiji peritonitisa, endometrioze i nekih kancera, ali uticaj pola na aktivnost ovih ćelija nije dovoljno ispitan tokom reproduktivnog starenja (Hogg i sar, 2021; Liu i sar, 2018). Bain i sar su ukazali da je kod mužjaka miša repopulacija makrofaga peritonealne šupljine makrofagama poreklom iz kostne srži mnogo izraženija nego kod ženki, kod kojih se repopulacija prevashodno obavlja proliferacijom tkivnih makrofaga (Bain i sar, 2019). Ova razlika rezultira polnim dimorfizmom u fenotipskom identitetu makrofaga peritonealne šupljine (Bain i sar, 2019). Novija istraživanja rađena metodama RNK sekvencioniranja na miševima oba pola potvrđuju postojanje značajnih promena tokom imunološkog starenja na makrofagama peritonealne šupljine koje se ogledaju u izmenjenom fenotipu, metaboličkom profilu, lizosomalnoj i fagocitnoj aktivnosti (Lu i sar, 2020; Márquez i sar, 2020). Primećena je smanjena sposobnost makrofaga mužjaka miša da acidifikuju lizosome nakon tretmana zimozanom (Lu i sar, 2020). Na modelu miša, pokazana je veća: ekspresija PRR, sinteza proinflamatornih citokina (npr. IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ), aktivnost makrofaga koja uključuje prezentaciju antigena i fagocitoza kod ženki u odnosu na mužjake (Berghöfer i sar, 2006; Da Silva, 1995; Fish, 2008; Mondal i Rai, 1999; Pisitkun i sar, 2006; Spitzer, 1999; Weinstein i sar, 1984).

Kod pacova starenje ne utiče na oslobađanje NO iz makrofaga ženki (Dimitrijević i sar, 2013), dok povećava ili smanjuje oslobađanje NO i uree iz makrofaga mužjaka, u zavisnosti od stepena stimulacije makrofaga i soja pacova (Dimitrijević i sar, 2014; Stanojević i sar, 2016). Funkcionalne promene makrofaga mogu biti posledica starenjem izmenjenih koncentracija polnih hormona i ekspresije ER. Bowling i sar (2014) su pokazali da se ekspresija ER- $\alpha$  receptora na makrofagama poreklom iz kostne srži miša starenjem smanjuje, dok je ekspresija ER- $\beta$  nepromenjena. U literaturi postoje podaci da su ER- $\beta$  više ekspimirani od ER- $\alpha$  na TG indukovanim makrofagama peritonealne šupljine miševa oba pola (Huang i sar, 2008).

Podaci u literaturi o polnim razlikama u urođenoj imunosti kod ljudi su vrlo oskudni, naročito kod starijih. U jednoj studiji, rađenoj na relativno maloj grupi ispitanika, pokazano je da starije žene imaju povišene koncentracije inflamatornih proteina u serumu u poređenju sa muškarcima, kao što je slučaj i kod mlađih muškaraca i žena (Furman i sar, 2014). Nakon menopauze uočeno je značajno povećanje u produkciji IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , a smanjenje IFN- $\gamma$  (Deguchi i sar, 2001; Kumru i sar, 2004). Testosteron ima immunosupresivni efekat na sintezu proinflamatornih citokina, pa je smanjenje njegove koncentracije sa starenjem povezano sa porastom nivoa solubilnog receptora za IL-6 u serumu (Maggio i sar, 2006). Razlike uslovljene polovima su primećene i na različitim subpopulacijama monocita u starijoj populaciji. Sredovečne žene imaju veći procenat intermedijarnih monocita (CD14++CD16+), koji imaju

proinflamatorne karakteristike, u odnosu na muškarce (Al-Attar i sar, 2016; Puchta i sar, 2016).

Navedeni rezultati ukazuju da postoji polni dimorfizam u uticaju starenja na funkciju makrofaga i da bi on mogao biti posledica promene koncentracije polnih hormona ili receptora za polne hormone, što nije dovoljno ispitano. Shodno tome, u ovom istraživanju bi se ispitaio značaj estradiola za reproduktivnim starenjem uslovljene fenotipske i funkcionalne promene peritonealnih makrofaga.

#### 1.4.3.1. Reproduktivno starenje

U najširem smislu moglo bi se reći da reproduktivno starenje kod žena počinje već u embrionalnom periodu i završava se deplecijom folikula u jajniku i menopauzom. U periodu perimenopauze generalno se koncentracija estradiola postepeno smanjuje u skladu sa iscrpljivanjem folikularnih rezervi (Butler i Santoro, 2011; Harlow i sar, 2012; Prior, 1998). Međutim, u perimenopauzi uočen je i fenomen povećanja koncentracije estradiola i odnosa estradiol/progesteron tokom folikularne faze ciklusa, tzv. hiperestrogeni ciklus (Santoro i sar, 1996). Prior (1998) je opisao „paradoks endogene hiperstimulacije“, jer uprkos povećanju koncentracije estradiola i osetljivosti ER, paradoksalno smanjuje se koncentracija progesterona u lutealnoj fazi (Prior, 1998). Ovakav hiperestrogeni ciklus predstavlja „prozor rizika“ za nastajanje kancera dojki i reproduktivnih organa (Hale i sar, 2002). Hiperestrogeni ciklus se može uporediti sa stanjem perzistentnog estrusa kod pacova usled postojanja sličnog odnosa koncentracije estradiola i progesterona (Finch, 2014). Perimenopauza se završava ulaskom žena u menopauzu, pri čemu dolazi do naglog pada koncentracije estradiola i daljeg smanjenja koncentracije progesterona u cirkulaciji (Djahanbakhch i sar, 2007).

S obzirom na konstantno produženje životnog veka i nepromenjen period ulaska žena u menopauzu, oko 50-e godine, predviđa se da će do 2025. godine broj žena koje su u menopauzi dostići oko 1,1 milijardu (Stute i sar, 2016) i da će žene u menopauzi provesti trećinu svog života.

Reproduktivno starenje kod muškaraca je praćeno postepenim padom koncentracije testosterona u plazmi usled povećanja aktivnosti aromataza koje sintetišu estradiol iz testosterona (Hemsell i sar, 1974). Koncentracija estradiola u cirkulaciji korelira sa količinom potkožnog masnog tkiva, s obzirom da kod muškaraca estradiol nastaje dominantno aromatizacijom iz androgena u ćelijama masnog tkiva koje je bogato aromatazama (Vermeulen i sar, 2002). Koncentracije estradiola u plazmi sredovečnih muškarca su veće nego u plazmi žena u postmenopauzi (Vermeulen i sar, 2002).

Za proučavanje reproduktivnog starenja kod žena potrebno je izabrati odgovarajući životinjski model. Kao i kod ljudi, tako i kod ostalih primata i glodara folikularna atrezija inicira reproduktivno starenje. Međutim dugačak životni vek, visoki troškovi i značajne prepreke u radu sa nehumanim primatima kao translacionim modelima ograničili su njihovo korišćenje na relativno mali broj laboratorija (Brinton, 2012). Sledstveno tome, za proučavanje ovog fenomena najčešće se koriste glodari, budući da su mehanizmi reproduktivnog starenja slični kao kod ljudi. Shodno tome, promene koje se događaju starenjem kod ovih životinja su slične kao kod ljudi, a ogledaju se u opadanju broja folikula, neredovnim ciklusima, fluktuaciji koncentracije steroidnih hormona i smanjenju plodnosti (Finch i sar, 1984; Saal i sar, 1994; Van Kempen i sar, 2011). Valja naglasiti da se nepravilnost dužine ciklusa smatra jednim od pouzdanih indikatora smanjenja plodnosti i predstojećeg reproduktivnog starenja (Saal i sar, 1994).

Početak reproduktivnog starenja kod životinja karakterišu faze dužih estrusnih ciklusa, koji su posledica izmenjenog trajanja faza u okviru jednog ciklusa, jer životinje mogu ostati u nekoj od faza 3-5 dana (Marcondes i sar, 2002). Period nepravilnih ciklusa često je praćen fazom perzistentnog estrusa, koju prati produžena vaginalna citologija koja odgovara fazi diestrusa sa intermitentnom ovulacijom, poznatom i kao pseudo-trudnoća (PP) (Paccola i sar, 2018). PP može trajati do 10 dana, a zatim može da bude prekinuta fazom estrusa koja se identifikuje prisustvom kornifikovanih ćelija u vaginalnom razmazu (Huang i sar, 1976; Lu i sar, 1979). Sredovečne ženke imaju povišene koncentracije estrona i estradiola u serumu u odnosu na mlade. S obzirom da je tokom PP prisutan i određeni broj folikula, sredovečne ženke mogu da ovuliraju a sve ovo vodi ka izmenjenim koncentracijama progesterona i narušenom odnosu estradiol/progesteron (Lu i sar, 1979; Sone i sar, 2007; Westwood, 2008). Krajnji stadijum reproduktivnog starenja kod pacova jeste anestrus koji karakteriše odsustvo svih faza ciklusa (Saal i sar, 1994) i ekvivalentan je periodu postmenopauze kod žena (Brinton, 2012; Finch, 2014).

Kako bismo ispitali značaj odnosa koncentracija cirkulišućeg estradiola i progesterona za inflamatorni odgovor peritonealnih makrofaga kod ženki pacova, ove životinje su ovarijektomisane. Naime, budući da nakon ovarijektomije kod pacova značajno raste koncentracija cirkulišućeg estradiola, ali ne i progesterona (Pilipović i sar, 2016), odnos koncentracija estradiola i progesterona je značajno veći u odnosu na onaj kod neovarijektomisanih životinja. Ovaj porast koncentracije estradiola nakon ovarijektomije objašnjava se pojačanom ekstragonadnom aromatizacijom androgena koje sekretuju nadbubrežne žlezde (Zhao i sar, 2005).

Kod ovarijektomisanih pacova pored estradiola i progesterona ovarijektomijom dolazi do gubitka i testosterona. Međutim, tokom vremena ekstragonadnom sintezom (adrenalna žlezda, mozak, koža, masno tkivo) navedeni hormoni se nadoknađuju delom ili u potpunosti. Nivo estradiola u operisanim i neoperisanim životinjama se izjednačava posle 10 meseci od ovarijektomije (Stanojević i sar, 2015). U međuvremenu treba ispitati da li je produžena, višemesečna razlika u koncentraciji hormona između dve grupe ženki pacova (dugotrajna hormonska deprivacija) uticala na aktivnost makrofaga.

Ispitivanja funkcijskog kapaciteta makrofaga korišćenjem „prirodnog“ modela i ovarijektomisanih životinja treba da omoguće sagledavanje njihove funkcije tokom tzv. „prozora rizika“. Ovo bi potencijalno moglo da bude važno za dizajniranje terapijskih intervencija koje bi omogućile da se izbegnu oni efekti reproduktivnog starenja koji bi mogli da doprinesu razvoju bolesti koje su karakteristične za period nastupanja menopauze kod žena. Ispitivanja na modelu ovarijektomisanih životinja mogu dodatno da potvrde fiziološki značaj odnosa ova dva steroidna hormona i da ukažu na potencijalne efekte izolovane supstitucione terapije estrogenima.

U zaključku, inflamatorni odgovor/aktivnost makrofaga zavisi od pola, genetike i starosti jedinke. Iako ima dosta podataka u literaturi koji ukazuju da postoje polne razlike u funkcionalnoj aktivnosti makrofaga, studije koje su usmerene na istraživanje uticaja pola i značaja polnih hormona za starenjem uslovljene promene u aktivnosti ovih ćelija izuzetno su retke. Takođe, uticaj genetske građe na starenjem uslovljene promene u aktivnosti makrofaga nedovoljno je ispitan. Za planiranje ovih istraživanja važno je napomenuti da životinjski modeli imaju prednost kada se ispituje uticaj genetskih faktora na inflamatorni odgovor u poređenju sa ispitivanjem na ljudima, kod kojih socijalni faktori, kao što su npr. pušenje, gojaznost i stres, mogu uticati na individualne razlike u inflamatornom odgovoru i otuda na dobijene rezultate (De Maio i sar, 2005).

## 2. CILJEVI

Imajući u vidu činjenice navedene u uvodu ove disertacije, ciljevi su bili:

1. da se ispituju promene koje nastaju u toku rane faze reproduktivnog starenja u fenotipskim karakteristikama (ekspresija markera aktivacije i markera koji ukazuju na poreklo/funkcijska svojstva) makrofaga izolovanih iz neinflamirane „mirne“ peritonealne duplje ženki AO pacova i peritonealne duplje ovih životinja kod kojih je tioglikolatom indukovani peritonitis, njihovoj fagocitnoj sposobnosti i sposobnosti da sintetišu proinflamatorne i antiinflamatorne medijatore;
2. da se istraži značaj genetskih faktora za reproduktivnim starenjem uslovljene fenotipske i funkcionalne promene peritonealnih makrofaga, posebno one značajne za njihovu sposobnost da kontrolišu razvoj/završetak akutnog inflamatornog odgovora, uporednom analizom ovih njihovih svojstava kod ženki pacova AO i DA soja;
3. da se utvrdi značaj polnih steroida za reproduktivnim starenjem uslovljene fenotipske i funkcionalne promene peritonealnih makrofaga pacova, posebno one značajne za njihovu sposobnost da kontrolišu razvoj/završetak akutnog inflamatornog odgovora, uporednom analizom ovih njihovih svojstava kod ženki i mužjaka pacova AO soja;
4. da se ispita značaj promena u delovanju steroidnih hormona jajnika tokom rane faze reproduktivnog starenja za fenotipske i funkcionalne promene peritonealnih makrofaga ženki pacova AO soja, pre svega one koje su od značaja za njihovu sposobnost da kontrolišu razvoj/završetak akutnog inflamatornog odgovora, analizom uticaja promena u njihovom delovanju u *in vivo* uslovima (hirurška ovarijektomija na kraju reproduktivnog perioda) i davanja estradiola u *in vitro* uslovima na ovu njihovu sposobnost.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalne životinje

U istraživanjima su korišćene ženke i mužjaci pacova AO soja, kao i ženke pacova DA soja uzrasta 2-4 meseca i 16-19 meseci. Pacovi su odgajani u Centru za imunološka istraživanja "Branislav Janković", Instituta za virusologiju, vakcine i serume "Torlak" u Beogradu. Pacovi su uzgajani u standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura od 22°C ± 2°C, relativna vlažnost vazduha 40%-70%, režim smenjivanja svetla i mraka u intervalima od 12 sati i *ad libitum* pristup hrani (Veterinarski Zavod Subotica, Srbija) i vodi. Po tri životinje istog pola i uzrasta su bile smeštene u providne kaveze od pleksiglasa.

Svi eksperimenti urađeni u ovoj tezi su u saglasnosti sa etičkim principima u radu sa eksperimentalnim životinjama i Zakonom o dobrobiti životinja (Rešenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije odobrenju sprovođenja oglada na životinjama broj 2323-07-01577/2016-05/14, izdato 25.02.2016. godine).

#### 3.2. Hemikalije, antitela i imunokonjugati

Tioglikolatu podlogu obezbedio je Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“. Lipopolisaharid (engl. Lipopolysaccharide, LPS), fenil-metil-sulfonil-fluorid (engl. phenylmethyl sulfonil fluorid, PMSF), izo-nitrozo-propio-fenon (engl.  $\alpha$ -isonitrosopropiophenone, ISPF), nitroblutetrazolijum (engl. nitrobluetetrazolium, NBT), orto-fenilen-diamin (engl. orthophenylenediamine, OPD), dimetilsulfoksid (engl. dimethylsulfoxide, DMSO), sulfanil-amid, naftil-etilen-diamin, medijum Roswell Park Memorial Institute (RPMI) sa i bez fenol crvenog indikatora, 17 $\beta$ -estradiol (E2) su nabavljeni od proizvođača „Sigma“, St. Louis, Mo., SAD. Fetalni teleći serum (engl. foetal calf serum, FCS) je nabavljen od proizvođača Gibco, Grand Island, NY, SAD.

Monoklonska antitela poreklom iz miša uperena protiv antigena na ćelijama pacova: anti-CD163 antitelo (klon HIS36) konjugovano sa fikoeritriinom (engl. phycoerythrin, PE), anti-MHCII antitelo (klon OX-6) konjugovano sa fluorescein-izotiocijanatom (engl. fluorescein isothiocyanate, FITC) ili PE-om i sekundarna antitela: FITC-om konjugovan kozji anti-zečiji IgG (engl. goat anti-rabbit, GAR-FITC), PE-om konjugovan magareći anti-zečiji IgG (engl. donkey anti-rabbit DAR-PE), kao i streptavidin konjugovan sa peridinin hlorofil proteinom (engl. peridinin chlorophyll protein, PerCP) nabavljena su od proizvođača BD Pharmingen (Mountain View, CA, SAD). Odgovarajuće izotipske kontrole su takođe nabavljene od BD Pharmingena. Monoklonsko anti-CD68 antitelo (klon ED1) konjugovano sa FITC-om, anti-CD68 antitelo (klon ED1) obeleženo biotinom i neobeleženo anti-CD169 antitelo (klon ED3) su kupljeni od proizvođača Serotec (Oxford, UK). Poliklonska antitela protiv estrogenskog receptora (ER)  $\alpha$  i  $\beta$ , kao i anti-CCR7 (engl. C-C chemokine receptor type 7, CCR7) i anti-TLR4 antitelo su nabavljena od proizvođača Abcam (Cambridge, MA, SAD). Sekundarno antitelo protiv mišjeg IgG obeleženo sa PCPCy5.5 (engl. goat anti-mouse, GAM-PCPCy5.5) je kupljeno od proizvođača Biologend (San Diego, CA, SAD).

### 3.3. Ovarijektomija

Ženke pacova AO soja u uzrastu od 10 meseci, odnosno pred sam kraj reproduktivnog perioda (Dudley, 1982) podvrgnute su bilateralnoj ovarijektomiji. Ovarijektomija je vršena u totalnoj anesteziji. Intraperitonealno je aplikovana smeša anestetika (8ml/kg) koja je sadržala ketamin (100 mg/ml), ksilazin (20 mg/ml) i fiziološki rastvor u odnosu 1:0,5:8,5. Jajnici su zatim uklanjani kroz dorzo-lateralne rezove sa obe strane kičmenog stuba. Rana je fiksirana hirurškim kopčama i lokalno tretirana antibiotskim praškom. Stanje životinja je praćeno 24 sata u individualnim kavezima. Kontrolne životinje su "lažno" operisane, tako što su prošle kroz isti tretman, uz manipulaciju jajnika ali bez njihovog uklanjanja. Eksperiment (izolacija makrofaga peritonealne šupljine) je urađen 10 meseci nakon ovarijektomije. Korišćene su samo životinje kod kojih je utvrđeno da su uspešno bilateralno ovarijektomisane, dok su one kod kojih su primećene rezidue tkiva ovarijuma izuzete iz eksperimenta.

### 3.4. Određivanje faze estrusnog ciklusa kod ženki pacova

Faza ciklusa može da se odredi identifikovanjem određenih ćelija u vaginalnom brisu, posmatranjem morfoloških promena na jajnicima i uterusu i makroskopskim pregledom vagine. U ovom istraživanju smo fazu ciklusa u kom se ženke nalaze utvrđivali identifikovanjem karakterističnih ćelija u vaginalnom brisu 10 dana uzastopno pre eksperimenta. Mala zapremina fiziološkog rastvora (200 $\mu$ l) je špricom aplikovana u vaginu, aspirirana i prenošena na mikroskopsko staklo, nakon čega je nativni preparat posmatran pod mikroskopom. Iako gustina ćelija nije najsigurniji način za procenu faze ciklusa, s obzirom da zavisi od načina na koji je uzet vaginalni bris, poznato je da i estrus i proestrus karakteriše visoka gustina ćelija. Razlika između estrusa i proestrusa ogleda se u tome što je prisustvo okruglih epitelnih ćelija sa jedrom karakteristično za proestrus, dok u estrusu preovladavaju velike rožnate epitelne ćelije nepravilnog oblika bez nukleusa, a može se primetiti i sluz (Paccola i sar, 2018). Metaestrus karakteriše mali broj ćelija, dok u diestrusu dominiraju limfociti i poneka okrugla epitelna ćelija sa jedrom.

U ovom istraživanju su korišćene mlade ženke koje su na dan eksperimenta bile u proestrusu. Vaginalni brisevi sredovećnih ženki su pokazali odsustvo ćelija karakterističnih za određene faze ciklusa. Dodatno je određivanjem koncentracije estradiola i progesterona u serumu potvrđeno da su ženke stare 16-19 meseci, ušle u fazu „perzistentnog anestrusa“. Takođe, korišćene su samo sredovećne ženke koje nikada nisu bile skotne, jer postoje istraživanja koja povezuju reproduktivno iskustvo sa izmenjenim vrednostima cirkulišućeg estrogena (Barrat i sar, 1997) koji posledično dovodi do promena u sekretornim funkcijama makrofaga (Carvalho-Freitas i sar, 2007).

### 3.5. Indukcija inflamatornih makrofaga intraperitonealnim ubrizgavanjem tioglikolatnog medijuma

Tioglikolatna podloga je suva mikrobiološka podloga u kojoj se pored natrijum-tioglikolata i L-cisteina (redukciona sredstva koja uklanjaju kiseonik i druge oksidanse), nalaze i hidrolizat kazeina, kvasac, agar, glukoza (hranljive materije), zatim natrijum-hlorid i metilensko-plavo (redoks indikator, redukovan je bezbojan, oksidovan je zelen). Rastvor tioglikolatnog

medijuma je pravljeno u koncentraciji 2,4% tako što je suva podloga kuvana u destilovanoj vodi do potpunog rastvaranja. Rastvor je hlađen na sobnoj temperaturi i mlak je filtriran kroz kvalitativni filter papir. Intraperitonealno je aplikovano po 7ml rastvora tioglikolatnog medijuma.

### **3.6. Dobijanje seruma i određivanje koncentracije polnih hormona u serumu**

Nakon 7 dana od ubrizgavanja tioglikolatnog medijuma, životinje su anestetizirane subkutanim davanjem rastvora anestetika (ketamin/ksilazin) što je obezbedilo dovoljno duboku anesteziju za izvođenje punkcije srca. Krv dobijena punkcijom iz srca životinja je korišćena za dobijanje seruma. Krv je ostavljena da koaguliše tokom 1h na sobnoj temperaturi, a zatim još 1h na +4° C. Serumi su izdvajani centrifugiranjem na 400 x g u toku 20 minuta. Uzorci su čuvani na -80°C do određivanja koncentracije hormona. Koncentracija estradiola, progesterona i testosterona je određivana hemiluminiscentnim enzimskim imuno esejom (Immulate, Euro/DPC, Velika Britanija) na analizatoru IMMULITE 1000.

### **3.7. Izolovanje rezidentnih i TG makrofaga iz peritonealne šupljine**

Nakon punkcije krvi iz srca životinja, što je dovelo do eutanazije iskrvarenjem, abdomen životinja je prebrisan 70% alkoholom. Pažljivim zasecanjem je odvojeno krzno od zida peritoneuma. Napravljen je mali rez na prednjem zidu peritoneuma dužine 1,5cm i u peritonealnu šupljinu je špricom sipano 10 ml hladnog, sterilnog fosfatnog pufera. Nakon blagog protresanja životinje kako bi se rastvor rasporedio po celoj peritonealnoj šupljini, špricom je pažljivo aspirirana suspenzija ćelija. Ćelije su oprane dva puta u rastvoru PBS/2%FCS pre brojanja. Ćelije su bojene u rastvoru Turck-a u odnosu 1:10, a zatim su brojane pod mikroskopom.

### **3.8. Određivanje ekspresije antigena na makrofagama peritonealne šupljine protočnom citofluorimetrijom**

Od suspenzija ćelija peritonealne šupljine prethodno podešenih na koncentraciju  $1 \times 10^7$ /ml, izdvojeno je 50  $\mu$ l suspenzije ( $5 \times 10^5$  ćelija) za detekciju antigena.

#### **3.8.1. Obeležavanje membranskih antigena**

Za obeležavanje antigena koji se eksprimiraju na membrani ćelije korišćena su antitela direktno konjugovana sa fluorescentnom bojom ili sa biotinom. Ćelije kojima su dodata antitela direktno konjugovana sa fluorohromima su inkubirane 30 minuta na 4°C u mraku, a zatim oprane dva puta rastvorom PBS/2%FCS/0,09%NaN<sub>3</sub>. Kada je izvođeno indirektno bojenje korišćenjem antitela konjugovanih sa biotinom, posle inkubacije sa ovim antitelima, ćelijama je posle pranja dodat streptavidin konjugovan FITC-om, PE-om ili PerCP-om. Ćelije su ponovo inkubirane 30 minuta na 4°C u mraku, nakon čega su oprane 2 x u rastvoru PBS/2%FCS/0,09%NaN<sub>3</sub>. Pre učitavanja, sve ćelije su oprane još jednom u rastvoru PBS/0,09%NaN<sub>3</sub>.

### **3.8.2. Obeležavanje unutarćelijskih antigena**

Ćelije su prvo fiksirane sa 500  $\mu$ l 0,25% paraformaldehida u PBS/ $\text{NaN}_3$  tokom 20 minuta na 4°C u mraku, a zatim oprane 2 puta rastvorom PBS/ $\text{NaN}_3$ . U sledećem koraku membrana ćelije je permeabilizovana dodatkom 500  $\mu$ l 0,2% rastvora Tween20 u PBS/ $\text{NaN}_3$  u trajanju od 15 minuta na 4°C u mraku. Pranje permeabilizovanih ćelija je rađeno sa 0,1% rastvorom Tween-a u PBS/ $\text{NaN}_3$  nakon čega je dodavano primarno antitelo. Dalji postupak inkubacije i pranja su rađeni na isti način kao kod membranskog obeležavanja.

### **3.8.3. Obeležavanje nuklearnih antigena**

Za detekciju estrogenskih receptora, posle fiksacije u 0,25% paraformaldehydu u PBS/ $\text{NaN}_3$  i pranja rastvorom PBS/ $\text{NaN}_3$ , ćelije su dodatno fiksirane ledenim (-20°C) 70% rastvorom metanola u PBS-u 1 sat na 4°C uz lagano mešanje na vorteksu. Nakon centrifugiranja i pranja u PBS, ćelije su permeabilizovane 0,05% rastvorom Triton X-100 u PBS na 4°C, 10 minuta. Ćelije su centrifugirane, a onda je opet nalivan Triton X-100 i postupak permeabilizacije je ponovljen. Da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, pre inkubacije sa antitelima protiv estrogenskih receptora, ćelijama je dodat 10% rastvor zečijeg seruma u Triton X-100 i ćelije su ostavljene na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon toga ćelije su inkubirane sa neobeležanim primarnim antitelima protiv estrogenskog receptora u 0,05% rastvoru Triton X-100/PBS preko noći na 4°C. Posle dva pranja u 0,05% rastvoru Triton X-100/PBS, na talog su dodavana fluorohromom obeležena sekundarna antitela (anti-zečiji IgG:FITC). Inkubacija je bila 30 minuta na 4°C i nakon dva pranja u PBS-u, talog ćelija je resuspendovan u 500  $\mu$ l PBS i uzorci su analizirani na protočnom citofluorimetru.

### **3.8.4. Analiza uzoraka protočnom citofluorimetrijom**

Uzorci su analizirani na citometru FACS Verse (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD) sa argonskim jonskim laserom talasne dužine 488 nm. Detektor aparata beleži prednje rasipanje svetlosti (engl. forward scatter channel, FSC), koje daje podatak o veličini ćelija. Detektor bočnog rasipanja svetlosti (engl. side scatter channel, SSC) daje podatke o granuliranosti, odnosno o unutrašnjoj strukturi ćelija. Obeležavanjem površinskih i/ili intracelularnih antigena ćelija fluorohromima obeležanim antitelima koja su pobuđena laserskim zrakom, emituje se svetlost određene talasne dužine, uz informaciju o veličini i granuliranosti ćelija, pa se tako dobijaju informacije o zastupljenosti ćelija koje ispoljavaju ispitivane antigene, kao i o gustini ekspresije njihovih antigena. U eksperimentima su korišćeni FITC, PE, PerCP i PerCP Cy5,5 fluorohromi, čiji ekscitacioni spektar obuhvata talasnu dužinu od 488 nm, a njihovi emisijski spektri su takvi da se mogu razdvojiti i istovremeno detektovati, uz minimalan gubitak intenziteta emitovane svetlosti (maksimumi emisije: FITC-530 nm, PE-585 nm, PerCP/PerCP Cy5,5-650 nm).

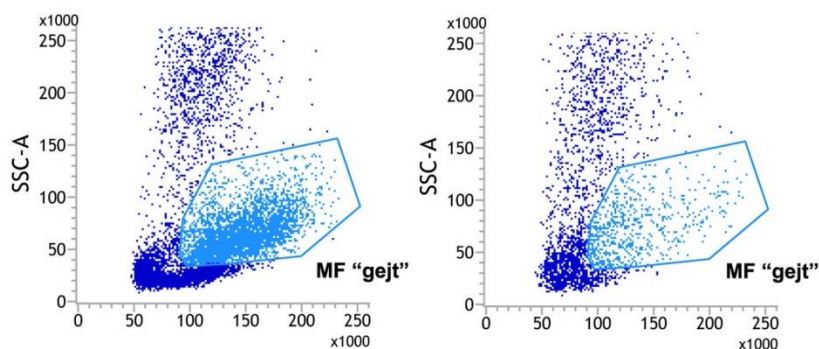
Po uzorku je učitavano 50 000 ćelija. Nespecifične IgG izotipske kontrole su korišćene u cilju definisanja nespecifičnog bojenja, a mrtve ćelije i delovi ćelija (ćelijski debris) su isključeni iz analize na osnovu veličine i granuliranosti ćelija. Procenat pozitivnih ćelija i procena srednjeg

intenziteta fluorescence za svako antitelo obeleženo fluorohromom određivani su korišćenjem kompjuterskog programa FACSuite™ (BD Biosciences). Kontrole su korišćene u višekolornim bojenjima i one su obuhvatale sve fluorohrome sadržane na panelu, osim onog koji se meri.

### 3.9. Određivanje funkcijskih karakteristika makrofaga peritonealne šupljine

Određivanje funkcijskih karakteristika makrofaga vršeno je ispitivanjem kapaciteta adherentnih makrofaga da u prisustvu ili u odsustvu stimulatora TLR4 (LPS) odgovore produkcijom pro- i anti-inflamatornih medijatora. Suspenzija ćelija peritonealne šupljine je podešena na koncentraciju  $2,5 \times 10^6$ /ml (za određivanje fagocitne i MPO aktivnosti), odnosno na koncentraciju  $1 \times 10^6$ /ml (za određivanje produkcije NO, određivanje enzima arginaze i produkcije citokina), i u zapremini od 100  $\mu$ l nalivena u bazene sa ravnim dnom mikrotitarske ploče (Nunc). Ćelije su adherirale na temperaturi od 37°C u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> u trajanju od 2h, nakon čega su neadherirane ćelije ispirane sa temperiranim PBS. Na slici 1 (levo) je prikazan makrofagni „gejt“ označen na *ex vivo* ćelijama peritonealnog eksudata, dok su na slici 1 (desno) prikazane ćelije koje su ostale u supernatantu nakon adherence. Na osnovu izgleda ovih profila i odsustva ćelija u makrofagnom „gejtu“ nakon adherence, može se potvrditi da su u najvećoj meri adherirane ćelije zapravo makrofage.

Nakon izvedenog testa, za čitanje optičkih gustina korišćen je spektrofotometar tipa Multiscan Ascent plate reader (Labsystems, Helsinki, Finska).



Slika 1. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profil *ex vivo* ćelija peritonealnog eksudata (levo) i ćelija u supernatantu nakon 2-časovne adherence (desno). Ćelije izolovane iz peritonealne šupljine su na osnovu svoje veličine (FSC) i stepena granuliranosti (SSC) odvojene u makrofagnom „gejt“-u.

#### 3.9.1. Određivanje fagocitne aktivnosti

Adherentne ćelije su inkubirane tokom 24h sa 100  $\mu$ l RPMI/5%FCS ili stimulisane sa 1mg/ml LPS/RPMI/5%FCS na 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Nakon 24 sata, ploče su isprane dva puta temperiranim PBS-om, a potom je nalivano po 50  $\mu$ l rastvora zimozana koncentracije 250  $\mu$ g/ml i po 50  $\mu$ l rastvora nitroblutetrazolijum soli koncentracije 1mg/ml. Inkubacija je trajala 1 satna 37°C/5%CO<sub>2</sub>, kada se žuti NBT redukuje u plave formazanske produkte (Pick i Mizel, 1981). Ćelije su fiksirane sa 100  $\mu$ l metanola, a nakon sušenja na sobnoj temperaturi preko noći, boja

je razvijana dodatkom 2M kalijum-hidroksida rastvorenog u 10% DMSO. Intenzitet plave boje je očitian na 620 nm, a rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti optičkih gustina.

### 3.9.2. **Određivanje aktivnosti enzima mijeloperoksidaze – MPO**

Adherentne ćelije su tokom sledećih 24h inkubirane u prisustvu 100 µl RPMI/5%FCS ili 1 mg/ml LPS/RPMI/5%FCS na 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Nakon 24 h inkubacije, ćelije u mikrotitarskoj ploči su oprane 2 puta rastvorom temperiranog PBS, a zatim je nalivano po 50 µl rastvora OPD (1mg/ml u 10 mM citratnom puferu pH 5,0), prethodno aktiviranog sa 12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0,001%Triton-X-100. Ploče su inkubirane u mraku do razvoja boje tokom 10 minuta, a reakcija je prekidana sa 50 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Intenzitet nastale žute boje je meren na talasnim dužinama 492 i 620 nm, a rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti optičkih gustina (Bradley i sar, 1982).

## 3.10. **Određivanje sekretornog profila makrofaga peritonealne šupljine**

### 3.10.1. **Određivanje produkcije azot-monoksida – NO**

Adherentne ćelije su inkubirane tokom 48h u prisustvu 100µl RPMI/5%FCS ili stimulisane sa 1mg/ml LPS/RPMI/5%FCS na 37°C / 5% CO<sub>2</sub>. Nakon 48h u novu ploču je preneto po 50 µl supernatanta ćelijskih kultura i dodavano je po 50 µl Griess-ovog reagensa. Griess-ov reagens je smeša 2% sulfanil-amida u koncentrovanoj fosfornoj kiselini i 0,2% naftil-etilen-diamina u vodi. Fotosenzibilan je, pa se pravi *ex tempore*, mešanjem ova dva rastvora u odnosu 1:1. Boja se razvija 10 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Optička gustina je očitavana na 405 nm, a koncentracija nitritnih jona je određivana ekstrapolacijom iz standardne krive koja je pokrivala opseg koncentracija od 1-100 µM NaNO<sub>2</sub>.

### 3.10.2. **Određivanje aktivnosti enzima arginaze**

Nakon uzimanja po 50 µl supernatanta ćelijskih kultura za određivanje koncentracije produkovanog NO, ploče sa adherentnim ćelijama su centrifugirane 5 minuta na 800g i ispirane 2 puta temperiranim PBS. Nalivano je po 50 µl pufera za lizu (2mM rastvor PMSF u apsolutnom etanolu je u razmeri 1:100 pomešan sa 0,1% rastvorom Triton X-100 u PBS) i ploče su postavljene na orbitalni šejker tokom 30 minuta. Nakon lize ćelija, ploče su po potrebi zamrzavane na -20°C, a aktivnost arginaze je određivana odmah ili najkasnije 7 dana od zaleđivanja. Aktivnost enzima arginaze je određivana merenjem koncentracije uree kao finalnog produkta metabolizma arginina.

U ploče sa liziranim ćelijama, koje su po potrebi prethodno odleđene i temperirane, dodavano je po 50 µl 10mM rastvora MnCl<sub>2</sub> u 50 mM rastvoru Tris-HCl i ploče su inkubirane 10 minuta na 55°C da bi došlo do aktivacije enzima arginaze. Nakon toga, po 25 µl lizata iz ploča je prenošeno u ependorfe kojima je dodavano 25 µl 0,5M rastvora arginina. Nakon inkubacije na 37°C preko noći, reakcija hidrolize arginina do ornitina i uree, je zaustavljana dodatkom 400 µl smeše kiselina (koncentrovane sumporne i fosforne kiseline u vodi u odnosu 1:3:7) i 25 µl 9% rastvora ISPF. Uzorci su zatim zagrevani 45 minuta na 100°C kada dolazi do razvijanja ružičaste boje. Nakon hlađenja, 100 µl uzorka i standarda uree se prenosilo u bazene

mikrotitracionih ploča i očitavala se optička gustina na 540 nm. Rezultati su se preračunavali na osnovu standardne krive uree koja je u opsegu koncentracija od 25-1600  $\mu\text{M}$ .

### 3.11. Određivanje koncentracije citokina ELISA testovima

#### 3.11.1.1. Priprema uzoraka za izvođenje ELISA testova

Adherentne ćelije su stimulisane tokom 24h sa 100  $\mu\text{l}$  rastvora LPS koncentracije 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  u RPMI/5%FCS na 37°C / 5% CO<sub>2</sub>. Ploče sa ćelijama su centrifugirane na 800g, 5 min, a supernatanti izdvojeni i čuvani na -70°C do određivanja koncentracije dole navedenih citokina.

#### 3.11.1.2. Izvođenje ELISA testova

Koncentracija citokina u supernatantima kultura ćelija peritonealne šupljine stimulisanih sa LPS je određivana komercijalnim imunoenzimskim (enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA) testovima. Generalno se koristi dvostruka (engl. Sandwich) ELISA, u kojoj se, kao u sendviču, kombinuju dva antitela koja su uperena protiv različitih epitopa u molekulu istog citokina. Vezujuće antitelo (engl. capture antibody) se koristi za oblaganje bazena mikrotitracione ploče, dok detektujuće antitelo može biti direktno vezano za enzim ili obeleženo biotinom. Na ovaj način se povećava senzitivnost detekcije citokina u odnosu na standardni ELISA protokol.

**Koncentracija IL-1 $\beta$**  određivana je pomoću komercijalnog ELISA Kit. U bazene ploča prethodno obloženih vezujućim anti-IL-1 $\beta$  antitelom je dodato po 100  $\mu\text{l}$  standarda ili uzoraka u triplikatu. Ploča zaštićena adhezivnom folijom je inkubirana na sobnoj temperaturi 2 h, posle čega su bazeni isprani 5  $\times$  sa 300  $\mu\text{l}$  pufera za ispiranje. Dodato je 100  $\mu\text{l}$  detekcionog antitela obeleženog biotinom i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim su bazeni ponovo isprani. Inkubacija sa rastvorom streptavidin-HRP je bila 30 minuta na sobnoj temperaturi i posle pranja ploče, bazenima je dodato po 100  $\mu\text{l}$  rastvora supstrata tetrametil benzidina (TMB). Ploča je zatim ostavljena na tamnom mestu, kako bi se razvila boja, a nakon zaustavljanja enzimske reakcije apsorbancija je očitavana na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija IL-1 $\beta$  u supernatantima ćelijskih kultura izračunata prema standardnoj krivi koja je konstruisana prema poznatim, dvostruko opadajućim koncentracijama standardnih rastvora u opsegu 2500-25,6 pg/ml. Ovim kitom se mogu detektovati koncentracije IL-1 $\beta$   $\leq$  12 pg/ml u ispitivanim uzorcima.

**Koncentracija IL-6** određivana je pomoću komercijalnog Legend max™ rat ELISA Kit-a. Nakon ispiranja ploča obloženih sa anti-IL-6 vezujućim antitelom, naliveno je po 100  $\mu\text{l}$  uzorka i standarda u triplikatu. Mikrotitracione ploče su inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi, bazeni isprani puferom i dodato je po 100  $\mu\text{l}$  anti-IL-6 antitela konjugovanog biotinom. Posle inkubacije od 1 h na sobnoj temperaturi uz mešanje, bazeni su ispirani i sledila je inkubacija sa 100  $\mu\text{l}$  avidin-HRP-a 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, ploče su inkubirane 10 minuta u mraku u rastvoru supstrata. Rastvorom za zaustavljanje reakcije prekinuto je razvijanje boje, a intenzitet razvijene boje je očitavan na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija IL-6 u uzorcima ekstrapolirana je sa standardne krive koja je

napravljena prema poznatim, dvostruko opadajućim koncentracijama standardnih rastvora od kojih je početna bila 1200 pg/ml i najniža je bila 18,8 pg/ml. Prosečna minimalna koncentracija IL-6 koju je moguće detektovati ovim testom je <6,2 pg/ml.

**Koncentracija TNF- $\alpha$**  određivana je komercijalnim ELISA MAX™ Deluxe Setom, prema uputstvu proizvođača. Bazeni mikrotitracione ploče se jedan dan pre izvođenja testa oblažu sa 100  $\mu$ l specifičnog monoklonskog antitela protiv pacovskog TNF- $\alpha$  (razblaženje 1:200). Ploča je inkubirana preko noći na +4°C, a sledećeg dana bazeni su isprani 4 puta sa 300  $\mu$ l PBS/0,05% Tween 20 i dodato je po 200  $\mu$ l komercijalnog rastvarača da bi se sprečilo nespecifično vezivanje. Nakon inkubacije tokom 1 h na orbitalnoj mešalici i ispiranja, u bazene je dodato po 100  $\mu$ l standarda/uzoraka u triplikatu koji su inkubirani tokom 2 h na orbitalnoj mešalici na sobnoj temperaturi. Bazeni su zatim isprani i u svaki bazen je dodato 100  $\mu$ l anti-TNF- $\alpha$  detekcionog antitela obeleženog biotinom (razblaženje 1:200) i uzorci su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Nakon ispiranja ploča, naliveno je 100  $\mu$ l avidina obeleženog peroksidazom rena (engl. horse radish peroxidase, HRP) u razblaženju 1:1000. Nakon inkubacije 30 minuta, ploče su isprane, a u bazene je naliveno po 100  $\mu$ l sveže pripremljenog rastvora supstrata. Nakon inkubacije u mraku, reakcija je zaustavljena dodavanjem po 100  $\mu$ l 4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Intenzitet boje meren je na talasnoj dužini 450 nm na spektrofotometru, a koncentracija TNF- $\alpha$  u uzorcima supernatanta izračunata prema standardnoj krivi napravljenoj na osnovu standarda poznatih, dvostruko opadajućih koncentracija počev od 1000 do 15,6 pg/ml. Minimalna detektabilna koncentracija TNF- $\alpha$  ovim kitom je 2 pg/ml.

**Koncentracija TGF- $\beta$**  određivana je korišćenjem Quantikine® ELISA. Kako bi se latentni TGF- $\beta$  preveo u imunoaktivni oblik, pre početka izvođenja testa 100  $\mu$ l uzorka je pomešano sa 20  $\mu$ l 1M HCl-a i inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi. Posle toga su uzorci neutralisani sa 20  $\mu$ l 1.2M NaOH/0.5 M HEPES-a i kao takvi korišćeni u testu za određivanje koncentracije TGF- $\beta$ . Ploče obložene vezujućim anti-TGF- $\beta$  antitelom su inkubirane 2h na sobnoj temperaturi sa standardom/uzorkom u triplikatu. Posle ispiranja dodato je 100  $\mu$ l anti-TGF- $\beta$ 1 antitela konjugovanog sa enzimom. Nakon inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi, bazeni su ispirani i inkubirani 30 minuta sa rastvorom supstrata. Reakcija je zaustavljena i intenzitet razvijene boje očitavan na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija TGF- $\beta$ 1 izračunata je na osnovu standardne krive čiji je opseg bio od 15,6 - 1000pg/ml. Minimalna koncentracija TGF- $\beta$ 1 koja se može detektovati ovim testom je 4,6 pg/ml.

**Koncentracija IL-10** određivana je pomoću komercijalnog R&D Systems® rat ELISA Kit-a. Ploče obložene vezujućim anti-IL-10 antitelom su inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi sa standardom/uzorkom u triplikatu, bazeni isprani 4 puta puferom i dodato je po 100  $\mu$ l anti-IL-10 antitela konjugovanog biotinom. Posle inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi uz mešanje, bazeni su ispirani i sledila je inkubacija sa 100  $\mu$ l avidin-HRP-a 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispranja ploče, uzorci su inkubirani 10 minuta u mraku u rastvoru supstrata. Nakon zaustavljanja reakcije, intenzitet razvijene boje očitavan je na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija IL-10 u uzorcima ekstrapolirana je sa standardne krive, koja je napravljena prema poznatim, dvostruko opadajućim koncentracijama standardnih rastvora,



čiji je opseg koncentracija bio od 15,6 – 1000 pg/ml. Prosečna minimalna koncentracija IL-10 koju je moguće detektovati ovim testom je >10 pg/ml.

### **3.12. Ispitivanje direktnog modulišućeg delovanja estradiola *in vitro* na promene u citokinskom profilu TG makrofaga tokom reproduktivnog starenja**

Poseban deo studije koja je prethodila izradi ove disertacije je bio posvećen ispitivanju direktnog modulišućeg delovanja estradiola u opsegu koncentracija od  $10^{-12}M$  do  $10^{-8}M$  na produkciju  $H_2O_2$ , NO, uree i citokina adheriranih inflamatornih makrofaga peritonealne šupljine pacova. S obzirom da se koncentracija estradiola u cirkulaciji menja tokom ciklusa, kao i da koncentracija lokalno produkovanog estradiola u tkivu može da bude značajno različita u odnosu na njegove vrednosti u cirkulaciji, koncentracija korišćena u ovoj studiji ( $10^{-10}M$ ) je izabrana na osnovu vrednosti nivoa estradiola u serumu ženki pacova tokom proestrusa i u središnjem delu testisa, tik do eferentnih semenih kanala mužjaka. Najviša koncentracija estradiola kojoj makrofage izolovane iz peritonealne šupljine mogu biti izložene jeste  $10^{-8}M$ , a ove vrednosti su zabeležene u krvi vena ovarijuma reproduktivno zrelih ženki u proestrusu (Lu i sar, 1979).

U *in vitro* istraživanju u ovoj disertaciji je izabrana koncentracija estradiola od  $10^{-10}M$ , jer su delovanjem estradiola u ovoj koncentraciji zapažene najveće promene u sekretornoj i funkcijskoj aktivnosti makrofaga.

### **3.13. Statistička evaluacija rezultata**

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Korišćena je metoda jednofaktorske i dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) uz primenu Bonferroni testa za *post hoc* poređenje. Statistička obrada podataka je vršena statističkim programom GraphPad Prism 5 (GraphPadSoftware, Inc., CA, USA). Statistički značajnom je smatrana vrednost  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

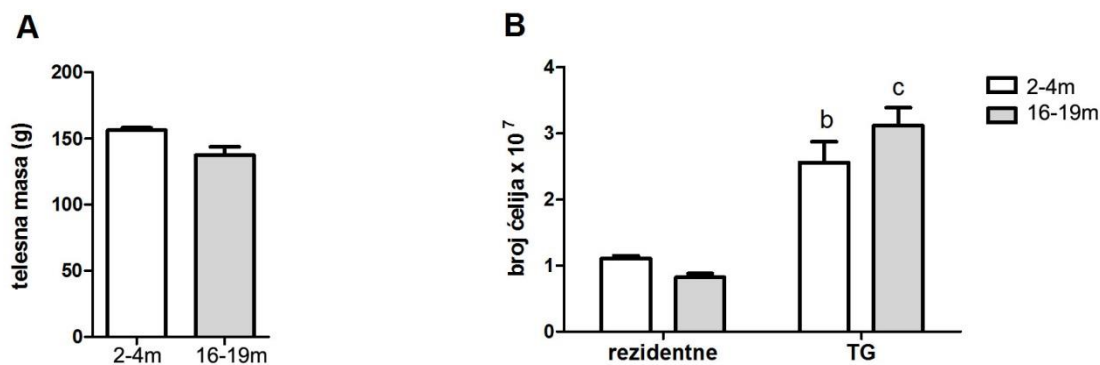
### 4.1. UTICAJ REPRODUKTIVNOG STARENJA NA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE KARAKTERISTIKE REZIDENTNIH I TIOGLIKOLATNIM MEDIJUMOM INDUKOVANIH ČELIJA PERITONEALNE ŠUPLJINE ŽENKI AO SOJA PACOVA

Makrofage odgovaraju na različite signale iz mikrosredine menjajući fenotipske i funkcijske karakteristike (Xu i sar, 2013). Shodno tome ispitivan je značaj reproduktivnog starenja za fenotipske i funkcijske karakteristike makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine intaktnih ženki pacova AO soja i pacova kojima je indukovano peritonitis TG medijumom.

#### 4.1.1. Telesna masa i broj rezidentnih i tioglikolatnim medijumom indukovanih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova

Telesna masa AO pacova nije se značajno razlikovala između grupa (Sl.2A). Broj ćelija koje su izolovane iz peritonealne šupljine životinja nije se značajno razlikovao između mladih i sredovečnih ženki pacova AO soja (Sl. 2B).

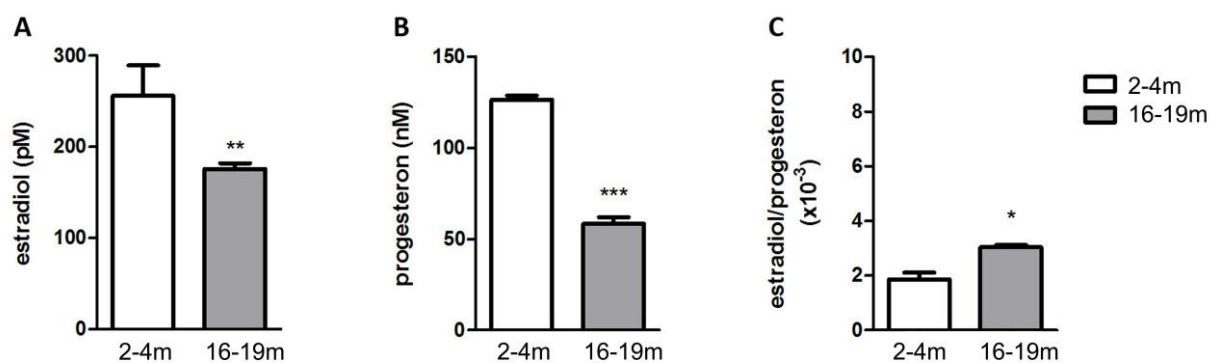
Intraperitonealno ubrizgavanje tioglikolata je dovelo do značajnog povećanja broja ćelija u peritonealnom eksudatu i kod mladih i kod sredovečnih ženki AO pacova. Starenje nije uticalo na ukupan broj ćelija.



Slika 2. Uticaj reproduktivnog starenja na (A) telesnu masu i (B) ukupan broj rezidentnih i tioglikolatnom indukovanih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine ženki pacova AO soja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: <sup>b</sup>p<0,01; <sup>c</sup>p<0,001 vs. rezidentne ćelije.

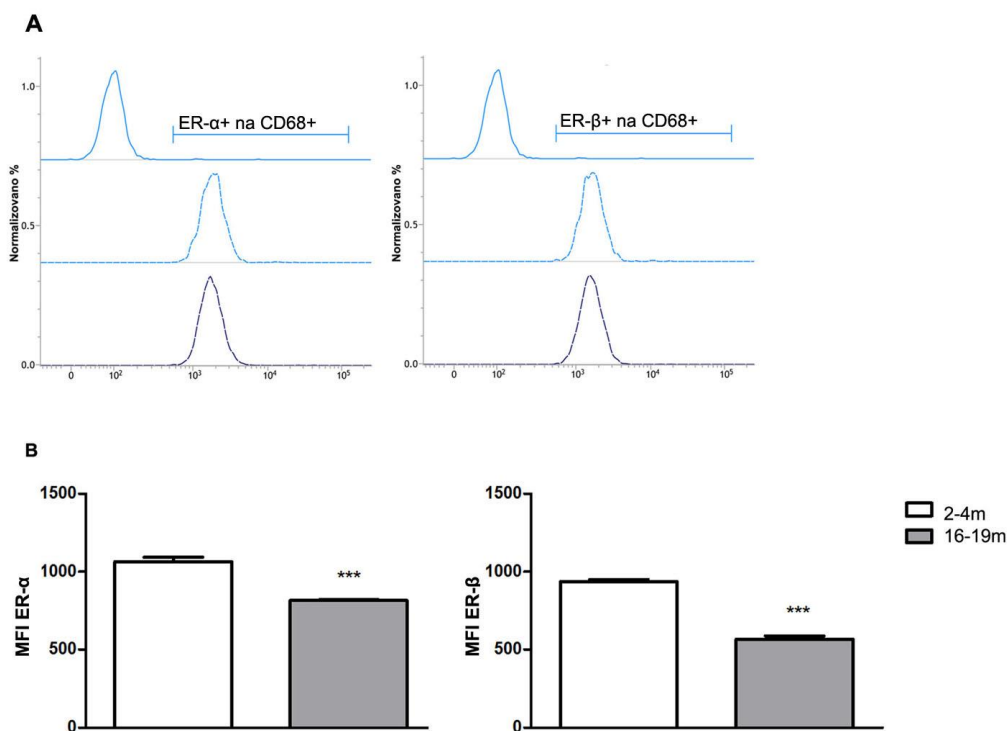
#### 4.1.2. Značaj promene odnosa serumskih koncentracija estradiola i progesterona tokom reproduktivnog starenja ženki AO pacova

Nalazi ove teze ukazuju da se reproduktivnim starenjem smanjuje koncentracija estradiola i progesterona u serumu ženki pacova (Sl. 3A, B). Koncentracija estradiola u serumu sredovečnih je bila oko 20% niža, a progesterona 52% niža u odnosu na vrednosti kod mladih ženki. Posledično, odnos estradiola i progesterona u serumu je bio značajno veći kod sredovečnih u odnosu na mlade ženke (Sl. 3).



Slika 3. Grafici predstavljaju koncentracije (A) estradiola (pM), (B) progesterona (nM) i (C) njihovog odnosa (estradiol/progesteron  $\times 10^{-3}$ ) merene u serumima ženki AO pacova. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade.

Sve CD68+ makrofage su eksprimirale ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  (Sl. 4A). Gustina ekspresije, sudeći prema srednjem intenzitetu fluorescencije (engl. mean fluorescence intensity, MFI) ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  je bila značajno niža u peritonealnim makrofagama sredovečnih u odnosu na mlade ženke pacova AO soja (Sl. 4B).



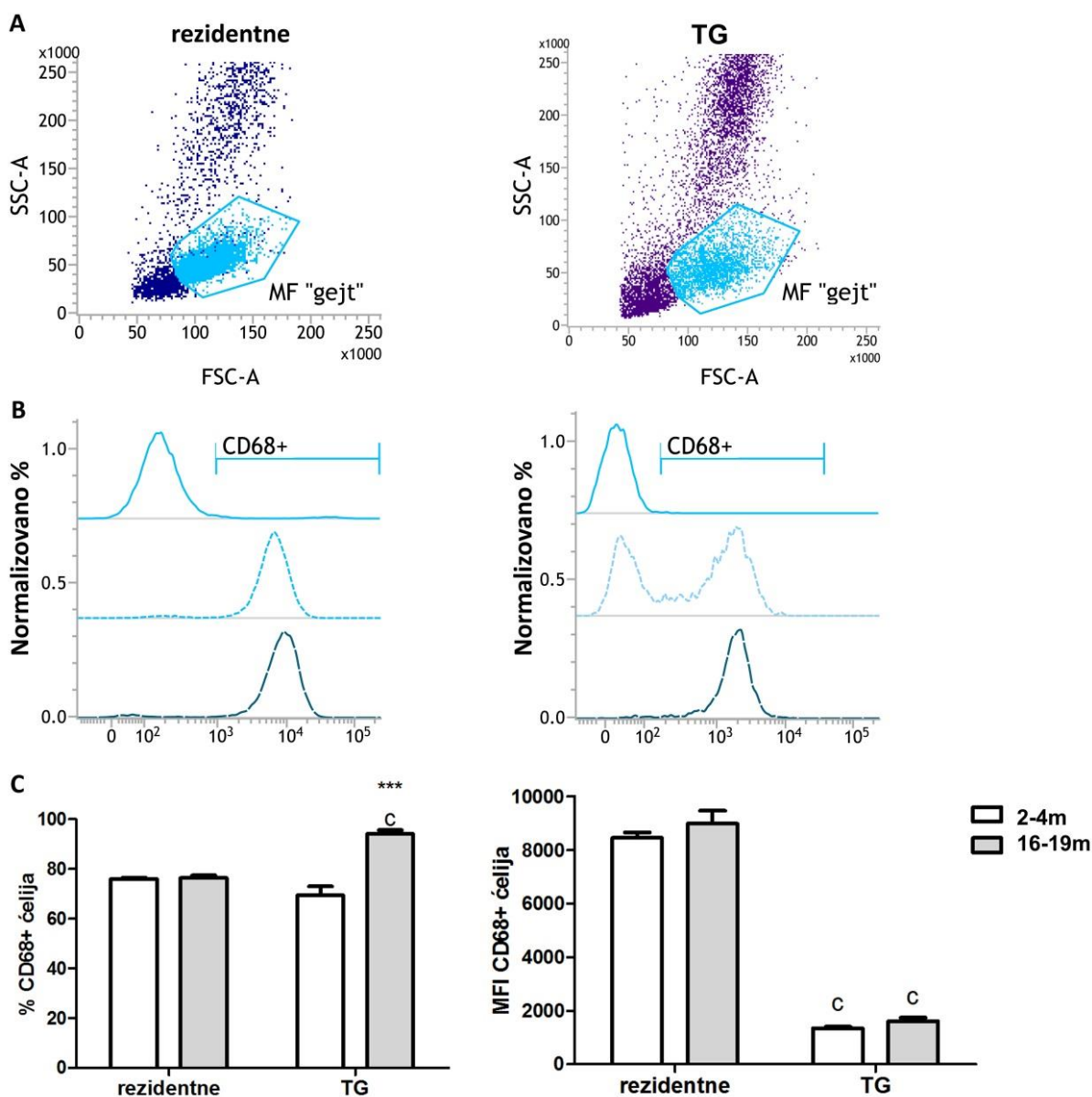
Slika 4. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami (A) ER- $\alpha$  (levo) i ER- $\beta$  (desno) (izotipska kontrola-puna linija, 2-4m-svetla, isprekidana i 16-19m-tamna, isprekidana linija). (B) Gustina ekspresije ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  u TG makrofagama izolovanih iz peritonealne šupljine ženki pacova AO soja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade.

#### **4.1.3. Fenotipski profil rezidentnih i TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova**

Ćelije izolovane iz peritonealne šupljine su analizirane na protočnom citofluorimetru u okviru populacije ćelija koja na osnovu svoje veličine (FSC) i stepena granuliranosti (SSC) odgovaraju makrofagama (makrofagni „gejt“).

Makrofage pacova se obično identifikuju na osnovu unutarćelijske ekspresije lizozomalnog markera CD68 (pan-makrofagni marker kod pacova) korišćenjem za njega specifičnog ED1 monoklonskog antitela (Dijkstra i sar, 1985). Analiza na protočnom citofluorimetru je pokazala da oko 80% rezidentnih ćelija peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki eksprimira CD68 molekul. Indukcija peritonitisa ubrizgavanjem tioglikolata nije dovela do promene procenta CD68+ ćelija kod mladih, ali je kod sredovečnih ženki porastao procenat CD68+ ćelija, tako da je zastupljenost CD68+ ćelija u populaciji tioglikolatom indukovanih ćelija bila značajno veća kod sredovečnih u odnosu na mlade AO ženke (Sl. 5C).

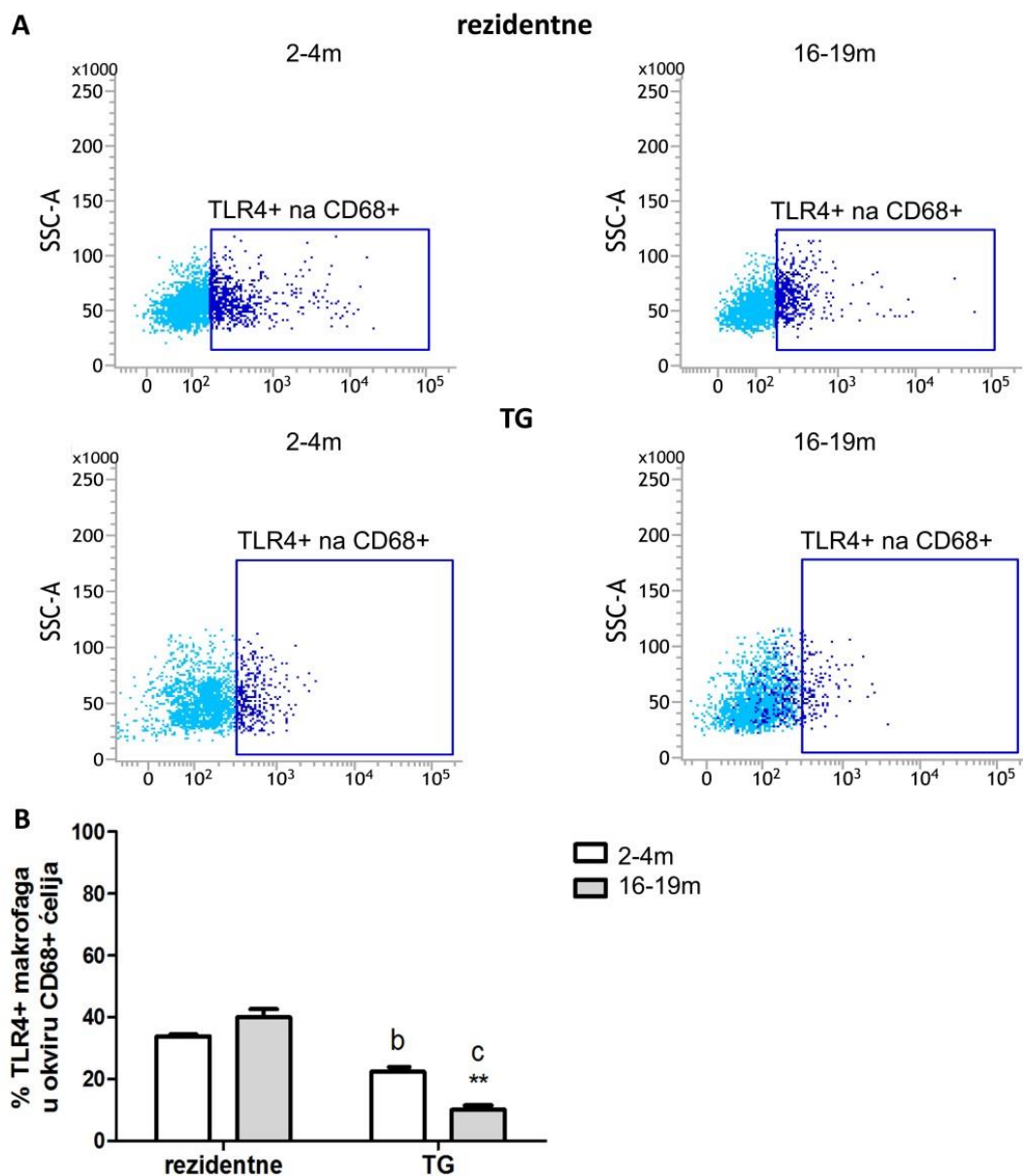
Gustina ekspresije CD68 molekula na CD68+ ćelijama se nije menjala tokom starenja, ali je bila značajno manja na TG makrofagama u odnosu na rezidentne (Sl. 5C).



Slika 5. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profil (A) i histogram (B) rezidentnih (levo) i tioglikolatom indukovanih (desno) ćelija u makrofagnom „gejtu“ izolovanih iz peritonealne šupljine ženki pacova AO soja (izotipska kontrola-puna linija, 2-4m-svetla, isprekidana i 16-19m-tamna, isprekidana linija) (C) Grafici prikazuju uticaj reproduktivnog starenja na (levo) procentualnu zastupljenost CD68+ ćelija u okviru makrofagnog „gejta“ i (desno) gustinu CD68 molekula po CD68+ ćeliji u populaciji rezidentnih i TG makrofaga. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade i <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. rezidentne ćelije.

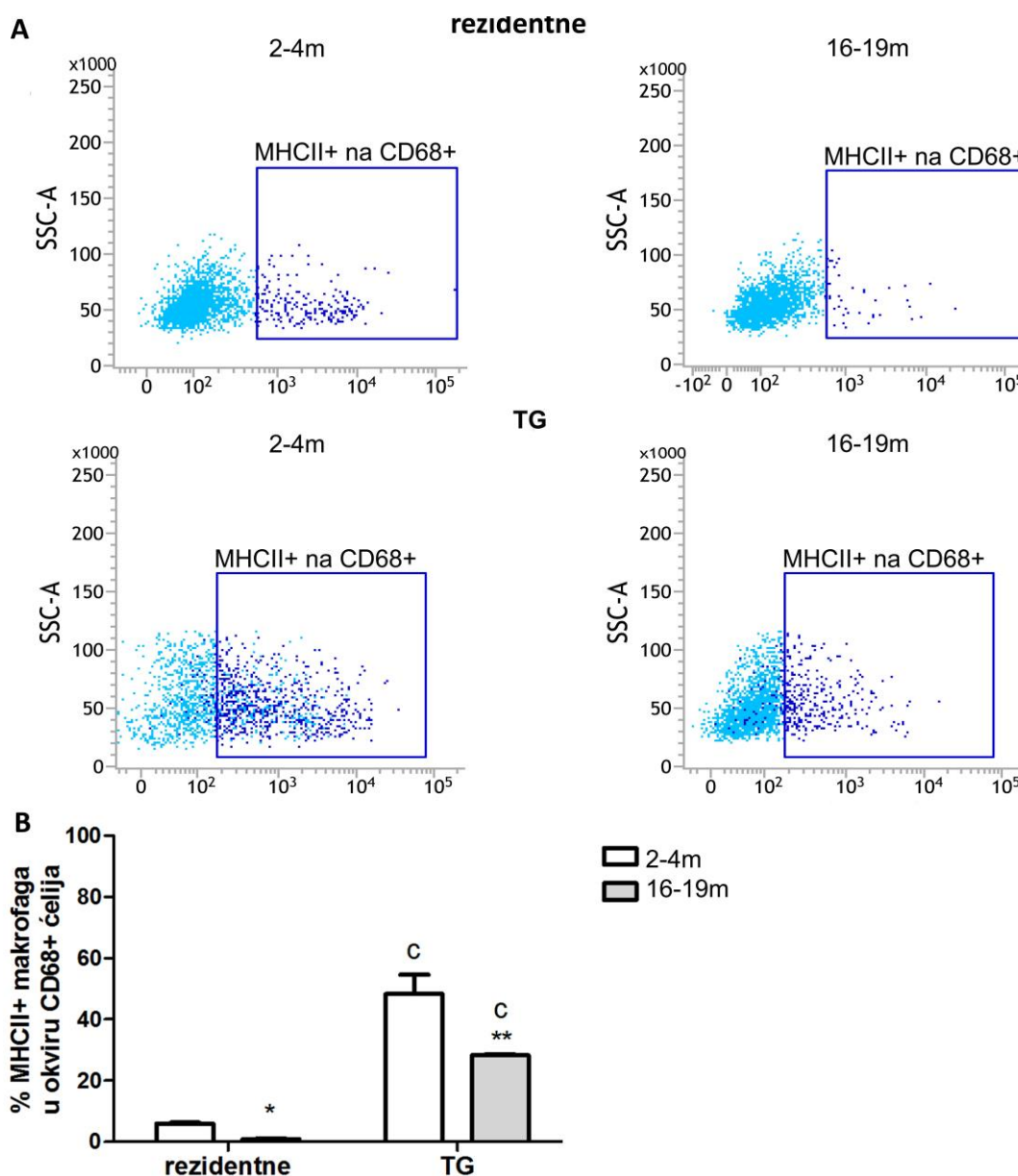
Kako bi se ispitao uticaj reproduktivnog starenja na aktivacioni status rezidentnih i CD68+ TG makrofaga, ćelije su obeležavane antitelima koja prepoznaju molekule TLR4, MHCII, CD169 i CCR7.

TLR4 molekul učestvuje u odgovoru ćelije na stimulaciju LPS-om (Kawai i Akira, 2010). Procenat CD68+ makrofaga koje ekspiriraju TLR4 se nije razlikovao u populaciji rezidentnih CD68+ makrofaga poreklom od mladih u odnosu na sredovečne ženke (Sl. 6A). Međutim, u populaciji CD68+ TG makrofaga procenat TLR4+ ćelija je bio značajno niži u grupi sredovečnih u odnosu na mlade ženke. Ubrizgavanje tioglikolata je dovelo do smanjenja procenta TLR4+ makrofaga u peritonealnoj šupljini kako mladih, tako i sredovečnih ženki pacova AO soja (Sl. 6B).



Slika 6. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (A) prikazuju ekspresiju TLR4 molekula u okviru CD68+ makrofaga (izdvojenih kao što je već prikazano na Sl. 5B) rezidentnih i TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki AO pacova. (B) Grafik prikazuje uticaj reproduktivnog starenja na procenat CD68+ makrofaga koje ekspiriraju TLR4 receptor u populaciji rezidentnih i TG makrofaga. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p<0,01 vs. mlade i b p<0,01, c p<0,001 vs. rezidentne ćelije.

MHCII molekuli, pored svoje uloge u prezentaciji antigena limfocitima (Buxadé i sar, 2018), zahvaljujući malom rastojanju od TLR4 molekula na membrani ćelije, sinergistički učestvuju u aktivaciji ćelije nakon stimulacije LPS-om (Frei i sar, 2010). Procenat CD68+ makrofaga koje eksprimiraju MHCII molekul se u populaciji rezidentnih ćelija smanjio starenjem (Sl. 7B). Ubrizgavanje tioglikolatnog medijuma dovelo je do dramatičnog porasta CD68+ ćelija koje eksprimiraju MHCII molekul i kod mladih i kod sredovečnih životinja. Reproductivnim starenjem se, kao i kod rezidentnih, i kod TG makrofaga smanjio procenat CD68+ ćelija koje eksprimiraju MHCII molekul (Sl. 7B).



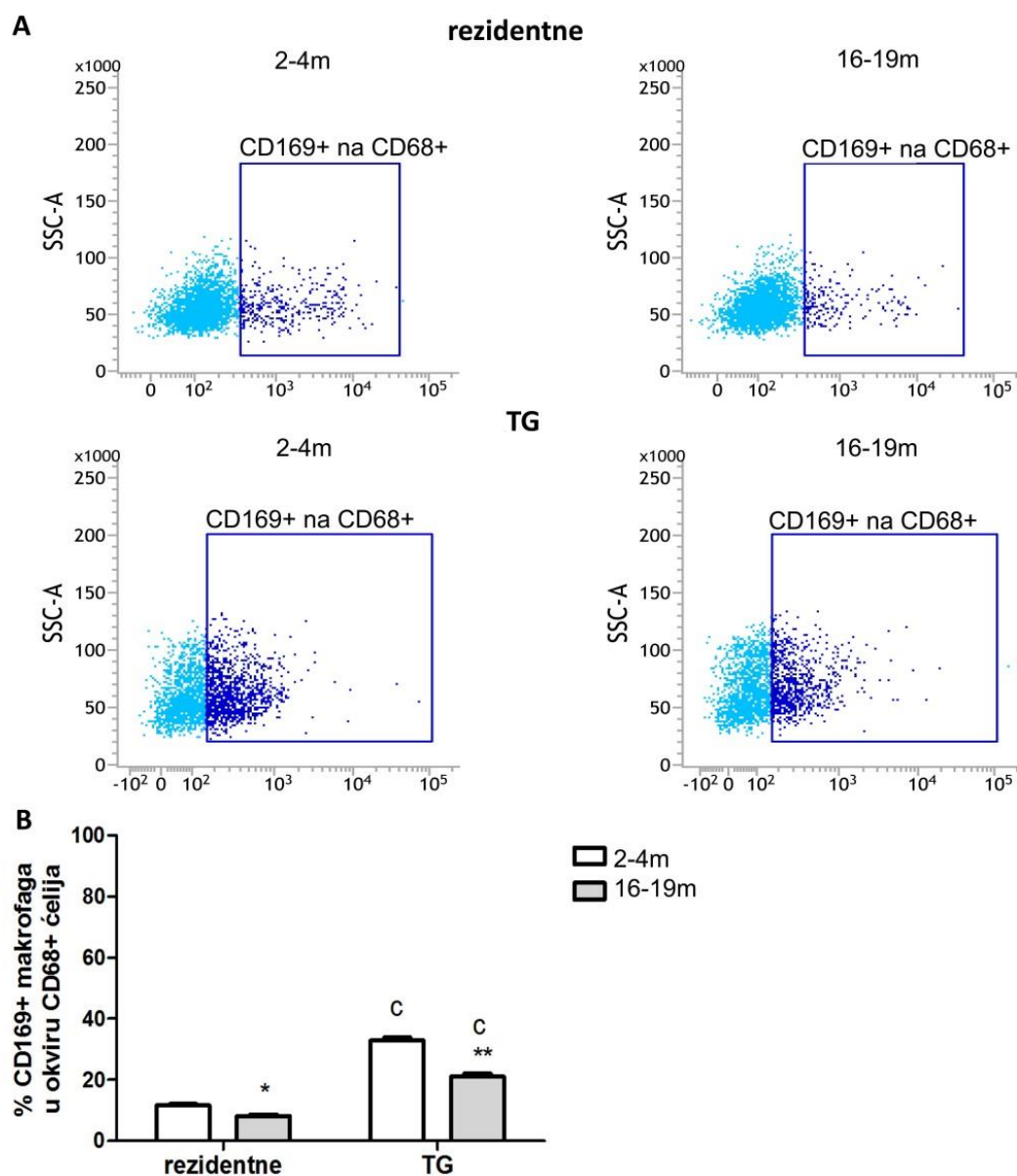
Slika 7. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (A) prikazuju ekspresiju MHCII molekula u okviru CD68+ makrofaga (izdvojenih kao što je već prikazano na Sl. 5B) rezidentnih i TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki AO pacova. (B) Grafik prikazuje uticaj reproduktivnog starenja na procenat CD68+ makrofaga koje eksprimiraju MHCII molekul u populaciji rezidentnih i TG makrofaga. Rezultati su prikazani kao srednja

---

vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade i c  
 $p < 0,001$  vs. rezidentne ćelije.

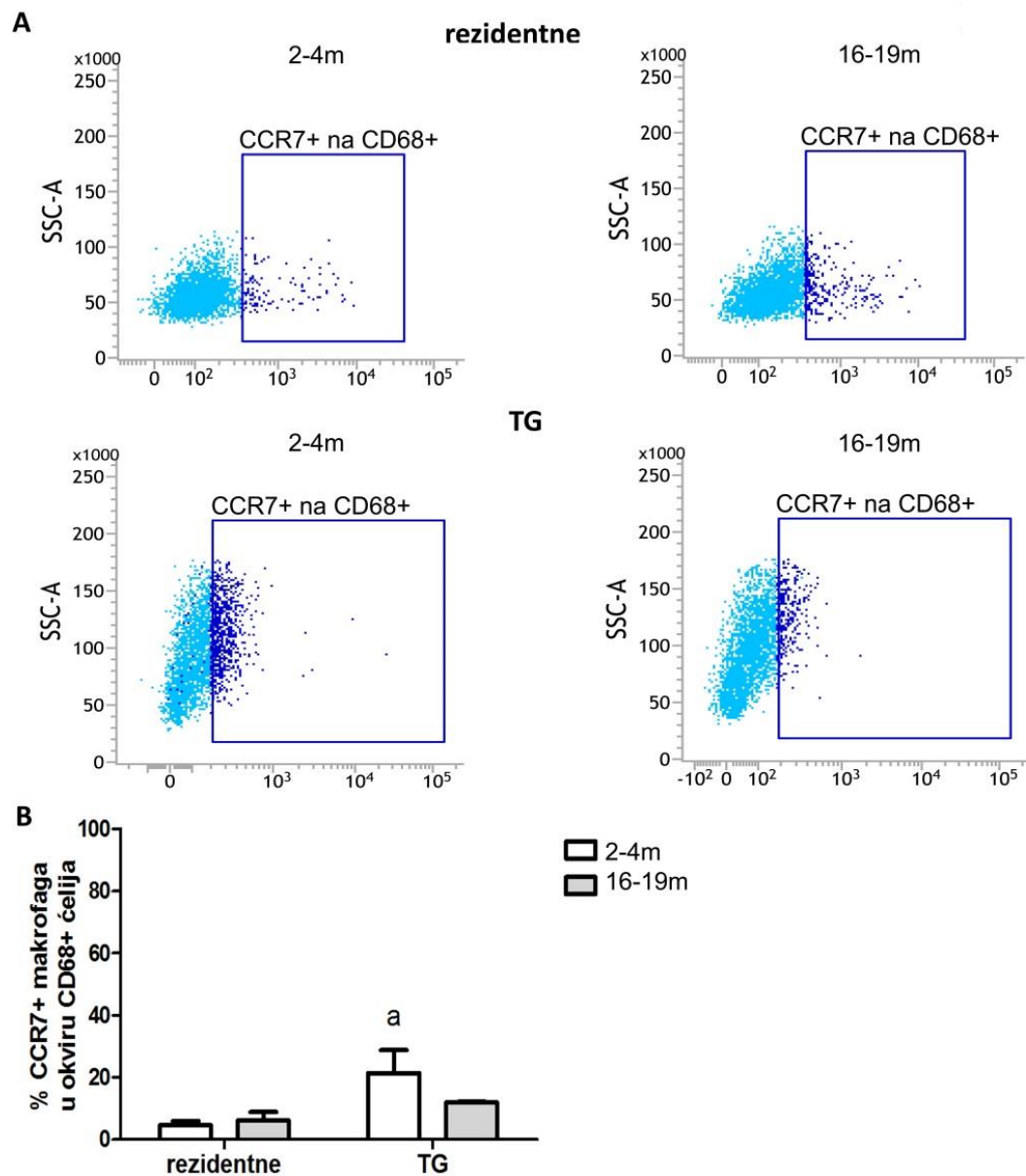


CD169 molekul, iako uglavnom opisan na makrofagama limfnih tkiva, prisutan je i na makrofagama duž krvnih sudova, gde smanjuje inluks neutrofila i u fiziološkim (Karasawa i sar, 2015) i u inflamatornim uslovima (Khmelewski i sar, 2004), uključujući i TG indukovani peritonitis (Oetke i sar, 2006). Ovi nalazi ukazuju na antiinflamatornu ulogu CD169+ makrofaga, što bi moglo da implicira njihovu polarizaciju ka M2 makrofagama. Analiza ekspresije markera CD169 na našem modelu je pokazala da je procenat CD169+ ćelija bio niži u okviru CD68+ makrofaga sredovečnih u odnosu na mlade ženke u populaciji rezidentnih, kao i u populaciji TG indukovanih ćelija. Ubrizgavanje tioglikolata značajno povećava procenat CD68+ ćelija koje eksprimiraju CD169 molekul u ženki obe starosti pacova AO soja (Sl. 8B).



Slika 8. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (A) prikazuju ekspresiju CD169 molekula u okviru CD68+ makrofaga (izdvojenih kao što je već prikazano na Sl. 5B) rezidentnih i TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki AO pacova. (B) Grafik prikazuje uticaj reproduktivnog starenja na procenat CD68+ makrofaga koje eksprimiraju CD169 molekul u populaciji rezidentnih i TG makrofaga. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \* p<0,05, \*\* p<0,01 vs. mlade i <sup>c</sup> p<0,001 vs. rezidentne ćelije.

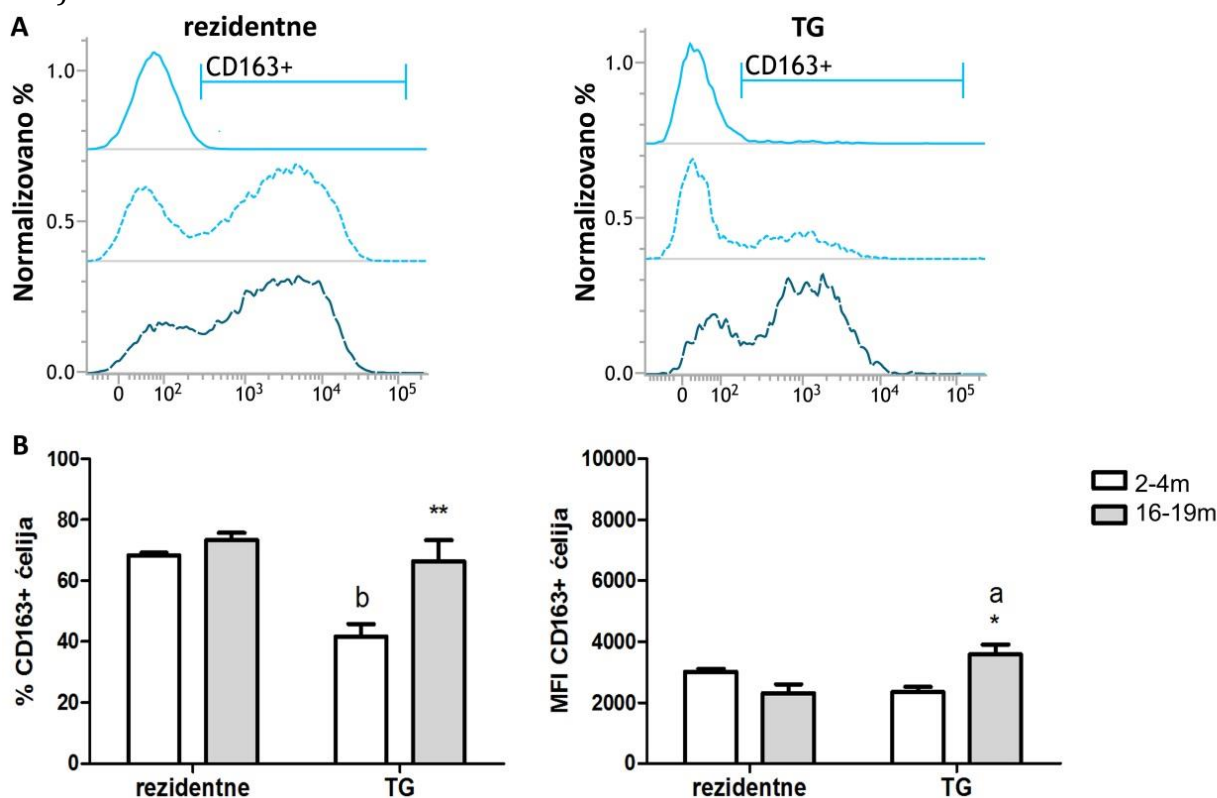
CCR7 je marker makrofaga monocitnog porekla (Gordon i Taylor, 2005) i uglavnom ukazuje na polarizaciju makrofaga ka M1 inflamatornom fenotipu (Martinez i sar, 2006). Za razliku od ekspresije MHCII i CD169 molekula, procenat rezidentnih i TG ćelija koje eksprimiraju CCR7 molekul u okviru CD68+ makrofaga se nije menjao značajno starenjem (Sl. 9A). Ubrizgavanje tioglikolatnog medijuma dovelo je do povećanja procenta CCR7+ u okviru CD68+ makrofaga samo kod mladih AO ženki (Sl. 9B).



Slika 9. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (A) prikazuju ekspresiju CCR7 molekula u okviru CD68+ makrofaga (izdvojenih kao što je već prikazano na Sl. 5B) rezidentnih i TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki AO pacova. (B) Grafik prikazuje uticaj reproduktivnog starenja na procenat CD68+ makrofaga koje eksprimiraju CCR7 molekul populaciji rezidentnih i TG makrofaga. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. rezidentne ćelije.

Molekul CD163 (prepoznaje ga ED2 monoklonsko antitelo) se ispoljava na diferenciranim, zrelim, tkivnim makrofagama (Polfliet i sar, 2006). Procenat CD163+ ćelija bio je sličan u suspenzijama rezidentnih ćelija dobijenih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki pacova AO soja (Sl. 10A). Ubrizgavanje tioglikolatnog medijuma je dovelo do smanjenja procenta CD163+ ćelija kod mladih, ali ne i sredovečnih ženki, te je zastupljenost CD163+ ćelija u populaciji TG makrofaga bila značajno viša kod sredovečnih u odnosu na mlade AO ženke (Sl. 10B levo).

Gustina ekspresije CD163 molekula se nije menjala tokom reproduktivnog starenja kod rezidentnih CD163+ ćelija, dok je na CD163+ TG makrofagama bila veća u grupi sredovečnih životinja (Sl. 10B).



Slika 10. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami (A) rezidentnih (levo) i TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki pacova AO soja (izotipska kontrola-puna linija, 2-4m-svetla, isprekidana i 16-19m-tamna, isprekidana linija). (B) Grafici prikazuju uticaj starenja na (levo) procentualnu zastupljenost CD163+ ćelija okviru makrofagnog „gejta“ i (desno) gustinu CD163 molekula po CD163+ ćeliji, u populaciji rezidentnih i TG ćelija. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade i <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs. rezidentne ćelije.

---

S obzirom da ubrizgavanje TG dovodi do intenzivnijeg porasta u ekspresiji molekula aktivacije makrofaga mladih u odnosu na sredovečne životinje, a da reproduktivno starenje ne menja ili smanjuje njihovu ekspresiju na makrofagama, rezultati ukazuju na značaj aktivacionog statusa ćelija peritoneuma za ishod modulacije njihove aktivnosti indukovane reproduktivnim starenjem.

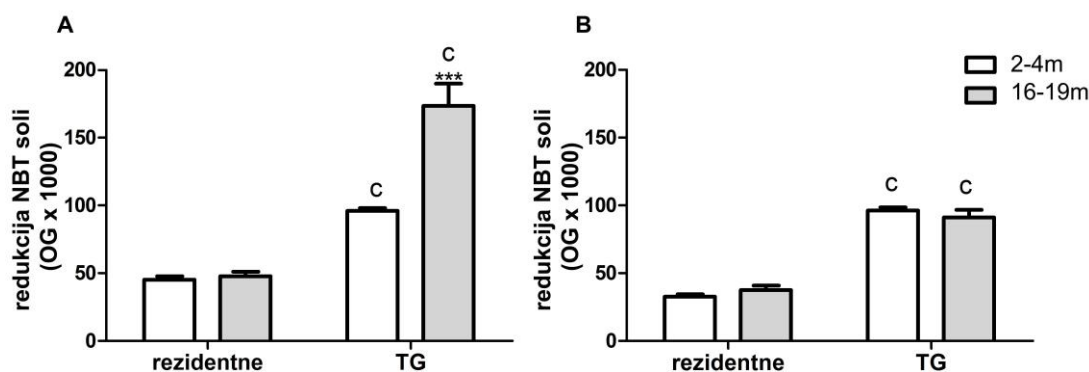
#### 4.1.4. Funkcijske karakteristike rezidentnih i TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova

Kako bi se ispitale funkcijske i sekretorne sposobnosti makrofaga peritonealne šupljine, odgovarajući testovi su rađeni nakon adherence makrofaga (postupak objašnjen u Materijalu i metodama na Sl. 1.).

##### 4.1.4.1. Fagocitna aktivnost

Fagocitoza zimozana dovodi do oksidativnog praska u makrofagama, odnosno produkcije superoksidnih anjona koji redukuju žute NBT soli do plavih formazana. Intenzitet plave boje indirektno ukazuje na stepen redukcije NBT soli i fagocitnu sposobnost ćelije (Müller i sar, 1981).

Ukoliko su ćelije tokom 24h inkubirane samo u medijumu (RPMI, Sl. 11A), stepen NBT redukcije je bio sličan u populaciji rezidentnih makrofaga sredovečnih i mladih ženki pacova AO soja, dok su TG makrofage sredovečnih ženki intenzivnije redukovale NBT u odnosu na ćelije mladih ženki. Ukoliko su ćelije dodatno *in vitro* stimulisane LPS-om (Sl. 11B), nije bilo razlika u sposobnosti redukcije NBT između ćelija mladih i sredovečnih ženki, bez obzira na indukciju tioglikolatom. Ubrizgavanje tioglikolata je dovelo do značajnog povećanja redukcionih sposobnosti makrofaga ženki pacova obe starosti.

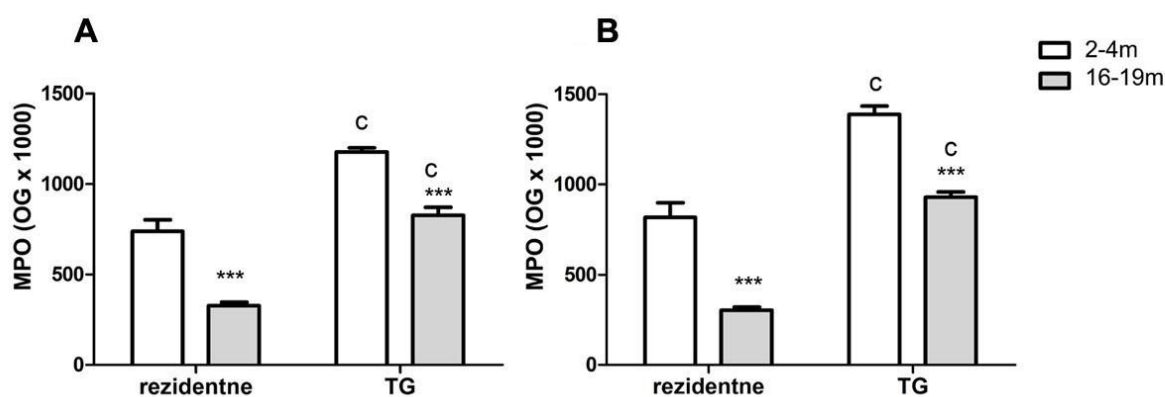


Slika 11. Uticaj reproduktivnog starenja na stepen redukcije NBT soli u populaciji rezidentnih i TG makrofaga koje su tokom 24h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (OG x 1000)  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\* p<0,001 vs. mlade i <sup>c</sup> p<0,001 vs. rezidentne ćelije.

## 4.1.4.2. Aktivnost mijeloperoksidaze – MPO

Aktivnost MPO je bila značajno niža u makrofagama sredovečnih u odnosu na makrofage mladih ženki pacova AO soja, i to kako u populaciji rezidentnih, tako i u populaciji TG makrofaga (Sl.12). Ubrizgavanje tioglikolata je dovelo do značajnog povećanja aktivnosti MPO u makrofagama ženki pacova obe starosti.

Međutim, kao i kod ćelija koje su inkubirane u medijumu (RPMI), tako i kod ćelija koje su dodatno *in vitro* stimulirane LPS-om tokom 24h, aktivnost MPO je bila niža u rezidentnim i TG makrofagama sredovečnih u odnosu na mlade ženke. Iako *in vitro* stimulacija LPS-om nije dovela do značajnog porasta u aktivnosti MPO (Sl. 12B).



Slika 12. Uticaj reproduktivnog starenja na aktivnost MPO u populaciji rezidentnih i TG makrofaga koje su tokom 24h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulirane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost optičkih gustina (OG x 1000)  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\* p<0,001 vs. mlade i c p<0,001 vs. rezidentne ćelije.

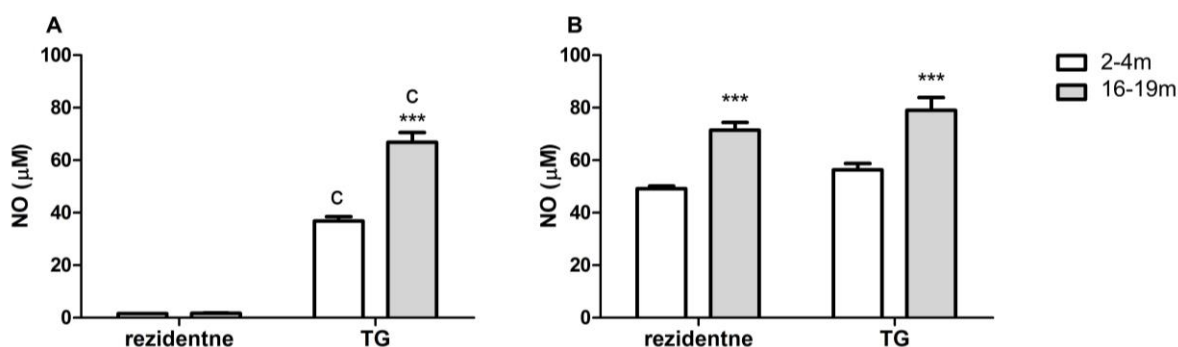
#### 4.1.5. Sekretorni profil rezidentnih i TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova

##### 4.1.5.1. Produkcija NO i uree

Od početnog uspostavljanja koncepta polarizacije makrofaga na M1 i M2 makrofage, iNOS i arginaza-1 smatraju se prototipskim markerom M1, odnosno M2 markera (Mills i sar, 2000). U kulturama makrofaga, sa ili bez LPS, merena je produkcija NO (marker aktivnosti iNOS-a) i uree (marker aktivnosti arginaze).

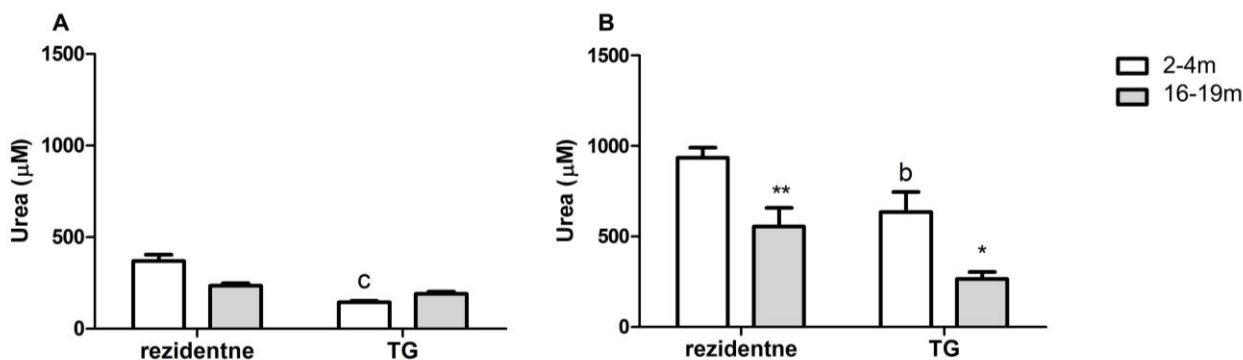
Ukoliko su makrofage tokom 24h inkubirane u medijumu (Sl. 13A), produkcija NO je bila detektabilna samo u populaciji TG makrofaga. TG makrofage izolovane iz sredovečnih ženki produkovale su više NO od ćelija mladih ženki AO pacova.

Ove razlike su se zadržale i nakon *in vitro* stimulacije LPS-om (Sl. 13B).



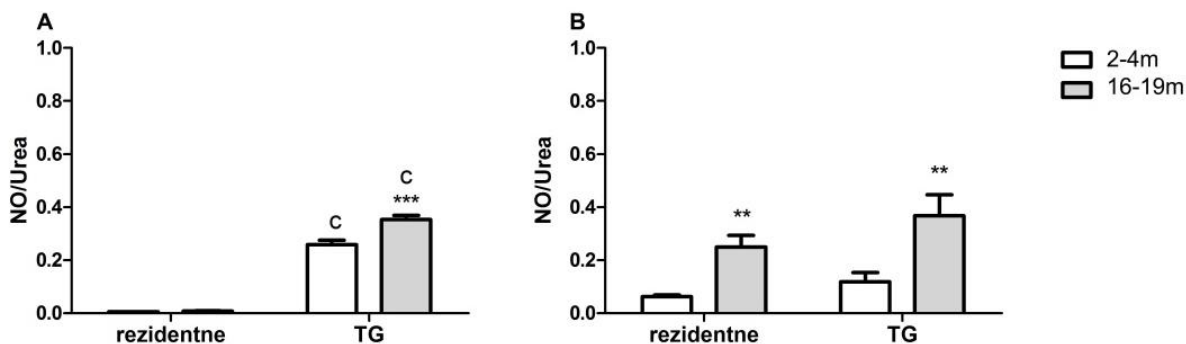
Slika 13. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju NO ( $\mu\text{M}$ ) u populaciji rezidentnih i TG ćelija koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade i <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. rezidentne ćelije.

Aktivnost enzima arginaze je određivana merenjem produkcije uree. Ukoliko su makrofage inkubirane u RPMI (Sl. 14A), produkcija uree, kako u rezidentnim, tako i u TG ćelijama izolovanim iz mladih i sredovečnih pacova je bila slična. Međutim, nakon stimulacije LPS-om produkcija uree u rezidentnim i TG makrofagama sredovečnih pacova je bila značajno niža u odnosu na produkciju u makrofagama mladih ženki (Sl. 14B). Ubrizgavanje tioglikolata je dovelo do smanjenja produkcije uree u ćelijama mladih ženki AO soja u odnosu na rezidentne ćelije, bez obzira na *in vitro* stimulaciju.



Slika 14. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju uree ( $\mu\text{M}$ ) u populaciji rezidentnih i TG makrofaga koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade i <sup>b</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. rezidentne ćelije.

S obzirom da iNOS i enzim arginaza koriste isti supstrat, L-arginin, za sintezu NO, odnosno uree, odnos između produkcije NO i uree može da ukaže na polarizaciju makrofaga ka inflamatornom ili antiinflamatornom fenotipu. Rezultati ovog ispitivanja su pokazali (Sl. 15) da je odnos NO i uree kod makrofaga sredovečnih u odnosu na mlade ženke pomećen u pravcu NO, bez obzira na prethodnu indukciju tioglikolatom ili stimulaciju LPS-om.

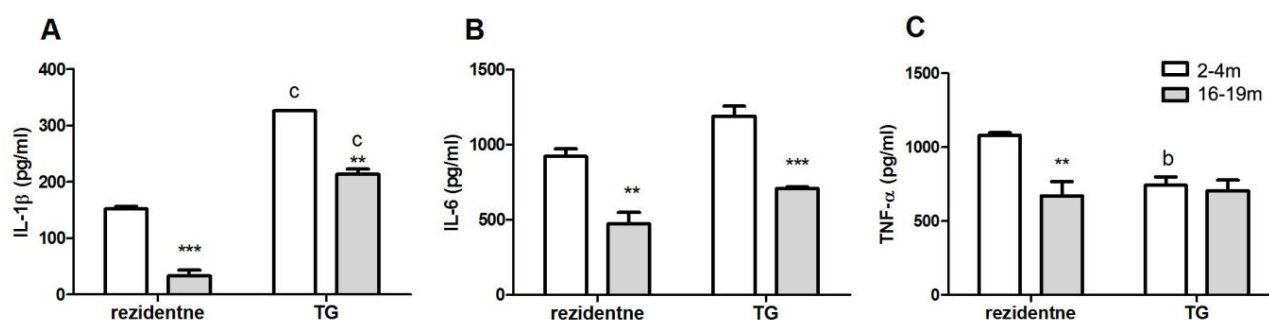


Slika 15. Uticaj reproduktivnog starenja na odnos NO/Urea u populaciji rezidentnih i TG makrofaga koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade i <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. rezidentne ćelije.



## 4.1.5.2. Produkcija proinflammatoryh citokina

Produkcija IL-1 $\beta$  (Sl. 16A) i IL-6 (Sl. 16B) je bila značajno niža u populaciji rezidentnih i TG makrofaga sredovečnih u odnosu na mlade ženke, dok je smanjenje TNF- $\alpha$  (Sl. 16C) tokom starenja primećeno samo u rezidentnim ćelijama pacova AO soja. Kod mladih životinja, indukcija makrofaga tioglikolatnim medijumom je dovelo do porasta u produkciji IL-1 $\beta$  i smanjenja u produkciji TNF- $\alpha$ , bez uticaja na produkciju IL-6 u odnosu na rezidentne ćelije. Međutim, ubrizgavanje tioglikolatnog medijuma je kod makrofaga sredovečnih životinja dovelo do značajnog porasta samo u produkciji IL-1 $\beta$ .



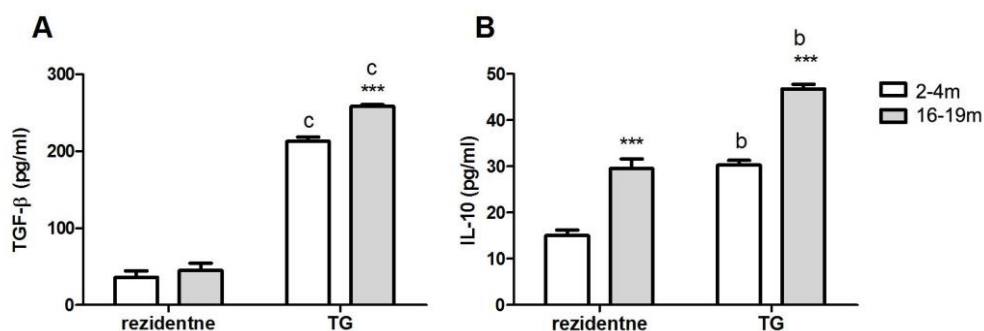
Slika 16. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 i (C) TNF- $\alpha$  u populaciji rezidentnih i TG makrofaga koje su tokom 24h stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 vs. mlade i <sup>b</sup> p < 0,01, <sup>c</sup> p < 0,001 vs. rezidentne ćelije.

Reproduktivnim starenjem se smanjuje oslobađanje proinflammatoryh citokina iz rezidentnih ćelija, kao i IL-1 $\beta$  i IL-6 iz TG indukovanih makrofaga.

#### 4.1.5.3. Produkcija antiinflamatornih citokina

U populaciji rezidentnih makrofaga sekrecija TGF- $\beta$  (Sl. 17A) se nije značajno menjala tokom starenja, dok je produkcija IL-10 bila značajno veća u makrofagama sredovečnih u odnosu na mlade ženke AO pacova (Sl. 17B). S druge strane u populaciji TG makrofaga, makrofage sredovečnih su produkovale značajno više TGF- $\beta$  i IL-10 u odnosu na mlade ženke (Sl. 17).

Ubrizgavanje tioglikolatnog medijuma je dovelo do porasta u produkciji oba antiinflamatorna citokina u odnosu na produkciju izmerenu kod rezidentnih makrofaga.



Slika 17. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju (A) TGF- $\beta$  i (B) IL-10 u populaciji rezidentnih i TG makrofaga koje su tokom 24h stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\* p<0,001 vs. mlade i <sup>b</sup> p<0,01; <sup>c</sup> p<0,001 vs. rezidentne ćelije.

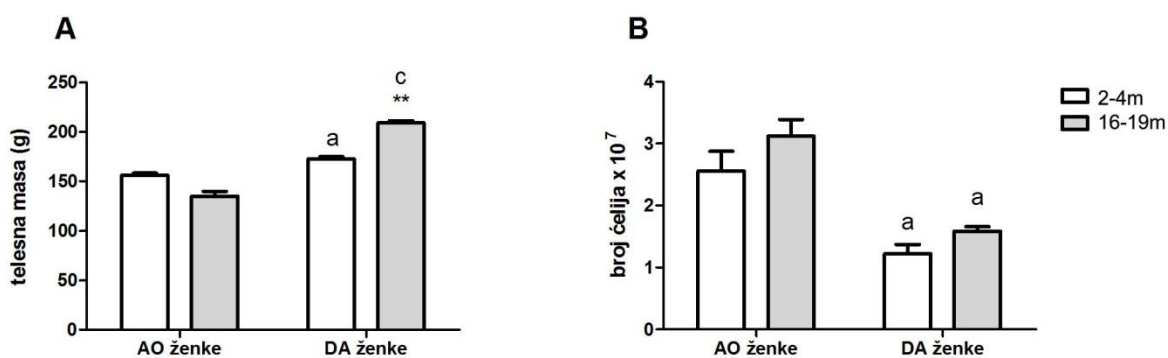
Za razliku od proinflamatornih citokina, reproduktivnim starenjem se povećavala koncentracija antiinflamatornih citokina, a TG je doveo do veće sinteze u odnosu na rezidentne ćelije.

## 4.2. UTICAJ GENETSKIH FAKTORA NA FENOTIPSKE I FUNKCIJSKE PROMENE PERITONEALNIH TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA

Da bi se ispitaio značaj genetskih faktora za inflamatorni odgovor makrofaga peritonealne šupljine tokom reproduktivnog starenja, u sledećem koraku su korišćeni pacovi dva genetski različita soja, DA i AO. U uslovima koji vladaju u štalici Instituta „Torlak“, pacovi AO i DA soja imaju različit životni vek.

### 4.2.1. Telesna masa i broj TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO i DA soja pacova

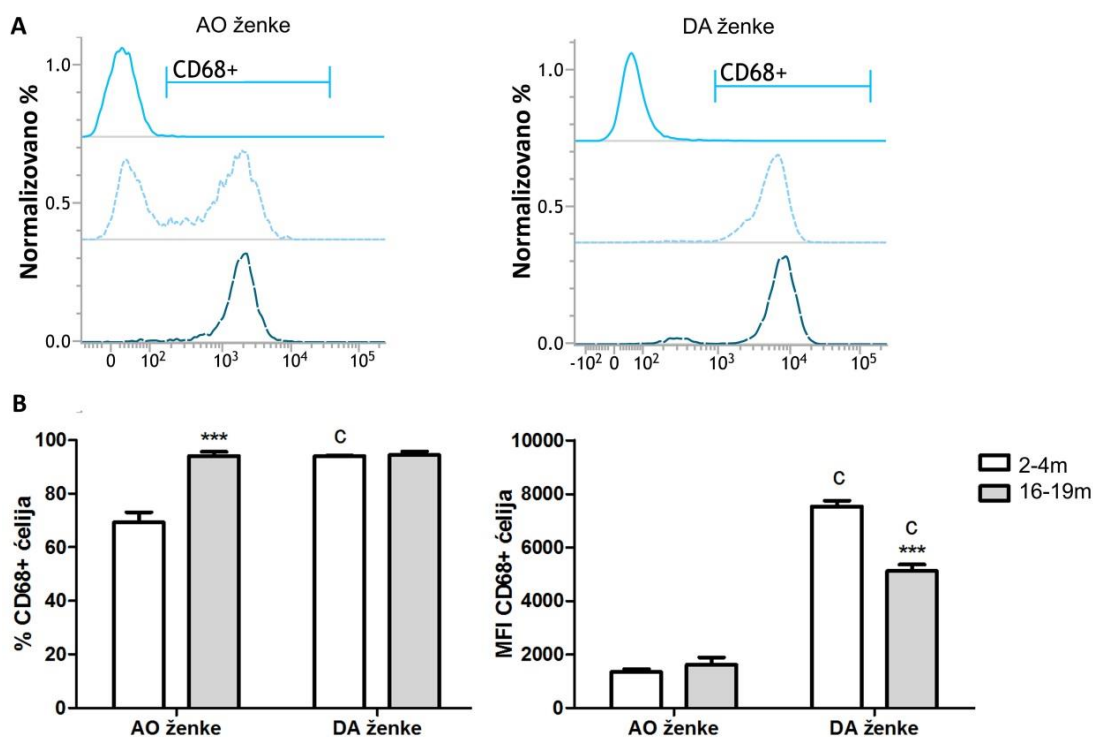
Za razliku od pacova AO soja, telesna masa kod ženki pacova DA soja se blago povećala (Sl. 18A). Ženke DA soja su imale veću telesnu masu u odnosu na ženke AO soja iz odgovarajućih starosnih grupa (Sl. 18A). Ukupan broj TG indukovanih ćelija u peritonealnom eksudatu (Sl. 18B) je bio značajno manji kod ženki obe starosti pacova DA u odnosu na AO soj (Sl. 18B), što ukazuje na manji prinos ćelija kod DA soja pacova. Ni u jednom soju starenjem nije došlo do promena u ukupnom broju ćelija koje su izolovane iz peritonealne šupljine.



Slika 18. Ispitivanje uticaja reproduktivnog starenja na (A) telesnu masu, (B) ukupan broj ćelija TG ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine ženki AO i DA soja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p < 0,01 vs. mlade i <sup>a</sup> p < 0,05, <sup>c</sup> p < 0,001 vs. AO ženke.

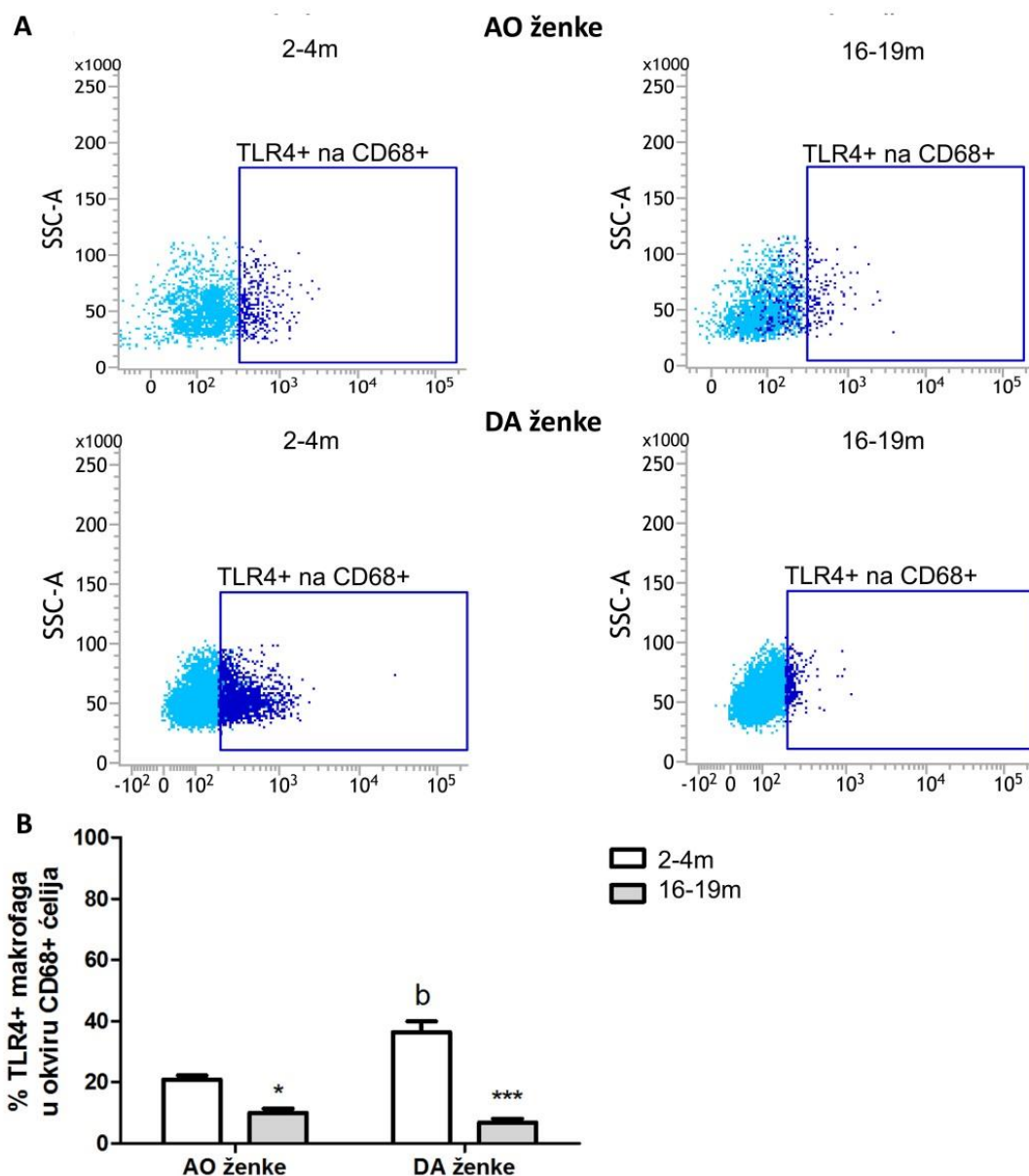
#### 4.2.2. Fenotipski profil TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO i DA soja pacova

Za razliku od ženki AO soja kod kojih je starenjem rasla procentualna zastupljenost CD68+ makrofaga, kod ženki DA soja u obe starosne grupe su gotovo sve ćelije eksprimirale CD68 molekul. Gustina ekspresije ovog molekula po ćeliji je bila značajno manja na makrofagama izolovanim iz AO ženki u odnosu na DA soj. Kod makrofaga ženki DA soja je starenjem opadala gustina ekspresije CD68 molekula (Sl. 19C), što ukazuje na razlike u stepenu diferencijacije ćelija peritoneuma ova dva soja pacova.



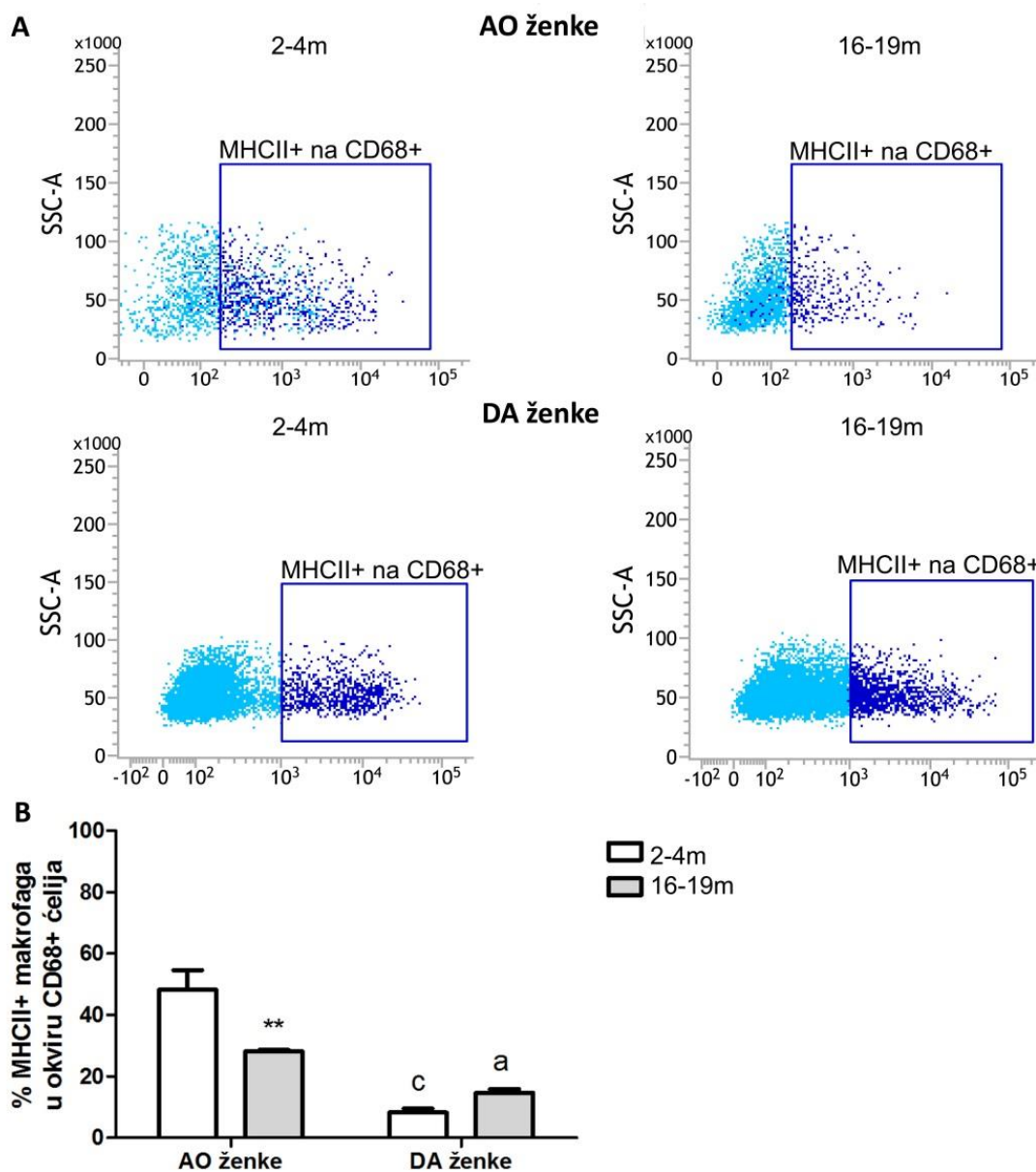
Slika 19. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami (A) TG makrofaga ženki (levo) AO soja i (desno) DA soja izolovanih iz peritonealne šupljine (izotipska kontrola-puna linija, 2-4m-svetla, isprekidana i 16-19m-tamna, isprekidana linija). Strategija izdvajanja makrofagnog „gejta“ je prikazana na Sl. 5A. Grafici (B) prikazuju uticaj reproduktivnog starenja na (levo) procentualnu zastupljenost CD68+ ćelija i (desno) gustinu ekspresije CD68 molekula po CD68+ ćeliji. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\* p<0,001 vs. mlade i <sup>c</sup> p<0,001 vs. AO ženke.

Ekspresija TLR4 receptora se starenjem smanjivala u makrofagama oba soja ženki (Sl. 20B). Mlade DA ženke su imale značajno veći procenat CD68+ makrofaga koje eksprimiraju TLR4 u odnosu na mlade ženke AO soja (Sl. 20B). Ovaj nalaz sugerije potencijalno jači odgovor nakon stimulacije LPS-om makrofaga mladih ženki DA u odnosu na AO soj.



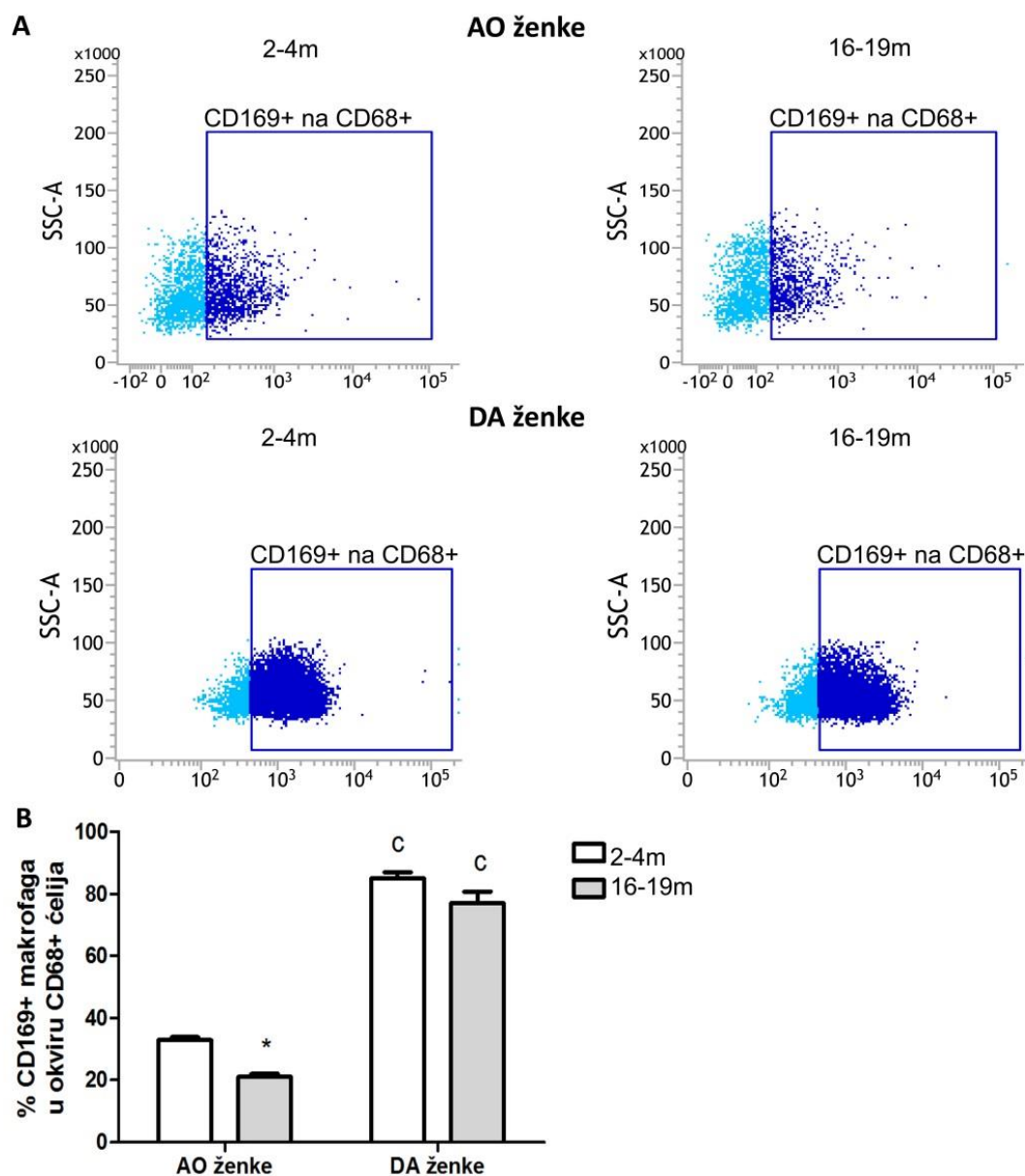
Slika 20. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (A) prikazuju ekspresiju TLR4 receptora u okviru CD68+ makrofaga (izdvojene kao na Sl. 19A) izolovanih iz peritonealne šupljine (gore) AO soja i (dole) DA soja sredovečnih ženki. Grafik (B) prikazuje uticaj starenja na procenat CD68+ makrofaga koje eksprimiraju TLR4 receptor u populaciji TG ćelija AO i DA ženki. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade i <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs. AO ženke.

Starenjem se kod AO ženki smanjio procenat MHCII+ makrofaga u okviru CD68+ ćelija, dok je kod DA ostao nepromenjen (Sl. 21B). DA ženke su imale značajno manje MHCII+ makrofaga u odnosu na AO ženke odgovarajućih starosti (Sl. 21B).



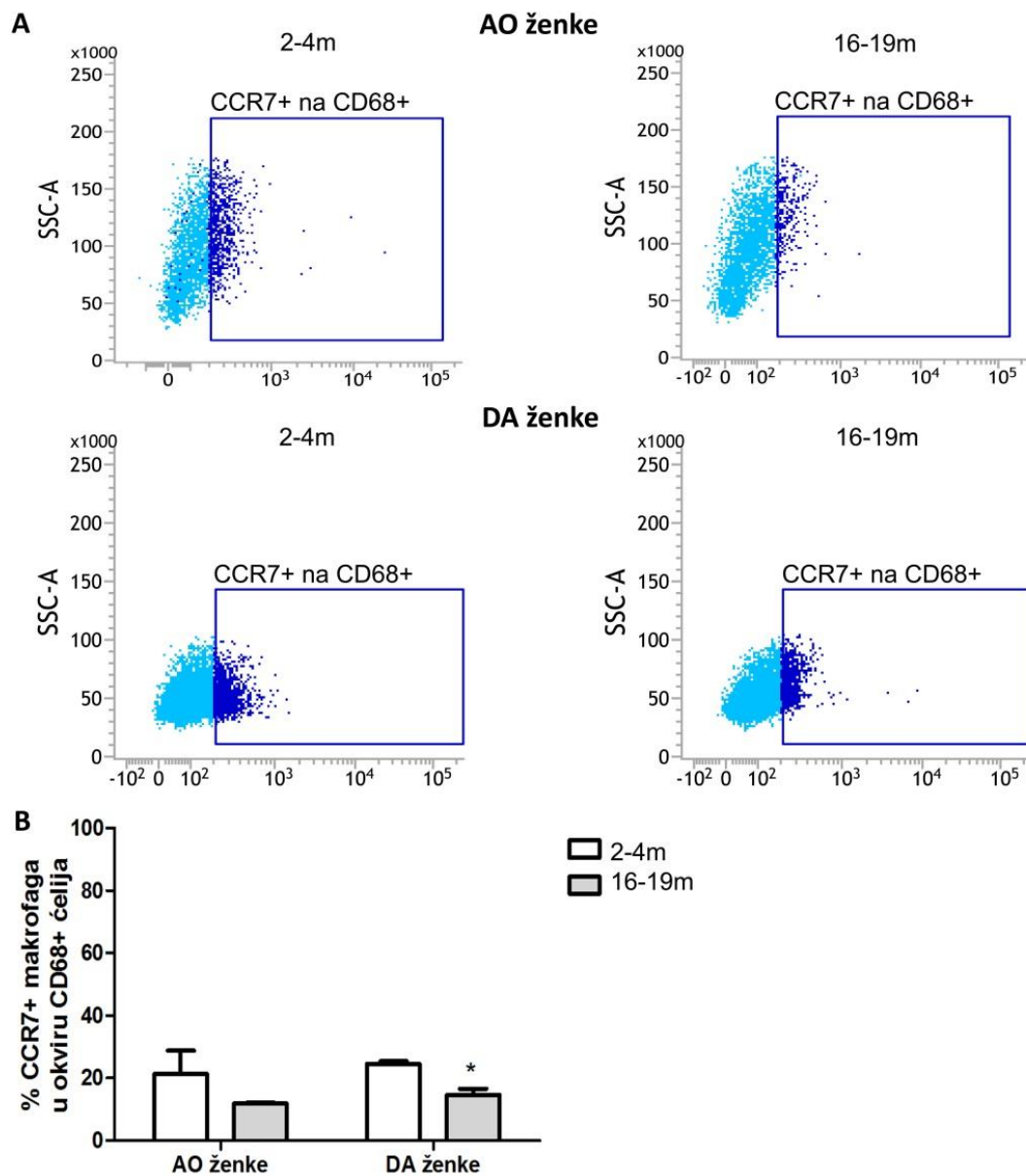
Slika 21. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (A) prikazuju ekspresiju MHCII molekula u okviru CD68+ makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine (gore) AO soja i (dole) DA soja ženki pacova. (B) Grafik prikazuje uticaj starenja na procenat CD68+ makrofaga koje ekspimiraju MHCII molekul u populaciji TG ćelija AO i DA ženki. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p<0,01 vs. mlade i <sup>a</sup>p<0,05, <sup>c</sup>p<0,001 vs. AO ženke.

Dok se reproduktivnim starenjem procenat CD169+ makrofaga u okviru CD68+ ćelija kod AO ženki smanjivao, na TG makrofagama ženki DA soja se nije menjao (Sl. 22B). Međutim, ženke DA soja su imale drastično veći procenat CD169+ makrofaga u odnosu na mlade i sredovečne ženke AO soja (Sl. 22B).



Slika 22. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (A) prikazuju ekspresiju CD169 molekula u okviru CD68+ makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine (gore) AO soja i (dole) DA soja ženki pacova. Grafik (B) prikazuje uticaj reproduktivnog starenja na procenat CD68+ makrofaga koje ekspimiraju CD169 molekul u populaciji TG makrofaga AO i DA ženki. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$  vs. mlade, <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. AO ženke.

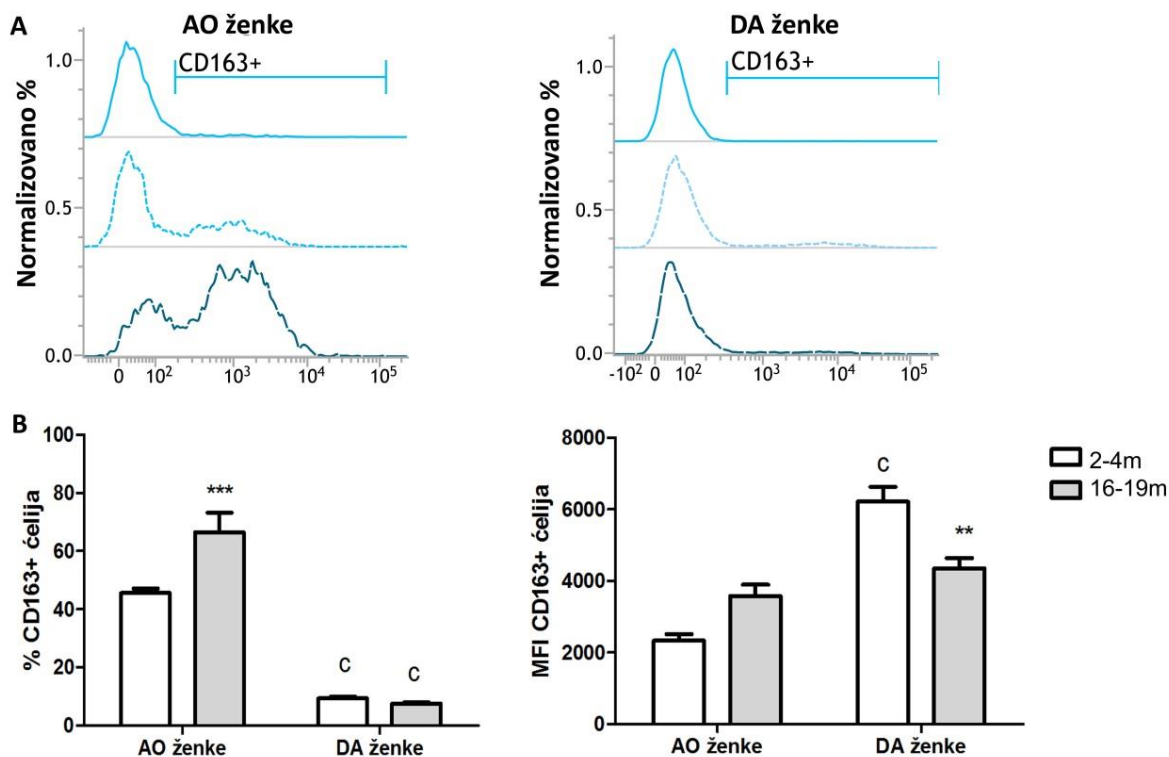
Procenat CD68+ makrofaga koje eksprimiraju CCR7 receptor nije se razlikovao između mladih ženki AO i DA soja (Sl. 23B). Samo kod ženki DA soja je došlo do značajnog pada procenta CCR7+ makrofaga u okviru CD68+ ćelija tokom reproduktivnog starenja.



Slika 23. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profil (A) CCR7 receptora u okviru CD68+ makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine (gore) ženki AO soja i (dole) DA soja. Grafik (B) prikazuje procenat TG makrofaga koje eksprimiraju CCR7 receptor na CD68+ makrofagama. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$  vs. mlade.



Za razliku od AO pacova kod kojih procenat CD163+ ćelija u okviru makrofagnog „gejta“ raste tokom reproduktivnog starenja, kod DA pacova on se ne menja (Sl. 24). Procenat CD163+ makrofaga je bio veći u obe starosne grupe AO soja u odnosu na DA soj. Gustina ekspresije CD163 receptora je bila značajno veća na makrofagama mladih DA ženki u odnosu na mlade AO ženke (Sl. 24B). Tokom starenja se gustina ekspresije CD163 receptora smanjivala, dok se kod AO pacova nije menjala (Sl. 24B).



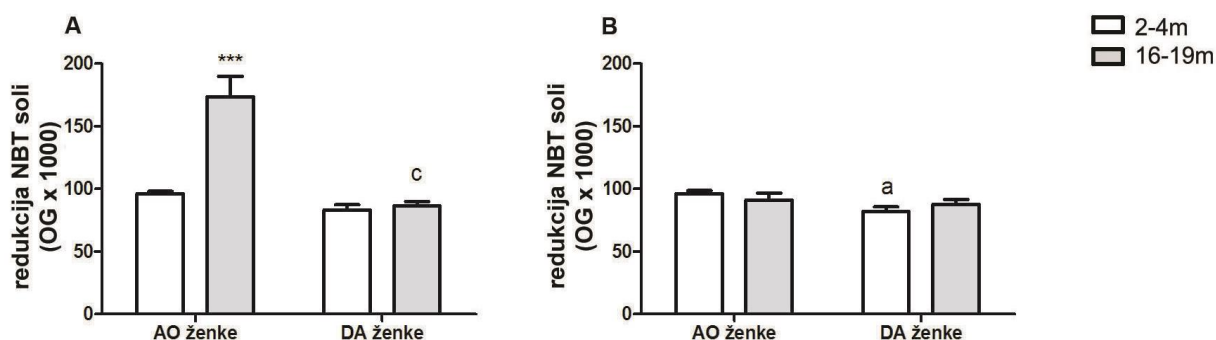
Slika 24. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami (A) TG makrofaga (levo) AO soja i (desno) DA soja izolovanih iz peritonealne šupljine ženki (izotipska kontrola-puna linija, 2-4m-svetla, isprekidana i 16-19m-tamna, isprekidana linija). Strategija izdvajanja makrofagnog „gejta“ je prikazana na Sl. 5A. Grafici (B) prikazuju uticaj reproduktivnog starenja na (levo) procentualnu zastupljenost CD163+ makrofaga i (desno) gustinu CD163 molekula po ćeliji. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$  vs. mlade; c,  $p < 0,001$  vs. AO ženke.

Ovi nalazi ukazuju na sojne razlike u stepenu diferencijacije ćelija peritoneuma ka zrelim makrofagama i značaj genetskih faktora za starenjem uslovljene promene u fenotipu, a verovatno i u modulaciji odgovora ovih ćelija na inflamatorne agense.

### 4.2.3. Funkcijske karakteristike TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki pacova AO i DA soja

#### 4.2.3.1. Fagocitna aktivnost

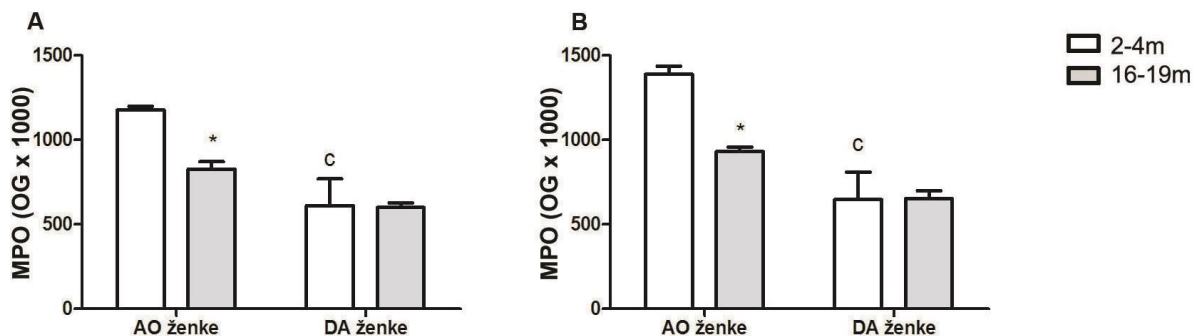
Redukcija NBT soli se povećavala tokom reproduktivnog starenja u nestimulisanim makrofagama izolovanim iz ženki AO soja, dok se kod DA ženki nije menjala (Sl. 25A). Stimulacija LPS-om je sprečila povećanje koje se desilo u nestimulisanim makrofagama tokom starenja ženki AO soja (Sl. 25B). Stepenn redukije NBT soli se nakon stimulacije LPS-om nije razlikovao u ispitivanim grupama oba soja 25B).



Slika 25. Uticaj reproduktivnog starenja na stepen redukije NBT soli u populaciji TG makrofaga koje su tokom 24h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\*,  $p < 0,001$  vs. mlade i <sup>a</sup>,  $p < 0,05$ , <sup>c</sup>,  $p < 0,001$  vs. AO ženke.

## 4.2.3.2. Aktivnost MPO

Dok se aktivnost MPO u nestimulisanim i LPS-om stimulisanim makrofagama smanjivala tokom reproduktivnog starenja kod ženki AO soja, kod ženki DA soja se nije menjala (Sl. 26A). Makrofage mladih AO ženki su imale veću aktivnost MPO u odnosu na ćelije mladih DA ženki (Sl. 26A, B).



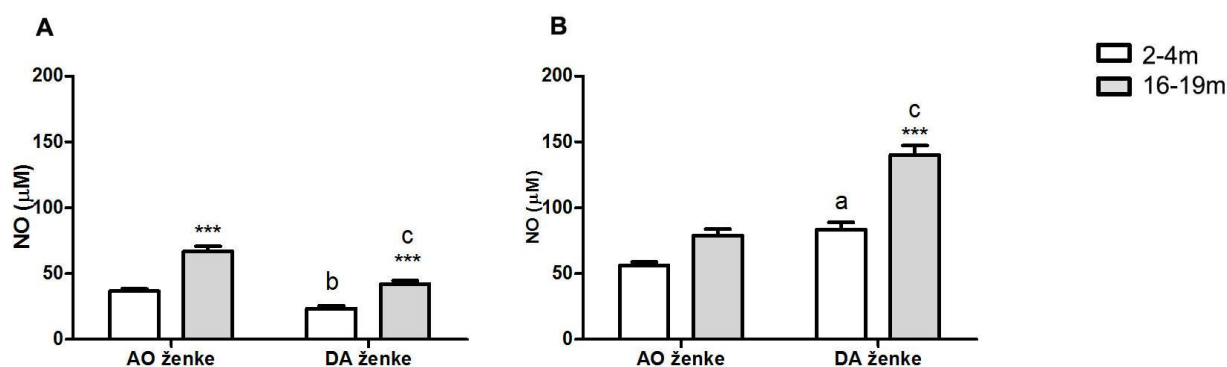
Slika 26. Uticaj starenja na aktivnost MPO u populaciji TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki AO i DA soja pacova koje su tokom 24h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*,  $p < 0,05$  vs. mlade i <sup>c</sup>,  $p < 0,001$  vs. AO ženke.

#### 4.2.4. Sekretorni profil TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki pacova AO i DA soja

##### 4.2.4.1. Produkcija NO i uree

Nestimulisane makrofage sredovečnih ženki pacova oba soja su produkovale više nivoe NO u odnosu na mlade životinje (Sl. 27A). Produkcija NO u nestimulisanim makrofagama izolovanim iz DA ženki je bila manja u odnosu na pacove AO soja.

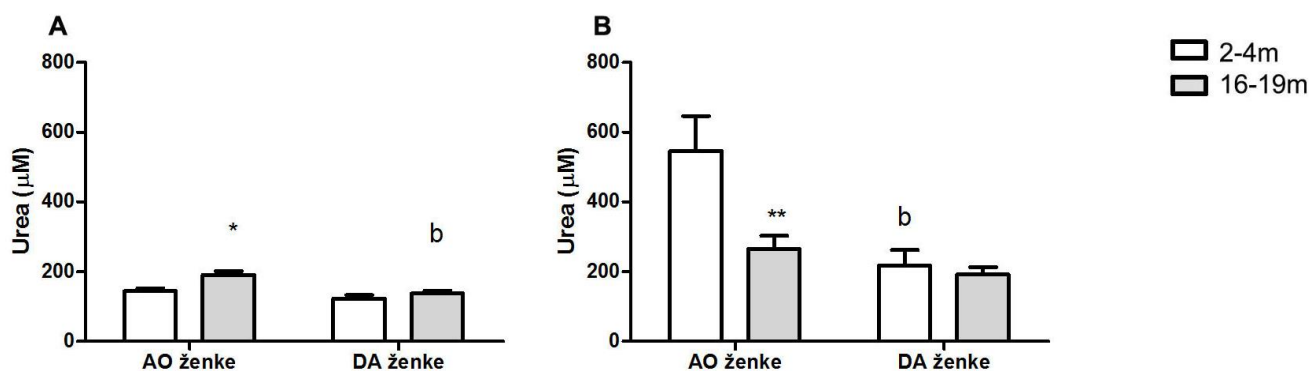
Makrofage sredovečnih ženki DA soja su nakon 48-časovne stimulacije LPS-om odgovorile većom produkcijom NO u odnosu na makrofage mladih životinja (Sl. 27B). Iako je u nestimulisanim uslovima produkcija NO kod DA ženki bila niža u odnosu na AO soj, nakon stimulacije LPS-om ova grupa ženki je odgovorila većim oslobađanjem NO.



Slika 27. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju NO ( $\mu\text{M}$ ) u populaciji TG makrofaga koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade i <sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>b</sup> $p < 0,01$ , <sup>c</sup> $p < 0,001$  vs. AO ženke.

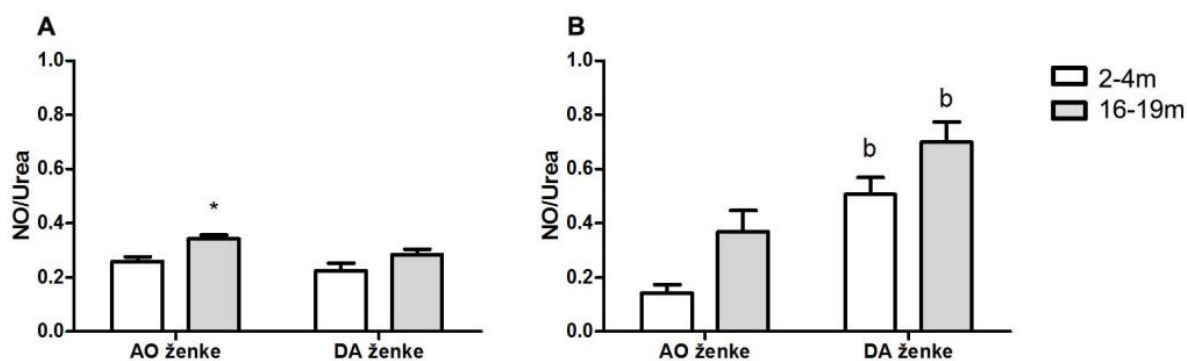
Nestimulisane makrofage izolovane iz sredovečnih ženki AO soja su oslobađale više uree od mladih ženki (Sl. 28A). U produkciji uree u makrofagama DA ženki nije bilo razlika tokom starenja. Makrofage sredovečnih ženki DA soja u odnosu na AO soj su produkovale manje uree (Sl. 28A).

Nakon stimulacije LPS-om (Sl. 28B), produkcija uree je bila niža u makrofagama sredovečnih u odnosu na mlade ženke AO soja. Produkcija u DA soju je ostala nepromenjena i nakon stimulacije LPS-om.



Slika 28. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju uree ( $\mu\text{M}$ ) u populaciji TG ćelija koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade i <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs. AO ženke.

Samo kod AO soja je bio veći odnos NO/urea (koji ukazuje na pro- ili anti-inflamatorni kapacitet makrofaga) kod makrofaga sredovečnih ženki inkubiranih u RPMI (Sl. 29A). Nakon stimulacije makrofaga LPS-om, kod DA ženki, u obe starosne grupe, su bile veće vrednosti NO/urea u odnosu na ženke AO soja odgovarajuće starosti (Sl. 29B). Starenje nije uticalo na odnos NO/urea u stimulisanim makrofagama ni kod jednog soja (Sl. 29A, B).

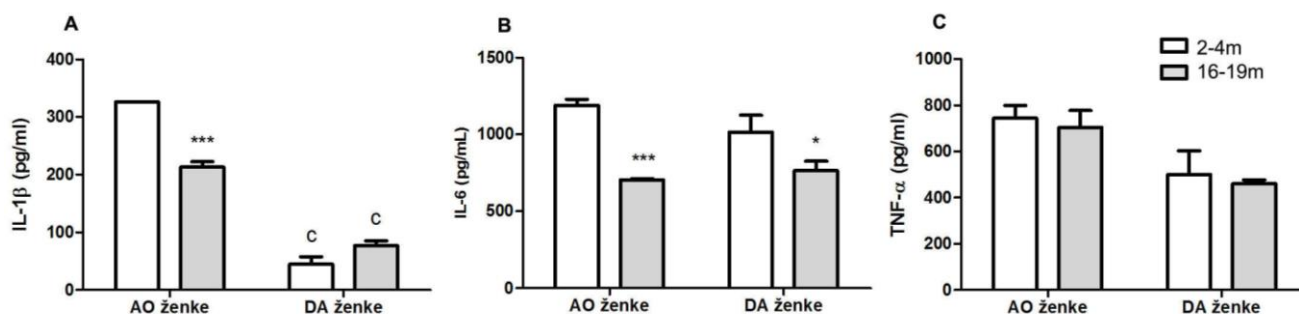


Slika 29. Uticaj reproduktivnog starenja na odnos NO/urea u populaciji TG makrofaga koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su

prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$  vs. mlade i <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs. ženke.

#### 4.2.4.2. Produkcija proinflamatornih citokina

Pokazano je da reproduktivnim starenjem kod LPS-om stimulisanih TG makrofaga AO ženki produkcija IL-1 $\beta$  i IL-6 opada, dok se produkcija TNF- $\alpha$  ne menja (Sl. 30). Kod DA ženki tokom reproduktivnog starenja dolazi do smanjenja produkcije IL-6, dok se produkcija TNF- $\alpha$  ne menja (Sl. 30). Produkcija IL-1 $\beta$  je bila značajno manja u makrofagama ženki DA u odnosu na ženke AO soja.

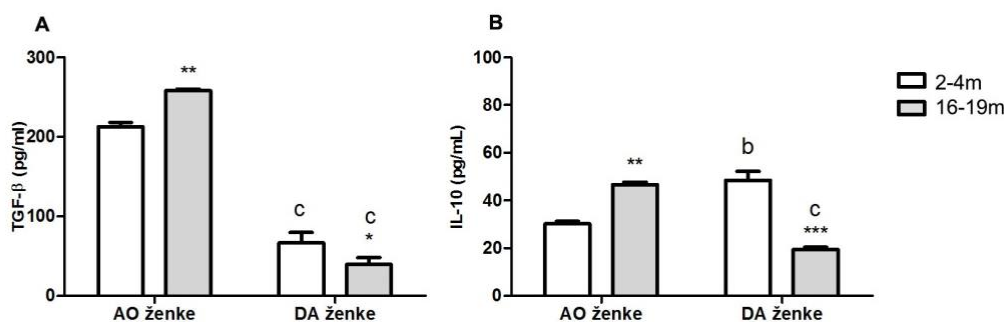


Slika 30. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 i (C) TNF- $\alpha$  u populaciji TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki AO i DA soja pacova koje su tokom 24h stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade i <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. AO ženke.

## 4.2.4.3. Produkcija antiinflamatornih citokina

Za razliku od AO soja, kod kojih su se antiinflamatorni citokini, TGF- $\beta$  i IL-10, više sintetisali u LPS-om stimulisanim TG makrofagama sredovečnih u odnosu na mlade AO ženke (Sl. 31), kod DA soja produkcija im je opadala starenjem (Sl. 31).

Dok je produkcija TGF- $\beta$  bila značajno veća kod AO soja u obe starosne grupe (Sl. 31A), produkcija IL-10 je bila veća kod mladih DA ženki, a manja kod sredovečnih u odnosu na odgovarajuće grupe ženki AO soja (Sl. 31B).



Slika 31. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju (A) TGF- $\beta$  i (B) IL-10 u populaciji TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki AO i DA soja pacova koje su tokom 24h stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. mlade i <sup>b</sup> p<0,05, <sup>c</sup> p<0,001 vs. AO ženke.

Pokazano je da se promene u sekreciji proinflamatornog citokina IL-1 $\beta$  i antiinflamatornih citokina tokom reproduktivnog starenja razlikuju kod AO i DA soja pacova, odnosno da do promena u koncentraciji ovih citokina tokom reproduktivnog starenja dolazi na sojno specifičan način.

### **4.3. ZNAČAJ POLA ZA FENOTIPSE I FUNKCIJSKE KARAKTERISTIKE TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA**

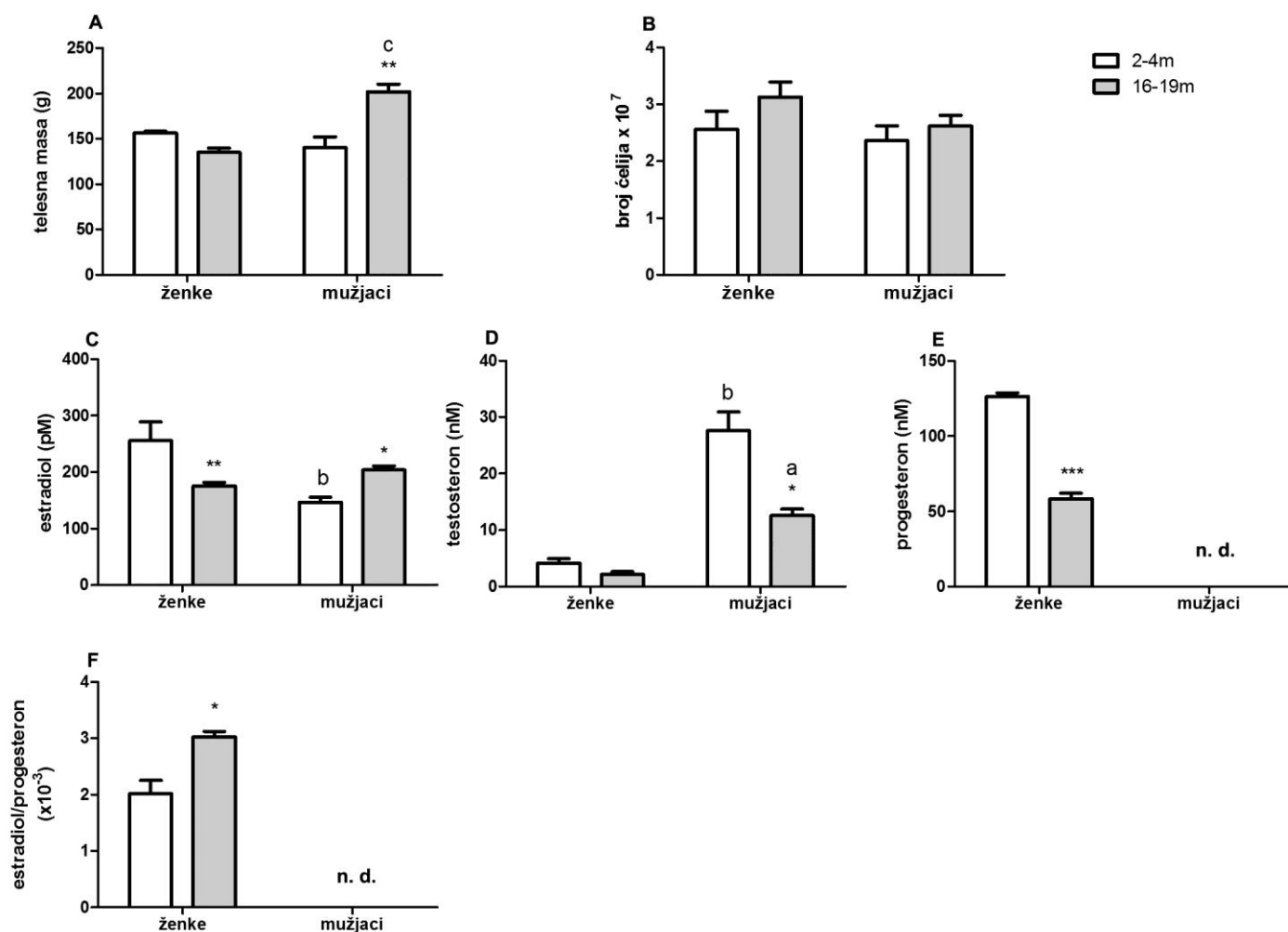
Kako smo pokazali da se starenjem menjaju fenotipske i funkcijske karakteristike TG makrofaga peritonealne šupljine kod ženki AO soja pacova, u narednom segmentu istraživanja cilj je bio da se ispita da li se i kod mužjaka ovog soja dešavaju slične promene.

#### ***4.3.1. Telesna masa, broj TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine i serumske koncentracije polnih steroida ženki i mužjaka AO soja pacova***

Za razliku od ženki kod kojih se telesna masa nije menjala tokom starenja, kod mužjaka tokom vremena koje odgovara reproduktivnom periodu kod ženki dolazi do povećanja telesne mase pa su tako sredovečni mužjaci značajno teži od ženki iz iste starosne grupe (Sl. 32A). Uočena polno zavisna promena u telesnoj masi nije se odrazila na promenu broja ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine (Sl. 32B).

Kod ženki se tokom reproduktivnog starenja smanjuju serumske koncentracije estradiola i progesterona (Sl. 32C, E), dok se koncentracija testosterona ne menja (Sl. 32D). Međutim, kod mužjaka koncentracija estradiola tokom starenja raste (Sl. 32C), dok testosteron opada (Sl. 32D), verovatno usled pojačane sinteze estradiola delovanjem aromataza na testosteron. S obzirom da je masno tkivo bogato aromatazama, porast koncentracije estradiola kod mužjaka je verovatno i u vezi sa povećanjem telesne mase tokom starenja (Sl. 32A). Odnos estradiol/progesteron u serumu se povećao tokom reproduktivnog starenja kod ženki (Sl. 32F).



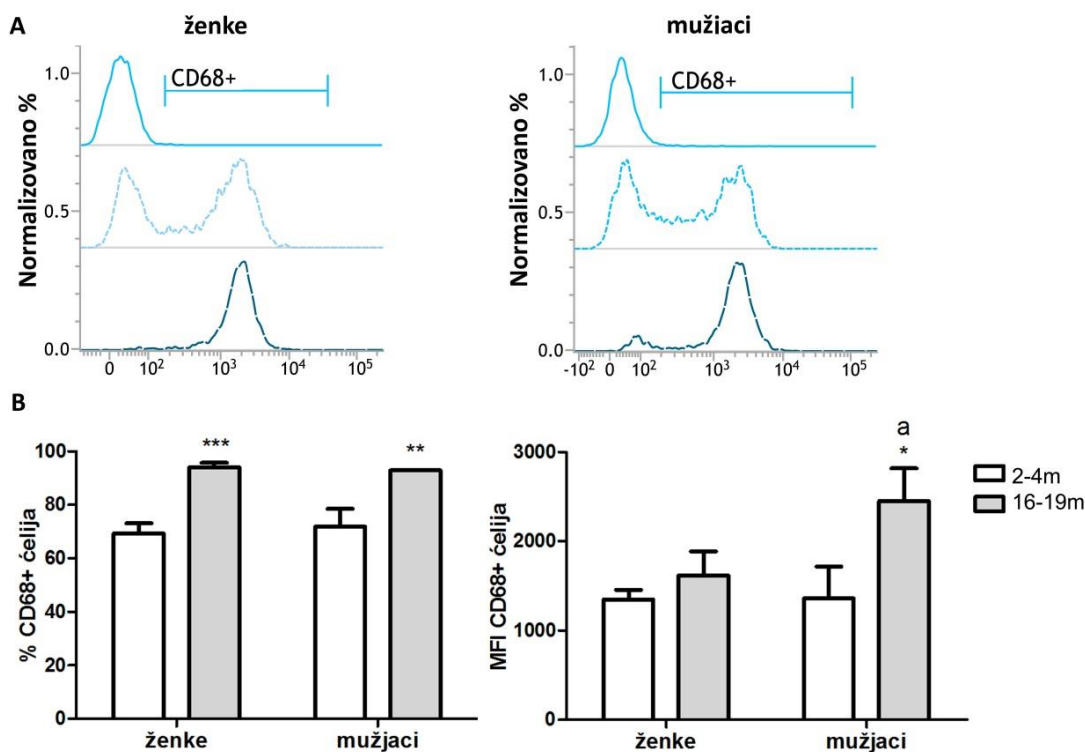


Slika 32. Uticaj reproduktivnog starenja na (A) telesnu masu, (B) ukupan broj TG ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine, (C) serumsku koncentraciju estradiola (pM), (D) serumsku koncentraciju testosterona (nM), (E) serumsku koncentraciju progesterona (nM) i (F) odnos estrogen/progesteron ( $\times 10^{-3}$ ) kod ženki i mužjaka pacova AO soja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* $p < 0,01$  vs. mlade i <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. ženke.

#### 4.3.2. Fenotipski profil TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki i mužjaka AO pacova

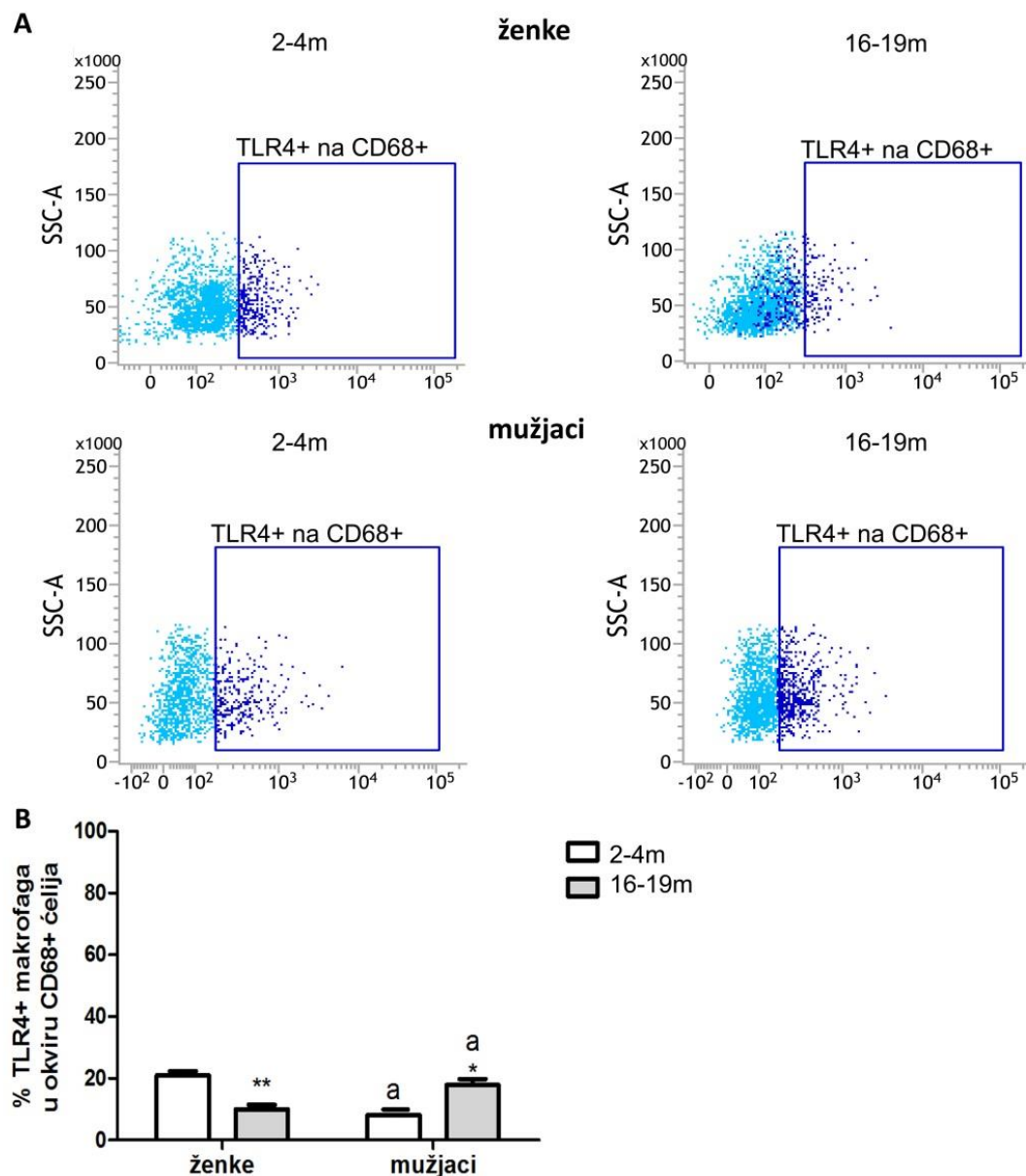
Na slici 33A je prikazana procentualna zastupljenost CD68+ ćelija u okviru populacije koja po SSC i FSC karakteristikama odgovara makrofagama. Kod mladih životinja, nije bilo razlike u zastupljenosti CD68+ makrofaga između polova. U oba pola se starenjem povećavao broj CD68+ makrofaga.

Gustina ekspresije CD68 molekula na CD68+ makrofagama se povećavala tokom reproduktivnog starenja samo kod mužjaka (Sl. 33B).



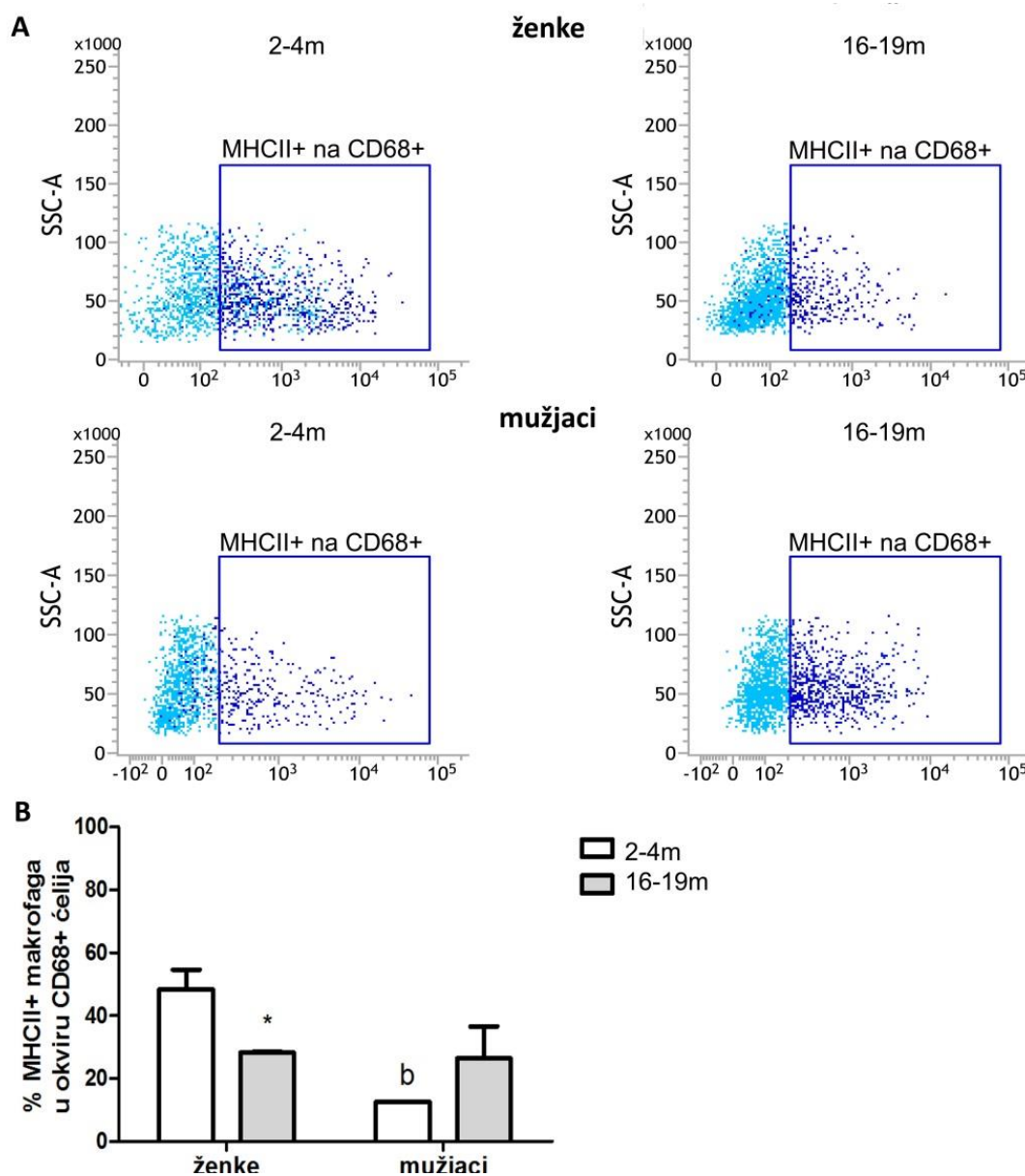
Slika 33. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili (A) i histogrami (B) TG ćelija ženki (levo) i mužjaka (desno) pacova AO soja (izotipska kontrola-puna linija, 2-4m-svetla, isprekidana i 16-19m-tamna, isprekidana linija). Grafici (B) prikazuju (levo) procentualnu zastupljenost CD68+ ćelija u okviru makrofagnog „gejta“ i (desno) gustinu CD68 molekula po CD68+ ćeliji. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade i <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. ženke.

Kod ženki AO pacova se starenjem smanjivala zastupljenost TLR4+ ćelija u okviru CD68+ makrofaga, dok je kod mužjaka taj procenat rastao, tako da su mladi mužjaci imali značajno manji, a sredovečni značajno veći procenat TLR4+ ćelija u okviru CD68+ makrofaga u odnosu na odgovarajuću grupu ženki (Sl. 34B). Ovaj nalaz ukazuje na to da je promena ekspresija TLR4 na CD68+ makrofagama tokom reproduktivnog starenja polno zavisna.



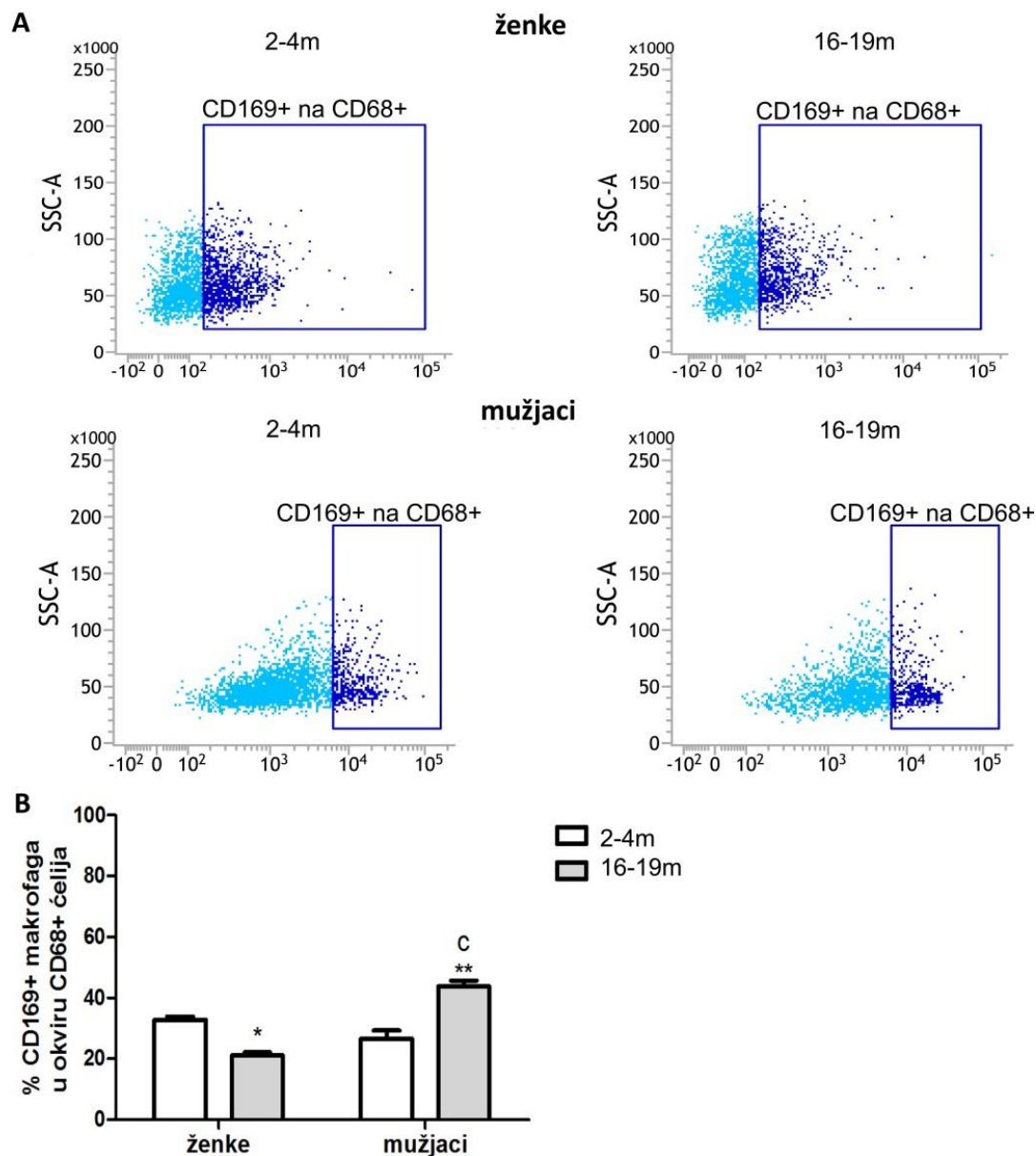
Slika 34. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju (A) ekspresiju TLR4 molekula u okviru CD68+ TG makrofaga (izdvojenih kao na Sl.33A) izolovanih iz peritonealne šupljine (gore) ženki i (dole) mužjaka AO pacova. Grafik (B) prikazuje uticaj starenja na procenat CD68+ makrofaga koje ekspimiraju TLR4 receptor. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade i <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. ženke.

Posmatrajući procentualnu zastupljenost MHCII (Sl. 35B) u okviru CD68+ makrofaga koja se reproduktivnim starenjem smanjuje kod ženki, uočili smo da se kod mužjaka ne menja. Mladi mužjaci su ekspresirali značajno manji procenat MHCII+ u odnosu na ženke odgovarajuće starosti.



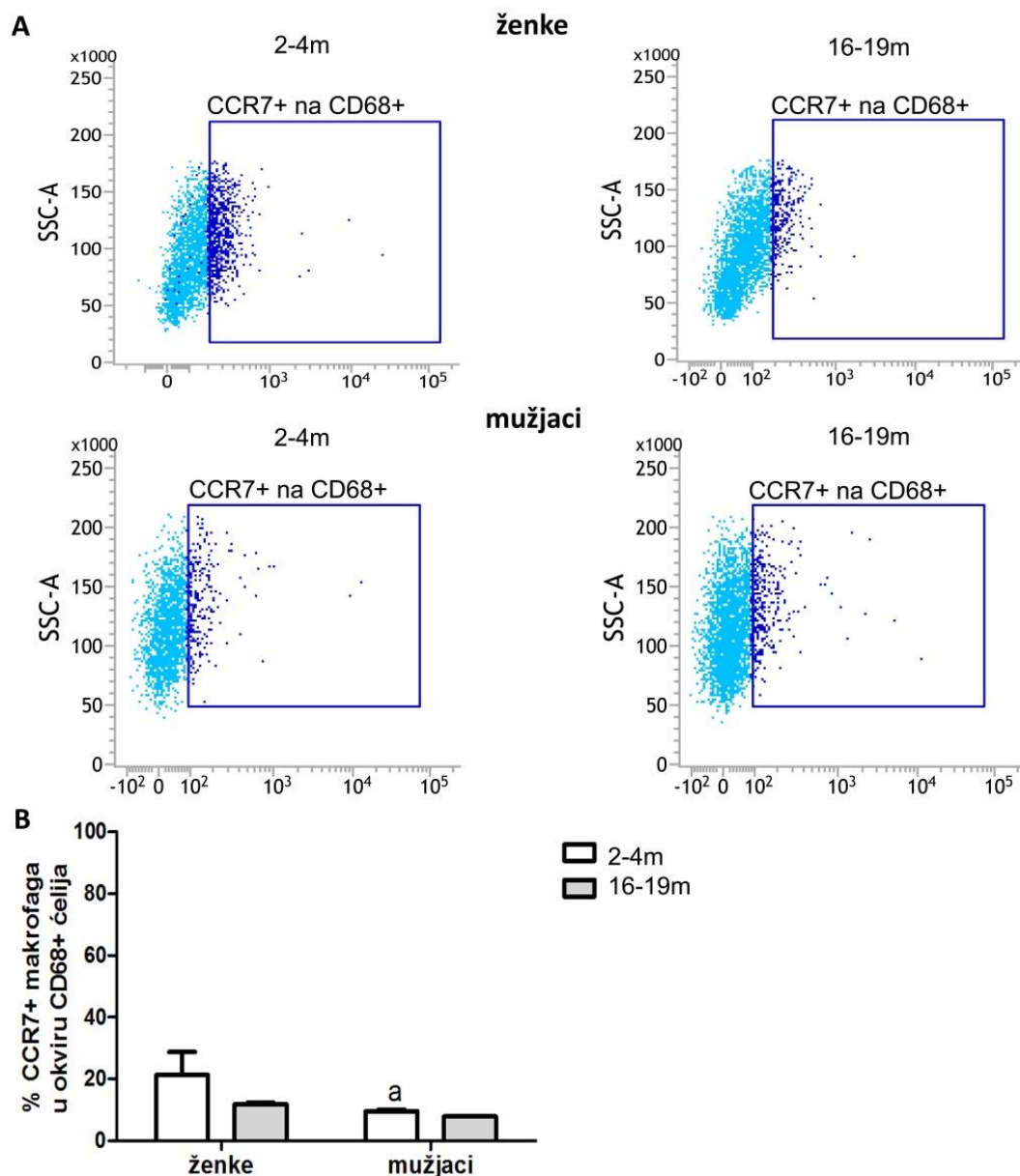
Slika 35. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju (A) ekspresiju MHCII molekula u okviru CD68+ makrofaga TG indukovanih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine (gore) ženki i (dole) mužjaka AO pacova. Grafik (B) prikazuje uticaj starenja na procenat CD68+ makrofaga koje ekspresiraju MHCII molekul. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$  vs. mlade i <sup>b</sup>  $p < 0,01$  vs. ženke.

Za razliku od ženke, kod mužjaka se procenat ćelija koje ispoljavaju CD169 molekul povećavao tokom starenja, pa su sredovečni mužjaci imali značajno veći procenat CD169+ makrofaga u okviru CD68+ ćelija u odnosu na ženke iste starosti (Sl. 36B).



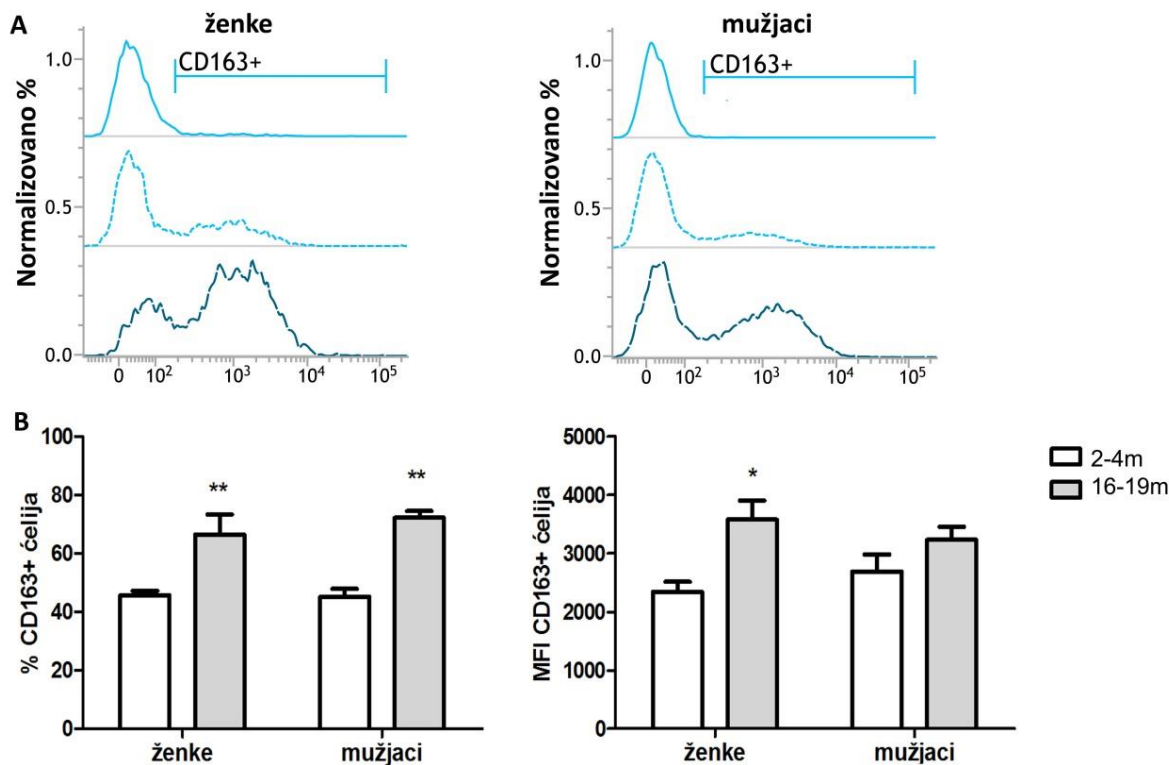
Slika 36. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju (A) ekspresiju CD169 molekula u okviru CD68+ makrofaga TG indukovanih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine (gore) ženki i (dole) mužjaka AO pacova. Grafik (B) prikazuje uticaj starenja na procenat CD68+ makrofaga koje ekspimiraju CD169 molekul. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade i <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. ženke.

Nezavisno od pola, starenje ne utiče na procenat makrofaga koje ekspimiraju CCR7 molekul (Sl. 37B). Mladi mužjaci imali su značajno manji procenat CCR7+ makrofaga u okviru CD68+ ćelija u odnosu na mlade ženke (Sl. 37B).



Slika 37. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski tačkasti profili prikazuju (A) ekspresiju CCR7 receptora u okviru CD68+ makrofaga TG indukovanih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine (gore) ženki i (dole) mužjaka AO pacova. Grafik (B) prikazuje uticaj starenja na procenat CD68+ makrofaga koje ekspimiraju CCR7 receptor. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. ženke.

Procenat CD163+ ćelija u okviru populacije koja po SSC i FSC karakteristikama odgovara makrofagama, rastao je tokom starenja u oba pola, pri čemu se procentualna zastupljenost CD163+ ćelija nije razlikovala između polova (Sl. 38B). Gustina ekspresije CD163 receptora je bila veća na ćelijama sredovečnih u odnosu na mlade ženke, dok kod mužjaka nije bilo razlike (Sl. 38B).

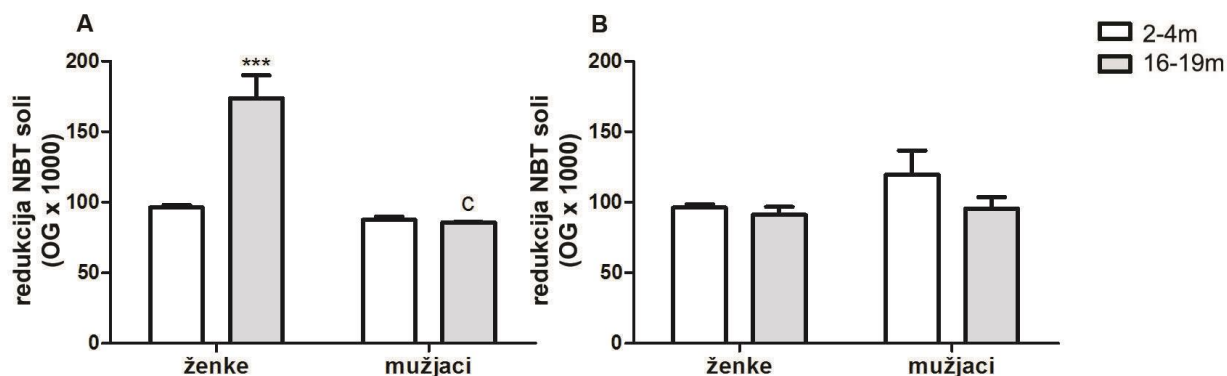


Slika 38. Reprezentativni protočno-citofluorometrijski histogrami (A) TG indukovanih ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine (levo) ženki i (desno) mužjaka pacova AO soja (izotipska kontrola-puna linija, 2-4m-svetla, isprekidana i 16-19m-tamna, isprekidana linija). Strategija izdvajanja makrofagnog „gejta“ je prikazana na Sl. 5A. Grafici (B) prikazuju uticaj reproduktivnog starenja na (levo) procentualnu zastupljenost CD163+ ćelija u okviru makrofagnog „gejta“ i (desno) gustinu CD163 molekula po CD163+ ćeliji. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade.

### 4.3.3. Funkcijske karakteristike TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki i mužjaka AO pacova

#### 4.3.3.1. Fagocitna aktivnost

Fagocitoza zimozana, merena redukcijom NBT soli, se povećavala tokom starenja u nestimulisanim makrofagama izolovanim iz ženki (Sl. 39A), tako da je kod sredovečnih ženki bila značajno viša u odnosu na sredovečne mužjake. Za razliku od nestimulisanih makrofaga, nije bilo razlike u redukciji NBT kod LPS-om stimulisanih makrofaga sredovečnih životinja (Sl. 39B).

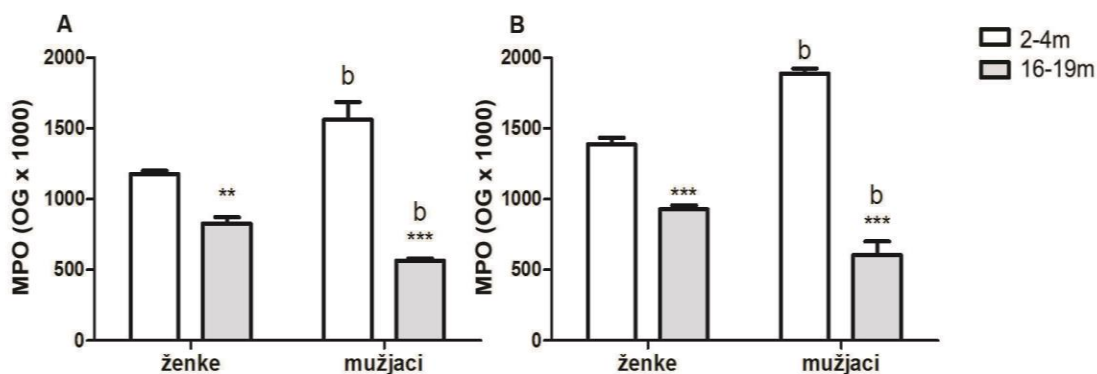


Slika 39. Uticaj reproduktivnog starenja na redukciju NBT soli u populaciji TG makrofaga izolovanim iz peritonealne šupljine ženki i mužjaka AO pacova, a koje su tokom 24h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (OG x 1000)  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\* p<0,001 vs. mlade i <sup>c</sup> p<0,001 vs. ženke.



## 4.3.3.2. Aktivnost MPO

Reproduktivno starenje je uticalo na aktivnost MPO u makrofagama, smanjujući je kako kod ženki, tako i kod mužjaka (Sl. 40A). Isti trend se zadržao i nakon stimulacije makrofaga LPS-om (Sl. 40B). Aktivnost MPO je bila veća kod mladih, a niža kod sredovečnih mužjaka u odnosu na ženke odgovarajuće starosti. Uprkos promenama u MPO aktivnosti makrofaga tokom starenja, kapacitet ćelija da na stimulaciju LPS-om odgovore povećanjem aktivnosti MPO je tokom starenja očuvan i ne razlikuje se između polova.



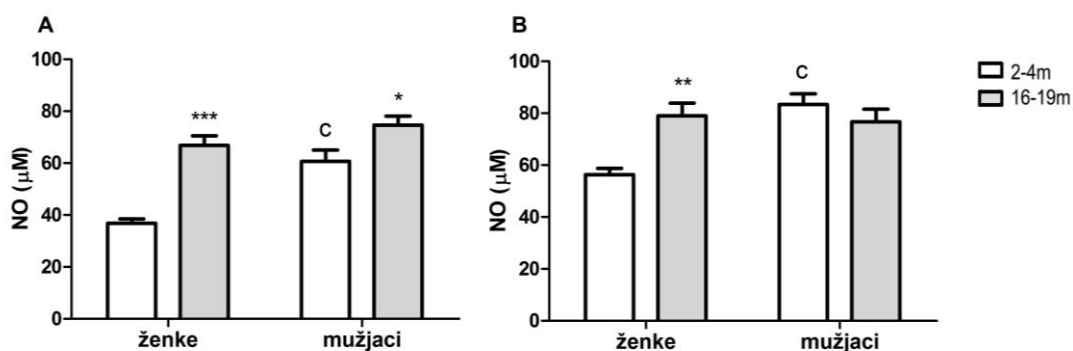
Slika 40. Uticaj starenja na aktivnost enzima MPO u populaciji TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki i mužjaka AO pacova, koje su tokom 24h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (OG x 1000)  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. mlade i <sup>b</sup> p<0,01 vs. ženke.

#### 4.3.4. Sekretorni profil TG makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki i mužjaka AO pacova

##### 4.3.4.1. Produkcija NO i uree

Aktivnost enzima iNOS u makrofagama je procenjena na osnovu oslobođenog NO. Nestimulisane makrofage sredovečnih pacova oba pola su produkovale više NO u odnosu na ćelije mladih životinja (Sl. 41A).

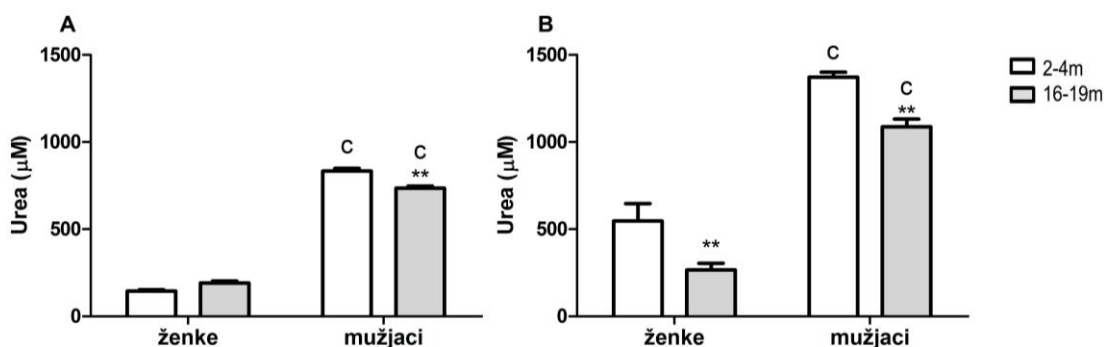
Makrofage stimulisane LPS-om izolovane iz sredovečnih ženki su odgovorile većom produkcijom NO u odnosu na mlade (Sl. 41B). Grupa mladih mužjaka je i nakon stimulacije LPS-om imala veću produkciju NO u odnosu na mlade ženke (Sl. 41B).



Slika 41. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju NO ( $\mu\text{M}$ ) u populaciji TG ćelija izolovanih iz peritonealne šupljine ženki i mužjaka AO pacova, koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. mlade i c  $p < 0,001$  vs. ženke.

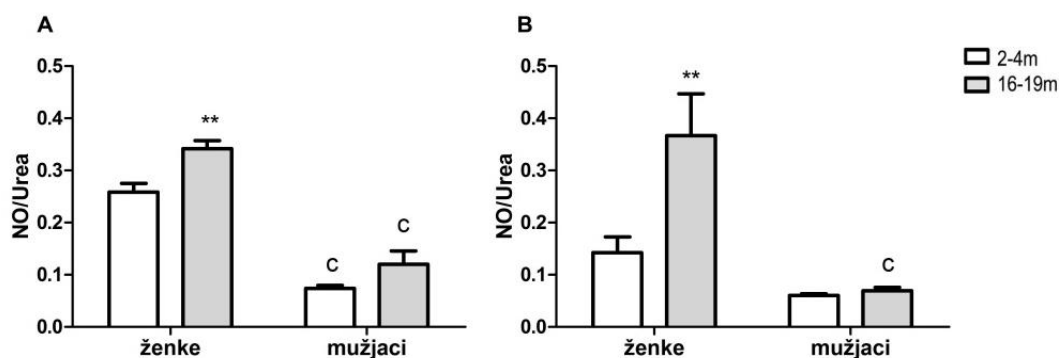
Za razliku od nestimuliranih makrofaga ženki, starenje je negativno uticalo na produkciju uree u makrofagama mužjaka pacova (Sl. 42A). Mužjaci su produkovali značajno više uree u odnosu na ženke (Sl. 42A).

Nakon stimulacije LPS-om došlo je do pada u produkciji uree kod sredovečnih ženki, a isti trend uočen i kod mužjaka (Sl. 42B). Makrofage mužjaka stimulisane LPS-om su produkovale više uree u odnosu na ženke (Sl. 42B).



Slika 42. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju uree ( $\mu\text{M}$ ) u populaciji TG makrofaga izolovanim iz peritonealne šupljine ženki i mužjaka AO pacova, koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade i <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. ženke.

Odnos NO/urea je bio viši kod nestimulisanih makrofaga sredovečnih u odnosu na mlade ženke, dok se kod mužjaka nije menjao starenjem (Sl. 43A). Odnos NO/urea je bio niži kod nestimulisanih makrofaga mužjaka u odnosu na ženke odgovarajućeg uzrasta. Stimulacija LPS-om nije uticala na navedene razlike (Sl. 43B).

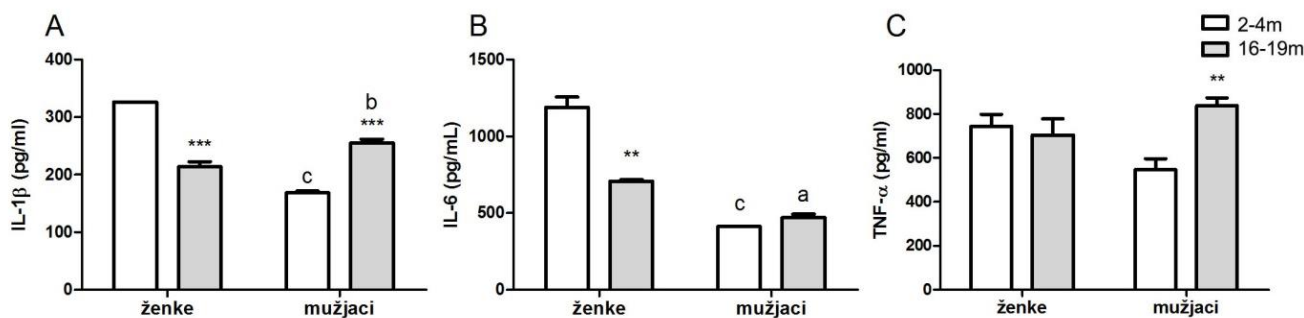


Slika 43. Uticaj reproduktivnog starenja na odnos NO/Urea u populaciji TG makrofaga izolovanim iz peritonealne šupljine ženki i mužjaka AO pacova, koje su tokom 48h inkubirane u (A) medijumu (RPMI) ili (B) stimulisane LPS. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*  $p < 0,01$  vs. mlade i <sup>c</sup>  $p < 0,001$  vs. ženke.

## 4.3.4.2. Produkcija proinflammatoryh citokina

Pokazali smo da se tokom reproduktivnog starenja smanjuje sposobnost LPS-om stimuliranih makrofaga ženki pacova da proizvode IL-1 $\beta$  (Sl. 44A) i IL-6 (Sl. 44B), dok se sposobnost za proizvodnju TNF- $\alpha$  ne menja (Sl. 44C). Međutim, kod mužjaka starenjem dolazi do povećanja proizvodnje IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u makrofagama, dok se proizvodnja IL-6 ne menja.

Makrofage mladih mužjaka sintetiziraju mnogo manje IL-1 $\beta$  i IL-6 u odnosu na one dobijene iz mladih ženki (Sl. 44).

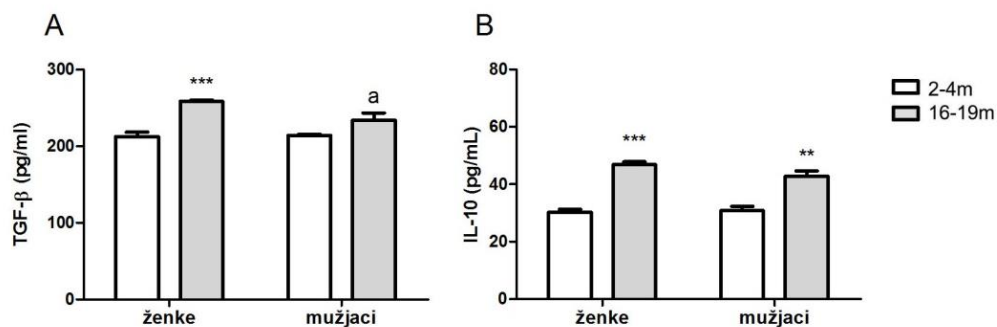


Slika 44. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 i (C) TNF- $\alpha$  u populaciji TG indukovanih makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki i mužjaka AO pacova koje su tokom 24h stimulirane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. mlade i a p<0,05, b p<0,01, c p<0,001 vs. ženke.

## 4.3.4.3. Produkcija antiinflamatornih citokina

Antiinflamatorni citokin, TGF- $\beta$ , se više sintetisao u LPS-om stimulisanim makrofagama sredovečnih u odnosu na mlade ženke (Sl. 45A). Produkcija citokina bila je manja u makrofagama sredovečnih mužjaka, nego u sredovečnih ženki.

Produkcija IL-10 se povećavala starenjem pacova oba pola (Sl. 45B).

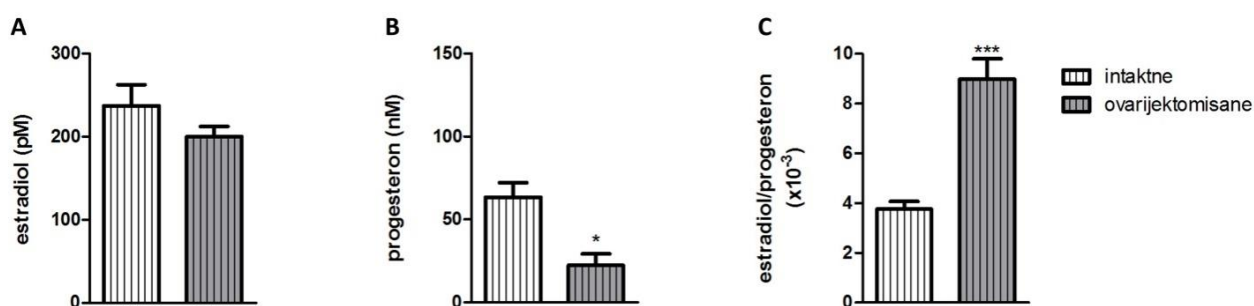


Slika 45. Uticaj reproduktivnog starenja na produkciju (A) TGF- $\beta$  i (B) IL-10 u populaciji TG makrofaga izolovanih iz peritonealne šupljine ženki i mužjaka AO pacova koje su tokom 24h stimulisane LPS-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. mlade i <sup>a</sup> p<0,05 vs. ženke.

Rezultati ukazuju na to da je samo sekrecija proinflamatornog citokina IL-1 $\beta$  bila značajno polno determinisana tokom reproduktivnog starenja.

#### 4.4. UTICAJ OVARIJEKTOMIJE NA SEKRETORNI PROFIL MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA

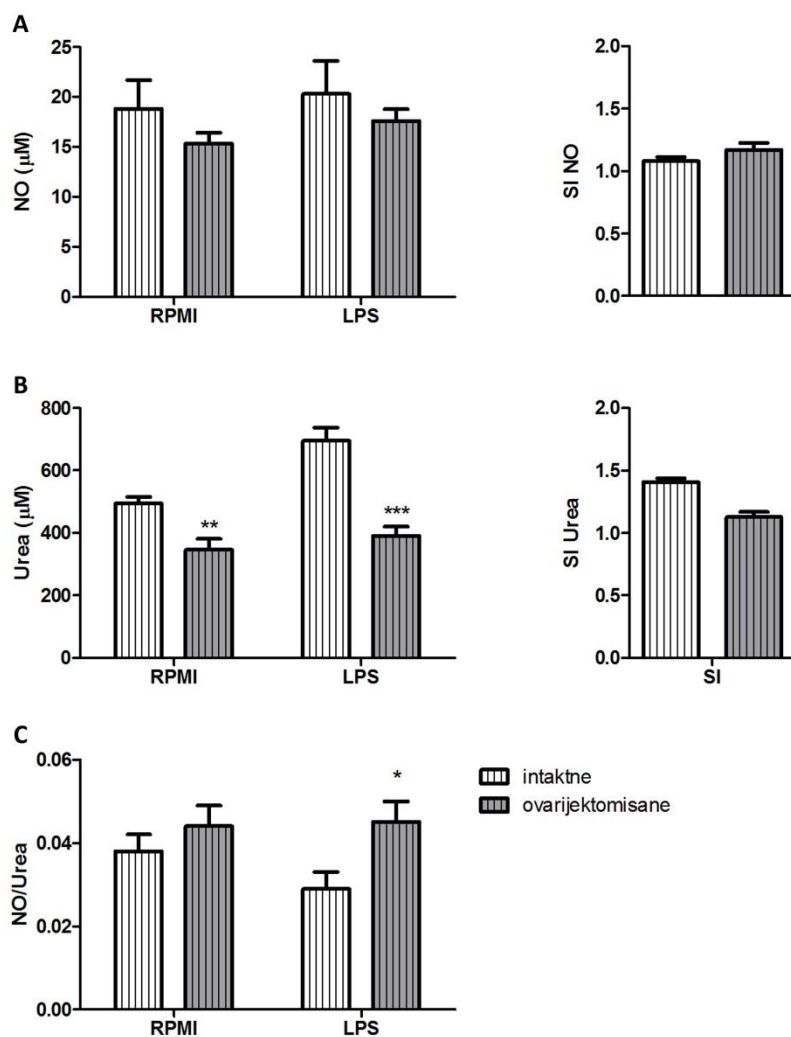
Kako bi se dodatno ispitaio značaj promene odnosa koncentracija estrogena i progesterona na sekretorni profil peritonealnih makrofaga, ženke su ovarijsktomisane pred sam kraj reproduktivnog perioda (10 meseci). Koncentracija estradiola kod ovarijsktomisanih ženki starih 20 meseci (10m+10m) je bila slična kao kod intaktnih ženki iste starosti (Sl. 46A), dok je koncentracija progesterona bila značajno niža (Sl. 46B). Posledično, odnos nivoa estradiola i progesterona u serumu (Sl. 46C) je bio dodatno povećan u odnosu na intaktne sredovečne ženke.



Slika 46. Grafici predstavljaju koncentracije (A) estradiola (pM), (B) progesterona (nM) i (C) njihovog odnosa (estradiol/progesteron  $\times 10^{-3}$ ) merene u serumima intaktnih i ovarijsktomisanih ženki AO pacova. Beli stubići predstavljaju intaktne (20 meseci), dok su sivim predstavljene ovarijsktomisane (10+10 meseci) AO ženke. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001 vs. intaktne.

#### 4.4.1. *Produkcija NO i uree*

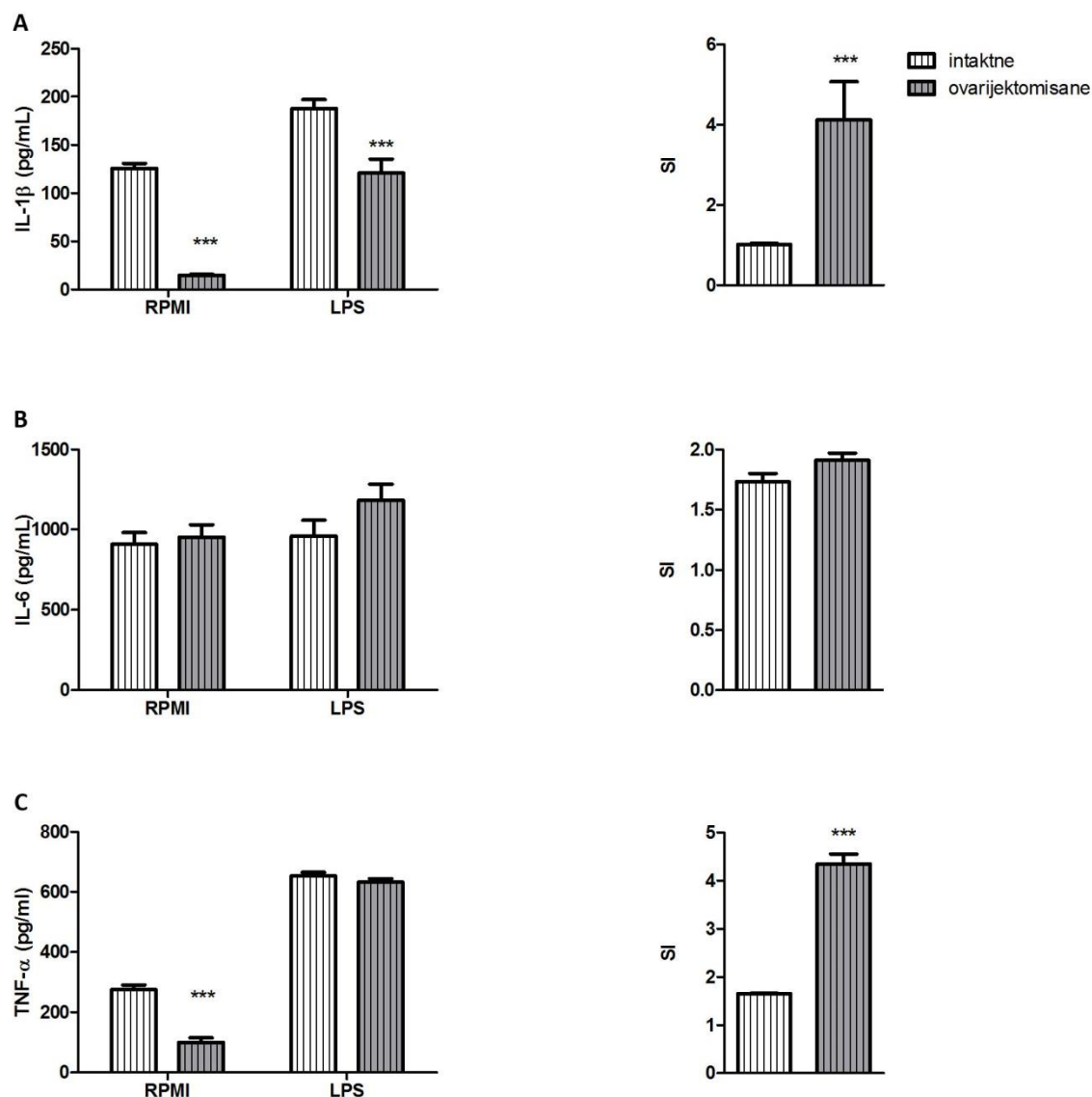
Produkcija NO je bila ista u populaciji makrofaga intaktnih i ovarijektomisanih, bez obzira na dodatnu *in vitro* stimulaciju LPS-om (Sl. 47A). Međutim, sinteza uree je bila niža u ćelijama ovarijektomisanih u odnosu na intaktne životinje, kako tokom inkubacije sa medijumom, tako i nakon stimulacije LPS-om (Sl. 47B). SI produkcije NO i uree nije se razlikovao između grupa. Odnos NO/urea je bio veći u LPS-om stimulisanim makrofagama ovarijektomisanih u odnosu na intaktne ženke (Sl. 47C). Porast odnosa NO/urea ćelija ovarijektomisanih ženki stimulisanih LPS-om reflektuje smanjenje produkcije uree a ne povećanje produkcije NO.



Slika 47. Grafici prikazuju (A) produkciju NO ( $\mu\text{M}$ ); (B) produkciju uree ( $\mu\text{M}$ ) i (C) odnos NO/urea u populaciji makrofaga koje su tokom 48h inkubirane u medijumu (RPMI) ili stimulisane LPS, a izolovane su iz peritoneuma intaktnih i ovarijektomisanih AO ženki 10 meseci nakon ovarijektomije. SI prikazuje promenu nivoa produkcije NO i uree u odgovoru na stimulaciju LPS-om (LPS/RPMI). Beli stubići predstavljaju intaktne (20 meseci), dok su sivim predstavljene ovarijektomisane (10+10 meseci) AO ženke. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM ( $n = 6$  po grupi). Statistički značajne razlike: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. intaktne.

#### 4.4.2. *Produkcija proinflammatoryh citokina*

Rezultati su pokazali da su makrofage ovarijektomisanih ženki produkovale značajno manje količine proinflammatoryh citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  i (Sl. 48 A,B,C) u odnosu na makrofage intaktnih ženke iste starosti, ukoliko su makrofage tokom 24h inkubirane u medijumu. Nakon *in vitro* stimulacije LPS-om u makrofagama ovarijektomisanih ženki je bila niža produkcija i IL-1 $\beta$  u odnosu na makrofage intaktnih životinja. SI je bio značajno viši kod makrofaga ovarijektomisanih ženki u odnosu na intaktne za TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , što ukazuje da su uprkos maloj bazalnoj produkciji, one imale veći kapacitet da odgovore na stimulaciju LPS-om.



Slika 48. Grafici prikazuju produkciju proinflammatoryh citokina (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 i (C) TNF- $\alpha$  u populaciji makrofaga, izolovanih iz peritonealne šupljine intaktnih i ovarijektomisanih ženki AO pacova 10 meseci nakon ovarijektomije, koje su tokom 24h inkubirane u medijumu (RPMI) ili stimulisane LPS. SI prikazuju promenu nivoa produkcije citokina u odgovoru na stimulaciju LPS-om (LPS/RPMI). Beli stubići predstavljaju intaktne (20 meseci), dok su sivim

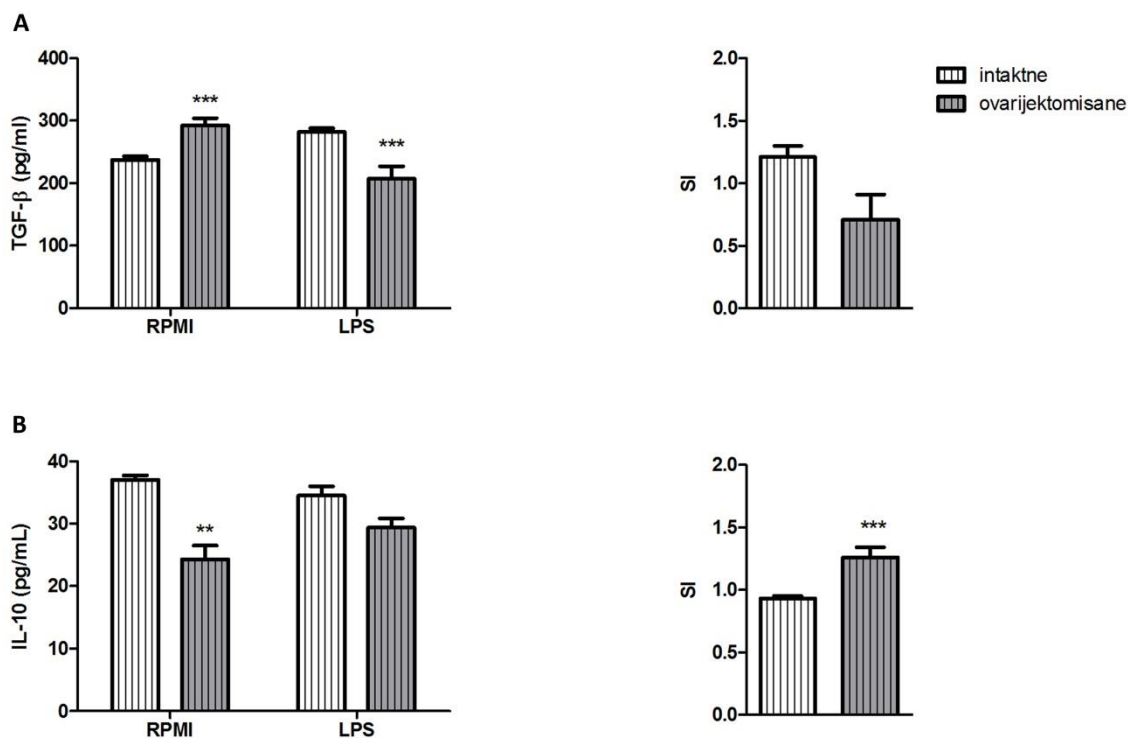


---

predstavljene ovarijektomisane (10+10 meseci) AO ženke. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\* p<0,001 vs. intaktne.

#### 4.4.3. *Produkcija antiinflamatornih citokina*

Koncentracija antiinflamatornog citokina TGF- $\beta$  je bila veća, dok je koncentracija IL-10 bila manja u supernatantima kultura nestimuliranih makrofaga ovarijektomisanih u odnosu na intaktne sredovečne ženke (Sl. 49 A, B). Nasuprot tome, u kulturi makrofaga stimuliranih LPS-om produkcija TGF- $\beta$  je bila niža, a produkcija IL-10 komparabilna u uzorcima ovarijektomisanih u odnosu na intaktne ženke. SI je bio značajno viši u testu produkcije IL-10 kod ovarijektomisanih ženki (Sl. 49B), dok je SI za TGF- $\beta$  bio nepromenjen (Sl. 49A).



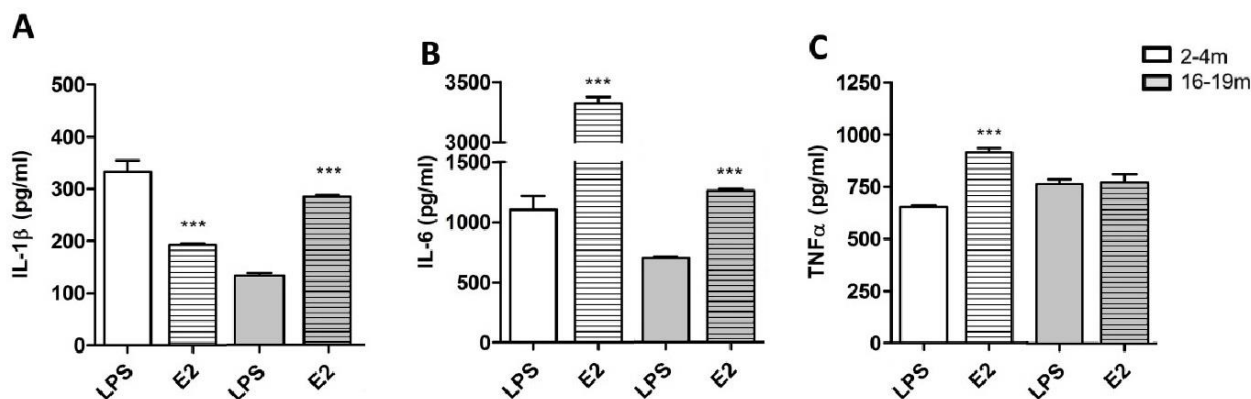
Slika 49. Grafici prikazuju produkciju antiinflamatornih citokina (A) TGF- $\beta$  i (B) IL-10 u populaciji makrofaga, izolovanih iz peritonealne šupljine intaktnih i ovarijektomisanih ženki AO pacova 10m nakon ovarijektomije, koje su tokom 24h inkubirane u medijumu (RPMI) ili stimulirane LPS-om. SI prikazuju promenu nivoa produkcije citokina u odgovoru na stimulaciju LPS-om (LPS/RPMI). Beli stubići predstavljaju intaktne (20 meseci), dok su sivim predstavljene ovarijektomisane (10+10 meseci) AO ženke. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 vs. intaktne.

#### 4.5. ISPITIVANJE DIREKTNOG MODULIŠUĆEG DELOVANJA ESTRADIOLA *IN VITRO* NA PROMENE U SEKRETORNOM PROFILU TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA

Da bismo utvrdili izolovane efekte estradiola na promene u sekretornom kapacitetu makrofaga tokom reproduktivnog starenja, makrofage peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova su tretirane estradiolom *in vitro* u koncentraciji od  $10^{-10}$ M. Prethodnim ispitivanjima je pokazano da je estradiol u ovoj koncentraciji značajno uticao na sekretorni kapacitet makrofaga.

##### 4.5.1. Produkcija proinflammatoryh citokina

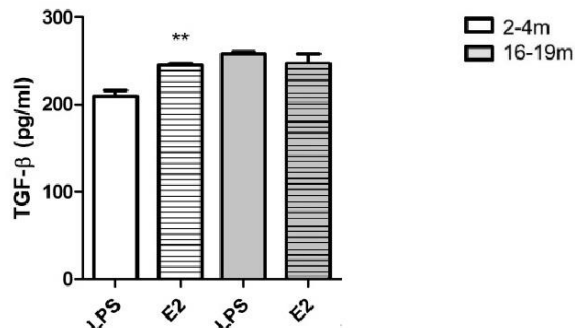
U LPS-om stimulisanim makrofagama mladih ženki *in vitro* tretman estradiolom ( $10^{-10}$ M) dovodi do povećane sekrecije IL-6 i TNF- $\alpha$  i smanjenja sekrecije IL-1 $\beta$  u odnosu na ćelije stimulisane samo LPS-om (Sl. 50). U makrofagama sredovečnih ženki (Sl. 50) je *in vitro* tretman estradiolom doveo do povećanja sekrecije IL-1 $\beta$  i IL-6 u odnosu na netretirane makrofage stimulisane samo LPS-om. Tretman estradiolom nije imao uticaja na produkciju TNF- $\alpha$  u makrofagama sredovečnih ženki.



Slika 50. Grafici prikazuju efekte na produkciju (A) IL-1 $\beta$  (pg/ml), (B) IL-6 (pg/ml) i (C) TNF- $\alpha$  nakon 24h *in vitro* tretmana estradiolom (E2,  $10^{-10}$ M). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\*\* p < 0,01 vs. LPS.

#### 4.5.2. Produkcija antiinflamatornog citokina

U stimulisanim makrofagama mladih ženki je *in vitro* tretman estradiolom ( $10^{-10}$ M) doveo do povećane sekrecije TGF- $\beta$  u odnosu na netretirane ćelije stimulisane LPS-om, dok estradiol nije doveo do promene sekrecije TGF- $\beta$  u makrofagama sredovečnih ženki (Sl. 51).



Slika 51. Grafici prikazuju efekte na produkciju TGF- $\beta$  (pg/ml) nakon 24h *in vitro* tretmana estradiolom (E2,  $10^{-10}$ M). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SEM (n = 6 po grupi). Statistički značajne razlike: \*\* p<0,01 vs. LPS.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. UTICAJ REPRODUKTIVNOG STARENJA NA FENOTIPSKU I FUNKCIJSKU KARAKTERISTIKU PERITONEALNIH MAKROFAGA ŽENKI AO SOJA PACOVA

Imajući u vidu uticaj polnih steroida na makrofage (Chao i sar, 1994; Miller i Hunt, 1996) u prvom delu istraživanja u sklopu ove disertacije ispitivan je uticaj reproduktivnog starenja na fenotipske i funkcijske karakteristike peritonealnih makrofaga. Tokom ispitivanog perioda (od 2-4. do 16-19. meseca) došlo je do gubitka cikličnosti u oslobađanju steroidnih hormona jajnika. Generalno, koncentracija estradiola u cirkulaciji se blago smanjila (oko 20%), dok je pad u koncentraciji progesterona bio izraženiji (oko 50%), tako da je odnos njihovih koncentracija pomeren na stranu estradiola, što je evidentno uticalo na fenotipske i funkcijske karakteristike makrofaga peritonealne šupljine.

#### 5.1.1. Makrofage iz neinflamirane peritonealne šupljine

##### 5.1.1.1. Fenotipske karakteristike

Tokom ispitivanog perioda, koji odgovara ranoj fazi reproduktivnog starenja, u okviru populacije ćelija izolovanih iz "mirne" (neinflamirane) peritonealne duplje ženki pacova AO soja nije se značajnije menjao ni broj ni procentualna zastupljenost makrofaga, koje su identifikovane na osnovu ekspresije CD68 molekula, a korišćenjem monoklonskog antitela ED1 (Damoiseaux i sar, 1994). U sastav peritonealnog eksudata, pored makrofaga, koji predstavljaju kako ontogenetski tako i funkcionalno heterogenu populaciju ćelija (Bou Ghosn i sar, 2010; Cassado i sar, 2011; Stout i Suttles, 2005), ulaze B-1 limfociti, B-2 limfociti, T-limfociti, NK ćelije, dendritske ćelije i eozinofili (Bou Ghosn i sar, 2010). Podaci dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da se procentualni odnosi ne razlikuju značajno između subpopulacije zrelih rezidentnih makrofaga, koje potiču od ćelija žumančane kese koje tokom embriogeneze naseljavaju ovaj prostor (Guilliams i sar, 2013; Yosef i sar, 2018) i većinski eksprimiraju CD163 molekul na svojoj površini (CD163+), što je pokazano korišćenjem ED2 monoklonskog antitela (Nawroth i sar, 2013; Schaiier i sar, 2009) i onih koje potiču od monocita (inflamatornih monocita) i koji su identifikovani na osnovu gustine ekspresije CD68 (Cohn i Benson, 1965) u peritonealnoj duplji mladih i sredovečnih ženki pacova AO soja. Ovaj nalaz je bio u skladu i sa činjenicom da se ekspresija CCR7, koji je jedan od markera makrofaga monocitnog porekla (Chen i sar, 2015; Gordon i Taylor, 2005) nije menjala tokom posmatranog perioda reproduktivnog starenja. Da bi se razumele funkcijske implikacije ovih podataka, treba navesti nekoliko činjenica. Rezidentne makrofage obezbeđuju održavanje homeostaze u „mirnoj“ sredini (Lawrence i Natoli, 2011; Murray i Wynn, 2011). Smatra se da su lokalno programirane da imunološki „nemo“ (engl. silent), bez pokretanja inflamatornog odgovora (iako eksprimiraju TLR koji prepoznaju nukleinske kiseline apoptotičnih ćelija), uklanjaju apoptotične ćelije iz svog okruženja i održavaju homeostazu (Roberts i sar, 2017). Budući da uz ove nalaze, postoje podaci koji pokazuju da se ekspresija CD163 na monocitima ushodno reguliše pod uticajem glukokortikoida i antiinflamatornih citokina, kao što je IL-10 (Buechler i sar, 2000; Högger i sar, 1998; Van Den Heuvel i sar, 1999), CD163 se dominantno posmatra kao marker alternativno aktivisanih M2 makrofaga, koji ispoljavaju imunosupresorne/imunoregulatorne karakteristike (Chen i sar, 2015; Gordon, 2003; Verreck i sar, 2006). Međutim, činjenica da je vezivanje ED2 monoklonskog antitela za CD163,

receptor „čistač“ koji vezuje hemoglon:haptoglobin komplekse (Fabriek i sar, 2005), na makrofagama sveže izolovanim iz „mirnog“ peritoneuma pacova dovelo do povećane sekrecije proinflammatoryh medijatora (Polfliet i sar, 2006), što evidentno nije u skladu sa viđenjem ovog molekula kao markera M2 makrofaga (Chen i sar, 2015; Gordon, 2003; Verreck i sar, 2006), nametnula je preispitivanje prethodnog stava. Pokazalo se da se ova, na prvi pogled, očigledna kontradiktornost može objasniti prethodno pomenutim nalazom koji govori da je genska ekspresija rezidentnih makrofaga regulisana delovanjem faktora iz njihovog neposrednog okruženja, te da se sekretorni profil makrofaga može razlikovati u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Roberts i sar, 2017). S druge strane, CCR7 molekul se može posmatrati i kao jedan od markera M1 makrofaga (Martinez i sar, 2006), što bi upućivalo da se relativni odnos M1:M2 makrofaga nije značajno menjao tokom faze reproduktivnog starenja, koja je bila predmet istraživanja u ovoj disertaciji. Dodatno, rezultati prikazani u ovoj disertaciji su pokazali da se procentualna zastupljenost makrofaga koje eksprimiraju CD169 molekul značajno smanjivala na makrofagama izolovanim iz „mirnog“ peritoneuma ženki AO pacova tokom posmatranog perioda reproduktivnog starenja. Ovaj molekul, koji je još poznat kao sijaloadhezin i Siglec-1, inicijalno je smatran receptorom za neopsonizovane ovčije eritrocite, eksprimiran je na makrofagama limfoidnih tkiva i stromalnim tkivnim makrofagama (Asano i sar, 2018). Smatra se da je uključen u međucelijske interakcije i interakcije makrofaga sa patogenima (Oetke i sar, 2006). Prvobitno se pretpostavljalo da CD169+ makrofage imaju proinflammatory svojsva, ali njihov sekretorni profil (manja sekrecija proinflammatoryh citokina u poređenju sa CD169- makrofagama, a visoka, ali uporediva sekrecija IL-10 sa onom u CD169- makrofagama) nije išao u prilog toj pretpostavci (Liu i sar, 2020). Posledično, makar kada su u pitanju CD169+ makrofage humanog porekla, prethodni stav vezan za funkcijske karakteristike ovih ćelija je revidiran, tako da se smatra, imajući u vidu M1/M2 paradigmu, da se ove ćelije ne mogu svrstati ni u M1 ni u M2 ćelije, već da čine posebnu subpopulaciju ćelija, čiju biološku ulogu tek treba ispitati (Chávez-Galán i sar, 2015), koja po svemu sudeći zavisi od tkiva u kojem se nalaze (Hiemstra i sar, 2014; Ravishankar i sar, 2014). Posebno važno u kontekstu ispitivanja prikazanih u ovoj disertaciji su, relativno nedavno, objavljeni podaci koji pokazuje da CD169+ makrofage peritonealne šupljine kod miša imaju važnu ulogu u razvoju hemijski-indukovne inflamacije crevne sluznice, budući da smanjenje njihovog broja značajno smanjuje razvoj inflamacije, moguće regulacijom odnosa između različitih subpopulacija T-ćelija (Wang i sar, 2017). Ovi nalazi se uklapaju u hipotezu prema kojoj CD169+ makrofage, generalno, imaju prevashodno ulogu u regulaciji inflamacije i imunskog odgovora, a ne u održavanju tkivne homeostaze (Chávez-Galán i sar, 2015). Iz svega prethodno iznetog jasno sledi da bi relativna zastupljenost subpopulacija makrofaga u jednom tkivu značajno uticala na njihov funkcijski kapacitet (Epelman i sar, 2014).

Uz sve što je navedeno, ispitivanja u okviru ove disertacije su pokazala da se procenat ćelija koje eksprimiraju MHC II molekule u okviru populacije CD68+ peritonealnih makrofaga ženki AO pacova smanjuje u toku perioda reproduktivnog starenja koji je ispitivan u ovoj disertaciji. MHCII molekule eksprimiraju i tkivne rezidentne makrofage peritonealne šupljine i makrofage monocitnog porekla, s tim što je gustina njihove ekspresije veća na ovim drugim (Bou Ghosn i sar, 2010). Treba istaći da postoje podaci koji ukazuju da MHCII molekuli učestvuju ne samo u započinjanju CD4+ T-ćelijskog imunskog odgovora, već, donekle potpuno iznenađujuće, i u generisanju optimalnog urođenog imunskog odgovora (Frei i sar, 2010). Ovo njihovo svojsvo se povezuje sa činjenicom da su kolokalizovani sa TLR-ima na plazma membrani, a ne sa direktnim vezivanjem liganda za MHCII (Frei i sar, 2010). TLR-i čine najznačajniji signalni sistem makrofaga (Moynagh, 2005). Naime, TLR prepoznaju čitav niz PAMP-ova čijim vezivanjem započinje akutni inflamatorni odgovor koji, u krajnjem, vodi

eliminaciji patogena (Moynagh, 2005), što jasno ukazuje na značaj moguće kooperacije MHCII i TLR. Smanjenje ekspresije MHCII starenjem je u skladu sa onim što je već opisano kod čoveka i miša (Herrero i sar, 2001). Smatra se da bi se ovo smanjenje moglo pripisati smanjenom vezivanju transkripcionih faktora za promotor gena za MHCII do kojeg dolazi starenjem (Herrero i sar, 2002). Da bi se potpunije sagledale funkcijske implikacije ovog nalaza, ispitivana je ekspresija TLR4, kao prototipskog člana TLR familije receptora (Lu i sar, 2008). TLR4 efikasno prepoznaje LPS u bakterijskoj membrani gram negativnih bakterija, čime se pokreće signalna kaskada, npr. NF- $\kappa$ B i mitogenom-aktivisana protein kinaza (MAPK), što kulminira sintezom proinflamatornih citokina (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12) i interferona tipa I (Lu i sar, 2008). Ovo je preduslov za efikasan inflamatorni odgovor koji vodi destruktiji patogena (Lu i sar, 2008). Pokazano je da se ekspresioni profil TLR4 na makrofagama mladih i sredovečnih ženki pacova nije značajno razlikovao. Posledično, može se pretpostaviti da stimulacija, makar membranskih TLR4, indukuje snažniji odgovor makrofaga mladih ženki AO pacova u poređenju sa makrofagama sredovečnih ženki ovih životinja, kao i da se tokom reproduktivnog starenja, usled smanjivanja ekspresije MHCII, može očekivati i smanjenje efikasnosti adaptivnog imunskog odgovora, u čijoj inicijaciji ovi molekuli imaju ključnu ulogu (Herrero i sar, 2002).

#### 5.1.1.2. Funkcijske karakteristike

Ispitivanja fagocitne sposobnosti makrofaga, kao jedne od njihovih najznačajnijih funkcijskih karakteristika, korišćenjem NBT testa, pokazalo je da je sposobnost preuzimanja zimozana A od strane makrofaga izolovanih iz "mirne" peritonealne duplje mladih i sredovečnih ženki pacova AO soja bila u potpunosti komparabilna bez obzira na stimulaciju LPS-om. Podaci iz literature ukazuju da se starenjem smanjuje fagocitna sposobnost rezidentnih peritonealnih makrofaga miša (merena testovima *in vivo*), ali ne i fagocitna sposobnost makrofaga monocitnog porekla i da ovaj efekat starenja nije vezan za intrinzična svojstva rezidentnih makrofaga već za delovanje faktora iz njihovog okruženja (Linehan i sar, 2014). Prema tome, diskrepanca između nalaza dobijenih u sklopu ove doktorske disertacije i u ispitivanjima Linehan-a i sar. (2014), mogla bi se objasniti činjenicom da je rezultat prikazan u disertaciji dobijen u ispitivanjima *in vitro*. Izostanak stimulatornog delovanja LPS-a na fagocitnu sposobnost makrofaga izolovanih iz "mirne" peritonealne duplje mladih i sredovečnih životinja mogao bi se pripisati nishodnoj regulaciji ekspresije receptora dektina-1 pod uticajem LPS-a (Willment i sar, 2003). Važno je napomenuti da se generalno, smanjenje fagocitnog kapaciteta makrofaga povezuje sa smanjenim kapacitetom za uklanjanje ćelijskog debrisa i patogena i povećanjem incidencije razvoja tumora kod starih životinja (Licastro i sar, 2005; Oishi i Manabe, 2016).

U sledećem koraku ispitivana je aktivnost MPO u peritonealnim makrofagama. MPO ne sintetišu makrofage već samo monociti, ali MPO generisan u drugim ćelijama (monociti, neutrofili) podstiče nastanak "oksidativnog praska" u makrofagama tokom fagocitoze (Rodrigues i sar, 2002). Interakcija MPO (koji u peritonealnoj duplji najverovatnije potiče od MPO koji su oslobodili monociti i neutrofili, čiji ulazak u peritonealnu duplju u inflamaciji prethodi ulasku monocita, ali i od neutrofila koji su eferocitozom uneti u makrofage) sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, u prisustvu hloridnih jona, dovodi do sinteze HOCl i tako povećava mikrobicidni kapacitet ovih ćelija (Rodrigues i sar, 2002). Treba istaći da MPO, delujući na makrofage, povećava njihovu sposobnost da sintetišu proinflamatorne citokine (Rodrigues i sar, 2002), ali i da se njegovo oslobađanje povezuje s destrukcijom tkiva (Winterbourn i sar, 2000). Bez obzira na stimulaciju LPS-om, aktivnost MPO je bila niža u makrofagama izolovanim iz peritonealne šupljine sredovečnih ženki AO pacova u poređenju s mladim. Imajući u vidu prethodno

pomenute podatke (Rodrigues i sar, 2002; Winterbourn i sar, 2000), može se spekulirati da bi manje preuzimanje MPO od strane makrofaga sredovečnih životinja moglo da pogoduje ne samo smanjenju njihovog mikrobicidnog kapaciteta, već i više izraženoj destrukciji tkiva sa razvojem hroničnog zapaljenja. Smanjeno preuzimanje MPO bi moglo da implicira da se u toku ispitivane faze reproduktivnog starenja povećava destruktivni kapacitet MPO. Međutim, i smanjena produkcija MPO u ćelijama peritonealne duplje kao objašnjenje se mora uzeti u obzir. U prilog ovoj pretpostavci ide činjenica da estrogen, čija se koncentracija smanjuje u toku reproduktivnog starenja, povećava sintezu MPO (Bekesi i sar, 2001).

Istraživanja su upotpunjena ispitivanjem sposobnosti makrofaga izolovanih iz "mirne" peritonealne duplje da sintetišu NO. Za razliku od LPS-om nestimuliranih makrofaga, koje su bez obzira na uzrast životinja iz kojih su izolovane pokazivale sličnu produkciju NO, LPS je snažnije stimulisao produkciju ovog proinflatornog medijatora u peritonealnim makrofagama sredovečnih ženki pacova AO soja. Stimulatorni efekat LPS-a na produkciju NO u peritonealnim makrofagama miša već je ranije pokazan (Cecilio i sar, 2011). Značajno snažniji stimulatorni efekat LPS-a na sintezu NO u makrofagama sredovečnih ženki mogao bi se povezati sa činjenicom da su makrofage peritonealne šupljine sredovečnih ženki pacova AO soja izložene značajno manjoj koncentraciji estrogena i progesterona, za koje je pokazano u *in vivo* i *in vitro* uslovima da deluju inhibitory na sintezu NO (Coughlan i sar, 2005). Imajući u vidu da NO i citrulin u makrofagama nastaju iz arginina pod uticajem iNOS, a da pod uticajem arginaze iz istog supstrata - arginina nastaje ornitin i urea, pa tako aktivacija jednog puta ograničava drugi (Rath i sar, 2014) u sklopu ove disertacije analiziran je i sadržaj uree u makrofagama "mirne" peritonealne šupljine. Sadržaj uree je bio sličan u makrofagama koje nisu stimulisane LPS-om. Međutim, u saglasnosti sa onim što je nađeno u drugim ispitivanjima (Lou i sar, 2014; Rath i sar, 2014) stimulacija LPS-om je povećala sintezu uree i u makrofagama mladih i u makrofagama sredovečnih ženki pacova AO soja, ali tako da je ovo povećanje, bilo manje u makrofagama sredovečnih životinja, pa i njen sadržaj u poređenju sa mladim ženkaama AO pacova. Treba naglasiti da NO može dalje da se metaboliše u RNS, kao i da se citrulin, koji nastaje istim metaboličkim putem, može ponovo koristiti za sintezu NO u citrulin - NO ciklusu, čime da se dodatno povećava sinteza NO (Lou i sar, 2014; Rath i sar, 2014). S druge strane, treba takođe napomenuti da aktivacija arginaznog puta dovodi, ne samo do smanjene raspoloživosti arginina za sintezu NO, već oritin koji nastaje tim metaboličkim putem može biti važan izvor za sintezu poliamina i prolina, koji su značajni za ćelijski proliferaciju i reparaciju tkiva, te da manja aktivnost ovog puta može da ishoduje smanjenom sposobnosti za reparaciju tkiva (Lou i sar, 2014; Rath i sar, 2014).

Konačno, ispitivan je mogući značaj promena koje se dešavaju tokom reproduktivnog starenja pacova, a koje se ogledaju u gubitku regularnosti estrusnih ciklusa i promenama u koncentraciji steroidnih hormona jajnika na citokinski profil peritonealnih makrofaga ženki AO pacova. Generalno, nakon stimulacije LPS-om makrofage sredovečnih ženki AO pacova su sintetisale značajno manje proinflatornih citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ). Imajući u vidu da se nije menjao odnos subpopulacija koje bi prema ekspresiji markera odgovarale proinflatornim M1 i antiinflatornim M2 makrofagama u toku ispitivanog perioda, a da se smanjio udeo CD169+ ćelija, koje sekretuju manje proinflatornih citokina nego CD169-ćelije (Liu i sar, 2020), u ukupnoj populaciji makrofaga, smanjenje sinteze proinflatornih citokina bi se mogle delimično pripisati promenama u odnosu ćelijskih subpopulacija koje čine populaciju peritonealnih makrofaga. Činjenica da makrofage sredovečnih životinja sintetišu i veće količine NO (da u njima dolazi do disregulacije sinteze NO), najverovatnije usled protražovanog izlaganja manjim koncentracijama estrogena i progesterona (Coughlan i sar, 2005) je takođe bila u skladu sa manjom sintezom proinflatornih citokina u ukupnoj



populaciji peritonealnih makrofaga sredovečnih ženki, s obzirom da je pokazano da NO aktivno suprimira sintezu proinflammatory citokina (Kobayashi, 2010). Postoje podaci koji ukazuju da bi smanjenje koncentracije estrogena moglo, i mehanizmima nezavisnim od njegovog uticaja na iNOS i sintezu NO, da utiče na sintezu proinflammatory citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) (Miller i Hunt, 1996; Sorachi i sar, 1993). Dodatno, u nastanku ovog fenomena mogla bi da učestvuje i smanjena aktivnost MPO u LPS-om stimulisanim ćelijama, kao posledica, pre svega, njihove smanjene sposobnosti za eferocitozu, a moguće i razlika u intenzitetu infiltracije neutrofila i kinetici razvoja inflamacije peritoneuma kod mladih i sredovečnih životinja (Rodrigues i sar, 2002), ali i da se njegovo oslobađanje povezuje s destrukcijom tkiva (Winterbourn i sar, 2000). Na kraju, mada i ne najmanje važno, nastanku ovog fenomena bi mogao da doprinese i smanjen aktivacioni kapacitet peritonealnih makrofaga sredovečnih ženki pacova u odnosu na mlade životinje. Recipročno, u peritonealnim makrofagama je bila povećana sinteza/sekrecija IL-10, što bi se delimično moglo povezati sa protrahovanom izlaganjem ovih ćelija nižim koncentracijama estrogena, budući da postoje podaci da ovaj hormon inhibiše sintezu IL-10 (Angele i sar, 2000). U prilog prethodnim nalazima ide podatak da M1 i M2 makrofage mogu biti i proinflammatory i antiinflammatory (Rath i sar, 2014). Treba istaći M1/M2 polarizacija makrofaga sekundarno utiče na polarizaciju CD4+ T limfocita, a onda ova povratno, na M1/M2 dihotomiju stvarajući bazu sa samoodržujuću, M1/M2 polarizaciju i profil imunskog odgovora u celini (Rath i sar, 2014).

### 5.1.2. TG makrofage

U sklopu sledećeg segmenta ispitivanja uticaja reproduktivnog starenja na makrofage ispitivane su fenotipske i funkcijske odlike peritonealnih makrofaga koje su izolovane 7. dana nakon hemijske indukcije peritonitisa davanjem tioglikolata. Odabran je upravo ovaj momenat u razvoju akutne inflamacije, budući da su ispitivanja na pacovskom modelu pokazala da je faza rezolucije, koja nastupa oko 7. dana od indukcije peritonitisa (Hekking i sar, 2005) i koju karakteriše izražena akumulacija makrofaga (Lam i sar, 2013) važna za završetak akutne inflamacije, i daleko važnije sprečavanje razvoja hronične niskogradne inflamacije, jedne od najprominentnijih posledica starenja ćelija urođene imunosti (Franceschi i sar, 2018).

#### 5.1.2.1. Fenotipske karakteristike

Ispitivanja fenotipskih karakteristika makrofaga izovanih iz peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki AO pacova, kod kojih je hemijski indukovani peritonitis su pokazala, da u skladu sa podacima dobijenim u studijama drugih autora (Laurin i sar, 2012), tretman tioglikolatom je i kod mladih i kod sredovečnih ženki AO pacova značajno povećao broj ćelija u peritonealnom eksudatu. Međutim, na osnovu ekspresije CD68 molekula, ovaj tretman je samo kod sredovečnih ženki uticao na procentualnu zastupljenost makrofaga u peritonealnom eksudatu (uzrokujući značajno povećanje njihove zastupljenosti). Treba istaći da je njihova zastupljenost bila veća kod sredovečnih nego kod mladih ženki AO pacova. Ovaj nalaz je dalje tumačen u svetlu podataka koji jasno pokazuju da peritonealna šupljina nije zatvoren sistem i da se broj ćelija u ovom prostoru može menjati u zavisnosti od influksa monocita u ovaj prostor, emigracije makrofaga iz ovog prostora u drenirajuće limfne čvorove, njihove adhezije za peritoneum, proliferacije/ćelijske smrti (Gordon i sar, 2014). Naime, zrele rezidentne makrofage, su ključne ćelije za započinjanje lokalnog inflamatornog odgovora, jer njihovom aktivacijom dolazi do sekrecije hemokina koji obezbeđuju signale neophodne za influks neutrofila i monocita iz cirkulacije (Cailhier i sar, 2005; Laurin i sar, 2012). Ovi

monociti, lokalno, u peritonealnoj duplji, sazrevaju u inflamatorne makrofage (Jakubzick i sar, 2017). Imajući u vidu činjenicu da su makrofage izuzetno otporne na delovanje proapoptotskih signala (Munn i sar, 1995; Perlman i sar, 1999), može se spekulirati da njihova eliminacija apoptozom ne utiče značajnije na ukupan broj makrofaga u peritonealnom eksudatu u akutnom peritonitisu. Verovatnije je da makrofage, u akutnoj inflamaciji, kakva je ona koju je indukovao tretman tioglikolatom nakon uklanjanja apoptotičnih neutrofila eferocitozom, migriraju u drenirajuće limfne čvorove (Bellingan i Laurent, 2008). Shodno svemu što je prethodno izneto, može se očekivati da se u akutnom peritonitisu menja ne samo ukupan broj makrofaga, već i odnos makrofagnih subpopulacija. Imajući u vidu da je CD68 molekul eksprimiran intracelularno na membranama lizozoma (Cohni Benson, 1965; Iqbal i sar, 2014) te da monociti imaju značajno manje lizozoma u odnosu na makrofage (Cohn i Benson, 1965), niža gustina ekspresije CD68 molekula na CD68+ TG makrofagama izolovanim iz ženki AO pacova oba uzrasta u odnosu na rezidentne makrofage je najverovatnije odražavala veću zastupljenost makrofaga monocitnog porekla, odnosno pojačan influks monocita sa periferije nakon tretmana tioglikolatom. Ovaj nalaz je bio potpuno očekivan imajući u vidu rezultate dobijene u drugim studijama (Hanna i sar, 2012). S druge strane, tioglikoladni tretman je smanjivao procentualnu zastupljenost CD163+ ćelija u okviru CD68+ makrofaga samo kod mladih ženki, što je ukazivalo da se odnos rezidentnih tkivnih CD163+ makrofaga i makrofaga monocitnog porekla značajno više pomerao na stranu monocitnih makrofaga kod mladih ženki u poređenju sa sredovečnim ženkaama AO pacova. U skladu sa ovim nalazom, kod mladih ženki AO pacova tretiranih tioglikolatom nađen je povećan procenat ćelija koje ekspresiraju CCR7, koji se smatra jednim od markera makrofaga monocitnog porekla (Gordon i Taylor, 2005) i ukazuje na M1 polarizaciju makrofaga (Martinez i sar, 2006). Nadalje, davanje tioglikolata je povećavalo i procentualnu zastupljenost CD169+ ćelija, ćelija koje imaju ulogu u regulaciji crevne inflamacije i imunskog odgovora (Wang i sar, 2017), u okviru CD68+ ćelija kod životinja oba uzrasta. Ovaj efekat davanja tioglikolata je bio više izražen kod mladih životinja.

Sledeće, analiza ekspresije molekula koji imaju ključnu ulogu u aktivaciji makrofaga je pokazala da je tretman tioglikolatom smanjivao procenat TLR4+ ćelija u okviru populacije peritonealnih TG makrofaga i mladih i sredovečnih ženki AO pacova, ali je ovaj efekat bio jače izražen kod sredovečnih ženki, tako da je kod njih procenat ovih ćelija bio značajno manji nego kod mladih životinja. Podatak da se gustina ekspresije TLR4 smanjuje na TG makrofagama u skladu je sa nalazima drugih istraživača (Renshaw i sar, 2002). S druge strane, tioglikolat je povećavao procentualnu zastupljenost MHC II+ na makrofagama i mladih i sredovečnih ženki AO pacova, ali je taj efekat bio više izražen kod mladih. Posledično, zastupljenost MHC II ćelija bila je veća u okviru populacije peritonealnih makrofaga mladih nego sredovečnih ženki pacova ovog soja. Ovaj nalaz je bio potpuno u skladu s podacima koji pokazuju da se kapacitet makrofaga za ekspresiju MHCII smanjuje starenjem (Herrero i sar, 2002). Imajući u vidu prethodno iznete podatke da MHCII molekuli učestvuju ne samo u započinjanju adaptivnog CD4+ T-ćelijama posredovanog imunskog odgovora, već i u generisanju optimalnog urođenog imunskog odgovora (Frei i sar, 2010), može se pretpostaviti da će LPS indukovati snažniji odgovor peritonealnih makrofaga kod mladih ženki AO pacova u poređenju sa ovim odgovorom kod sredovečnih ženki pacova ovog soja.

#### 5.1.2.2. Funkcijske karakteristike

Makrofage izolovane iz peritonealne duplje pacova oba uzrasta kod kojih je tioglikolatom izazvan peritonitis, i u prisustvu i u odsustvu LPS-a, pokazivale su veću sposobnost preuzimanja zimozana A u odnosu na ove ćelije izolovane iz "mirne" peritonealne duplje

životinja istog uzrasta. Zimozan A (poreklom iz *Saccharomyces cerevisiae*) je polisaharid D-glukoznih monomera povezanih  $\beta$ -1,3 glikozidnim vezama i ćelije ga prepoznaju, vezuju i fagocituju posredstvom dektina-1 (Herre i sar, 2004). Dektin-1 je  $\beta$ -glukanski receptor sa osobinama klasičnog PRR koji prepoznaje visoko konzervirane sekvence  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,6 glukana (Herre i sar, 2004). Imajući ovo u vidu, veća sposobnost preuzimanja zimozana A od strane TG makrofaga u poređenju sa onim izolovanim iz "mirne" peritonealne duplje, bi se mogla povezati sa činjenicom da tioglikolat ushodno reguliše ekspresiju dektin-1 receptora (Herre i sar, 2004). Veća fagocitna sposobnost TG makrofaga sredovečnih ženki u odnosu na ženke mladih životinja mogla bi se povezati sa reproduktivnim starenjem uslovljenim razlikama u njegovoj ekspresiji, budući da koncentracija estradiola i dužina ekspozicije delovanju ovog hormona u određenoj koncentraciji može uticati na ekspresiju dektin-1 receptora (Costa i sar, 2020). Izostanak značajnijeg povećanja fagocitoze zimozana A od strane TG makrofaga u prisustvu LPS-a, kao i kada su u pitanju makrofage izolovane iz "mirne" peritonealne duplje, mogao bi se pripisati nishodnoj regulaciji ekspresije dektin-1 receptora u odgovoru na stimulaciju LPS-a (Willment i sar, 2003). Činjenica da nakon stimulacije LPS-om, uprkos većoj fagocitnoj sposobnosti koje su pokazivale TG makrofage sredovečnih životinja koje nisu stimulisane LPS-om, nije bilo uzrasnih razlika u fagocitnoj sposobnosti TG makrofaga stimulisanih LPS-om, ide u prilog manjem stimulativnom kapacitetu LPS-a kod sredovečnih u poređenju sa mladim životinjama.

Ispitivanje uticaja reproduktivnog starenja na TG makrofage je uključivala i analizu aktivnosti MPO u ovim ćelijama. U skladu s podacima dobijenim u drugim studijama, koji ukazuju da se delovanjem aktivacijskih stimulusa na peritonealne monocite/makrofage povećava aktivnost ovog enzima (Rodrigues i sar, 2002), njegova aktivnost je bila veća u TG makrofagama u odnosu na makrofage izolovane iz "mirne" peritonealne duplje ženki AO pacova istog uzrasta koje su *in vitro* podvrgnute istom tretmanu (kultivacija u čistom medijumu vs stimulacija LPS-om). Tokom reproduktivnog starenja se smanjivala aktivnost ovog enzima u TG makrofagama bez obzira na stimulaciji LPS-om što je, kao što je prethodno rečeno, moglo da implicira ne samo smanjenu mikrobicidnu aktivnost, već moguće veću mogućnost nastanka MPO-om posredovane destrukcije tkiva (Rodrigues i sar, 2002). Ovo, sa reproduktivnim starenjem povezano, smanjenje aktivnosti MPO bi moglo da bude posledica smanjene sposobnosti aktivacije makrofaga sredovečnih životinja (Rodrigues i sar, 2002). Alternativno, ovaj nalaz bi mogao, kao u nekim drugim inflamiranim tkivima (Campuzano i sar, 2011), da odražava starenjem uslovljeno smanjenje infiltracije neutrofilima i monocitima i sledstveno smanjenje ukupne aktivnosti MPO. Teorijski, smanjenje sposobnosti sinteze MPO starenjem se takođe mora uzeti u obzir. O ovome ima posebno smisla razmišljati u kontekstu činjenice da je koncentracija estrogena bila manja kod sredovečnih ženki nego kod mladih ženki AO pacova, s obzirom da postoje podaci da estrogen povećava koncentraciju MPO u plazmi i njegovu aktivnost u mijeloidnim ćelijama (Santanam i sar, 1998).

U sklopu istraživanja u ovoj disertaciji ispitivana je i sposobnost TG makrofaga da u bazalnim uslovima i nakon stimulacije LPS-om sintetišu NO. TG makrofage izolovane iz ženki AO pacova oba uzrasta su produkovala više NO nego makrofage izolovane iz "mirne" peritonealne duplje životinja odgovarajućeg uzrasta, što je u skladu sa podacima dobijenim u drugim istraživanjima koji pokazuju da stimulacija tioglikolatom povećava produkciju NO u peritonealnim makrofagama (Cecílio i sar, 2011). Ovaj efekat je bio više izražen u TG makrofagama sredovečnih ženki AO pacova, što bi, makar delimično, moglo da se poveže sa manjom koncentracijom ne samo estrogena, već i progesterona u njihovoj cirkulaciji (Coughlan i sar, 2005). Kao što se na osnovu podataka iz literature (Cecílio i sar, 2011) moglo

očekivati, LPS je u rezidentnim makrofagama oba uzrasta značajno povećavao sintezu NO i ovaj efekat je bio više izražen kod sredovečnih ženki pacova.

U skladu sa činjenicom da iNOS i arginaza kompetuju za isti supstrat (Lou i sar, 2014; Rodrigues i sar, 2002), TG makrofage izolovane iz mladih ženki AO pacova su sintetisale manje uree u poređenju sa ovim ćelijama izolovanim iz "mirne" peritonealne životinja istog uzrasta. Podaci iz literature govore da u inflamiranim tkivima, zavisno od toga kakav je genetski "background" eksperimentalnih životinja, makrofage mogu da produkuju i više i manje uree u poređenju sa ćelijama izolovanim iz neinflamiranih tkiva (Campuzano i sar, 2011; Marinkovic i sar, 2017). U skladu sa onim što je već opisano (Rath i sar, 2014), LPS je smanjivao produkciju uree u TG makrofagama i mladih i sredovečnih AO pacova, a ovaj efekat je bio jače izražen u makrofagama sredovečnih pacova u odnosu na one izolovane iz mladih životinja.

Konačno, ispitivan je citokinski sekretorni profil TG makrofaga. Pokazano je da slično kao u peritonealnim makrofagama izolovanim iz "mirne" peritonealne duplje AO pacova, LPS-om stimulisana sinteza/sekrecija svih analizovanih proinflamatornih citokina (IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) je bila značajno niža (osim TNF- $\alpha$ ) u TG makrofagama sredovečnih ženki ovih životinja u poređenju sa onim izolovanim iz mladih životinja istog pola. Kao, i kada su bile u pitanju makrofage izolovane iz "mirne" peritonealne duplje, ovaj nalaz bi mogao da se objasni u svetlu nekolicine drugih nalaza. Pre svega on je bio u skladu sa podacima koji su ukazivali na značajno manji inluks monocita u peritonealnu duplju sredovečnih pacova. Osim toga, kao i makrofage izolovane iz "mirne" peritonealne duplje, TG makrofage sredovečnih pacova su pokazivale pojačanu sintezu NO, a smanjenu MPO, što se može povezati sa smanjenom sintezom proinflamatornih citokina (Kobayashi, 2010; Rodrigues i sar, 2002), ali i da se njegovo oslobađanje povezuje s destrukcijom tkiva (Winterbourn i sar, 2000). Dodatno, smanjena sinteza/sekrecija proinflamatornih citokina u LPS-om stimulisanim TG makrofagama sredovečnih ženki u poređenju sa ovim ćelijama izolovanim iz mladih životinja bi mogla da se poveže i sa manjom zastupljenosti ćelija koje eksprimiraju TLR4, posebno imajući u vidu da je bila i manja procentualna zastupljenost ćelija koje eksprimiraju MHCII u okviru populacije peritonealnih makrofaga sredovečnih ženki AO pacova. Povećana sinteza/sekrecija IL-10 u TG makrofagama sredovečnih u odnosu na ćelije izolovane iz mladih AO životinja se može povezati sa protrahovanim izlaganjem ovih ćelija manjim koncentracijama estrogena, za koji je pokazano da inhibira sintezu ovog citokina (Angele i sar, 2000). Povećana sinteza profibrinogenog TGF- $\beta$  u TG makrofagama sredovečnih ženki pacova bila je skladu sa nedavno objavljenim podacima, prema kojima estrogen suprimira ekspresiju gena za ovaj citokin i smanjuje njegovo delovanje (Avouac i sar, 2020).

Dakle, tokom posmatranog perioda reproduktivnog starenja sekretorni i enzimski profil peritonealnih makrofaga izolovanih iz "mirne" i inflamirane peritonealne duplje (7. dana nakon tretmana tioglikolatom) menjao se na isti način, tako što se u njima smanjivala aktivnost MPO, a povećavala sinteza NO i sledstveno tome se smanjivala sinteza/sekrecija proinflamatornih, a povećavala sekrecija TGF- $\beta$ , antiinflamatornog citokina. Dodatno, na promenu citokinskog sekretornog profila ovih ćelija uticale su i uzrasno-zavisne promene u odnosu subpopulacija koje ulaze u sastav makrofagne populacije (smanjenje zastupljenost regulatornih CD169+ ćelija u populaciji ćelija "mirnog peritoneuma, a smanjenje zastupljenosti ćelija monocitnog porekla u okviru TG populacije). Treba istaći da bi ovo moglo da implicira smanjenje antimikrobnog kapaciteta peritonealnih makrofaga inicijacijom reproduktivnog starenja, ali i pojačanu sklonost ka razvoju fibroze peritoneuma, usled

---

pojačane sinteze antiinflamatornog TGF- $\beta$ , koji ima ključnu ulogu u inicijaciji, progresiji i održavanju fibroze peritoneuma (Hu i sar, 2012).

## 5.2. UTICAJ REPRODUKTIVNOG STARENJA NA FENOTIPSKU I FUNKCIJSKU KARAKTERISTIKU TG MAKROFAGA PERITONEALNE ŠUPLJINE ŽENKI AO I DA SOJA PACOVA

S obzirom da je primećeno da ženke pacova AO soja imaju duži životni vek i duži period života bez znakova bolesti i makroskopski vidljivih patoloških promena od ženki DA soja u štalici Instituta „Torlak“ (Dimitrijević i sar, 2014a), a da je dužina životnog veka povezana sa starenjem uslovljenim promenama kako u stečenoj imunosti tako i u urođenoj imunosti, pre svega sa onim koje utiču na ishod akutne inflamacije – sprečavaju razvoj hroničnog zapaljenskog procesa (Alonso-Fernandez i De la Fuente, 2012; Hekking i sar, 2005; Lastrucci i sar, 2015), u ovom delu istraživanja ispitivan je uticaj reproduktivnog starenja na fenotipski i funkcijski profil peritonealnih makrofaga ova dva soja pacova 7. dana posle indukcije peritonitisa.

### 5.2.1. Fenotipske karakteristike

Ispitivanja u okviru ove disertacije su pokazala da je broj ćelija u peritonealnom eksudatu 7. dana posle davanja TG bio manji i kod mladih i kod sredovečnih ženki pacova DA soja u odnosu na pacove AO soja odgovarajuće starosti. U prilog ovom nalazu ide činjenica da su sojne razlike u broju ovih ćelija uočene i kod miševa (Festing, 1990). Procentualna zastupljenost CD68+ ćelija – makrofaga bila je veća kod mladih jedinki DA soja u odnosu na jedinke AO soja odgovarajuće starosti. Budući da je procenat CD68+ ćelija rastao samo kod pacova AO soja starenjem, njihov procenat je bio sličan kod sredovečnih životinja ova dva soja. Imajući u vidu da gustina ekspresije ovog molekula ukazuje na poreklo makrofaga (Cohn i Benson, 1965), kao i da kod pacova DA soja skoro sve makrofage peritonealne šupljine (za razliku od AO pacova) ekspresiraju CD68 i da je gustina njegove ekspresije, bez obzira na uzrast, bila veća kod DA nego kod AO pacova, može se pretpostaviti da se makrofage koje se nalaze u eksudatu inflamiranog peritoneuma DA i AO pacova razlikuju prema poreklu. Osim toga, budući da se gustina ekspresije CD68 molekula menjala (smanjivala) starenjem kod DA pacova (što je ukazivalo na veće učešće makrofaga monocitnog porekla) (Cohn i Benson, 1965; Iqbal i sar, 2014), a nije se menjala kod AO pacova, može se zaključiti da se učešće subpopulacije poreklom od cirkulišućih monocita u sastavu ovog eksudata značajno menjalo samo kod DA pacova. Ovaj nalaz sojnih razlika u sastavu peritonealnog eksudata je u skladu s podacima dobijenim kod miševa (Festing, 1990). Dakle, iako se ukupno procentualno učešće makrofaga u peritonealnom eksudatu sredovečnih pacova nije razlikovalo kod AO i DA pacova, dobijeni nalazi su ukazivali na manje učešće ćelija monocitnog porekla kod DA pacova u poređenju sa AO pacovima (Hoover-Plow i sar, 2008).

U skladu s prethodnim nalazima uočeno je da se tokom reproduktivnog starenja procentualna zastupljenost CCR7+ ćelija u okviru populacije CD68+ makrofaga smanjivala kod DA pacova (ukazujući na smanjenje udela ćelija monocitnog porekla), dok se procentualna zastupljenost ovih ćelija kod AO ženki nije menjala. Ovaj zaključak je izveden na osnovu, već iznetih, podataka koji ukazuju da je CCR7 jedan od markera makrofaga monocitnog porekla (Gordon i Taylor, 2005).

Kod mladih, kao i kod sredovečnih ženki DA pacova procentualna zastupljenost ćelija koje ekspresiraju CD163, klasičan marker zrelih rezidentnih makrofaga (Chen i sar, 2015; Gordon,

2003; Verreck i sar, 2006), u okviru CD68+ makrofaga se nije menjala (oko 10%), i bila je značajno niža u odnosu na zastupljenost kod ženki AO soja odgovarajućeg uzrasta. Prethodni nalaz bi ukazivao da je kod DA pacova bila manja zastupljenost zrelih tkivnih makrofaga nego kod AO pacova. S druge strane, procentualna zastupljenost CD163+ ćelija u okviru makrofaga se starenjem značajno povećavala kod AO pacova, što bi moglo da implicira da se povećanje procentualne zastupljenosti makrofaga kod sredovečnih u odnosu na mlade životinje, makar delimično, može pripisati povećanju zastupljenosti zrelih tkivnih makrofaga.

Bez obzira na uzrast, za razliku od AO pacova, CD68+ makrofage DA pacova su većinski eksprimirale CD169 marker. Procentualna zastupljenost CD169+ ćelija nije se menjala starenjem kod DA pacova za razliku od pacova AO soja kod kojih se smanjivala starenjem. Već je istaknuto da CD169+ makrofage imaju ulogu u regulaciji inflamacije, pa bi sojne razlike u njihovoj procentualnoj zastupljenosti mogle da impliciraju razlike u ukupnom regulatornom kapacitetu TG makrofaga peritonealne šupljine DA i AO pacova (Epelmani i sar, 2014). Izrazito velika zastupljenost ovih ćelija kod DA pacova bi mogla da se posmatra i u kontekstu podataka iz literature koji ukazuju da se izrazito povećan broj CD169+ makrofaga može dovesti u vezu sa razvojem hronične inflamacije (Wangi sar 2017), autoimunskih bolesti i tumora (Liu i sar, 2020), odnosno s podacima koji ukazuju da bi ovo povećanje moglo negativno da utiče na „uspešno“ starenje. Pokazano je da CD169+ makrofage koje se akumuliraju tokom eksperimentalne arterijske okluzije nastaju od lokalno proliferišućih rezidentnih prekursora, a ne od monocita koji su migrirali iz krvnih sudova (Khmelewski i sar, 2004). S obzirom na prethodno iznete podatke da su to zrele rezidentne makrofage, koje su klasično okarakterisane markerom CD163, detektovane u malom procentu kod pacova DA soja u obe starosne grupe (ispod 10%), može se postaviti pitanje da li CD169+ makrofage predstavljaju posebnu subpopulaciju tkivnih makrofaga (Chávez-Galán i sar, 2015). Ovo pitanje je posebno opravdano s obzirom da monociti ne eksprimiraju CD169 (Oetke i sar, 2006), da se tokom inflamacije povećava procenat makrofaga koji eksprimiraju ovaj molekul (Khmelewski i sar, 2004; Ikezumi, 2005) i da CD169+ makrofage imaju sposobnost proliferacije (Khmelewski i sar, 2004). Uzimajući u obzir sve prethodno navedene činjenice može se spekulirati da CD169+ makrofage odgovaraju posebnoj populaciji rezidentnih ćelija koje se umnožavaju tokom inflamacije. U prilog ovoj hipotezi ide manja procentualna zastupljenost MHCII+ ćelija u okviru CD68+ ćelija DA pacova, budući da je pokazano da rezidentne makrofage embrionalnog porekla odlikuje značajno manja ekspresija ovog molekula u poređenju sa onim monocitnog porekla (Bou Ghosn i sar, 2010; Cassado i sar, 2015). U zaključku, svi prethodno izneti podaci dodatno idu u prilog tezi da se starenjem u inflamaciji peritoneuma menja učešće različitih subpopulacija makrofaga, tako kod sredovečnih DA pacova u fazi rezolucije inflamacije dominantno učestvuju tkivne CD169+ rezidentne makrofage, a kod AO pacova prevashodno makrofage monocitnog porekla, ali i da je učešće zrelih rezidentnih CD163+ makrofaga značajno manje kod DA pacova nego kod AO pacova.

Kod oba soja pacova, nađena je manja zastupljenost TLR4+ ćelija u okviru CD68+ makrofaga sredovečnih pacova u poređenju sa mladim pacovima. Podaci vezani za uticaj starenja na ekspresiju ovog molekula su inkonzistentni, budući da ukazuju da se starenjem kod miša ona ne menja (Boehmer i sar, 2004; Boehmeri sar, 2005), ali i da se smanjuje. Starenjem uslovljeno smanjenje ekspresije ovog molekula povezuje se sa nemogućnošću makrofaga izolovanih iz starih miševa da efikasno odgovore produkcijom citokina na stimulaciju LPS-om (Renshaw i sar, 2002), što u potpunosti odgovara samo onome što je u sklopu ove disertacije nađeno kod AO pacova.

### 5.2.2. Funkcijske karakteristike

Ispitivanje fagocitne sposobnosti TG makrofaga izolovanih iz pacova AO i DA soja je pokazalo da se fagocitna sposobnost makrofaga izolovanih iz pacova DA soja nije menjala tokom reproduktivnog starenja, a da je fagocitna sposobnost peritonealnih makrofaga pacova AO soja rasla. S obzirom da se ekspresija CD163+ povezuje s fagocitozom (Kneidl i sar, 2012), podaci dobijeni ispitivanjem fagocitne sposobnosti makrofaga pacova DA soja tokom reproduktivnog starenja bili su u skladu s nepromenjenom procentualnom zastupljenosti CD163+ ćelija u okviru populacije ćelija. Ovaj nalaz bi se mogao posmatrati u kontekstu podataka koji pokazuju da postoje sojne razlike u uticaju starenja na fagocitozu i da se smanjenje fagocitne sposobnosti makrofaga povezuje s kraćim životnim vekom miševa (Guayerbas i De La Fuente, 2003).

Aktivnost MPO nije se menjala u nestimulisanim i LPS-om stimulisanim makrofagama DA pacova tokom ispitivanog perioda reproduktivnog starenja, dok se, nezavisno od stimulacije LPS-om, u makrofagama AO pacova smanjivala, sa mogućim implikacijama o kojima je već diskutovano u prethodnom poglavlju. Komparativno posmatrano, na bazi prethodnih istraživanja (Rodrigues i sar, 2002), ovaj nalaz bi mogao da ukaže na manju mogućnost nastanka MPO-om posredovane destrukcije tkiva, što bi bilo u skladu sa boljom kontrolom/ishodom inflamacije i moguće dužim životnim vekom AO pacova u odnosu na DA pacove (Lehners i sar, 2014). U prilog smanjenju aktivnosti ovog enzima, poreklom iz ćelija urođene imunosti, kod pacova starenjem idu podaci iz drugih studija (Campuzano i sar, 2011), te bi opisane sojne razlike mogle da upućuju na različitu dinamiku razvoja promena vezanih za starenje ovih ćelija kod pacova AO i DA soja.

Ispitivanja sinteze NO i uree su pokazala da je, bez obzira na uzrast, sinteza NO u LPS-om stimulisanim makrofagama DA pacova bila značajno veća nego u ovim ćelijama pacova odgovarajućeg uzrasta AO soja. S druge strane, sinteza uree je bila veća u LPS-om stimulisanim makrofagama (samo mladih) pacova AO soja s obzirom da je u makrofagama pacova ovog soja detektovano značajno više uree u odnosu na pacove DA soja. Ovi nalazi bi mogli da imaju više implikacija. Moguće je da se aktivnost ključnih enzima (iNOS i arginaza) koji učestvuju u sintezi NO i uree, u ćelijama ova dva soja pacova razlikuje posle stimulacije LPS-om (Sonoki i sar, 1997). U prilog ovoj pretpostavci ide i istraživanje u kome su razlike u aktivnosti iNOS-a i arginaze povezane sa osetljivošću različitih inbrednih sojeva miševa i pacova na infekciju izazvanu *Toxoplasma gondii* (Li i sar, 2012). Značaj genetskih faktora za aktivnost ovih enzima pokazana je u nekim ranijim ispitivanjima (Hussain i Qureshi, 1997; Müllner i sar, 2002). Pored razlike u aktivnosti enzima, moguće je da razlika u sintezi NO i/ili uree kod ova dva soja pacova reflektuje i različitu dostupnosti supstrata za enzime, a usled razlika u aktivnosti transportnih proteina koji ga dopremaju u ćeliju (Yeramian i sar, 2006). Konačno, razlike u sintezi NO i uree u odgovoru na stimulaciju LPS-om bi se mogle pripisati i razlikama u odnosu makrofagnih subpopulacija (Rath i sar, 2014). Da bi se sagledale moguće funkcijske posledice ovih nalaza, treba istaći da NO može imati ne samo proinflamatornu, već i imunoregulatornu ulogu zavisno od nivoa njegove sinteze (Kobayashi, 2010). Naime, ustanovljeno je da manja sinteza NO može uticati na povećanje proizvodnje hemokina, kao što su MIP-2 (engl. macrophage inflammatory protein-2, MIP-2) i MCP-1 (engl. monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), koji su hemoatraktanti za monocite. Shodno tome, imajući u vidu veću zastupljenost ćelija monocitnog porekla kod AO pacova, manja produkcija NO u makrofagama pacova AO soja bi mogla da se posmatra kao očekivan nalaz, a budući da ove ćelije u ispitivanoj fazi razvoja inflamacije (7. dan nakon ubrizgavanja tioglikolata) učestvuju u rezoluciji zapaljenja i kao poželjan nalaz. Veća produkcija NO se povezuje sa njegovim



efektorskim funkcijama koje mogu dovesti do destrukcije tkiva (Kobayashi, 2010). Ovaj nalaz bi mogao da ukaže na moguće negativne posledice povećane sinteze NO tokom reproduktivnog starenja kod pacova DA soja i moguće delimično objasni manje „uspešno“ starenje životinja ovog soja u odnosu na pacove AO soja.

U sledećem koraku je ispitivan uticaj reproduktivnog starenja na citokinski sekretorni profil peritonealnih makrofaga AO i DA pacova. Za razliku od ženki AO pacova, kod ženki DA pacova je pronađeno da se starenjem smanjuje sekrecija IL-10 u kulturama makrofaga. Ovo se može povezati sa sojnim razlikama u starenjem uslovljenim promenama u enzimskoj aktivnosti makrofagne dipeptidil peptidaze (DP4) (Dimitrijević i sar, 2014), enzima koji razgrađuje mnoge citokine i hemokine (Mentlein, 1999; Wrenger, 2006). Naime, aktivnost ovog enzima tokom starenja raste kod DA, a smanjuje se kod AO soja pacova, što je u negativnoj korelaciji sa sekrecijom antiinflamatornog IL-10 (Dimitrijević i sar, 2014). U prilog ovoj tezi idu podaci koji pokazuju da pacovi sa nedostatkom ovog enzima produkuju više IL-10 (Schmiedl i sar, 2010). Povećane koncentracije IL-10 u serumu kod ljudi se dovode u vezu sa dugovečnošću i odsustvom patologije povezane sa starenjem kod starih jedinki (Carrieri i sar, 2004; Lio i sar, 2002; Licastro i sar, 2005). Takođe, pokazano je da su ženke AO pacova koje su doživele maksimalni životni vek (31 mesec) u našoj štatici, uz odsustvo vidljivih patoloških promena, imale značajno više vrednosti IL-10 u supernatantima peritonealnih makrofaga stimuliranih LPS-om u odnosu na ženke iz mlađih starosnih grupa (Dimitrijević i sar, 2014b).

Na isti način na koji se menjala sinteza/sekrecija IL-10 u TG makrofagama tokom reproduktivnog starenja AO (uzrasno-zavisno porast) i DA pacova (uzrasno-zavisno smanjenje), menjala se i sekrecija TGF- $\beta$ . Posledično, veća sekrecija TGF- $\beta$  uočena je u kulturi makrofaga sredovečnih ženki AO u odnosu na DA ženke. Sojne razlike u sintezi ovog citokina u makrofagama uočene su kod miševa (Marques i sar, 2011). Međutim, iako postoje podaci da starenje dovodi do poremećaja u regulaciji sinteze/sekrecije TGF- $\beta$  (Uhrlaub i sar, 2016), podaci o značaju genetskih faktora za uticaj starenja na makrofagnu sintezu/sekreciju ovog citokina su oskudni. Veća sinteza/sekrecija antiinflamatornih citokina u makrofagama AO soja bila je u skladu sa većom procentualnom zastupljenošću CD163+ makrofaga u peritoneumu AO ženki.

S obzirom da dodavanje TGF- $\beta$  u kulturu makrofaga suprimira sintezu proinflamatornih citokina (Fadok i sar, 1998), niže koncentracije proinflamatornih citokina IL-1 $\beta$  i IL-6 u kulturama peritonealnih makrofaga sredovečnih ženki AO pacova u odnosu na kulture ovih ćelija mladih životinja mogu se, makar delimično, povezati sa porastom koncentracije TGF- $\beta$  u supernatantima makrofaga ovih životinja tokom starenja. S druge strane, sinteza/sekrecija TGF- $\beta$  je bila značajno manja u kulturama makrofaga sredovečnih pacova DA soja u odnosu na one mladih životinja, je veća sinteza/sekrecija proinflamatornog IL-1 $\beta$  u ovim kulturama bila očekivan nalaz, posebno imajući u vidu i zastupljenost CCR7+ ćelija u okviru populacije makrofaga. Izostanak supresornog efekta nižih koncentracija TGF- $\beta$  na sintezu IL-6 u kulturama peritonealnih makrofaga sredovečnih pacova DA soja, bi mogao da implicira da smanjenje koncentracije TGF- $\beta$  nije bilo dovoljno da obezbedi porast koncentracije IL-6.

U zaključku ovog dela istraživanja, reproduktivnim starenjem se na sojno specifičan način menjao ćelijski sastav inflamatornog peritonealnog eksudata (kada je analiziran u fazi rezolucije inflamacije, 7. dana od ubrizgavanja tioglikolata), fagocitna sposobnost ovih ćelija, njihova enzimska aktivnost i citokinski profil. Naime, kod sredovečnih ženki pacova AO soja nađena je veća zastupljenosti ćelija monocitnog porekla i zrelih rezidentnih ćelija koji eksprimiraju CD163, marker „klasičnih“ zrelih rezidentnih ćelija u poređenju sa životinjama

istog pola i uzrasta DA soja, a kod životinja DA soja su dominirale ćelije koje ispoljavaju CD169 marker, čija se ekspresija povezuje sa imunoregulatornim karakteristikama ćelija i za koje se smatra da potiču od rezidentnih prekursornih ćelija. Osim toga, makrofage sredovečnih pacova AO soja su pokazivale bolju fagocitnu sposobnost, a manju aktivnost MPO-a i sintezu NO, što se sve može povezati sa efikasnijom kontrolom rezolucije zapaljenja i moguće „uspešnijim“ starenjem ženki pacova ovog soja u odnosu na ženke pacova DA soja. Zatim, makrofage ženki pacova AO soja su proizvele više antiinflamatornih citokina, koji ograničavaju razvoj akutne inflamacije i dovode do njene rezolucije (Fadok i sar, 1998), a manje oštećujućih proinflamatornih citokina, dok su ove ćelije sredovečnih pacova DA soja proizvele više IL-1 $\beta$ , a manje antiinflamatornih citokina, što bi takođe moglo da se poveže sa boljom kontrolom inflamatornog odgovora i sledstveno podacima koji ukazuju da AO pacovi „uspešnije“ stare (Dimitrijević i sar 2014b). S druge strane, značajno veća sinteza/sekrecija TGF- $\beta$  u makrofagama sredovečnih AO ženki u poređenju sa DA pacovima, mogla bi da implicira i izraženiju sklonost ka fibrozi peritoneuma ukoliko ne dođe do potpune rezolucije inflamacije (Hu i sar, 2012).

### 5.3. ZNAČAJ POLA ZA FENOTIPSKU I FUNKCIJSKU KARAKTERISTIKU TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA

Seksualni dimorfizam i diergizam u urođenoj imunosti je dobro poznat i povezan sa razlikama u koncentraciji polnih steroida u cirkulaciji s obzirom na njihov direktan efekat na inflamatorni kapacitet ovih ćelija (Shepherd i sar, 2021), kao i činjenice da se tokom starenja menja koncentracija polnih steroida (što je potvrđeno i istraživanjima u okviru ove disertacije) i funkcijski kapacitet ćelija urođene imunosti, pre svega makrofaga (Bonafè i sar, 2020; Franceschi i sar, 2000; Marriott i Huet-Hudson, 2006; Robert i Spitzer, 1997). Uprkos ovim nalazima, podaci o uticaju starenja na polno-zavisne razlike u funkcijskom/inflamatornom kapacitetu urođene imunosti, uključujući i makrofage, posebno o njihovom kapacitetu da kontrolišu rezoluciju akutne inflamacije, tokom starenja, nisu dovoljno dokumentovani. Imajući sve ovo u vidu, u sledećem segmentu istraživanja ispitivan je uticaj reproduktivnog starenja na TG makrofage izolovane 7. dana od indukcije peritonitisa.

#### 5.3.1. Fenotipske karakteristike

Procentualna zastupljenost CD68+ makrofaga u peritonealnom eksudatu, koja se nije razlikovala između mladih mužjaka i ženki AO pacova, povećavala se u istoj meri tokom ispitivanog perioda reproduktivnog starenja kod životinja oba pola. Međutim, uočeno je da se gustina ekspresije ovog molekula razlikovala kod makrofaga izolovanih iz sredovečnih mužjaka i ženki, tako da su makrofage mužjaka pokazivale viši nivo ekspresije CD68 molekula, što je u skladu sa već pomenutim nalazima (Cohn i Benson, 1965), ukazivalo na manje učestće ćelija monocitnog porekla u peritonealnom eksudatu. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa podacima dobijenim kod miša koji pokazuju da u repopulaciji peritonealnih makrofaga kod mužjaka miša, za razliku od ženki, učestvuju većinski ćelije poreklom iz kostne srži, što se može povezati s promenama u lokalnom mikrokruženju koje nastaju nakon polnog sazrevanja, a koje makar delimično odražavaju promene u oslobađanju/delovanju polnih steroida (Bain i sar 2019). Procentualna zastupljenost ćelija koje ispoljavaju CD163, marker dominantno zrelih rezidentnih ćelija embrionalnog porekla (Bain i sar, 2019; Louwe i sar, 2021), u okviru populacije CD68+ makrofaga, bila je veća kod sredovečnih u odnosu na mlade AO pacove odgovarajućeg pola, što implicira veći doprinos zrelih, dugoživećih tkivnih makrofaga populaciji peritonealne šupljine sredovečnih pacova u poređenju s mladim. S druge strane, starenjem kod ženki je došlo do smanjenja zastupljenosti CD169+ ćelija, za koje je pokazano da prevashodno imaju imunoregulatornu ulogu (Chávez-Galán i sar, 2015), u okviru populacije peritonealnih CD68+ makrofaga, za razliku od mužjaka kod kojih se procenat ovih ćelija povećavao. Ovaj nalaz bi trebalo sagledavati u sklopu podataka koji pokazuju da se veća zastupljenost CD169+ makrofaga može dovesti u vezu sa razvojem inflamacije (Wang i sar, 2017), autoimunskih bolesti i tumora (Liu i sar, 2021) i sledstveno, generalno, kraćim životnim vekom jedinki muškog pola u odnosu na jedinke ženskog pola (Lemaître i sar., 2020).

Imajući u vidu procentualnu zastupljenost ćelija koje eksprimiraju TLR4, jedan od ključnih molekula za prepoznavanje PAMP-ova, čija ekspresija raste nakon aktivacije vezivanjem za njega specifičnih liganda (Fang i sar, 2017), istraživanje u okviru ove disertacije je ukazalo na veći procenat aktivisanih ćelija u okviru populacije makrofaga izolovanih iz peritonealnog eksudata mladih ženki u odnosu na mlade mužjake, što bi moglo da implicira njihovu veću

reaktivnost (na šta bi upućivao veći procenat CCR7+ i MHCII+ ćelija). Ovaj nalaz bi se mogao povezati s činjenicom da endogeni estradiol može da poveća ekspresiju TLR4 na peritonealnim makrofagama miša (Rettew i sar, 2009), dok je testosteron suprimira (Rettew i sar, 2008). Starenjem se procentualna zastupljenost ovih ćelija menjala suprotno u peritonealnom ćelijskom eksudatu mužjaka i ženki. Naime, zastupljenost ovih ćelija se starenjem smanjivala u populaciji peritonealnih makrofaga ženki, a povećavala u ovoj populaciji mužjaka. Ovaj nalaz bi upućivao na manju reaktivnost i/ili bolju kontrolu inflamacije kod sredovečnih ženki u poređenju s mužjacima istog uzrasta. Značajno povećanje procentualne zastupljenosti CD169+ ćelija kod mužjaka moglo bi da ide u prilog drugoj pretpostavci (Wangi sar 2017). Starenjem uslovljene promene u procentualnoj zastupljenosti TLR4+ ćelija su korelirale s promenama u serumskoj koncentraciji estradiola kod ženki tokom reproduktivnog starenja. Naime, tokom starenja se koncentracija estradiola smanjivala kod ženki, a rasla kod mužjaka. Dodatno, pokazano je da se starenjem menja gustina ekspresije ER- $\alpha$  u makrofagama peritonealne šupljine na polno zavisani način (smanjuje se kod ženki, a raste kod mužjaka) doprinoseći razvoju ovog fenomena. S druge strane, s obzirom na suprimirajući efekat testosterona na ekspresiju TLR4 (Rettew i sar, 2008), većem procentu ćelija koje ispoljavaju TLR4 u okviru makrofaga izolovanih iz peritonealnog eksudata sredovečnih mužjaka u odnosu na mlade mužjake je moglo doprineti i smanjenje serumske koncentracije testosterona kod mužjaka tokom starenja.

### 5.3.2. Funkcijske karakteristike

Fagocitna sposobnost peritonealnih nestimuliranih TG makrofaga mladih mužjaka i ženki pacova AO soja nije se značajno razlikovala. Međutim, tokom reproduktivnog starenja fagocitna sposobnost nestimuliranih TG makrofaga ženki pacova se povećavala, dok ove ćelije izolovane iz peritonealne duplje mužjaka nisu pokazivale značajne promene u ovoj sposobnosti. Kao rezultat navedenih polno dimorfni promena, fagocitna sposobnost peritonealnih makrofaga sredovečnih ženki bila je veća u poređenju sa onom izmerenom kod mužjake iste starosti, što bi impliciralo bolju kontrolu akutne inflamacije kod ženki. Ako uzmemo u obzir da se kod ženki tokom starenja povećava odnos estradiol/progesteron u korist estradiola i da je pokazano da estradiol favorizuje proliferaciju zrelih, tkivnih makrofaga (Pepe i sar, 2017), a ne migraciju monocita u peritoneum, (Bain i sar, 2019) i da zrele rezidentne makrofage imaju veću fagocitnu sposobnost (Davies i sar, 2013), veća fagocitna sposobnost sredovečnih ženki u odnosu na sredovečne mužjake mogla bi da reflektuje veću procentualnu zastupljenost zrelih tkivnih makrofaga u peritonealnom eksudatu ženki. Međutim, analiza procentualne zastupljenosti ćelija koje ekspresiraju CD163, "klasičan" marker rezidentnih zrelih ćelija nije išla ovome u prilog, budući da je procenat CD163+ ćelija bio sličan u populaciji peritonealnih makrofaga sredovečnih mužjaka i ženki pacova. Veća fagocitna sposobnost TG makrofaga sredovečnih ženki u odnosu na mužjake istog uzrasta bi se mogla povezati sa reproduktivnim starenjem uslovljenim razlikama u ekspresiji receptora za dektin-1, budući da koncentracija estradiola i dužina ekspozicije delovanju ovog hormona u određenoj koncentraciji može uticati na ekspresiju dektin-1 receptora (Costa i sar, 2020). Izostanak značajnijeg sa starenjem povezanog povećanja fagocitne sposobnosti (merene preuzimanjem zimozana A) TG makrofaga ženki u prisustvu LPS-a, mogla bi se, kao što je već rečeno, pripisati nishodnoj regulacijom ekspresije dektin-1 receptora u odgovoru na stimulaciju LPS-om (Willment i sar, 2003).

U kulturama nestimuliranih TG makrofagama sredovečnih pacova oba pola uočena je i veća sinteza NO u poređenju sa kulturama ovih ćelija izolovanih iz mladih životinja istog pola.

Imajući u vidu da NO može biti supstrat za katalitičko razlaganje posredovano MPO-om (Abu-Soud i Hazen, 2000), a da se aktivnost MPO smanjivala u nestimuliranim makrofagama sredovečnih u odnosu na mlade pacove oba pola, moguće je da je smanjena aktivnost ovog enzima doprinela većem oslobađanju NO iz nestimuliranih makrofaga sredovečnih pacova. Nakon stimulacije LPS-om, za razliku od kultura makrofaga mladih ženki (veća sinteza u kulturama sredovečnih životinja), sinteza NO u kulturama makrofaga mladih mužjaka je bila slična onoj koja je detektovana u kulturama makrofaga sredovečnih životinja, iako je aktivnost MPO bila veća kod mladih mužjaka u odnosu na sredovečne životinje istog pola. Ovo bi se moglo objasniti većom efikasnošću LPS u stimulaciji iNOS u makrofagama mladih životinja (Cecilio i sar, 2011; Sonoki i sar, 1997) i/ili lošijom kontrolom njegove sinteze kod sredovečnih životinja. Sinteza NO u kulturama i nestimuliranih i LPS-om stimuliranih TG makrofaga mladih mužjaka pacova bila je veća nego u kulturama mladih ženki pacova (ukazujući na bolji odgovor na stimulaciju i/ili lošiju kontrolu aktivacionog procesa), dok je bila uporediva u kulturama TG makrofaga sredovečnih životinja sugerirajući uzrasno-zavisne promene u kontroli ovog procesa.

Starenjem indukovane polno dimorfne promene u zastupljenosti aktiviranih TLR4+ i MHCII+ makrofaga, korelirale su sa porastom makrofagne sinteze IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  kod mužjaka i smanjenjem sinteze IL-1 $\beta$  i IL-6 kod ženki. S obzirom na činjenicu da je ekspresija TLR4 i MHCII tesno povezana sa odgovorom na stimulaciju LPS-om i da korelira sa stepenom aktivacijom makrofaga u odgovoru na stimulaciju LPS-om (Frei i sar, 2010), može se zaključiti da starenje različito utiče na peritonealne makrofage mužjaka i ženki pacova AO soja. Naši rezultati su pokazali da se kod ženki pacova procenat CCR7+ (marker M1 makrofaga) ćelija u okviru CD68+ makrofaga ne menja tokom ispitivanog perioda starenja, a da se povećava procenat ćelija koje ispoljavaju CD163 molekul (koji se često posmatra kao jedan od markera dominantno M2 makrofaga), što bi, uz smanjenje zastupljenosti CD169+ ćelija (Liu i sar, 2020) moglo da utiče na uspešnije okončanje inflamacije u odnosu na mužjake iste starosti. U prilog ovoj tvrdnji povećanu zastupljenost CD163+ makrofaga je pratio i porast sekrecije antiinflamatornih citokina tokom starenja AO pacova oba pola.

Analiza sinteze proinflamatornih citokina u kulturi TG makrofaga stimuliranih LPS-om je pokazala da je, u skladu sa prethodno diskutovanim rezultatima, sekretorni odgovor meren koncentracijom proinflamatornih citokina u supernatantima kultura TG makrofaga mladih ženki pacova bio veći u poređenju sa onim u kulturama ovih ćelija izolovanim iz mužjaka istog uzrasta. U tom kontekstu valja istaći da je proinflamatorni sekretorni citokinski odgovor makrofaga na delovanje aktivacijskih signala kritičan za efikasnu kontrolu infekcije, tako da nedovoljan odgovor čini jedinice osetljivim na oštećujuće delovanje infekta, a ekscesivan odgovor nosi rizik od razvoja inflamatornih bolesti (Nathan, 2002; Pavlov i Tracey, 2004). Važno je i naglasiti da nije uočena značajna razlika u sintezi antiinflamatornih citokina u LPS-om stimuliranim kulturama mladih ženki i mužjaka pacova. Analiza istih parametara tokom ispitivanog reproduktivnog starenja je pokazala da se sinteza/sekrecija proinflamatornih citokina u LPS-om stimuliranim kulturama TG makrofaga menjala na polno dimorfan način. Naime, starenjem se smanjivala sposobnost TG makrofaga ženki da odgovore sekrecijom proinflamatornih citokina, a povećavala sposobnost da odgovore (veća koncentracija IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) mužjaka pacova. Rezultat ovih promena je bila veća sinteza/sekrecija IL-1 $\beta$  u kulturama TG makrofaga sredovečnih mužjaka u poređenju sa kulturama ovih ćelija izolovanih iz sredovečnih ženki. Ovi nalazi posmatrani zajedno sa onim koji pokazuju da se sposobnost TG makrofaga i ženki i mužjaka pacova da sintetišu antiinflamatorne citokine u kulturi povećavala tokom reproduktivnog starenja, ali u većoj meri kod ženki, mogli bi takođe

---

da sugerišu bolju kontrolu inflamatornog odgovora kod sredovečnih ženki u poređenju s mužjacima istog uzrasta. Iako direktna interpolacija ovih rezultata na čoveka nije moguća, oni bi svakako mogli da stimulišu dalja istraživanja kojim bi se ispitaio/potvrdio značaj ovih promena za polni dimorfizam u incidenciji bolesti povezanih sa hroničnom inflamacijom, kao što su ateroskleroza, dijabetes i maligne bolesti (Cutolo i sar, 2016; Klein, 2000; vom Steeg i Klein, 2016), a čija incidencija raste tokom reproduktivnog starenja jedinke.

U zaključku, imajući u vidu promene u ekspresiji molekula povezanih sa aktivacijom makrofaga, promene u fagocitnoj sposobnosti makrofaga i njihovom sekretornom profilu, može se zaključiti da tokom reproduktivnog starenja peritonealne makrofage AO ženki pacova trpe takve promene koje ih čine sposobnijim da kontrolišu inflamatorni odgovor i, moguće, manje podložnim za razvoj patologija povezanih sa hroničnom inflamacijom (Sayed i sar, 2021), što se makar delimično može povezati sa razlikama u koncentraciji polnih steroida.

#### 5.4. UTICAJ OVARIJEKTOMIJE NA SEKRETORNI PROFIL MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA

U okviru sledećeg segmenta istraživanja, ženke AO pacova su podvrgnute bilateralnoj ovarijektomiji na kraju reproduktivnog perioda da bi se potvrdio značaj steroidnih hormona za promene koje nastaju u inflamatornom kapacitetu makrofaga, posebno, u njihovoj sposobnosti da kontrolišu inflamaciju. Ova istraživanja su pokazala da je 10 meseci od ovarijektomije koncentracija estradiola bila nešto niža nego kod kontrolnih ženki iste starosti (iako ova promena nije dostigla statističku značajnost), dok je koncentracija progesterona značajno niža nego kod kontrolnih ženki, odnosno da je odnos estradiol/progesteron bio oko dva puta veći u poređenju sa onim kod kontrolnih životinja. Ovo je omogućilo da promene u inflamatornom potencijalu makrofaga budu posmatrane i kao rezultat izražene deficijencije progesterona, tim pre što je pokazano da 10 meseci po urađenoj ovarijektomiji u uzrastu koja odgovara kraju reproduktivnog perioda, dolazi do smanjenja procentualne zastupljenosti makrofaga koje ekspimiraju receptore za progesteron (Stanojević i sar, 2015), što bi moglo da sugeriše i manju gustinu ekspresije receptora za ovaj hormon. Nalaz koji ukazuje da kod ovarijektomisanih životinja ne dolazi do drastičnog pada koncentracije estradiola u skladu je sa nalazima drugih istraživača i mogao bi se pripisati ekstragonadnoj sintezi estradiola (Zhao i sar, 2005). Međutim, imajući u vidu da je, iako promene u koncentraciji estradiola nisu bile dramatične kod sredovečnih ženki pacova (Lu i sar, 1979; Stanojević i sar, 2015), a da je gustina ekspresije ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  u peritonealnim makrofagama bila značajno niža kod sredovečnih u odnosu na mlade ženke AO pacova, to bi se manja gustina ekspresije ovih receptora na makrofagama mogla očekivati i kod sredovečnih ovarijektomisanih životinja u odnosu na kontrolne životinje. U prilog ovoj pretpostavci govore podaci koji pokazuju da estradiol u drugim tipovima ćelija ushodno reguliše ekspresiju ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  (Aguirre i sar, 2010). Smanjenje gustine ekspresije ER- $\alpha$  bi moglo da se poveže sa smanjenjem koncentracija progesterona, budući da makrofage peritonealne šupljine ispoljavaju receptore za progesteron (Khan i sar, 2005; Stanojević i sar, 2015), a da progesteron u drugim tipovima ćelija ushodno reguliše ekspresiju ER- $\alpha$  (Daniel i sar, 2014).

Imajući u vidu prethodno iznete podatke i nalaze, kao i istraživanja koja pokazuju da progesteron *in vitro* povećava sekreciju IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  iz makrofaga ženki miša, dok estrogen smanjuje njihovu sekreciju (Huang i sar, 2008), smanjena sinteza/sekrecija IL-1 $\beta$  u kulturi peritonealnih makrofaga miša bazalno i u odgovoru na LPS, kao i TNF- $\alpha$  bazalno, kod ovarijektomisanih ženki, mogla bi se delimično povezati sa promenama odnosa estradiol/progesteron koji je bio značajno pomeren u korist estradiola. S druge strane, treba naglasiti da efekti estradiola na sintezu proinflamatornih citokina zavise od mikrookruženja u kojem se ćelije nalaze, tako da mogu da budu potpuno različiti i kada je isti tip ćelija u pitanju (Shivers i sar, 2015). U tom kontekstu se mogu sagledati podaci koji pokazuju da estradiol stimuliše bazalnu (u odsustvu stimulacije LPS-om) i LPS-om stimulisanu sintezu IL-1 $\beta$  u TG makrofagama miša (Calippe i sar, 2010). Razlike u produkciji proinflamatornih citokina, odnosno IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6 od strane peritonealnih makrofaga ovarijektomisanih i kontrolnih životinja u kulturi, sugerišu različitu osetljivost citokina na modulatorno delovanje steroidnih hormona. U prilog nalazu koji pokazuje razlike u bazalnoj i LPS-om stimulisanju sekreciji proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ ) treba istaći da je pokazano da efekti estradiola na sintezu proinflamatornih citokina mogu biti bitno različiti bazalno i u uslovima kada je ćelija izložena delovanju inflamatornih stimulusa (Dragin i sar, 2017). Takođe je važno napomenuti da još uvek nije moguće precizno opisati mehanizme posredstvom kojih estrogen interferira sa

produkcijom citokina, ali se može pretpostaviti da delovanje estrogena uključuje interakcije kompleksa estrogen/ER sa različitim transkripcionim faktorima, ali i direktne efekte na plazma membranu (Pfeilschifter i sar, 2002).

Budući da je pokazano da estradiol može da deluje stimulatorno na produkciju IL-10 (Shivers i sar, 2015), smanjena sinteza/sekrecija IL-10 u makrofagama ovarijektomisanih pacova, kako u bazalnim uslovima tako i posle izlaganja delovanju LPS-u (mada nije dostigla statističku značajnost), u poređenju sa ovim ćelijama izolovanim iz kontrolnih neovarijektomisanih životinjama, mogla bi se povezati sa smanjenjem stimulatornog delovanja estradiola na sintezu IL-10. Međutim, treba naglasiti da bi ona mogla da reflektuje i slabiju aktivaciju ovih ćelija izolovanih iz ovarijektomisanih životinja. S druge strane, promene u sintezi TGF- $\beta$  u makrofagama ovarijektomisanih životinja, posebno povećanu sintezu u bazalnim uslovima, nije jednostavno objasniti. Naime, kada je u pitanju delovanje estradiola, literaturni podaci su kontradiktorni, budući da se mogu naći nalazi koji pokazuju da on povećava (Xie i Cao, 2019), ali i da smanjuje (Jeng i sar, 1993) sintezu ovog citokina. S druge strane, literaturni podaci pokazuju da progesteron povećava sintezu TGF- $\beta$  (Itagaki, 2005; Luo i sar, 2002; Mercier i sar, 2002; Xie i Cao, 2019). Međutim, treba imati u vidu da su navedeni podaci dobijeni ispitivanjem uticaja progesterona na druge tipove ćelija (Itagaki, 2005; Luo i sar, 2002; Mercier i sar, 2002; Xie i Cao, 2019).

Ispitivanja u okviru ovog segmenta istraživanja jasno pokazuju da bi promene u delovanju polnih steroida mogle da utiču na inflamatorni kapacitet makrofaga (preciznije, kapacitet makrofaga da učestvuju u terminaciji akutnog zapaljenja), ali ne daju preciznu sliku uticaja različitih polnih steroida (estradiola i progesterona) na njihov kapacitet, te nameću potrebu za daljim istraživanjima. Specifičnije, dobijeni rezultati sugerišu da u prisustvu niskih koncentracija progesterona u cirkulaciji i nešto manjih koncentracija estradiola (bez cikličnih promena vezanih za faze estrusnog ciklusa) u uslovima manje gustine ER, peritonealne TG makrofage pokazuju manju sposobnost aktivacije i/ili bolju kontrolu inflamatornog odgovora. Međutim, odmah treba naglasti da se opisane promene ne mogu isključivo povezati s promenama u delovanju polnih steroida, jer bi i drugi faktori čija se sinteza/sekrecija menja starenjem mogli da doprinesu razvoju ovog fenomena (Gui i sar, 2004; Barnes i sar, 2015).



## 5.5. ISPITIVANJE DIREKTOG MODULIŠUĆEG DELOVANJA ESTRADIOLA *IN VITRO* NA PROMENE U SEKRETORNOM PROFILU TG MAKROFAGA TOKOM REPRODUKTIVNOG STARENJA

Ispitivanja drugih istraživača su pokazala da davanje estradiola ovarijektomisanim životinjama koriguje smanjenje sinteze IL-1 $\beta$ , što ukazuje na regulatorno delovanju estrogena (Hu i sar, 1988). U istom smislu se mogu navesti podaci da estradiol *in vivo* moduliše sintezu proinflammatoryh citokina i u ćelijama mikroglije (Soucy i sar, 2005). U literaturi postoje i podaci da, suprotno akutnom izlaganju estradiolu *in vitro*, hronični tretman estradiolom stimuliše ekspresiju proinflammatoryh citokina u rezidentnim makrofagama mišje peritonealne šupljine (Calippe i sar, 2008, 2010), što dodatno implicira njegovu regulatornu ulogu. U saglasnosti sa prethodnom tvrdnjom nađeno je da se sinteza IL-1 $\beta$  u TG makrofagama izolovanim iz peritonealne šupljine ženki pacova i *in vitro* stimulisanim LPS-om menja sa promenama u koncentraciji estrogena tokom ontogeneze kod glodara (Inamizu i sar, 1985; Hu i sar, 1988). Poslednji nalaz je u skladu sa rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. On je takođe u skladu s podacima iz literature koji pokazuju da efekti estrogena na makrofage zavise od koncentracije estradiola, tako da ovaj hormon u nižim koncentracijama potencira, a u višim suprimira sintezu IL-1 $\beta$  u makrofagama i monocitima (Hu i sar, 1988; Morishita i sar, 1999). Imajući poslednje navedeno u vidu, može se pretpostaviti da su razlike u koncentraciji estradiola u lokalnom okruženju makrofaga peritonealne šupljine mladih i sredovečnih ženki dovele do različitog uticaja estradiola *in vitro* na sekreciju IL-1 $\beta$  iz makrofaga u oglelima prikazanim u ovoj disertaciji. Naime, kod ženki pacova postoji komunikacija između periovarijalnog prostora i peritonealne šupljine (Gaytan i sar, 1991). Anatomski je omogućeno da makrofage peritonealne šupljine ženki budu izložene hormonima iz jajnika i uterusu (koncentracije estradiola u ovarijalnoj veni, endometriju uterusu i vagini su 10-100 puta više nego one izmerene u perifernoj krvi) (Lu i sar, 1979; Murphy i sar, 2010; Shaikh, 1971), pa su tako s visokim stepenom verovatnoće može pretpostaviti da su makrofage mladih ženki pre izolacije iz peritonealne šupljine bile izložene višim koncentracijama estradiola u odnosu na makrofage sredovečnih, te da je to moglo da doprinese da tretman estradiolom *in vitro* dovede do inhibicije sinteze IL-1 $\beta$  u makrofagama mladih, a potencijacije njegove sinteze u ćelijama sredovečnih ženki. Dodatno, u prilog ovoj hipotezi ide činjenica da sekretorni odgovor proinflammatoryh citokina na stimulaciju LPS-om zavisi od prethodne izloženosti makrofaga delovanju estrogena (Ruh i sar, 1998). Imajući u vidu da se ekspresija ER menja starenjem kod čoveka i glodara (Batra i sar, 2003; Novensà i sar, 2011; Ogueta i sar, 1999; Wilson i sar, 2002), različiti efekti estradiola na makrofage mladih i sredovečnih ženki bi se mogli povezati i sa uzrasno-zavisnim promenama u ekspresiji pojedinih tipova ovih receptora. Pokazano je da makrofage peritonealne šupljine ženki pacova, za razliku od onih koje su izolovane iz miša, većinski, ispoljavaju oba tipa intracelularnih ER (Stanojević i sar, 2015). Peritonealne makrofage miša ispoljavaju samo ER- $\alpha$ , tako da se može pretpostaviti da je ekspresija ER specifična za vrstu životinja (Pepe i sar, 2018) i da estradiol ostvaruje svoju regulatornu ulogu kod obe životinjske vrste delujući na ER- $\alpha$ , a da se eventualne razlike u njegovom delovanju mogu pripisati njegovim efektima posredstvom ER- $\beta$ .

S druge strane, *in vitro* tretman estradiolom stimulisao je produkciju TNF- $\alpha$  u TG makrofagama mladih ženki. Suprotni efekti estradiola na sintezu TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u makrofagama mladih ženki mogu se povezati sa činjenicom da estradiol, zavisno od tipa ER (makrofage pacova ispoljavaju oba tipa receptora) na koji deluje i (ko)faktora sa kojim stupa u interakciju može i da aktivira i da suprimira ekspresiju gena (Macgregor i Jordan, 1998;

Parker, 1998). Naime, estrogene, zavisno od koncentracije, ne deluju samo kao hormonski faktori koji dovode direktno do transkripcije/supresije transkripcije gena, već stupaju u interakcije sa citoplazmatskim i nuklearnim proteinima koji su odgovorni za prenos signala i tako interferiraju sa njihovim funkcijama (Kovats, 2015; Levin, 2001). U prilog različitog uticaja estradiola na sintezu TNF- $\alpha$  u makrofagama mladih (povećanje) i sredovečnih ženki (izostanak efekta), mogu se navesti podaci koji pokazuju da estradiol, na dozno zavisnan način, reguliše sintezu ovog citokina u kulturi (Dimitrijević i sar, 2013). Navedeni nalazi bi se mogli povezati i sa podacima koji ukazuju da efekti LPS-a na sintezu proinflammatoryh citokina zavise od prethodne izloženosti ćelija delovanju estrogena (Ruh i sar, 1998). Ovo bi moglo da se poveže sa nalazima koji pokazuju da estradiol, makar kod čoveka, može da utiče na ekspresiju receptora za koje je specifičan i da tako moduliše sopstveno delovanje (Murphy i sar, 2009). Alternativno, kompatibilno sa prethodnim pretpostavkama, različit uticaj estradiola na sintezu proinflammatoryh citokina *in vitro* bi mogao da se poveže sa podacima koji pokazuju da se starenjem u ćelijama mnogih tkiva menja ekspresija receptora za estrogene i da su te promene specifične za pojedine subtipove ovih receptora, tako da se menja njihov odnos u ćeliji (Batra i sar, 2003; Koenig i sar, 2017; Novensà i sar, 2011; Ogueta i sar, 1999; Wilson i sar, 2002).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji su pokazali i da je *in vitro* tretman estradiolom povećao sintezu IL-6 u TG makrofagama i mladih i sredovečnih ženki. Ovo povećanje sinteze u makrofagama mladih ženki bi se moglo pripisati činjenici da TNF- $\alpha$ , u sklopu složene mreže međusobne regulacije citokina, dovodi do ushodne regulacije IL-6 (Dinarelo, 1987). S druge strane, povećanje sinteze IL-6 u makrofagama sredovečnih ženki pacova se evidentno nije moglo povezati s promenama u sekreciji TNF- $\alpha$ . Međutim, ovaj nalaz bi se možda mogao objasniti uzimajući u obzir podatak da estradiol, delujući posredstvom ER- $\alpha$ , indukuje u makrofagama sintezu prostaglandina E2 (PGE2) (Lu i sar, 2004), za koji je pokazano da suprimira sintezu TNF- $\alpha$ , a stimuliše sekreciju IL-6 (Ghezzi i sar, 2000), kao i da se sposobnost ćelija da sintetišu PGE2 povećava starenjem (Wu i sar, 1998).

Konačno, rezultati dobijeni u ogleđima obuhvaćenim ovom disertacijom su pokazali da estradiol stimuliše sintezu TGF- $\beta$  u TG makrofagama mladih pacova. Ovaj nalaz je u skladu s podacima dobijenim u drugim studijama koji pokazuju da estrogene stimulišu sintezu TGF- $\beta$  u nekim drugim tipovima ćelija (Gantus i sar, 2011). Činjenica da se ovaj efekat estradiola gubi starenjem mogla bi, u skladu sa onim što je prethodno diskutovano, da se poveže sa starenjem uslovljenim promenama u ekspresiji ER i/ili interakcijama estradiola s transkripcionim faktorima/kofaktorima koji određuju delovanje estrogena, a zavise od njegove koncentracije.

U zaključku, ispitivanja uticaja estradiola na *in vitro* LPS-om stimulisano sintezu inflamatornih citokina ne samo da idu u prilog modulatornom delovanju estrogena na inflamatorni kapacitet TG makrofaga, već ukazuju da se njihov modulatorni kapacitet menja u toku reproduktivnog starenja sugerišući da u toku ovog perioda dolazi do promena u samim makrofagama (indukovanih delovanjem drugih egzogenih ili intrinzičkih faktora) koje menjaju njihov odgovor na delovanje estrogena. Ovaj nalaz jasno nameće potrebu i trasira put za dalja istraživanja.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Tokom ispitivanog perioda reproduktivnog starenja (od 2-4. do 16-19. meseca), koji karakteriše gubitak cikličnosti u oslobađanju steroidnih hormona jajnika sa smanjenjem koncentracije estradiola i posebno progesterona u cirkulaciji, menjale su se funkcijske karakteristike peritonealnih makrofaga izolovanih i iz neinflamirane, "mirne" i inflamirane peritonealne duplje (TG makrofage, izolovane 7. dana nakon indukcije inflamacije tioglikolatom) AO ženki, tako što se u njima smanjivala aktivnost MPO, a povećavala sinteza NO (za koji je pokazano da može aktivno da suprimira sintezu proinflamatornih citokina) i sledstveno tome se u odgovoru na *in vitro* stimulaciju LPS-om smanjivala sinteza/sekrecija proinflamatornih, a povećavala antiinflamatornih citokina, što je kod TG makrofaga koreliralo sa povećanjem fagocitnog kapaciteta i pomeranjem procentualnog odnosa zrelih rezidentnih tkivnih CD163+ makrofaga i makrofaga monocitnog porekla na stranu CD163+ ćelija.
2. U toku ispitivanog perioda reproduktivnog starenja fenotipski i funkcijski profil makrofaga se menjao na sojno specifičan način, tako da je, za razliku od sredovečnih ženki DA pacova, u inflamatornom peritonealnom eksudatu sredovečnih ženki AO pacova, bilo procentualno manje CD169+ makrofaga koje bi mogle da doprinesu razvoju inflamacije, što je koreliralo sa većom fagocitnom sposobnosti TG makrofaga i većom sintezom/sekrecijom antiinflamatornih citokina od strane ovih ćelija u odgovoru na *in vitro* stimulaciju LPS-om, odnosno sa fenomenima koji bi se mogli povezati sa efikasnijom rezolucijom zapaljenja i moguće „uspešnijim“ starenjem AO pacova.
3. Kao što se moglo očekivati imajući u vidu polne razlike u koncentraciji polnih steroida u cirkulaciji, tokom ispitivane faze reproduktivnog starenja fenotipske i funkcijske karakteristike TG makrofaga pacova AO soja menjale su se na polno zavisani način, tako da je u inflamatornom peritonealnom eksudatu sredovečnih ženki pacova AO soja nađena manja procentualna zastupljenost CD169+ makrofaga i aktivisanih makrofaga u poređenju sa mužjacima i veća fagocitna sposobnost, a u odgovoru na *in vitro* stimulaciju LPS-om veća sinteza/sekrecija antiinflamatornih citokina (TGF- $\beta$ ), a manja proinflamatornih citokina, što bi se makar delimično moglo povezati sa "uspešnijim" starenjem ženki u odnosu na mužjake.
4. Ispitivanje uzrasno-zavisnih promena u sekretornim karakteristikama makrofaga AO pacova kojima su hirurški uklonjeni jajnici na kraju reproduktivnog perioda, što je dovelo do drastičnog pada koncentracije progesterona i blagog smanjenja koncentracije estradiola uz smanjenje gustine ER kod sredovečnih pacova, nađeno je da ove ćelije izolovane iz sredovečnih pacova pokazuju manju sposobnost aktivacije i/ili bolju kontrolu inflamatornog odgovora (mereno nivoom sinteze/sekrecije NO, uree i antiinflamatornih citokina) u poređenju sa neovarijektomisanim životinjama.

5. Ispitivanje delovanja estradiola u *in vitro* uslovima na citokinski profil TG makrofaga izolovanih iz mladih i sredovečnih ženki AO pacova pokazalo je da se modulatorno delovanje ovog hormona na LPS-om stimulisanu sintezu/sekreciju inflamatornih citokina menja u toku reproduktivnog starenja reflektujući promene u samim makrofagama (najverovatnije usled promena u ekspresiji ER i različitih kofaktora) koje određuju njihov odgovor na delovanje estrogena.

Imajući u vidu sve prethodno iznete zaključke može se pretpostaviti da se već tokom rane faze reproduktivnog starenja menja modulatorno delovanje ženskih polnih steroida na sposobnost makrofaga pacova da kontrolišu razvoj inflamacije (specifično, rezoluciju zapaljenja), što je od izuzetnog značaja za razvoj hronične inflamacije i posledično njihovu podložnost za razvoj patologija povezanih sa hroničnom inflamacijom, odnosno za ono što se naziva “uspešnim” starenjem, kao i da ove promene delimično zavise od same genetske osnove pacova.

## 7. LITERATURA

- Abu-Soud, H. M., & Hazen, S. L. (2000). Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5425–5430. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5425>
- Agostino, P., Milano, S., Barbera, C., Di Bella, G., La Rosa, M., Ferlazzo, V., Farruggio, R., Miceli, D. M., Miele, M., Castagnetta, L., & Cillari, E. (1999). Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 876, pp. 426–429). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07667.x>
- Aguirre, C., Jayaraman, A., Pike, C., & Baudry, M. (2010). Progesterone inhibits estrogen-mediated neuroprotection against excitotoxicity by down-regulating estrogen receptor- $\beta$ . *Journal of Neurochemistry*, 115(5), 1277–1287. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07038.x>
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1538–1543. <https://doi.org/10.1038/nn2014>
- Akdis, C. A., & Blaser, K. (2001). Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. In *Immunology* (Vol. 103, Issue 2, pp. 131–136). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01235.x>
- Al-Attar, A., Presnell, S. R., Peterson, C. A., Thomas, D. T., & Lutz, C. T. (2016). The effect of sex on immune cells in healthy aging: Elderly women have more robust natural killer lymphocytes than do elderly men. *Mechanisms of Ageing and Development*, 156, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.04.001>
- Alonso-Fernández, P., Puerto, M., MatÃ, I., Ribera, J. M., & De La Fuente, M. (2008). Neutrophils of Centenarians Show Function Levels Similar to Those of Young Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 56(12), 2244–2251. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2008.02018.x>
- Alonso-Fernandez, P., & De la Fuente, M. (2012). Role of the Immune System in Aging and Longevity. *Current Aging Science*, 4(2), 78–100. <https://doi.org/10.2174/1874609811104020078>
- Amdur, R. L., Feldman, H. I., Gupta, J., Yang, W., Kanetsky, P., Shlipak, M., Rahman, M., Lash, J. P., Townsend, R. R., Ojo, A., Roy-Chaudhury, A., Go, A. S., Joffe, M., He, J., Balakrishnan, V. S., Kimmel, P. L., Kusek, J. W., & Raj, D. S. (2016). Inflammation and progression of CKD: The CRIC study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(9), 1546–1556. <https://doi.org/10.2215/CJN.13121215>
- Andrade, S. S., Azevedo, A. D. C., Monasterio, I. C. G., Paredes-Gamero, E. J., Gonçalves, G. A., Bonetti, T. C., Albertoni, G., Schor, E., Barreto, J. A., Luiza Oliva, M., Juliano, L., Girão, M. J. B. C., & Da Silva, I. D. C. G. (2013). 17 $\beta$ -Estradiol and steady-state concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Antiapoptotic effect in endometrial cells from patients with endometriosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.034>

- Angele, M. K., Ayala, A., Schwacha, M. G., Cioffi, W. G., Bland, K. I., & Chaudry, I. H. (2000). Immune dysfunction following trauma-haemorrhage: Influence of gender and age. *Cytokine*, *12*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0511>
- Arranz, L., Caamano, J. H., Lord, J. M., & De la Fuente, M. (2010). Preserved Immune Functions and Controlled Leukocyte Oxidative Stress in Naturally Long-lived Mice: Possible Role of Nuclear Factor Kappa B. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *65A*(9), 941–950. <https://doi.org/10.1093/gerona/glq101>
- Asano, K., Kikuchi, K., & Tanaka, M. (2018). CD169 macrophages regulate immune responses toward particulate materials in the circulating fluid. *J. Biochem*, *2*(164), 77–85. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy050>
- Avouac, J., Pezet, S., Gonzalez, V., Baudoin, L., Cauvet, A., Ruiz, B., Boleto, G., Brandely, M. L., Elmerich, M., & Allanore, Y. (2020). Estrogens Counteract the Profibrotic Effects of TGF- $\beta$  and their Inhibition Exacerbates Experimental Dermal Fibrosis. *Journal of Investigative Dermatology*, *140*(3), 593-601.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.719>
- Avraham-Chakim, L., Elad, D., Zaretsky, U., Kloog, Y., Jaffa, A., & Grisaru, D. (2013). Fluid-Flow Induced Wall Shear Stress and Epithelial Ovarian Cancer Peritoneal Spreading. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060965>
- Aw, D., Silva, A. B., & Palmer, D. B. (2007). Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*, *120*(4), 435–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02555.x>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2014). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azevedo, R. B., Lacava, Z. G. M., Miyasaka, C. K., Chaves, S. B., & Curi, R. (2001). Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *34*(5), 683–687. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000500018>
- Aziz, N. (2015). Measurement of circulating cytokines and immune-activation markers by multiplex technology in the clinical setting: What are we really measuring? *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*, *6*(1–2), 19–22. <https://doi.org/10.1615/ForumImmDisTher.2015014162>
- Baeza, I., Fdez-Tresguerres, J., Ariznavarreta, C., & De La Fuente, M. (2010). Effects of growth hormone, melatonin, oestrogens and phytoestrogens on the oxidized glutathione (GSSG)/reduced glutathione (GSH) ratio and lipid peroxidation in aged ovariectomized rats. *Biogerontology*, *11*(6), 687–701. <https://doi.org/10.1007/s10522-010-9282-7>
- Bain, C. C., Gibson, D. A., Steers, N. J., Boufe, K., Louwe, P. A., Doherty, C., Huici, V., Gentek, R., Magalhaes-Pinto, M., Bajenoff, M., Benezech, C., Dockrell, D., Saunders, P. T. K., Batadar, N., & Jenkins, S. J. (2019). Origin and microenvironment contribute to the sexually dimorphic phenotype and function of peritoneal macrophages. *BioRxiv*, 837336. <https://doi.org/10.1101/837336>

- Bakker, O. B., Aguirre-Gamboa, R., Sanna, S., Oosting, M., Smeekens, S. P., Jaeger, M., Zorro, M., Vösa, U., Withoff, S., Netea-Maier, R. T., Koenen, H. J. P. M., Joosten, I., Xavier, R. J., Franke, L., Joosten, L. A. B., Kumar, V., Wijmenga, C., Netea, M. G., & Li, Y. (2018). Integration of multi-omics data and deep phenotyping enables prediction of cytokine responses. *Nature Immunology*, *19*(7), 776–786. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0121-3>
- Bansal, V., Syres, K. M., Makarenkova, V., Brannon, R., Matta, B., Harbrecht, B. G., & Ochoa, J. B. (2005). Interactions Between Fatty Acids and Arginine Metabolism: Implications for the Design of Immune-Enhancing Diets. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, *29*(1\_suppl), S75–S80. <https://doi.org/10.1177/01486071050290s1s75>
- Barik, S. (2016). What really rigs up RIG-I? In *Journal of Innate Immunity* (Vol. 8, Issue 5, pp. 429–436). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000447947>
- Barksdale, A. R., Bernard, A. C., Maley, M. E., Gellin, G. L., Kearney, P. A., Boulanger, B. R., Tsuei, B. J., & Ochoa, J. B. (2004). Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. *Surgery*, *135*(5), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2003.10.007>
- Barrat, F., Lesourd, B., Boulouis, H. J., Thibault, D., Vincent-Naulleau, S., Gjata, B., Louise, A., Neway, T., & Pilet, C. (1997). Sex and parity modulate cytokine production during murine ageing. *Clinical and Experimental Immunology*, *109*(3), 562–568. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1997.4851387.x>
- BARSKI G, M. G. L. P. (1955). Artificial peritoneal exudate, source of cells for virus culture in vitro. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, *3*(89), 366–371.
- Batra, G. S., Hailey, L., Freemont, A. J., Andrew, G., Saunders, P. T. K., Hoyland, J. A., & Braidman, I. P. (2003). Evidence for cell-specific changes with age in expression of oestrogen receptor (ER)  $\alpha$  and  $\beta$  in bone fractures from men and women. *Journal of Pathology*, *200*(1), 65–73. <https://doi.org/10.1002/path.1332>
- Bauer, M. E., & De la Fuente, M. (2016). The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. In *Mechanisms of Ageing and Development* (Vol. 158, pp. 27–37). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.01.001>
- Becker, K. J. (2016). Strain-Related Differences in the Immune Response: Relevance to Human Stroke. *Translational Stroke Research*, *7*(4), 303–312. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0455-9>
- Bekesi, G., Kakucs, R., Varbiro, S., Feher, J., Pazmany, T., Magyar, Z., Sprintz, D., & Szekacs, B. (2001). Induced myeloperoxidase activity and related superoxide inhibition during hormone replacement therapy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *108*(5), 474–481. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2001.00108.x>
- Bellingan, G. J., & Laurent, G. J. (2008). Fate of macrophages once having ingested apoptotic cells: Lymphatic clearance or in situ apoptosis? *The Resolution of Inflammation*, 75–91. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7506-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7506-5_5)
- Berghöfer, B., Frommer, T., Haley, G., Fink, L., Bein, G., & Hackstein, H. (2006). TLR7 Ligands Induce Higher IFN- $\alpha$  Production in Females. *The Journal of Immunology*, *177*(4), 2088–2096. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.4.2088>

- Besedovsky, H. O., & Rey, A. del. (2007). Physiology of psychoneuroimmunology: A personal view. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(1), 34–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.09.008>
- Bindl, L., Buderus, S., Dahlem, P., Demirakca, S., Goldner, M., Huth, R., Kohl, M., Krause, M., Kühl, P., Lasch, P., Lewandowski, K., Merz, U., Moeller, J., Mohamad, Y., Peters, M., Porz, W., Vierzig, A., Rüdard, J., Scharf, J., & Varnholt, V. (2003). Gender-based differences in children with sepsis and ARDS: The ESPNIC ARDS Database Group. *Intensive Care Medicine*, 29(10), 1770–1773. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-1948-z>
- Biswas, S. K., Chittechath, M., Shalova, I. N., & Lim, J. Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic Research*, 53(1–3), 11–24.  
<https://doi.org/10.1007/s12026-012-8291-9>
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2012). Orchestration of metabolism by macrophages. In *Cell Metabolism* (Vol. 15, Issue 4, pp. 432–437). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.11.013>
- Blagojević, V., Kovačević-Jovanović, V., Ćuruvija, I., Petrović, R., Vujnović, I., Vujić, V., & Stanojević, S. (2018). Rat strain differences in peritoneal immune cell response to selected gut microbiota: A crossroad between tolerance and autoimmunity? *Life Sciences*, 197, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.02.011>
- Boehmer, E. D., Goral, J., Faunce, D. E., & Kovacs, E. J. (2004). Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 342–349.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.0803389>
- Boehmer, E. D., Meehan, M. J., Cutro, B. T., & Kovacs, E. J. (2005). Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(12), 1305–1313. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.07.009>
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. In *Nature Immunology* (Vol. 2, Issue 10, pp. 907–916). <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>
- Bonafè, M., Prattichizzo, F., Giuliani, A., Storci, G., Sabbatinelli, J., & Olivieri, F. (2020). Inflammaging: Why older men are the most susceptible to SARS-CoV-2 complicated outcomes. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 53, 33–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.04.005>
- Bonds, R. S., & Midoro-Horiuti, T. (2013). Estrogen effects in allergy and asthma. In *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 92–99). Curr Opin Allergy Clin Immunol. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32835a6dd6>
- Boorsma, C. E., Draijer, C., & Melgert, B. N. (2013). Macrophage heterogeneity in respiratory diseases. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2013).  
<https://doi.org/10.1155/2013/769214>
- Borras, C. (2007). Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Frontiers in Bioscience*, 12(1), 1008.  
<https://doi.org/10.2741/2120>



- Bou Ghosn, E. E., Cassado, A. A., Govoni, G. R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D. M., Bortoluci, K. R., Almeida, S. R., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(6), 2568–2573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107>
- Bouman, A., Jan Heineman, M., & Faas, M. M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. In *Human Reproduction Update* (Vol. 11, Issue 4, pp. 411–423). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi008>
- Bradley, P. P., Priebe, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, *78*(3), 206–209. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>
- Brandenberger, C., & Mühlfeld, C. (2017). Mechanisms of lung aging. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 367, Issue 3, pp. 469–480). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2511-x>
- Breen, A. P., & Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 18, Issue 6, pp. 1033–1077). Free Radic Biol Med. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00209-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00209-3)
- Brinton, R. D. (2012). Minireview: Translational animal models of human menopause: Challenges and emerging opportunities. In *Endocrinology* (Vol. 153, Issue 8, pp. 3571–3578). The Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>
- Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J., & Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology*, *67*(1), 97–103. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.97>
- Bupp, M. R. G., Potluri, T., Fink, A. L., & Klein, S. L. (2018). The confluence of sex hormones and aging on immunity. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01269>
- Butler, L., & Santoro, N. (2011). The reproductive endocrinology of the menopausal transition. In *Steroids* (Vol. 76, Issue 7, pp. 627–635). Steroids. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.026>
- Buxadé, M., Encabo, H. H., Riera - Borrull, M., Quintana - Gallardo, L., López - Cotarelo, P., Tellechea, M., Martínez - Martínez, S., Redondo, J. M., Martín - Caballero, J., Flores, J. M., Bosch, E., Rodríguez - Fernández, J. L., Aramburu, J., & López - Rodríguez, C. (2018). Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(11), 2901–2918. <https://doi.org/10.1084/jem.20180314>
- Cai, B., Deitch, E. A., & Ulloa, L. (2010). Novel Insights for Systemic Inflammation in Sepsis and Hemorrhage. *Mediators of Inflammation*, *2010*. <https://doi.org/10.1155/2010/642462>
- Cailhier, J. F., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Ko, K., Watson, S., Savill, J., Hughes, J., & Lang, R. A. (2005). Conditional Macrophage Ablation Demonstrates That Resident Macrophages

- Initiate Acute Peritoneal Inflammation. *The Journal of Immunology*, 174(4), 2336–2342. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.2336>
- Calder, P. C., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Capuron, L., Delzenne, N., Doré, J., Franceschi, C., Lehtinen, M. J., Recker, T., Salvioli, S., & Visioli, F. (2017). Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 40, pp. 95–119). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.09.001>
- Calippe, B., Douin-Echinard, V., Delpy, L., Laffargue, M., Lélou, K., Krust, A., Pipy, B., Bayard, F., Arnal, J.-F., Guéry, J.-C., & Gourdy, P. (2010). 17 $\beta$ -Estradiol Promotes TLR4-Trigged Proinflammatory Mediator Production through Direct Estrogen Receptor  $\alpha$  Signaling in Macrophages In Vivo. *The Journal of Immunology*, 185(2), 1169–1176. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902383>
- Calippe, B., Douin-Echinard, V., Laffargue, M., Laurell, H., Rana-Poussine, V., Pipy, B., Guéry, J.-C., Bayard, F., Arnal, J.-F., & Gourdy, P. (2008). Chronic Estradiol Administration In Vivo Promotes the Proinflammatory Response of Macrophages to TLR4 Activation: Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *The Journal of Immunology*, 180(12), 7980–7988. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.7980>
- Campuzano, O., Castillo-Ruiz, M. del M., Acarin, L., Gonzalez, B., & Castellano, B. (2011). Decreased myeloperoxidase expressing cells in the aged rat brain after excitotoxic damage. *Experimental Gerontology*, 46(9), 723–730. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.05.003>
- Carrieri, G., Marzi, E., Olivieri, F., Marchegiani, F., Cavallone, L., Cardelli, M., Giovagnetti, S., Steconi, R., Molendini, C., Trapassi, C., De Benedictis, G., Kletsas, D., & Franceschi, C. (2004). The G/C915 polymorphism of transforming growth factor  $\beta$ 1 is associated with human longevity: A study in Italian centenarians. *Ageing Cell*, 3(6), 443–448. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00129.x>
- Carvalho-Freitas, M. I. R., Anselmo-Franci, J. A., Teodorov, E., Nasello, A. G., Palermo-Neto, J., & Felicio, L. F. (2007). Reproductive experience modifies dopaminergic function, serum levels of prolactin, and macrophage activity in female rats. *Life Sciences*, 81(2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.04.032>
- Casimir, G. J. A., Mulier, S., Hanssens, L., Knoop, C., Ferster, A., Hofman, B., & Duchateau, J. (2010). Chronic inflammatory diseases in children are more severe in girls. *Shock*, 34(1), 23–26. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181ce2c3d>
- Casimir, G. J. A., Mulier, S., Hanssens, L., Zylberberg, K., & Duchateau, J. (2010). Gender differences in inflammatory markers in children. *Shock*, 33(3), 258–262. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181b2b36b>
- Casimir, G. J., Heldenbergh, F., Hanssens, L., Mulier, S., Heinrichs, C., Lefevre, N., Désir, J., Corazza, F., & Duchateau, J. (2010). Gender differences and inflammation: An in vitro model of blood cells stimulation in prepubescent children. *Journal of Inflammation*, 7, 28. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-28>
- Cassado, A. A., D'Império Lima, M. R., & Bortoluci, K. R. (2015). Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. In *Frontiers in Immunology*

(Vol. 6, Issue MAY, p. 225). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00225>

Cassado, A. dos A., de Albuquerque, J. A. T., Sardinha, L. R., de Buzzo, C. L., Faustino, L., Nascimento, R., Ghosn, E. E. B., Lima, M. R., Alvarez, J. M. M., & Bortoluci, K. R. (2011). Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS ONE*, *6*(7), 1–8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022141>

Cecílio, C. A., Costa, E. H., Simioni, P. U., Gabriel, D. L., & Tamashiro, W. M. S. C. (2011). Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *44*(7), 671–681.  
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500067>

Cederbaum, S. D., Yu, H., Grody, W. W., Kern, R. M., Yoo, P., & Iyer, R. K. (2004). Arginases I and II: Do their functions overlap? *Molecular Genetics and Metabolism*, *81*(SUPPL.), 38–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.10.012>

Cesar Machado, M. C., & Mendonca Coelho, A. M. (2012). Role of Peritoneal Macrophages on Local and Systemic Inflammatory Response in Acute Pancreatitis. In *Acute Pancreatitis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/25639>

Chainy, G. B. N., Samantaray, S., & Samanta, L. (1997). Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. *Andrologia*, *29*(6), 343–349.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1997.tb00328.x>

Chao, T. -C, Alten, P. J. V., & Walter, R. J. (1994). Steroid Sex Hormones and Macrophage Function: Modulation of Reactive Oxygen Intermediates and Nitrite Release. *American Journal of Reproductive Immunology*, *32*(1), 43–52. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1994.tb00877.x>

Chao, T. C., Van Alten, P. J., Greager, J. A., & Walter, R. J. (1995). Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cellular Immunology*, *160*(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(95\)80007-6](https://doi.org/10.1016/0008-8749(95)80007-6)

Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue MAY, p. 263). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>

Chelvarajan, R. L. (2006). Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, *79*(6), 1314–1327.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.0106024>

Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 12, pp. 826–837).  
<https://doi.org/10.1038/nri2873>

Chen, Y. J., Zhu, H., Zhang, N., Shen, L., Wang, R., Zhou, J. S., Hu, J. G., & Lü, H. Z. (2015). Temporal kinetics of macrophage polarization in the injured rat spinal cord. *Journal of Neuroscience Research*, *93*(10), 1526–1533. <https://doi.org/10.1002/jnr.23612>

Cohn, Z. A., & Benson, B. (1965). The differentiation of mononuclear phagocytes. *Morphology*,

- cytochemistry, and biochemistry. *The Journal of Experimental Medicine*, 121(1), 153–170. <https://doi.org/10.1084/jem.121.1.153>
- Collin, F. (2019). Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102407>
- Costa, M. C., Barros Fernandes, H., Gonçalves, G. K. N., Santos, A. P. N., Ferreira, G. F., Freitas, G. J. C., Carmo, P. H. F., Hubner, J., Emídio, E. C. P., Santos, J. R. A., Santos, J. L., Reis, A. M., Fagundes, C. T., Silva, A. M., & Santos, D. A. (2020). 17- $\beta$ -Estradiol increases macrophage activity through activation of the G-protein-coupled estrogen receptor and improves the response of female mice to *Cryptococcus gattii*. *Cellular Microbiology*, 22(6), e13179. <https://doi.org/10.1111/cmi.13179>
- Coughlan, T., Gibson, C., & Murphy, S. (2005). Modulatory effects of progesterone on inducible nitric oxide synthase expression in vivo and in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 93(4), 932–942. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03068.x>
- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing. *Trends Mol Med. (National Institutes of Health)*, 19(3), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007.Estrogen>
- Cutolo, M., Sulli, A., Capellino, S., Villaggio, B., Montagna, P., Seriolo, B., & Straub, R. H. (2016). Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity: <Http://Dx.Doi.Org/10.1191/0961203304lu1094oa>, 13(9), 635–638. <https://doi.org/10.1191/0961203304LU1094OA>
- Da Silva, J. A. P. (1995). Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: Facts and hypotheses. In *Annals of the Rheumatic Diseases* (Vol. 54, Issue 1, pp. 6–16). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/ard.54.1.6>
- Dahdah, A., Gautier, G., Attout, T., Fiore, F., Lebourdais, E., Msallam, R., Daëron, M., Monteiro, R. C., Benhamou, M., Charles, N., Davoust, J., Blank, U., Malissen, B., & Launay, P. (2014). Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4577–4589. <https://doi.org/10.1172/JCI75212>
- Damoiseaux, J. G., Döpp, E. A., Calame, W., Chao, D., MacPherson, G. G., & Dijkstra, C. D. (1994). Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology*, 83(1), 140–147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7821959>
- Daniel, A. R., Gaviglio, A. L., Knutson, T. P., Ostrander, J. H., D'Assoro, A. B., Ravindranathan, P., Peng, Y., Raj, G. V., Yee, D., & Lange, C. A. (2014). Progesterone receptor-B enhances estrogen responsiveness of breast cancer cells via scaffolding PELP1- and estrogen receptor-containing transcription complexes. *Oncogene* 2015 34:4, 34(4), 506–515. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.579>
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. In *Nature Immunology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 986–995). <https://doi.org/10.1038/ni.2705>
- Davis, R. L., Sanchez, A. C., Lindley, D. J., Williams, S. C., & Syapin, P. J. (2005). Effects of mechanistically distinct NF- $\kappa$ B inhibitors on glial inducible nitric-oxide synthase expression. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 12(4), 200–209.

<https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.04.005>

- De Azevedo, Ricardo B., Costa Rosa, L. F. B. P., Lacava, Z. G. M., & Curi, R. (1997). Gonadectomy impairs lymphocyte proliferation and macrophage function in male and female rats. Correlation with key enzyme activities of glucose and glutamine metabolism. *Cell Biochemistry and Function*, 15(4), 293–298. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0844\(199712\)15:4<293::AID-CBF755>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0844(199712)15:4<293::AID-CBF755>3.0.CO;2-1)
- De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., Skvir, N. J., Criscione, S. W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E. M., Boeke, J. D., Le, O., Beauséjour, C., Ambati, J., Ambati, K., Simon, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., Slagboom, P. E., Helfand, S. L., ... Sedivy, J. M. (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*, 566(7742), 73–78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>
- De la Fuente, M. (2008). Role of Neuroimmunomodulation in Aging. *Neuroimmunomodulation*, 15(4–6), 213–223. <https://doi.org/10.1159/000156465>
- De La Fuente, M. (2014). The immune system, a marker and modulator of the rate of aging. In *Immunology of Aging* (pp. 3–23). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39495-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39495-9_2)
- De Maio, A., Mooney, M. D. L., Matesic, L. E., Paidas, C. N., & Reeves, R. H. (1998). Genetic component in the inflammatory response induced by bacterial lipopolysaccharide. *Shock*, 10(5), 319–323. <https://doi.org/10.1097/00024382-199811000-00002>
- De Maio, A., Torres, M. B., & Reeves, R. H. (2005). Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock*, 23(1), 11–17. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000144134.03598.c5>
- De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D., & Ginaldi, L. (2006). Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. In *Experimental and Molecular Pathology* (Vol. 80, Issue 3, pp. 219–227). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.11.004>
- Deguchi, K., Kamada, M., Irahara, M., Maegawa, M., Yamamoto, S., Ohmoto, Y., Murata, K., Yasui, T., Yamano, S., & Aono, T. (2001). Postmenopausal changes in production of type 1 and type 2 cytokines and the effects of hormone replacement therapy. *Menopause*, 8(4), 266–273. <https://doi.org/10.1097/00042192-200107000-00008>
- Desai, M. K., & Brinton, R. D. (2019). Autoimmune disease in women: Endocrine transition and risk across the lifespan. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10, Issue APR, p. 265). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00265>
- Deshpande, R., Khalili, H., Pergolizzi, R. G., Michael, S. D., & Chang, M. D. Y. (1997). Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFκB activation in murine macrophages. *American Journal of Reproductive Immunology*, 38(1), 46–54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1997.tb00275.x>
- Dewan, S. K., Zheng, S. bai, Xia, S. jin, & Bill, K. (2012). Senescent remodeling of the immune system and its contribution to the predisposition of the elderly to infections. *Chinese Medical Journal*, 125(18), 3325–3331. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.18.023>

- di Giovine, F. S., & Duff, G. W. (1990). Interleukin 1: the first interleukin. In *Immunology Today* (Vol. 11, Issue C, pp. 21–24). [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90006-U](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90006-U)
- Dijkstra, C. D., Döpp, E. A., Joling, P., & Kraal, G. (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 186, 409–419. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2463-8\\_50](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2463-8_50)
- Dimitrijević, M., Aleksić, I., Vujić, V., Stanojević, S., Pilipović, I., von Hörsten, S., & Leposavić, G. (2014a). Peritoneal exudate cells from long-lived rats exhibit increased IL-10/IL-1 $\beta$  expression ratio and preserved NO/urea ratio following LPS-stimulation in vitro. *Age*, 36(4). <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9696-2>
- Dimitrijević, M., Aleksić, I., Vujić, V., Stanojević, S., Pilipović, I., von Hörsten, S., & Leposavić, G. (2014b). Peritoneal exudate cells from long-lived rats exhibit increased IL-10/IL-1 $\beta$  expression ratio and preserved NO/urea ratio following LPS-stimulation in vitro. *Age*, 36(4). <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9696-2>
- Dimitrijević, M., Stanojević, S., Kuštrimović, N., Mitić, K., Vujić, V., Aleksić, I., Radojević, K., & Leposavić, G. (2013). The influence of aging and estradiol to progesterone ratio on rat macrophage phenotypic profile and NO and TNF- $\alpha$  production. *Experimental Gerontology*, 48(11), 1243–1254. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.07.001>
- Dimitrijević, M., Stanojević, S., Vujić, V., Aleksić, I., Pilipović, I., & Leposavić, G. (2014a). Aging oppositely affects TNF- $\alpha$  and IL-10 production by macrophages from different rat strains. *Biogerontology*, 15(5), 475–486. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9513-4>
- Dimitrijević, M., Stanojević, S., Vujić, V., Aleksić, I., Pilipović, I., & Leposavić, G. (2014b). Aging oppositely affects TNF- $\alpha$  and IL-10 production by macrophages from different rat strains. *Biogerontology*, 15(5), 475–486. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9513-4>
- Dinarello, C. A. (1987). The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunology Letters*, 16(3–4), 227–231. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(87\)90151-9](https://doi.org/10.1016/0165-2478(87)90151-9)
- Djahanbakhch, O., Ezzati, M., & Zosmer, A. (2007). Reproductive ageing in women. In *Journal of Pathology* (Vol. 211, Issue 2, pp. 219–231). <https://doi.org/10.1002/path.2108>
- Dragin, N., Nancy, P., Villegas, J., Roussin, R., Le Panse, R., & Berrih-Aknin, S. (2017). Balance between Estrogens and Proinflammatory Cytokines Regulates Chemokine Production Involved in Thymic Germinal Center Formation. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08631-5>
- Dudley, S. D. (1982). Responsiveness to estradiol in central nervous system of aging female rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 6(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(82\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0149-7634(82)90005-7)
- Dumonde, D. C., Wolstencroft, R. A., Panayi, G. S., Matthew, M., Morley, J., & Howson, W. T. (1969). “lymphokines”: Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature*, 224(5214), 38–42. <https://doi.org/10.1038/224038a0>
- Duque, G. A., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue OCT). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>

- Efron, D. T., Most, D., & Barbul, A. (2000). Role of nitric oxide in wound healing. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 3, Issue 3, pp. 197–204).  
<https://doi.org/10.1097/00075197-200005000-00006>
- Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Review Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*, *41*(1), 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Ershler, W. B. (2003). Biological interactions of aging and anemia: a focus on cytokines. *Journal of the American Geriatrics Society*, *51*(3 Suppl), S18–21.  
<https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.51.3s.2.x>
- Espinosa-Heidmann, D. G., Marin-Castano, M. E., Pereira-Simon, S., Hernandez, E. P., Elliot, S., & Cousins, S. W. (2005). Gender and estrogen supplementation increases severity of experimental choroidal neovascularization. *Experimental Eye Research*, *80*(3), 413–423.  
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.10.008>
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. In *Diabetes Research and Clinical Practice* (Vol. 105, Issue 2, pp. 141–150). Elsevier Ireland Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>
- Evans, R. M., Currie, L., & Campbell, A. (1982). The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals, and its relation to the plasma concentration. *British Journal of Nutrition*, *47*(3), 473–482.  
<https://doi.org/10.1079/bjn19820059>
- Fabriek, B. O., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2005). The macrophage scavenger receptor CD163. In *Immunobiology* (Vol. 210, Issues 2–4, pp. 153–160). Elsevier GmbH.  
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.05.010>
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(4), 890–898. <https://doi.org/10.1172/JCI1112>
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 10, pp. 820–832). Nat Rev Microbiol. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>
- Fang, W., Bi, D., Zheng, R., Cai, N., Xu, H., Zhou, R., Lu, J., Wan, M., & Xu, X. (2017). Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. *Scientific Reports*, *7*(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01868-0>
- Farooq, A. (2015). Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *15*(14), 1372–1384.  
<https://doi.org/10.2174/1568026615666150413154841>
- Felty, Q., & Roy, D. (2005). Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. In *Journal of Carcinogenesis* (Vol. 4, p. 1). Wolters Kluwer -- Medknow Publications.  
<https://doi.org/10.1186/1477-3163-4-1>

- Ferguson, F. G., Wikby, A., Maxson, P., Olsson, J., & Johansson, B. (1995). Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: A comparison between survivors and nonsurvivors. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 50A(6), B378–B382. <https://doi.org/10.1093/gerona/50A.6.B378>
- Ferrucci, L., Semba, R. D., Guralnik, J. M., Ershler, W. B., Bandinelli, S., Patel, K. V., Sun, K., Woodman, R. C., Andrews, N. C., Cotter, R. J., Ganz, T., Nemeth, E., & Longo, D. L. (2010). Proinflammatory state, hepcidin, and anemia in older persons. *Blood*, 115(18), 3810–3816. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-201087>
- Festing, M. F. W. (1990). Inbred strains of mice, 12th. listing, and distribution of some polymorphisms among inbred strains. *Mouse Genome, No. 88*, 19–112.
- Fietta, A., Merlini, C., De Bernardi, P. M., Gandola, L., Piccioni, P. D., & Grassi, C. (1993). Non specific immunity in aged healthy subjects and in patients with chronic bronchitis. *Aging Clinical and Experimental Research*, 5(5), 357–361. <https://doi.org/10.1007/BF03324187>
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., & Frackelton, J. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*, 14(10), 1649–1660. <https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0532>
- Finch, C. E. (2014). The menopause and aging, a comparative perspective. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.010>
- FINCH, C. E., FELICIO, L. S., MOBBS, C. V., & NELSON, J. F. (1984). Ovarian and Steroidal Influences on Neuroendocrine Aging Processes in Female Rodents\*. *Endocrine Reviews*, 5(4), 467–497. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-4-467>
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 194, Issue 1, pp. 7–15). J Cell Biol. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Fish, E. N. (2008). The X-files in immunity: Sex-based differences predispose immune responses. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 9, pp. 737–744). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2394>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2006). Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908(1), 244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Franceschi, C., Valensin, S., Bonafè, M., Paolisso, G., Yashin, A. I., Monti, D., & De Benedictis, G. (2000). The network and the remodeling theories of aging: Historical background and new perspectives. *Experimental Gerontology*, 35(6–7), 879–896. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00172-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00172-8)
- Franceschi, Claudio, Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., & Santoro, A. (2018). Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology* 2018 14:10, 14(10), 576–590. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-4>



- Franceschi, Claudio, Salvioli, S., Garagnani, P., de Eguileor, M., Monti, D., & Capri, M. (2017). Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: A focus on inflammaging and trained immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue AUG, p. 1). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00982>
- Frasor, J., Danes, J. M., Komm, B., Chang, K. C. N., Richard Lyttle, C., & Katzenellenbogen, B. S. (2003). Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: Insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*, *144*(10), 4562–4574. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0567>
- Frei, R., Steinle, J., Birchler, T., Loeliger, S., Roduit, C., Steinhoff, D., Seibl, R., Büchner, K., Seger, R., Reith, W., & Lauener, R. P. (2010). MHC class II molecules enhance toll-like receptor mediated innate immune responses. *PLoS ONE*, *5*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008808>
- Freire-de-Lima, C. G., Yi, Q. X., Gardai, S. J., Bratton, D. L., Schiemann, W. P., & Henson, P. M. (2006). Apoptotic cells, through transforming growth factor- $\beta$ , coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(50), 38376–38384. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605146200>
- Fuente, M., & Miquel, J. (2009). An Update of the Oxidation-Inflammation Theory of Aging: The Involvement of the Immune System in Oxi-Inflamm-Aging. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(26), 3003–3026. <https://doi.org/10.2174/138161209789058110>
- Fülöp, T., Dupuis, G., Witkowski, J., & Larbi, A. (2016). The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. *Undefined*.
- Fulop, T., Larbi, A., Dupuis, G., Page, A. Le, Frost, E. H., Cohen, A. A., Witkowski, J. M., & Franceschi, C. (2018). Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: Friends or Foes? *Frontiers in Immunology*, *8*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>
- Fulop, T., Larbi, A., Kotb, R., de Angelis, F., & Pawelec, G. (2011). Aging, immunity, and cancer. In *Discovery medicine* (Vol. 11, Issue 61, pp. 537–550).
- Fulop, T., McElhaney, J., Pawelec, G., Cohen, A. A., Morais, J. A., Dupuis, G., Baehl, S., Camous, X., Witkowski, J. M., & Larbi, A. (2015). Frailty, Inflammation and Immunosenescence. *Interdisciplinary Topics in Gerontology and Geriatrics*, *41*, 26–40. <https://doi.org/10.1159/000381134>
- Furman, D., Hejblum, B. P., Simon, N., Jojic, V., Dekker, C. L., Thiebaut, R., Tibshirani, R. J., & Davis, M. M. (2014). Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(2), 869–874. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321060111>
- Gantus, M. A. V., Alves, L. M., Stipursky, J., Souza, E. C. L., Teodoro, A. J., Alves, T. R., Carvalho, D. P., Martinez, A. M. B., Gomes, F. C. A., & Nasciutti, L. E. (2011). Estradiol modulates TGF- $\beta$ 1 expression and its signaling pathway in thyroid stromal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *337*(1–2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.02.001>

- Garrido, A., Cruces, J., Ceprián, N., Vara, E., & de la Fuente, M. (2019). Oxidative-inflammatory stress in immune cells from adult mice with premature aging. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(3), 5–7. <https://doi.org/10.3390/ijms20030769>
- Gaytan, F., Aceitero, J., Bellido, C., Sanchez-Criado, J. E., & Aguilar, E. (1991). Estrous cycle-related changes in mast cell numbers in several ovarian compartments in the rat. *Biology of Reproduction*, *45*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.1.27>
- Gery, I., Gershon, R. K., & Waksman, B. H. (1971). Potentiation of cultured mouse thymocyte responses by factors released by peripheral leucocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *107*(6), 1778–1780. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4941117>
- Ghezzi, P., Sacco, S., Agnello, D., Marullo, A., Caselli, G., & Bertini, R. (2000). LPS induces IL-6 in the brain and in serum largely through TNF production. *Cytokine*, *12*(8), 1205–1210. <https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0697>
- Ghisletti, S., Meda, C., Maggi, A., & Vegeto, E. (2005). 17 $\beta$ -Estradiol Inhibits Inflammatory Gene Expression by Controlling NF- $\kappa$ B Intracellular Localization. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(8), 2957–2968. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.8.2957-2968.2005>
- Giefing-Kröll, C., Berger, P., Lepperdinger, G., & Grubeck-Loebenstien, B. (2015). How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. In *Aging Cell* (Vol. 14, Issue 3, pp. 309–321). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/accel.12326>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, *330*(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Gómez-Zubeldia, M. A., Hernandez, R., Viguera, J., Arbues, J. J., Aparicio, A., & Millán, J. C. (2000). Effect of bilateral ovariectomy and ovarian steroid hormones on the antioxidant systems and plasma malondialdehyde levels in Wistar rats. *Endocrine Research*, *26*(1), 97–107. <https://doi.org/10.1080/07435800009040149>
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 3, Issue 1, pp. 23–35). <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Gordon, S., Fraser, I., Nath, D., Hughes, D., & Clarke, S. (1992). Macrophages in tissues and in vitro. *Current Opinion in Immunology*, *4*(1), 25–32. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(92\)90119-Y](https://doi.org/10.1016/0952-7915(92)90119-Y)
- Gordon, S., Plüddemann, A., & Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. *Immunological Reviews*, *262*(1), 36–55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, *5*(12), 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Kannookadan, S., Ochsenreiter, M., Popova, A., Yu, X., Mamidi, S., Stonehouse-Usselman, E., Muller-Molinet, I., Gooi, L., & Goerdts, S. (2008). Activation of a TGF- $\beta$ -Specific Multistep Gene Expression Program in Mature Macrophages Requires

- Glucocorticoid-Mediated Surface Expression of TGF- $\beta$  Receptor II. *The Journal of Immunology*, 180(10), 6553–6565. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6553>
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83(5), 793–802. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90192-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90192-2)
- Guayerbas, N., & De La Fuente, M. (2003). An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(4), 339–350. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00103-9)
- Gubbels Bupp, M. R. (2015). Sex, the aging immune system, and chronic disease. In *Cellular Immunology* (Vol. 294, Issue 2, pp. 102–110). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.02.002>
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 1977–1992. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>
- Ha, B. J., Lee, S. H., Kim, H. J., & Lee, J. Y. (2006). The role of Salicornia herbacea in ovariectomy-induced oxidative stress. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(7), 1305–1309. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1305>
- Hale, G. E., Hughes, C. L., & Cline, J. M. (2002). Endometrial Cancer: Hormonal Factors, the Perimenopausal “Window of Risk,” and Isoflavones. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1), 3–15. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8132>
- Hales, D. B. (2002). Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, 57(1–2), 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(02\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(02)00020-7)
- Hanna, R. N., Shaked, I., Hubbeling, H. G., Punt, J. A., Wu, R., Herrley, E., Zaugg, C., Pei, H., Geissmann, F., Ley, K., & Hedrick, C. C. (2012). NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circulation Research*, 110(3), 416–427. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.253377>
- Haraguchi, Y., Takiguchi, M., Amaya, Y., Kawamoto, S., Matsuda, I., & Mori, M. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(2), 412–415. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.2.412>
- Harlow, S. D., Gass, M., Hall, J. E., Lobo, R., Maki, P., Rebar, R. W., Sherman, S., Sluss, P. M., & De Villiers, T. J. (2012). Executive summary of the stages of reproductive aging workshop + 10: Addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(4), 1159–1168. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3362>

- Harness-Brumley, C. L., Elliott, A. C., Rosenbluth, D. B., Raghavan, D., & Jain, R. (2014). Gender differences in outcomes of patients with cystic fibrosis. *Journal of Women's Health, 23*(12), 1012–1020. <https://doi.org/10.1089/jwh.2014.4985>
- Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes <sup>1</sup>. *The FASEB Journal, 6*(9), 2675–2683. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.9.1612291>
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., ... Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity, 38*(4), 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>
- Hattori, T., Fujisawa, T., Sasaki, K., Yutani, Y., Nakanishi, T., Takahashi, K., & Takigawa, M. (1998). Isolation and characterization of a rheumatoid arthritis-specific antigen (RA-A47) from a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochemical and Biophysical Research Communications, 245*(3), 679–683. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8505>
- Hayase, F., Nagaraj, R. H., Miyata, S., Njoroge, F. G., & Monnier, V. M. (1989). Aging of proteins: Immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction in vivo. *Journal of Biological Chemistry, 264*(7), 3758–3764.
- Hekking, L. H. P., Zweers, M. M., Keuning, E. D., Driesprong, B. A. J., De Waart, D. R., Beelen, R. H. J., & Van Den Born, J. (2005). Apparent successful mesothelial cell transplantation hampered by peritoneal activation. *Kidney International, 68*, 2362–2367. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00698.x>
- Hemsell, D. L., Grodin, J. M., Brenner, P. F., Siiteri, P. K., & Macdonald, P. C. (1974). Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 38*(3), 476–479. <https://doi.org/10.1210/jcem-38-3-476>
- Herre, J., Gordon, S., & Brown, G. D. (2004). Dectin-1 and its role in the recognition of  $\beta$ -glucans by macrophages. *Molecular Immunology, 40*(12), 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.007>
- Herrero, C., Marqués, L., Lloberas, J., & Celada, A. (2001). IFN- $\gamma$ -dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice. *Journal of Clinical Investigation, 107*(4), 485–493. <https://doi.org/10.1172/JCI11696>
- Herrero, Carmen, Sebastiaán, C., Marqueés, L., Comalada, M., Xaus, J., Valledor, A. F., Lloberas, J., & Celada, A. (2002a). Immunosenescence of macrophages: Reduced MHC class II gene expression. *Experimental Gerontology, 37*(2–3), 389–394. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00205-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00205-4)
- Herrero, Carmen, Sebastiaán, C., Marqueés, L., Comalada, M., Xaus, J., Valledor, A. F., Lloberas, J., & Celada, A. (2002b). Immunosenescence of macrophages: Reduced MHC class II gene expression. *Experimental Gerontology, 37*(2–3), 389–394. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00205-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00205-4)
- Hiemstra, I. H., Beijer, M. R., Veninga, H., Vrijland, K., Borg, E. G. F., Olivier, B. J., Mebius, R. E.,

- Kraal, G., & Den Haan, J. M. M. (2014). The identification and developmental requirements of colonic CD169+ macrophages. *Immunology*, *142*(2), 269–278. <https://doi.org/10.1111/imm.12251>
- Higashi-Kuwata, N., Makino, T., Inoue, Y., Takeya, M., & Ihn, H. (2009). Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. In *Experimental Dermatology* (Vol. 18, Issue 8, pp. 727–729). *Exp Dermatol*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00828.x>
- Hogg, C., Panir, K., Dhami, P., Rosser, M., Mack, M., Soong, D., Pollard, J. W., Jenkins, S. J., Horne, A. W., & Greaves, E. (2021). Macrophages inhibit and enhance endometriosis depending on their origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.2013776118>
- Högger, P., Dreier, J., Droste, A., Buck, F., & Sorg, C. (1998). Identification of the Integral Membrane Protein RM3/1 on Human Monocytes as a Glucocorticoid-Inducible Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Family (CD163). *The Journal of Immunology*, *161*(4).
- Holáň, V., Pindjácová, J., Krulová, M., Neuwirth, A., Frič, J., & Zajícová, A. (2006). Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism. *Transplantation*, *81*(12), 1708–1715. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000226067.89690.2b>
- Hoover-Plow, J. L., Gong, Y., Shchurin, A., Busuttil, S. J., Schneeman, T. A., & Hart, E. (2008). Strain and model dependent differences in inflammatory cell recruitment in mice. *Inflammation Research*, *57*(10), 457–463. <https://doi.org/10.1007/s00011-008-7062-5>
- Howard, C. J., Charleston, B., Stephens, S. A., Sopp, P., & Hope, J. C. (2004). The role of dendritic cells in shaping the immune response. *Animal Health Research Reviews*, *5*(2), 191–195. <https://doi.org/10.1079/ahr200468>
- Hu, W., Jiang, Z., Zhang, Y., Liu, Q., Fan, J., Luo, N., Dong, X., & Yu, X. (2012). Characterization of infiltrating macrophages in high glucose-induced peritoneal fibrosis in rats. *Molecular Medicine Reports*, *6*(1), 93–99. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.890>
- Huang, H.-H., Marshall, S., & Meites, J. (1976). Capacity of Old Versus Young Female Rats to Secrete LH, FSH and Prolactin. *Biology of Reproduction*, *14*(5), 538–543. <https://doi.org/10.1095/biolreprod14.5.538>
- Huang, H., He, J., Yuan, Y., Aoyagi, E., Takenaka, H., Itagaki, T., Sannomiya, K., Tamaki, K., Harada, N., Shono, M., Shimizu, I., & Takayama, T. (2008). Opposing effects of estradiol and progesterone on the oxidative stress-induced production of chemokine and proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages. *Journal of Medical Investigation*, *55*(1–2), 133–141. <https://doi.org/10.2152/jmi.55.133>
- Hussain, I., & Qureshi, M. A. (1997). Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. *Poultry Science*, *76*(11), 1524–1530. <https://doi.org/10.1093/PS/76.11.1524>
- Huynh, M.-L. N., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- $\beta$ 1 secretion and the resolution of inflammation. *Journal*

*of Clinical Investigation*, 109(1), 41–50. <https://doi.org/10.1172/jci11638>

- Ibrahim, Z. A., Armour, C. L., Phipps, S., & Sukkar, M. B. (2013). RAGE and TLRs: Relatives, friends or neighbours? In *Molecular Immunology* (Vol. 56, Issue 4, pp. 739–744). Mol Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.008>
- Inamizu, T., Chang, M. P., & Makinodan, T. (1985). Influence of age on the production and regulation of interleukin-1 in mice. *Immunology*, 55(3), 447. [/pmc/articles/PMC1453648/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1453648/)
- Iqbal, A. J., McNeill, E., Kapellos, T. S., Regan-Komito, D., Norman, S., Burd, S., Smart, N., Machemer, D. E. W., Stylianou, E., McShane, H., Channon, K. M., Chawla, A., & Greaves, D. R. (2014). Human CD68 promoter GFP transgenic mice allow analysis of monocyte to macrophage differentiation in vivo. *Blood*, 124(15), e33–e44. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-568691>
- Itagaki, T. (2005). Opposing effects of oestradiol and progesterone on intracellular pathways and activation processes in the oxidative stress-induced activation of cultured rat hepatic stellate cells. *Gut*, 54(12), 1782–1789. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.053728>
- Italiani, P., Boraschi, D., & Ley, K. (2014). *From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>
- Izgüt-Uysal, V. N., Özkaya, Y. G., Özdemir, S., Yargıçođlu, P., & Ağar, A. (2004). Effect of L-arginine on age-related changes in macrophage phagocytic activity. *Immunological Investigations*, 33(3), 287–293. <https://doi.org/10.1081/IMM-120037276>
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 6, pp. 349–362). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.28>
- Jankovic, D., Kugler, D. G., & Sher, A. (2010). IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunology*, 3(3), 239–246. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.8>
- Jeng, M. H., ten Dijke, P., Iwata, K. K., & Jordan, V. C. (1993). Regulation of the levels of three transforming growth factor  $\beta$  mRNAs by estrogen and their effects on the proliferation of human breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 97(1–2), 115–123. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(93\)90217-8](https://doi.org/10.1016/0303-7207(93)90217-8)
- Jenkins, S. J., & Hume, D. A. (2014). Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends in Immunology*, 35(8), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.06.006>
- Jiang, X., Shen, C., Yu, H., Karunakaran, K. P., & Brunham, R. C. (2010). Differences in innate immune responses correlate with differences in murine susceptibility to Chlamydia muridarum pulmonary infection. *Immunology*, 129(4), 556–566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03157.x>
- Kankofer, M., Radzki, R. P., Bieńko, M., & Albera, E. (2007). Anti-oxidative/oxidative status of rat liver after ovariectomy. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 54(5), 225–229. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00916.x>
- Karasawa, K., Asano, K., Moriyama, S., Ushiki, M., Monya, M., Iida, M., Kuboki, E., Yagita, H.,

- Uchida, K., Nitta, K., & Tanaka, M. (2015). Vascular-resident CD169-positive monocytes and macrophages control neutrophil accumulation in the kidney with ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(4), 896–906. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014020195>
- Katakura, T., Miyazaki, M., Kobayashi, M., Herndon, D. N., & Suzuki, F. (2004). CCL17 and IL-10 as Effectors That Enable Alternatively Activated Macrophages to Inhibit the Generation of Classically Activated Macrophages. *The Journal of Immunology*, 172(3), 1407–1413. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1407>
- Kaufmann, S. H. E., & Dorhoi, A. (2016). Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. In *Immunity* (Vol. 44, Issue 3, pp. 476–491). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.014>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. In *Nature Immunology* (Vol. 11, Issue 5, pp. 373–384). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Khmelewski, E., Becker, A., Meinertz, T., & Ito, W. D. (2004). Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation. *Circulation Research*, 95(6). <https://doi.org/10.1161/01.res.0000143013.04985.e7>
- Kinn, P. M., Holdren, G. O., Westermeyer, B. A., Abuissa, M., Fischer, C. L., Fairley, J. A., Brogden, K. A., & Brogden, N. K. (2015). Age-dependent variation in cytokines, chemokines, and biologic analytes rinsed from the surface of healthy human skin. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep10472>
- Kireev, R. A., Tresguerres, A. F., Vara, E., Ariznavarreta, C., & Tresguerres, J. A. F. (2007). Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens, and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. *Biogerontology*, 8(5), 469–482. <https://doi.org/10.1007/s10522-007-9089-3>
- Kirstein, M., Brett, J., Radoff, S., Ogawa, S., Stern, D., & Vlassara, H. (1990). Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: Role in vascular disease of diabetes and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(22), 9010–9014. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.22.9010>
- Kissin, E., Tomasi, M., McCartney-Francis, N., Gibbs, C. L., & Smith, P. D. (1997). Age-Related Decline in Murine Macrophage Production of Nitric Oxide. *The Journal of Infectious Diseases*, 175(4), 1004–1007. <https://doi.org/10.1086/513959>
- Klein, S. L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(6), 627–638. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00027-0)
- Klein, Sabra L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Kleinnijenhuis, J., Quintin, J., Preijers, F., Joosten, L. A. B., Ifrim, D. C., Saeed, S., Jacobs, C., Van Loenhout, J., De Jong, D., Hendrik, S., Xavier, R. J., Van Der Meer, J. W. M., Van Crevel, R., & Netea, M. G. (2012). Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific

- protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43), 17537–17542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109>
- Kneidl, J., Löffler, B., Erat, M. C., Kalinka, J., Peters, G., Roth, J., & Barczyk, K. (2012). Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. *Cellular Microbiology*, 14(6), 914–936. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2012.01766.X>
- Knight, J. A. (2000). Free radicals, antioxidants, and the immune system. In *Annals of Clinical & Laboratory Science* (Vol. 30, Issue 2). <http://www.annclinlabsci.org/content/30/2/145.short>
- Kobayashi, Y. (2010). The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(6), 1157–1162. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310149>
- Koenig, A., Buskiewicz, I., & Huber, S. A. (2017). Age-associated changes in estrogen receptor ratios correlate with increased female susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01585>
- Kohler, O., Krogh, J., Mors, O., & Eriksen Benros, M. (2016). Inflammation in Depression and the Potential for Anti-Inflammatory Treatment. *Current Neuropharmacology*, 14(7), 732–742. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666151208113700>
- Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular Immunology*, 294(2), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>
- Kramnik, I., & Boyartchuk, V. (2002). Immunity to intracellular pathogens as a complex genetic trait. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 111–117). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00295-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00295-3)
- Kufer, T. A., Nigro, G., & Sansonetti, P. J. (2017). Multifaceted Functions of NOD-Like Receptor Proteins in Myeloid Cells at the Intersection of Innate and Adaptive Immunity. In *Myeloid Cells in Health and Disease* (pp. 295–304). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819194.ch16>
- Kumru, S., Godekmerdan, A., & Yilmaz, B. (2004). Immune effects of surgical menopause and estrogen replacement therapy in peri-menopausal women. *Journal of Reproductive Immunology*, 63(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2004.02.001>
- Land, W. G. (2015). The role of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in human diseases part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. In *Sultan Qaboos University Medical Journal* (Vol. 15, Issue 2, pp. e157–e170). Sultan Qaboos University. </pmc/articles/PMC4450777/>
- Lang, T. J. (2004). Estrogen as an immunomodulator. In *Clinical Immunology* (Vol. 113, Issue 3, pp. 224–230). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.05.011>
- Lastrucci, C., Baillif, V., Behar, A., Al Saati, T., Dubourdeau, M., Maridonneau-Parini, I., & Cougoule, C. (2015). Molecular and cellular profiles of the resolution phase in a damage-associated molecular pattern (DAMP)-mediated peritonitis model and revelation of



- leukocyte persistence in peritoneal tissues. *FASEB Journal*, 29(5), 1914–1929. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259341>
- Laurin, L. P., Brissette, M. J., Lepage, S., & Cailhier, J. F. (2012). Regulation of experimental peritonitis: A complex orchestration. In *Nephron - Experimental Nephrology* (Vol. 120, Issue 1). <https://doi.org/10.1159/000334169>
- Lauw, F. N., Pajkrt, D., Hack, C. E., Kurimoto, M., van Deventer, S. J. H., & van der Poll, T. (2000). Proinflammatory Effects of IL-10 During Human Endotoxemia. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2783–2789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2783>
- Lawrence, T., & Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 750–761). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3088>
- Lehners, A., Lange, S., Niemann, G., Rosendahl, A., Meyer-Schwesinger, C., Oh, J., Stahl, R., Ehmke, H., Benndorf, R., Klinke, A., Baldus, S., & Wenzel, U. O. (2014). Myeloperoxidase deficiency ameliorates progression of chronic kidney disease in mice. <https://doi.org/10.1152/Ajprenal.00262.2014>, 307(4). <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00262.2014>
- Lemaître, J. F., Ronget, V., Tidière, M., Allainé, D., Berger, V., Cohas, A., Colchero, F., Conde, D. A., Garratt, M., Liker, A., Marais, G. A. B., Scheuerlein, A., Székely, T., & Gaillard, J. M. (2020). Sex differences in adult lifespan and aging rates of mortality across wild mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(15), 8546–8553. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1911999117>
- Levin, E. R. (2001). Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. <https://doi.org/10.1152/Jappl.2001.91.4.1860>, 91(4), 1860–1867. <https://doi.org/10.1152/JAPPL.2001.91.4.1860>
- Levin, E. R. (2009). Plasma membrane estrogen receptors. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 20, Issue 10, pp. 477–482). Trends Endocrinol Metab. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.009>
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K. L., & Flavell, R. A. (2006). TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$  REGULATION OF IMMUNE RESPONSES. *Annual Review of Immunology*, 24(1), 99–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>
- Li, Y. (2016). *Using the thioglycollate-elicited murine peritonitis model for investigation of macrophage behaviour and its relationship with Irg1 expression* By.
- Li, Y. M., Baviello, G., Vlassara, H., & Mitsuhashi, T. (1997). Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. *Journal of Immunological Methods*, 201(2), 183–188. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(96\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(96)00224-4)
- Li, Z., Zhao, Z.-J., Zhu, X.-Q., Ren, Q.-S., Nie, F.-F., Gao, J.-M., Gao, X.-J., Yang, T.-B., Zhou, W.-L., Shen, J.-L., Wang, Y., Lu, F.-L., Chen, X.-G., Hide, G., Ayala, F. J., & Lun, Z.-R. (2012). Differences in iNOS and Arginase Expression and Activity in the Macrophages of Rats Are Responsible for the Resistance against *T. gondii* Infection. *PLoS ONE*, 7(4).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035834>

- Libert, C., Dejager, L., & Pinheiro, I. (2010). The X chromosome in immune functions: When a chromosome makes the difference. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 8, pp. 594–604). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2815>
- Licastro, F., Candore, G., Lio, D., Porcellini, E., Colonna-Romano, G., Franceschi, C., & Caruso, C. (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: A key for understanding age-related diseases. In *Immunity and Ageing* (Vol. 2, Issue 1, pp. 1–14). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-8>
- Linehan, E., & Fitzgerald, D. (2015). Ageing and the immune system: focus on macrophages. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 5(1), 14–24. <https://doi.org/10.1556/eujmi-d-14-00035>
- Linehan, Eimear, Dombrowski, Y., Snoddy, R., Fallon, P. G., Kissenpfennig, A., & Fitzgerald, D. C. (2014). Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. *Aging Cell*, 13(4), 699–708. <https://doi.org/10.1111/accel.12223>
- Lio, D., Scola, L., Crivello, A., Colonna-Romano, G., Candore, G., Bonafe, M., Cavallone, L., Franceschi, C., & Caruso, C. (2002). Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes and Immunity*, 3(1), 30–33. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363827>
- Liu, G., & Yang, H. (2013). Modulation of macrophage activation and programming in immunity. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 228, Issue 3, pp. 502–512). <https://doi.org/10.1002/jcp.24157>
- Liu, T., Liu, F., Peng, L.-W., Chang, L., & Jiang, Y.-M. (2018). The Peritoneal Macrophages in Inflammatory Diseases and Abdominal Cancers. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 26(5), 817–826. <https://doi.org/10.3727/096504017X15130753659625>
- Liu, Y., Xia, Y., & Qiu, C. H. (2020). Functions of cd169 positive macrophages in human diseases (Review). *Biomedical Reports*, 14(2), 1–9. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1402>
- Lloberas, J., & Celada, A. (2002). Effect of aging on macrophage function. *Experimental Gerontology*, 37(12), 1325–1331. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(02\)00125-0](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00125-0)
- Lockshin, M. D. (2010). Nonhormonal explanations for sex discrepancy in human illness: Annals of the New York Academy of Sciences. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1193, 22–24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05293.x>
- Lorenzo, J. (2003). A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *Journal of Clinical Investigation*, 111(11), 1641–1643. <https://doi.org/10.1172/jci18812>
- Losonczy, G., Kriston, T., Szabó, A., Müller, V., Harvey, J., Hamar, P., Heemann, U., & Baylis, C. (2000). Male gender predisposes to development of endotoxic shock in the rat. *Cardiovascular Research*, 47(1), 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00075-4)
- Lou, Y., Zhang, G., Geng, M., Zhang, W., Cui, J., & Liu, S. (2014). TIPE2 negatively regulates inflammation by switching arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase.

*PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096508>

- Louwe, P. A., Badiola Gomez, L., Webster, H., Perona-Wright, G., Bain, C. C., Forbes, S. J., & Jenkins, S. J. (2021). Recruited macrophages that colonize the post-inflammatory peritoneal niche convert into functionally divergent resident cells. *Nature Communications*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21778-0>
- Lu, B., Jiang, Y. J., & Choy, P. C. (2004). 17- $\beta$  estradiol enhances prostaglandin E2 production in human U937-derived macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262(1–2), 101–110. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000038222.08915.84>
- Lu, K. H., Hopper, B. R., Vargo, T. M., & Yen, S. S. C. (1979). Chronological Changes in Sex Steroid, Gonadotropin and Prolactin Secretion in Aging Female Rats Displaying Different Reproductive States1. *Biology of Reproduction*, 21(1), 193–203. <https://doi.org/10.1095/biolreprod21.1.193>
- Lu, R., Brown, S. B., Sampathkumar, N. K., Shen, C., Chae, J., & Benayoun, B. A. (2020). Extensive sex-dimorphism in age-related transcriptional remodeling in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology*, 204(1 Supplement).
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. In *Cytokine* (Vol. 42, Issue 2, pp. 145–151). Cytokine. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Luo, X.-H., Liao, E.-Y., & Su, X. (2002). Progesterone Upregulates TGF- $\beta$  Isoforms ( $\beta$ 1, $\beta$ 2, and  $\beta$ 3) Expression in Normal Human Osteoblast-Like Cells. *Calcified Tissue International*, 71(4), 329–334. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-2129-0>
- Lynch, A. M., Murphy, K. J., Deighan, B. F., O'Reilly, J. A., Gun'ko, Y. K., Cowley, T. R., Gonzalez-Reyes, R. E., & Lynch, M. A. (2010). The impact of glial activation in the aging brain. In *Aging and Disease* (Vol. 1, Issue 3, pp. 262–278). International Society on Aging and Disease.
- Macgregor, J. I., & Jordan, V. C. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological Reviews*, 50(2), 151–196. <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/content/full/50/2/151>
- Maggio, M., Basaria, S., Ble, A., Lauretani, F., Bandinelli, S., Ceda, G. P., Valenti, G., Ling, S. M., & Ferrucci, L. (2006). Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(1), 345–347. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1097>
- Maggiolini, M., & Picard, D. (2010). The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 204, Issue 2, pp. 105–114). J Endocrinol. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0242>
- Mancuso, P., McNish, R. W., Peters-Golden, M., & Brock, T. G. (2001). Evaluation of phagocytosis and arachidonate metabolism by alveolar macrophages and recruited neutrophils from F344xBN rats of different ages. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(15), 1899–1913. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00322-0](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00322-0)
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013a). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*, 229(2), 176–185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>

- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013b). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. In *Journal of Pathology* (Vol. 229, Issue 2, pp. 176–185). <https://doi.org/10.1002/path.4133>
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4 A), 609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>
- Marinkovic, E., Djokic, R., Lukic, I., Filipovic, A., Inic-Kanada, A., Kosanovic, D., Gavrovic-Jankulovic, M., & Stojanovic, M. (2017). Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. *PLoS ONE*, 12(2), e0172469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172469>
- Marques, S. M., Campos, P. P., Castro, P. R., Cardoso, C. C., Ferreira, M. A. N. D., & Andrade, S. P. (2011). Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvascular Research*, 82(3), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.MVR.2011.08.011>
- Márquez, E. J., Chung, C. han, Marches, R., Rossi, R. J., Nehar-Belaid, D., Eroglu, A., Mellert, D. J., Kuchel, G. A., Banchereau, J., & Ucar, D. (2020). Sexual-dimorphism in human immune system aging. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14396-9>
- Marriott, I., & Huet-Hudson, Y. M. (2006). Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. In *Immunologic Research* (Vol. 34, Issue 3, pp. 177–192). <https://doi.org/10.1385/IR:34:3:177>
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7303–7311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>
- Mattingly, K. A., Ivanova, M. M., Riggs, K. A., Wickramasinghe, N. S., Barch, M. J., & Klinge, C. M. (2008). Estradiol Stimulates Transcription of Nuclear Respiratory Factor-1 and Increases Mitochondrial Biogenesis. *Molecular Endocrinology*, 22(3), 609–622. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0029>
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 12, pp. 991–1045). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015>
- Maynard, C. L., & Weaver, C. T. (2008). Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunological Reviews*, 226(1), 219–233. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00711.x>
- McLaren, J., Prentice, A., Charnock-Jones, D. S., Millican, S. A., Müller, K. H., Sharkey, A. M., & Smith, S. K. (1996). Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *Journal of Clinical Investigation*, 98(2), 482–489. <https://doi.org/10.1172/JCI118815>
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. In *Cell* (Vol. 140,

Issue 6, pp. 771–776). *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>

- Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. In *Immunological Reviews* (Vol. 173, Issue 1, pp. 89–97). <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x>
- Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. In *Regulatory Peptides* (Vol. 85, Issue 1, pp. 9–24). *Regul Pept*. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(99\)00089-0](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(99)00089-0)
- Mercier, I., Colombo, F., Mader, S., & Calderone, A. (2002). Ovarian hormones induce TGF- $\beta$ 3 and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovascular Research*, 53(3), 728–739. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00525-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00525-9)
- Merola, M., Blanchard, B., & Tovey, M. G. (1996). The  $\kappa$ B enhancer of the human interleukin-6 promoter is necessary and sufficient to confer an IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  response in transfected human cell lines: Requirement for members of the C/EBP family for activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 16(10), 783–798. <https://doi.org/10.1089/jir.1996.16.783>
- Milan-Mattos, J. C., Anibal, F. F., Perseguini, N. M., Minatel, V., Rehder-Santos, P., Castro, C. A., Vasilceac, F. A., Mattiello, S. M., Faccioli, L. H., & Catai, A. M. (2019). Effects of natural aging and gender on pro-inflammatory markers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52(9). <https://doi.org/10.1590/1414-431x20198392>
- Miletić, T., Kovačević-Jovanović, V., Vujić, V., Stanojević, S., Mitić, K., Lazarević-Macanović, M., & Dimitrijević, M. (2007). Reactive oxygen species (ROS), but not nitric oxide (NO), contribute to strain differences in the susceptibility to experimental arthritis in rats. *Immunobiology*, 212(2), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.11.012>
- Miljkovic, D., Stosic-Grujicic, S., Markovic, M., Momcilovic, M., Ramic, Z., Maksimovic-Ivanic, D., Mijatovic, S., Popadic, D., Cvetkovic, I., & Mostarica-Stojkovic, M. (2006). Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *Journal of Neuroscience Research*, 84(2), 379–388. <https://doi.org/10.1002/jnr.20883>
- Miller, L., & Hunt, J. S. (1996). Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sciences*, 59(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00122-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00122-1)
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Minakami, R., & Sumimoto, H. (2006). Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (Nox) family. In *International Journal of Hematology* (Vol. 84, Issue 3, pp. 193–198). *Int J Hematol*. <https://doi.org/10.1532/IJH97.06133>
- Mizel, S. B., Honko, A. N., Moors, M. A., Smith, P. S., & West, A. P. (2003). Induction of Macrophage Nitric Oxide Production by Gram-Negative Flagellin Involves Signaling Via Heteromeric Toll-Like Receptor 5/Toll-Like Receptor 4 Complexes. *The Journal of*

- Immunology*, 170(12), 6217–6223. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6217>
- Moghaddam, A. S., Mohammadian, S., Vazini, H., & Taghadosi, M. (2018). *Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease* † \* Corresponding author : Amirhossein Sahebkar, PharmD, PhD, Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, (Issue January). <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Mondal, S., & Rai, U. (1999). Sexual dimorphism in phagocytic activity of wall lizard's splenic macrophages and its control by sex steroids. *General and Comparative Endocrinology*, 116(2), 291–298. <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7370>
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- Moraga, I., Spangler, J., Mendoza, J. L., & Garcia, K. C. (2014). Multifarious Determinants of Cytokine Receptor Signaling Specificity. In *Advances in Immunology* (Vol. 121, pp. 1–39). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00001-5>
- Morley, J. E., & Baumgartner, R. N. (2004). Cytokine-Related Aging Process. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 59(9), M924–M929. <https://doi.org/10.1093/gerona/59.9.M924>
- Morris, S. M. (2004). Enzymes of Arginine Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 134(10), 2743S–2747S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2743s>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008a). Exploring the full spectrum of macrophage activation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 12, pp. 958–969). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008b). Exploring the full spectrum of macrophage activation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 8, Issue 12, pp. 958–969). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mosser, D. M., & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. In *Immunological Reviews* (Vol. 226, Issue 1, pp. 205–218). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x>
- Moynagh, P. N. (2005). TLR signalling and activation of IRFs: Revisiting old friends from the NF-κB pathway. In *Trends in Immunology* (Vol. 26, Issue 9, pp. 469–476). Trends Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.06.009>
- Müller, J., Alföldy, P., & Lemmel, E. M. (1981). Nitroblue-tetrazolium test for the functional evaluation of phagocytic cells: A critical analysis of the methodology. *Agents and Actions*, 11(4), 384–390. <https://doi.org/10.1007/BF01982475>
- Müller, L., Fülöp, T., & Pawelec, G. (2013). Immunosenescence in vertebrates and invertebrates. In *Immunity and Ageing* (Vol. 10, Issue 1, p. 12). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-12>
- Müllner, N., Lázár, Á., & Hrabák, A. (2002). Enhanced utilization and altered metabolism of arginine in inflammatory macrophages caused by raised nitric oxide synthesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(9), 1080–1090.

[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00028-6)

- Munder, M., Eichmann, K., Morán, J. M., Centeno, F., Soler, G., & Modolell, M. (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *163*(7), 3771–3777. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490974>
- Munn, D. H., Beall, A. C., Song, D., Wrenn, R. W., & Throckmorton, D. C. (1995). Activation-induced apoptosis in human macrophages: Developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon  $\gamma$ . *Journal of Experimental Medicine*, *181*(1), 127–136. <https://doi.org/10.1084/jem.181.1.127>
- Murphy, A. (2010). *Molecular mechanisms of estrogen receptor regulation and signaling in human monocytes and macrophages*. <http://search.proquest.com/openview/efe19df5562a151e985af7609f86387d/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>
- Murphy, A. J., Guyre, P. M., & Pioli, P. A. (2010). Estradiol Suppresses NF- $\kappa$ B Activation through Coordinated Regulation of let-7a and miR-125b in Primary Human Macrophages. *The Journal of Immunology*, *184*(9), 5029–5037. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903463>
- Murphy, A. J., Guyre, P. M., Wira, C. R., & Pioli, P. A. (2009). Estradiol regulates expression of estrogen receptor ER $\alpha$ 46 in human macrophages. *PLoS ONE*, *4*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005539>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 723–737). <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Nacka-Aleksić, M., Stojanović, M., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Kosec, D., & Leposavić, G. (2018). Strain differences in thymic atrophy in rats immunized for EAE correlate with the clinical outcome of immunization. *PLoS ONE*, *13*(8), e0201848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201848>
- Nadal, A., Díaz, M., & Valverde, M. A. (2001). The Estrogen Trinity: Membrane, Cytosolic, and Nuclear Effects. *Physiology*, *16*(6), 251–255. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.6.251>
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* *2002* *420*:6917, *420*(6917), 846–852. <https://doi.org/10.1038/nature01320>
- Nawroth, I., Alsner, J., Deleuran, B. W., Dagnaes-Hansen, F., Yang, C., Horsman, M. R., Overgaard, J., Howard, K. A., Kjems, J., & Gao, S. (2013). Peritoneal macrophages mediated delivery of chitosan/siRNA nanoparticle to the lesion site in a murine radiation-induced fibrosis model. *Acta Oncologica*, *52*(8), 1730–1738. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2012.726373>
- Netea, M. G., & van der Meer, J. W. M. (2017). Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 21, Issue 3, pp. 297–300). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.003>
- Ngo, S. T., Steyn, F. J., & McCombe, P. A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 35, Issue 3, pp. 347–369). Academic Press Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.04.004>

- Nguyen, H.-H., Tran, B.-T., Muller, W., & Jack, R. S. (2012). IL-10 Acts As a Developmental Switch Guiding Monocyte Differentiation to Macrophages during a Murine Peritoneal Infection. *The Journal of Immunology*, *189*(6), 3112–3120. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200360>
- Nikodemova, M., & Watters, J. J. (2011). Outbred ICR/CD1 mice display more severe neuroinflammation mediated by microglial TLR4/CD14 activation than inbred C57Bl/6 mice. *Neuroscience*, *190*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.006>
- Novensà, L., Novella, S., Medina, P., Segarra, G., Castillo, N., Heras, M., Hermenegildo, C., & Dantas, A. P. (2011). Aging Negatively Affects Estrogens-Mediated Effects on Nitric Oxide Bioavailability by Shifting ER $\alpha$ /ER $\beta$  Balance in Female Mice. *PLoS ONE*, *6*(9), 25335. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0025335>
- Odegaard, A. O., Jacobs, D. R., Sanchez, O. A., Goff, D. C., Reiner, A. P., & Gross, M. D. (2016). Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0369-6>
- Oetke, C., Vinson, M. C., Jones, C., & Crocker, P. R. (2006). Sialoadhesin-Deficient Mice Exhibit Subtle Changes in B- and T-Cell Populations and Reduced Immunoglobulin M Levels. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(4), 1549–1557. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.4.1549-1557.2006>
- Ogueta, S. B., Schwartz, S. D., Yamashita, C. K., & Farber, D. B. (1999). Estrogen receptor in the human eye: Influence of gender and age on gene expression. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *40*(9), 1906–1911. <http://europepmc.org/article/MED/10440242>
- Oishi, Y., & Manabe, I. (2016). Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *Nature Publishing Group, May*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.18>
- OLSEN, N. J., & KOVACS, W. J. (1996). Gonadal Steroids and Immunity\*. *Endocrine Reviews*, *17*(4), 369–384. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-4-369>
- Paccola, C. C., Resende, C. G., Stumpp, T., Miraglia, S. M., & Cipriano, I. (2018). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. In *Anim. Reprod.*, v (Vol. 10, Issue 4). Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. <http://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6046f7783717068b467f>
- Packiam, M., Veit, S. J., Anderson, D. J., Ingalls, R. R., & Jerse, A. E. (2010). Mouse strain-dependent differences in susceptibility to *Neisseria gonorrhoeae* infection and induction of innate immune responses. *Infection and Immunity*, *78*(1), 433–440. <https://doi.org/10.1128/IAI.00711-09>
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. In *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* (Vol. 20, Issue 2, pp. 87–103). Begell House Inc. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10>
- Parker, M. G. (1998). Transcriptional activation by oestrogen receptors. *Biochemical Society Symposium*, *63*, 45–50.
- Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2004). Neural regulators of innate immune responses and



- inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(18), 2322–2331.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-004-4102-3>
- Pawelec, G. (2017). Does the human immune system ever really become “senescent”? In *F1000Research* (Vol. 6). Faculty of 1000 Ltd.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.11297.1>
- Pawelec, G. (2018). Age and immunity: What is “immunosenescence”? In *Experimental Gerontology* (Vol. 105, pp. 4–9). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.024>
- Peled, M., & Fisher, E. A. (2014). Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00579>
- Pepe, G., Braga, D., Renzi, T. A., Villa, A., Bolego, C., D’Avila, F., Barlassina, C., Maggi, A., Locati, M., & Vegeto, E. (2017). Self-renewal and phenotypic conversion are the main physiological responses of macrophages to the endogenous estrogen surge. *Scientific Reports*, 7(July 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep44270>
- Pepe, G., Locati, M., Della Torre, S., Mornata, F., Cignarella, A., Maggi, A., & Vegeto, E. (2018). The estrogen-macrophage interplay in the homeostasis of the female reproductive tract. In *Human Reproduction Update* (Vol. 24, Issue 6, pp. 652–672). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy026>
- Perlman, H., Pagliari, L. J., Georganas, C., Mano, T., Walsh, K., & Pope, R. M. (1999). FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to Fas-mediated apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 190(11), 1679–1688.  
<https://doi.org/10.1084/jem.190.11.1679>
- Pfeilschifter, J., Köditz, R., Pfohl, M., & Schatz, H. (2002). Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. In *Endocrine Reviews* (Vol. 23, Issue 1, pp. 90–119). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/edrv.23.1.0456>
- Piasecka, B., Duffy, D., Urrutia, A., Quach, H., Patin, E., Posseme, C., Bergstedt, J., Charbit, B., Rouilly, V., MacPherson, C. R., Hasan, M., Albaud, B., Gentien, D., Fellay, J., Albert, M. L., & Quintana-Murci, L. (2018). Distinctive roles of age, sex, and genetics in shaping transcriptional variation of human immune responses to microbial challenges. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(3), E488–E497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714765115>
- Pick, E., & Mizel, D. (1981). Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods*, 46(2), 211–226.  
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90138-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90138-1)
- Pilipović, I., Vujnović, I., Arsenović-Ranin, N., Dimitrijević, M., Kosec, D., Stojić-Vukanić, Z., & Laposavić, G. (2016). Peripubertal ovariectomy influences thymic adrenergic network plasticity in adult rats. *Journal of Neuroimmunology*, 297, 103–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.017>
- Pisitkun, P., Deane, J. A., Difilippantonio, M. J., Tarasenko, T., Satterthwaite, A. B., & Bolland, S.

- (2006). Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*, 312(5780), 1669–1672. <https://doi.org/10.1126/science.1124978>
- Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., & Sambhara, S. (2004). Innate immunity in aging: Impact on macrophage function. *Aging Cell*, 3(4), 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00102.x>
- Polfliet, M. M. J., Fabriek, B. O., Daniëls, W. P., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2006). The rat macrophage scavenger receptor CD163: Expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology*, 211(6–8), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.05.015>
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., Chan, E. K. L., Ledesma, J., Roe, B., Clifton, S., Vogel, S. N., & Beutler, B. (1998). Genetic and physical mapping of the Lps locus: Identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 24(3), 340–355. <https://doi.org/10.1006/bcmd.1998.0201>
- Pongor, S., Ulrich, P. C., Bencsath, F. A., & Cerami, A. (1984). Aging of proteins: Isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(9 I), 2684–2688. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.9.2684>
- Prior, J. C. (1998). Perimenopause: The complex endocrinology of the menopausal transition. In *Endocrine Reviews* (Vol. 19, Issue 4, pp. 397–428). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.4.0341>
- Puchta, A., Naidoo, A., Verschoor, C. P., Loukov, D., Thevaranjan, N., Mandur, T. S., Nguyen, P. S., Jordana, M., Loeb, M., Xing, Z., Kobzik, L., Larché, M. J., & Bowdish, D. M. E. (2016). TNF Drives Monocyte Dysfunction with Age and Results in Impaired Anti-pneumococcal Immunity. *PLoS Pathogens*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005368>
- Pugin, J. (2012). How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Annals of Intensive Care*, 2(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-2-27>
- Raeburn, C. D., Calkins, C. M., Zimmerman, M. A., Song, Y., Ao, L., Banerjee, A., Harken, A. H., & Meng, X. (2002). ICAM-1 and VCAM-1 mediate endotoxemic myocardial dysfunction independent of neutrophil accumulation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 283(2 52-2). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2002>
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue OCT, p. 532). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Ravishankar, B., Shinde, R., Liu, H., Chaudhary, K., Bradley, J., Lemos, H. P., Phillip, C., Tanaka, M., Munn, D. H., Mellor, A. L., & McGaha, T. L. (2014). Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), 4215–4220. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320924111>

- Rea, I. M., Gibson, D. S., McGilligan, V., McNerlan, S. E., Denis Alexander, H., & Ross, O. A. (2018). Age and age-related diseases: Role of inflammation triggers and cytokines. *Frontiers in Immunology*, 9(APR), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00586>
- Reed, J. L., Dimayuga, F. O., Davies, L. M., Keller, J. N., & Bruce-Keller, A. J. (2004). Estrogen increases proteasome activity in murine microglial cells. *Neuroscience Letters*, 367(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.05.077>
- Reichert, S., & Stier, A. (2017). Does oxidative stress shorten telomeres in vivo? A review. In *Biology Letters* (Vol. 13, Issue 12). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0463>
- Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., & Sambhara, S. (2002). Cutting Edge: Impaired Toll-Like Receptor Expression and Function in Aging. *The Journal of Immunology*, 169(9), 4697–4701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4697>
- Reth, M. (2002). Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. In *Nature Immunology* (Vol. 3, Issue 12, pp. 1129–1134). <https://doi.org/10.1038/ni1202-1129>
- Rettew, J. A., Huet-Hudson, Y. M., & Marriott, I. (2008a). Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biology of Reproduction*, 78(3), 432–437. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063545>
- Rettew, J. A., Huet-Hudson, Y. M., & Marriott, I. (2008b). Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biology of Reproduction*, 78(3), 432–437. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063545>
- Rettew, J. A., Huet, Y. M., & Marriott, I. (2009). Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology*, 150(8), 3877–3884. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0098>
- Rich AR, & Lewis MR. (1932). The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 50, 115–131.
- Rivera, A., Siracusa, M. C., Yap, G. S., & Gause, W. C. (2016). Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. In *Nature Immunology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 356–363). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.3375>
- Robert, R., & Spitzer, J. A. (1997). Effects of female hormones (17 $\beta$ -estradiol and progesterone) on nitric oxide production by alveolar macrophages in rats. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 1(6), 453–462. <https://doi.org/10.1006/niox.1997.0157>
- Roberts, A. W., Lee, B. L., Deguine, J., John, S., Shlomchik, M. J., & Barton, G. M. (2017). Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. *Immunity*, 47(5), 913–927.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.006>
- Rodrigues, M. R., Rodriguez, D., Russo, M., & Campa, A. (2002). Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(4), 869–873. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6724>
- Rose-John, S., & Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors:

- Generation and biological function. In *Biochemical Journal* (Vol. 300, Issue 2, pp. 281–290). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/bj3000281>
- Routley, C. E., & Ashcroft, G. S. (2009). Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 17(1), 42–50. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00440.x>
- Ruh, M. F., Bi, Y., D'Alonzo, R., & Bellone, C. J. (1998). Effect of estrogens on IL-1 $\beta$  promoter activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 66(4), 203–210. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(98\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(98)00042-9)
- Saal, F. vom, Finch, C., & Nelson, J. (1994). Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. In: Knobil E, Neill JD, eds. *Undefined*.
- Sansores, R. H., & Ramírez-Venegas, A. (2016). COPD in women: Susceptibility or vulnerability. In *European Respiratory Journal* (Vol. 47, Issue 1, pp. 19–22). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/13993003.01781-2015>
- Santanam, N., Shern-Brewer, R., McClatchey, R., Castellano, P. Z., Murphy, A. A., Voelkel, S., & Parthasarathy, S. (1998). Estradiol as an antioxidant: Incompatible with its physiological concentrations and function. *Journal of Lipid Research*, 39(11), 2111–2118. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)32465-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)32465-2)
- Santoro, N., Brown, J. R., Adel, T., & Skurnick, J. H. (1996). Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(4), 1495–1501. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.4.8636357>
- Sayed, N., Huang, Y., Nguyen, K., Krejciova-Rajaniemi, Z., Grawe, A. P., Gao, T., Tibshirani, R., Hastie, T., Alpert, A., Cui, L., Kuznetsova, T., Rosenberg-Hasson, Y., Ostan, R., Monti, D., Lehallier, B., Shen-Orr, S. S., Maecker, H. T., Dekker, C. L., Wyss-Coray, T., ... Furman, D. (2021). An inflammatory aging clock (iAge) based on deep learning tracks multimorbidity, immunosenescence, frailty and cardiovascular aging. *Nature Aging 2021* 1:7, 1(7), 598–615. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00082-y>
- Schaefer, L. (2014). Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 289, Issue 51, pp. 35237–35245). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.619304>
- Schaier, M., Vorwalder, S., Sommerer, C., Dikow, R., Hug, F., Gross, M. L., Waldherr, R., & Zeier, M. (2009). Role of FTY720 on M1 and M2 macrophages, lymphocytes, and chemokines in 5/6 nephrectomized rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 297(3), 769–780. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90530.2008>
- Scheidt-Nave, C., Bismar, H., Leidig-Bruckner, G., Woitge, H., Seibel, M. J., Ziegler, R., & Pfeilschifter, J. (2001). Serum Interleukin 6 Is a Major Predictor of Bone Loss in Women Specific to the First Decade Past Menopause\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(5), 2032–2042. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.5.7445>
- Schmiedl, A., Krainski, J., Schwichtenhövel, F., Schade, J., Klemann, C., Raber, K. A., Zscheppang, K., Beekmann, T., Acevedo, C., Glaab, T., Wedekind, D., Pabst, R., Von Hörsten, S., &

- Stephan, M. (2010). Reduced airway inflammation in CD26/DPP4-deficient F344 rats is associated with altered recruitment patterns of regulatory T cells and expression of pulmonary surfactant proteins. *Clinical and Experimental Allergy*, 40(12), 1794–1808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03547.x>
- Scotland, R. S., Stables, M. J., Madalli, S., Watson, P., & Gilroy, D. W. (2011). Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. *Blood*, 118(22), 5918–5927. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340281>
- Scrivo, R., Vasile, M., Bartosiewicz, I., & Valesini, G. (2011). Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 10, Issue 7, pp. 369–374). *Autoimmun Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.12.006>
- Sebastián, C., Herrero, C., Serra, M., Lloberas, J., Blasco, M. A., & Celada, A. (2009). Telomere Shortening and Oxidative Stress in Aged Macrophages Results in Impaired STAT5a Phosphorylation. *The Journal of Immunology*, 183(4), 2356–2364. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901131>
- Seghaye, M. C., Qing, M., & Von Bernuth, G. (2001). Systemic inflammatory response to cardiac surgery: Does female sex really protect? *Critical Care*, 5(6), 280–282. <https://doi.org/10.1186/cc1047>
- Shaikh, A. A. (1971). Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, 5(3), 297–307. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/5.3.297>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 233, Issue 9, pp. 6425–6440). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Shaw, A. C., Goldstein, D. R., & Montgomery, R. R. (2013). Age-dependent dysregulation of innate immunity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 12, pp. 875–887). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3547>
- Shaw, A. C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A., & Lord, J. M. (2010). Aging of the innate immune system. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 22, Issue 4, pp. 507–513). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.05.003>
- Shepherd, R., Cheung, A. S., Pang, K., Saffery, R., & Novakovic, B. (2021). Sexual Dimorphism in Innate Immunity: The Role of Sex Hormones and Epigenetics. *Frontiers in Immunology*, 0, 3559. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.604000>
- Shivers, K. Y., Amador, N., Abrams, L., Hunter, D., Jenab, S., & Quiñones-Jenab, V. (2015). Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Cytokine*, 72(2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.007>
- Shu-Kuang Hu, Mitcho, Y. L., & Rath, N. C. (1988a). Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *International Journal of Immunopharmacology*, 10(3), 247–252. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(88\)90055-0](https://doi.org/10.1016/0192-0561(88)90055-0)

- Shu-Kuang Hu, Mitcho, Y. L., & Rath, N. C. (1988b). Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *International Journal of Immunopharmacology*, 10(3), 247–252. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(88\)90055-0](https://doi.org/10.1016/0192-0561(88)90055-0)
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 122, Issue 3, pp. 787–795). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
- Smith, J. A., Das, A., Butler, J. T., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2011). Estrogen or estrogen receptor agonist inhibits lipopolysaccharide induced microglial activation and death. *Neurochemical Research*, 36(9), 1587–1593. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0336-7>
- Sone, K., Yamamoto-Sawamura, T., Kuwahara, S., Nishijima, K., Ohno, T., Aoyama, H., & Tanaka, S. (2007). Changes of estrous cycles with aging in female F344/N rats. *Experimental Animals*, 56(2), 139–148. <https://doi.org/10.1538/expanim.56.139>
- Sonoki, T., Nagasaki, A., Gotoh, T., Takiguchi, M., Takeya, M., Matsuzaki, H., & Mori, M. (1997). Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3689–3693. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3689>
- Sorachi, K. ichi, Kumagai, S., Sugita, M., Yodoi, J., & Imura, H. (1993). Enhancing effect of 17 $\beta$ -estradiol on human NK cell activity. *Immunology Letters*, 36(1), 31–35. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(93\)90065-A](https://doi.org/10.1016/0165-2478(93)90065-A)
- Soucy, G., Boivin, G., Labrie, F., & Rivest, S. (2005). Estradiol Is Required for a Proper Immune Response to Bacterial and Viral Pathogens in the Female Brain. *The Journal of Immunology*, 174(10), 6391–6398. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6391>
- Spitzer, J. A. (1999). Gender differences in some host defense mechanisms. *Lupus*, 8(5), 380–383. <https://doi.org/10.1177/096120339900800510>
- Stanojević, S., Ćuruvija, I., Blagojević, V., Petrović, R., Vujić, V., & Dimitrijević, M. (2016). Strain-dependent response to stimulation in middle-aged rat macrophages: A quest after a useful indicator of healthy aging. *Experimental Gerontology*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.10.005>
- Stanojević, S., Kovačević-Jovanović, V., Dimitrijević, M., Vujić, V., Ćuruvija, I., Blagojević, V., & Lepasavić, G. (2015). Unopposed Estrogen Supplementation/Progesterone Deficiency in Post-Reproductive Age Affects the Secretory Profile of Resident Macrophages in a Tissue-Specific Manner in the Rat. *American Journal of Reproductive Immunology*, 74(5). <https://doi.org/10.1111/aji.12424>
- Stanojević, Stanislava, Kovačević-Jovanović, V., Dimitrijević, M., Vujić, V., Ćuruvija, I., Blagojević, V., & Lepasavić, G. (2015). Unopposed Estrogen Supplementation/Progesterone Deficiency in Post-Reproductive Age Affects the Secretory Profile of Resident Macrophages in a Tissue-Specific Manner in the Rat. *American Journal of Reproductive Immunology*, 74(5), 445–456. <https://doi.org/10.1111/aji.12424>
- Stanojević, Stanislava, Kuštrimović, N., Mitić, K., Vujić, V., Aleksić, I., & Dimitrijević, M. (2013).

- Peritoneal mast cell degranulation differently affected thioglycollate-induced macrophage phenotype and activity in Dark Agouti and Albino Oxford rats. *Life Sciences*, 93(16), 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.021>
- Stout, R. D., & Suttles, J. (2005). Immunosenescence and macrophage functional plasticity: Dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. In *Immunological Reviews* (Vol. 205, pp. 60–71). <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00260.x>
- Stute, P., Ceausu, I., Depypere, H., Lambrinouadaki, I., Mueck, A., Pérez-López, F. R., van der Schouw, Y. T., Senturk, L. M., Simoncini, T., Stevenson, J. C., & Rees, M. (2016). A model of care for healthy menopause and ageing: EMAS position statement. *Maturitas*, 92, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.06.018>
- Suchy, D., Łabuzek, K., Bułdak, Ł., Szkudłapski, D., & Okopień, B. (2014). Comparison of chosen activation markers of human monocytes/macrophages isolated from the peripheral blood of young and elderly volunteers. *Pharmacological Reports*, 66(5), 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.04.008>
- Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., & Akira, S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10(1), 39–49. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80005-9)
- Tieri, P., Grignolio, A., Zaikin, A., Mishto, M., Remondini, D., Castellani, G. C., & Franceschi, C. (2010). Network, degeneracy and bow tie integrating paradigms and architectures to grasp the complexity of the immune system. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-7-32>
- Toda, Y., Tsukada, J., Misago, M., Kominato, Y., Auron, P. E., & Tanaka, Y. (2002). Autocrine Induction of the Human Pro-IL-1 $\beta$  Gene Promoter by IL-1 $\beta$  in Monocytes. *The Journal of Immunology*, 168(4), 1984–1991. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1984>
- Tukiainen, T., Villani, A. C., Yen, A., Rivas, M. A., Marshall, J. L., Satija, R., Aguirre, M., Gauthier, L., Fleharty, M., Kirby, A., Cummings, B. B., Castel, S. E., Karczewski, K. J., Aguet, F., Byrnes, A., Gelfand, E. T., Getz, G., Hadley, K., Handsaker, R. E., ... MacArthur, D. G. (2017). Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature*, 550(7675), 244–248. <https://doi.org/10.1038/nature24265>
- Turk, Z. (2002). Glycation and Age in Diabetes and Complications. *EJIFCC*, 13(5), 210–214. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30349440>
- Ueda, K., & Karas, R. H. (2013). Emerging evidence of the importance of rapid, non-nuclear estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. *Steroids*, 78(6), 589–596. *Steroids*, 78(6), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.12.006>
- Uhrlaub, J. L., Pulko, V., DeFilippis, V. R., Broeckel, R., Streblow, D. N., Coleman, G. D., Park, B. S., Lindo, J. F., Vickers, I., Anzinger, J. J., & Nikolich-Žugich, J. (2016). Dysregulated TGF- $\beta$  Production Underlies the Age-Related Vulnerability to Chikungunya Virus. *PLoS Pathogens*, 12(10), e1005891. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005891>

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *39*(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Van de Loo, F. A. J., Bennink, M. B., Arntz, O. J., Smeets, R. L., Lubberts, E., Joosten, L. A. B., Van Lent, P. L. E. M., Coenen-de Roo, C. J. J., Cuzzocrea, S., Segal, B. H., Holland, S. M., & Van den Berg, W. B. (2003). Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. *American Journal of Pathology*, *163*(4), 1525–1537. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63509-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63509-2)
- Van Den Heuvel, M. M., Tensen, C. P., Van As, J. H., Van Den Berg, T. K., Fluitsma, D. M., Dijkstra, C. D., Döpp, E. A., Droste, A., Van Gaalen, F. A., Sorg, C., Högger, P., & Beelen, R. H. J. (1999). Regulation of CD163 on human macrophages: Cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *Journal of Leukocyte Biology*, *66*(5), 858–866. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.5.858>
- Van Kempen, T. A., Milner, T. A., & Waters, E. M. (2011). Accelerated ovarian failure: A novel, chemically induced animal model of menopause. In *Brain Research* (Vol. 1379, pp. 176–187). Brain Res. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.064>
- Vannella, K. M., & Wynn, T. A. (2017). Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annual Review of Physiology*, *79*(1), 593–617. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034356>
- Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology*, *33*(1), 643–675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C. R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M. P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D., & Caruso, C. (2007). Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, *128*(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.015>
- Vegeto, E., Bonincontro, C., Pollio, G., Sala, A., Viappiani, S., Nardi, F., Brusadelli, A., Viviani, B., Ciana, P., & Maggi, A. (2001). Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *Journal of Neuroscience*, *21*(6), 1809–1818. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-06-01809.2001>
- Vegeto, E., Pollio, G., Pellicciari, C., & Maggi, A. (1999). Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *The FASEB Journal*, *13*(8), 793–803. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.8.793>
- Vénéreau, E., Ceriotti, C., & Bianchi, M. E. (2015). DAMPs from cell death to new life. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00422>
- Ventura-Clapier, R., Piquereau, J., Veksler, V., & Garnier, A. (2019). Estrogens, Estrogen Receptors Effects on Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondria. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10, p. 557). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00557>



- Vermeulen, A., Kaufman, J. M., Goemaere, S., & Van Pottelberg, I. (2002). Estradiol in elderly men. *Aging Male*, 5(2), 98–102. <https://doi.org/10.1080/tam.5.2.98.102>
- Verreck, F. A. W., de Boer, T., Langenberg, D. M. L., van der Zanden, L., & Ottenhoff, T. H. M. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- $\gamma$ - and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(2), 285–293. <https://doi.org/10.1189/jlb.0105015>
- Vida, C., Gonzalez, E., & Fuente, M. (2014). Increase of Oxidation and Inflammation in Nervous and Immune Systems with Aging and Anxiety. *Current Pharmaceutical Design*, 20(29), 4656–4678. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140130201734>
- Vidya, M. K., Kumar, V. G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., & Bhatta, R. (2018). Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. In *International Reviews of Immunology* (Vol. 37, Issue 1, pp. 20–36). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>
- Vignais, P. V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: Structural aspects and activation mechanism. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 59, Issue 9, pp. 1428–1459). Cell Mol Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8520-9>
- Villa, A., Rizzi, N., Vegeto, E., Ciana, P., & Maggi, A. (2015). Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep15224>
- Vockley, J. G., Jenkinson, C. P., Shukla, H., Kern, R. M., Grody, W. W., & Cederbaum, S. D. (1996). Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics*, 38(2), 118–123. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0606>
- vom Steeg, L. G., & Klein, S. L. (2016). SeXX Matters in Infectious Disease Pathogenesis. In *PLoS Pathogens* (Vol. 12, Issue 2). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005374>
- Wang, C., Yu, X., Cao, Q., Wang, Y., Zheng, G., Tan, T. K., Zhao, H., Zhao, Y., Wang, Y., & Harris, D. C. H. (2013). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-6>
- Wang, D., Li, Q., Yang, Y., Hao, S., Han, X., Song, J., Yin, Y., Li, X., Tanaka, M., & Qiu, C. H. (2017). Macrophage Subset Expressing CD169 in Peritoneal Cavity-Regulated Mucosal Inflammation Together with Lower Levels of CCL22. *Inflammation*, 40(4), 1191–1203. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0562-0>
- Wang, H. H., Liu, M., Clegg, D. J., Portincasa, P., & Wang, D. Q. H. (2009). New insights into the molecular mechanisms underlying effects of estrogen on cholesterol gallstone formation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1791, Issue 11, pp. 1037–1047). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.06.006>
- Wang, J., & Kubes, P. (2016). A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell*, 165(3), 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.009>
- Wang, Y., Szretter, K. J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A. D., Diamond, M.

- S., & Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature Immunology*, 13(8), 753–760. <https://doi.org/10.1038/ni.2360>
- Warren, L. (1998). John Rowe and Robert Kahn. 1997. Successful ageing. *The Gerontologist*, 37 (4), 433–440. *Ageing and Society*, 18(3), 371–378. <https://doi.org/10.1017/s0144686x98236932>
- Wayne, S. J., Rhyne, R. L., Garry, P. J., & Goodwin, J. S. (1990). Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *Journals of Gerontology*, 45(2). <https://doi.org/10.1093/geronj/45.2.M45>
- Weinstein, Y., Ran, S., & Segal, S. (1984). Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 132(2), 656–661. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6228595>
- Westwood, F. R. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375–384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
- Whitacre, C. C. (2001). Sex differences in autoimmune disease. In *Nature Immunology* (Vol. 2, Issue 9, pp. 777–780). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni0901-777>
- Willment, J. A., Lin, H.-H., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y. C., Gordon, S., & Brown, G. D. (2003). Dectin-1 Expression and Function Are Enhanced on Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4569–4573. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4569>
- Wilson, C. J., Finch, C. E., & Cohen, H. J. (2002). Cytokines and cognition - The case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(12), 2041–2056. <https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.2002.50619.x>
- Wilson, M. E., Rosewell, K. L., Kashon, M. L., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., & Wise, P. M. (2002). Age differentially influences estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) gene expression in specific regions of the rat brain. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(6), 593–601. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00406-7](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00406-7)
- Winterbourn, C. C., Vissers, M. C. M., & Kettle, A. J. (2000). Myeloperoxidase. In *Current Opinion in Hematology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 53–58). Curr Opin Hematol. <https://doi.org/10.1097/00062752-200001000-00010>
- Wrenger, S. (2006). Attractin, a dipeptidyl peptidase IV/CD26-like enzyme, is expressed on human peripheral blood monocytes and potentially influences monocyte function. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(3), 621–629. <https://doi.org/10.1189/jlb.1105678>
- Wu, D., Mura, C., Beharka, A. A., Han, S. N., Paulson, K. E., Hwang, D., & Meydani, S. N. (1998). Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 275(3 44-3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.3.c661>
- Wythe, S. E., Nicolaidou, V., & Horwood, N. J. (2014). Cells of the immune system orchestrate

- changes in bone cell function. In *Calcified Tissue International* (Vol. 94, Issue 1, pp. 98–111). Springer Science and Business Media, LLC. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9764-0>
- Xia, S., Zhang, X., Zheng, S., Khanabdali, R., Kalionis, B., Wu, J., Wan, W., & Tai, X. (2016). An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/8426874>
- Xie, Jianling, Méndez, J. D., Méndez-Valenzuela, V., & Aguilar-Hernández, M. M. (2013). Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). In *Cellular Signalling* (Vol. 25, Issue 11, pp. 2185–2197). Cell Signal. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.06.013>
- Xie, Juping, & Cao, Y. (2019). Expression of TGF- $\beta$ 1 and miR-99a in serum of patients with early spontaneous abortion and correlation with hormone levels during pregnancy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(6), 4593–4597. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7477>
- Xu, W., Zhao, X., Daha, M. R., & van Kooten, C. (2013). Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Molecular Immunology*, 53(3), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.005>
- Yalin, S., Comelekoglu, U., Bagis, S., Sahin, N. O., Ogenler, O., & Hatungil, R. (2006). Acute effect of single-dose cadmium treatment on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in ovariectomized rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(1), 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.06.006>
- Yeramian, A., Martin, L., Serrat, N., Arpa, L., Soler, C., Bertran, J., McLeod, C., Palacín, M., Modolell, M., Lloberas, J., & Celada, A. (2006). Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages. *The Journal of Immunology*, 176(10), 5918–5924. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.10.5918>
- Yohei Ikezumi, T. S. S. H. S. O. D. J. N.-P. H. K. F. S. M. U. (2005, December). *sialoadhesin (CD169) expressing a macrophage subset in human proliferative glomerulonephritis | Nephrology Dialysis Transplantation | Oxford Academic*. <https://academic.oup.com/ndt/article/20/12/2704/1924461>
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Williams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Yosef, N., Vadakkan, T. J., Park, J. H., Poché, R. A., Thomas, J. L., & Dickinson, M. E. (2018). The phenotypic and functional properties of mouse yolk-sac-derived embryonic macrophages. *Developmental Biology*, 442(1), 138–154. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.07.009>
- Zein, J. G., & Erzurum, S. C. (2015). Asthma is Different in Women. In *Current Allergy and Asthma Reports* (Vol. 15, Issue 6, p. 28). Current Medicine Group LLC 1.

---

<https://doi.org/10.1007/s11882-015-0528-y>

Zhang, X., & Mosser, D. M. (2008). Macrophage activation by endogenous danger signals. In *Journal of Pathology* (Vol. 214, Issue 2, pp. 161–178). J Pathol.  
<https://doi.org/10.1002/path.2284>

Zhao, H., Tian, Z., Hao, J., & Chen, B. (2005). Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-6>

## 8. BIOGRAFIJA

Ivana Ćuruvija (rođena Jakovljević), je rođena 26.10.1986. u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu, a školske 2005/2006. godine upisala je diplomske osnovne studije - studijski profil diplomirani farmaceut, na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2011. god. sa prosečnom ocenom 8,48 i ocenom na diplomskom ispitu 10. Državni ispit je položila 2012. godine, nakon čega je bila zaposlena kao diplomirani farmaceut u apoteci.

Školske 2013/2014. godine Ivana Ćuruvija je upisala doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, iz oblasti Farmakologije/Imunofarmakologije. Od decembra 2013. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik, a potom i kao istraživač saradnik u Odseku za naučnoistraživački rad Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“.

U periodu 2013-2019. godine učestvovala je u realizaciji projekta „Plastičnost imunskog sistema tokom starenja: imunomodulatorni potencijal estrogena (O1175050, MPNTR RS), oblast Medicina, pod rukovodstvom dr Gordane Laposavić, redovnog profesora na Katedri za patobiologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Nakon toga, u periodu 2020-2021. godine, istraživački rad Ivane Ćuruvije je finansiran na osnovu Ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO između Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

U dosadašnjem naučnoistraživačkom radu Ivana Ćuruvija je kao autor ili koautor objavila 9 radova, i to 5 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21) i 4 rada u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorije M22). Na skupovima međunarodnog značaja učestvovala je sa 6 saopštenja, a na skupu nacionalnog značaja sa 4 saopštenja.

## 9. IZJAVE

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ивана Ђурувија

Број индекса 22/13

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Полне и сојне специфичности промена цитокинског профила макрофага

женки пацова у репродуктивном старењу

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

Потпис аутора

У Београду, 15.11.2021.



\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ивана Ћурувија

Број индекса 22/13

Студијски програм Фармакологија - Имунофармакологија

Наслов рада Полне и сојне специфичности промена цитокинског профила макрофага женки пацова у репродуктивном старењу

Ментор др сц. Невена Арсеновић Ранин и др сц. Весна Вујић

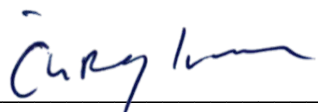
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора**

У Београду, 15.11.2021.





## Изјава о коришћењу

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

Полне и сојне специфичности промена цитокинског профила макрофага  
женки пацова у репродуктивном старењу

---

која је моје ауторско дело.

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

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

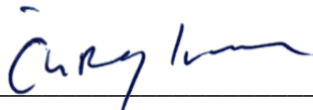
1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 15.11.2021.

  
\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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