



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Драгана Б. Арсенијевић

**АНТИИНФЛАМАЦИЈСКА АКТИВНОСТ
СМЕШЕ ДИПРОПИЛ ПОЛИСУЛФИДА У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ АКУТНОГ
ХЕПАТИТИСА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Dragana B. Arsenijević

**ANTIINFLAMACIJSKA AKTIVNOST SMEŠE
DIPROPIL POLISULFIDA U
EKSPERIMENTALNOM MODELU AKUTNOG
HEPATITISA**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCIES

Dragana B. Arsenijević

**ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF DIPROPYL
POLYSULFIDES IN EXPERIMENTAL MODEL OF
ACUTE HEPATITIS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021.

Аутор
Име и презиме: Драгана Арсенијевић
Датум и место рођења: 23.05.1990. Приштина
Садашње запослење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Антиинфламацијска активност смеше дипропил полисулфида у експерименталном моделу акутног хепатитиса
Број страница: 69
Број слика: слика 5, схема 6, графикона 17, табела 1
Број библиографских података: 196
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): медицина, изборно подручје: имунологија, инфекција, инфламација
Ментор: dr sci. med. Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 22.01.2019.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-15/61 15.03.2019.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. проф. др Вера Дондур, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физичка хемија, председник 2. проф. др Драган Манојловић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Аналитичка хемија, члан 3. проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације: 1. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 2. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 3. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета
Датум одбране дисертације:

Author
Name and surname: Dragana Arsenijević
Date and place of birth: 23.05.1990. Priština
Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Antiinflammatory Activity of Dipropyl Polysulfides in Experimental Model of Acute Hepatitis
No. of pages: 69
No. of images: 5 pictures, 6 schemes, 17 figures, 1 tables
No. of bibliographic data: 196
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): medicine: immunology, infection, inflammation
Mentor: dr sci. med. Marija Milovanović, associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 22.01.2019.
Decision number and date od acceptance of the doctoral: IV-03-15/61 15.03.2019.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. prof. dr Vera Dondur, Full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, president 2. prof. dr Dragan Manojlović, Full professor of Faculty of Chemistry, University of Belgrade, member 3. prof. dr Vladislav Volarević, professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 2. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 3. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Увод: Активне компоненте биљака рода *Allium*, којем припадају бели лук, црни лук и празилук, једним именом се називају органосумпорна једињења (ОСЈ). Антиинфламацијски, антиоксидативни и имуномодулацијски ефекти ових биљака се приписују ОСЈ, при чему је уочено да на јачину њихове биолошке активности утиче броја атома сумпора присутан у структури ових једињења. Алицин, органосумпорно једињење белог лука, делује хепатопротективно током хепатитиса изазваног конканавалином А (Con A). Главну улогу у развоју оштећења јетре мишева у овом хепатитису играју активирани Т лимфоцити који продукују инфламацијске цитокине, као и Купферове ћелије/макрофаги који су такође извор цитокина али и реактивних кисеоникових једињења (енгл. *Reactive oxygen species*, ROS).

Циљ ове студије је синтетисати смешу дипропил полисулфида (DPPS) и испитивање антиинфламацијске и хепатопротективне улоге ове смеше у моделу акутног хепатитиса изазваног конканавалином А.

Метод: Смеша DPPS давана је мишевима, соја C57BL/6, орално шест сати пре интравенске инјекције Con A. Инфламација јетре, некроза и апоптоза хепатоцита процењени су хистолошком анализом. Цитокини у ткивима јетре одређени су ELISA методом, експресија адхезивних молекула и ензима RT PCR (енгл. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT PCR) методом, док су мононуклеарне ћелије јетре анализирани проточном цитометријом.

Резултати: Превентивна примена смеше DPPS значајно је ублажила инфламацију и оштећење јетре на шта указују биохемијски и патохистолошки параметри. Код мишева који су превентивно примили смешу DPPS ниво информационе РНК адхезионих молекула и комплекса NADPH оксидазе значајно је смањен, док је ниво експресије различитих субјединица антиоксидантног SOD (енгл. *Superoxide dismutase*, SOD) ензима повећан. Смањена је концентрација инфламацијских, а повећана концентрација антиинфламацијског цитокина, IL-10, као и проценат регулаторних Т лимфоцита у јетрама мишева третираних DPPS-ом пре интравенске инјекције Con A.

Закључак: Смеша DPPS остварује хепатопротективни ефекат у моделу хепатитиса изазваног Con A, на шта нам указује смањење инфламације у јетри и измењен баланс Th17/Treg лимфоцита у корист регулаторних Т лимфоцита. На основу ових резултата закључујемо да смеша DPPS има потенцијални протективни и терапијски ефекат у инфламацијским болестима јетре.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: дипропил полисулфиди, Con A хепатитис, хепатопротективни ефекти, антиинфламацијска активност, бели лук, органосумпорна једињења

ABSTRACT

Background: The main biologically active components of plants belonging to the genus *Allium*, such as garlic and onion, are organosulfur compounds. They are responsible for their biological activities, including anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory. The activity of organosulfur compounds depends on the number of sulfur atoms in their structure. Hepatoprotective effect of garlic organosulfur compound, allicin, has been previously shown in Con A induced hepatitis in mice. Con A induced hepatitis is known to be mediated by activated T cells, inflammatory cytokines, and reactive oxygen species (ROS) produced in Kupffer cells/macrophages.

The aim of this study was to synthesize the mixture of dipropyl polysulfides (DPPS) and to test their biological activity in acute hepatitis.

Methods: C57BL/6 mice were administered orally with DPPS 6 hours before intravenous injection of Con A. Liver inflammation, necrosis and hepatocytes apoptosis were determined by histological analyses. Cytokines in liver tissue were determined by ELISA, expression of adhesive molecules and enzymes by RT PCR, while liver mononuclear cells were analyzed by flow cytometry.

Results: DPPS pretreatment significantly attenuated liver inflammation and injury, as evidenced by biochemical and histopathological observations. In DPPS pretreated mice, messenger RNA levels of adhesion molecules and NADPH oxidase complex were significantly reduced, while the expression of SOD enzymes was enhanced. DPPS pretreatment decreased protein level of inflammatory cytokines, enhanced expression of antiinflammatory interleukin-10 and increased percentage of T regulatory cells in the livers of Con A mice.

Conclusion: Our data show hepatoprotective effects of DPPS in Con A induced hepatitis, these effects were associated by attenuation of inflammation and affection of Th17/Treg balance in favor of T regulatory cells and implicate potential therapeutic usage of DPPS mixture in inflammatory liver diseases.

KEY WORDS: dipropyl polysulfides, Con A hepatitis, antiinflammatory activity, hepatoprotective effects, garlic, organosulfur compounds

САДРЖАЈ

Садржај

1. УВОД	1
1.1. Експериментални модел акутног, инфламацијског оштећења јетре	2
1.1.1. Улога Купферових ћелија у развоју Соп А хепатитиса	5
1.1.2. Улога Т лимфоцита у развоју Соп А хепатитиса	6
1.1.3. Улога НКТ ћелија у развоју Соп А хепатитиса	7
1.1.4. Цитокини и развој Соп А хепатитиса	8
1.2. Органосумпорна једињења	15
1.2.1. Познати ефекти органосумпорних једињења на функцију јетре	16
1.2.2. Антиоксидативни ефекти органосумпорних једињења	17
2. ЦИЉ РАДА	19
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	20
3.1. Синтеза смеше дипропил полисулфида (DPPS)	20
3.2. Аналитички поступак	20
3.3. Мишеви, индукција хепатитиса и третман смешом DPPS	21
3.3.1. Смеша DPPS	21
3.3.2. Експерименталне животиње.	21
3.4. Одређивање концентрације трансаминаза у серуму	22
3.5. Хистологија јетре и TUNEL бојење	22
3.6. Мерење цитокина	23
3.7. Изолација моноклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија	23
3.8. Екстракција РНК и <i>Real-Time</i> qRT-PCR	23
3.9. Статистичка анализа	25
4. РЕЗУЛТАТИ	26
4.1. Орална примена смеше дипропил полисулфида стимулише у јетри активацију и регулаторни фенотип ћелија које презентују антиген	26
4.2. Претретман смешом дипропил полисулфида остварује хепатопротективне ефекте у Соп А хепатитису	32
4.3. Смеша дипропил полисулфида делује антиинфламацијски у јетри мишева са Соп А хепатитисом	38
4.4. Смеша полисулфида повећава проценат регулаторних Т лимфоцита и смањује проценат ћелија које продукују IL-17 у јетри	42

5.1. Превентивна примена дипропил полисулфида смањује експресију адхезионих молекула у јетри мишева са Соп А хепатитисом	50
5.2. Превентивна примена дипропил полисулфида смањује концентрацију инфламацијских цитокина у јетри мишева са Соп А хепатитисом	51
5.3. Смеша дипропил полисулфида смањује експресију оксидативних, а повећава експресију антиоксидативних ензима у јетри мишева са Соп А хепатитисом	52
5.4. Смеша дипропил полисулфида повећава проценат регулаторних Т лимфоцита а смањује проценат Th17 ћелија у јетри мишева са Соп А хепатитисом.....	53
6. ЗАКЉУЧЦИ	56
7. ЛИТЕРАТУРА.....	57
8. Биографија	69

1. УВОД

Акутна инсуфицијенција јетре је клинички синдром који карактерише веома брза појава симптома акутног оштећења јетре удружених са коагулопатијом и енцефалопатијом, а који се развијају у току неколико дана или недеља код особа које претходно нису имале обољења јетре [1]. Ово стање је познато и као фулминантни хепатитис. Различити фактори могу да утичу на акутно оштећење хепатоцита и појаву фулминантног хепатитиса, али је у великом проценту оштећење јетре изазвано инфламацијским цитокинима, често у склопу аутоимунског или вирусног хепатитиса. Фулминантни хепатитис и даље представља један од највећих терапијских изазова у поређењу са осталим ургентним стањима, па је и належање нових терапијских могућности стално актуелно.

Хепатитис који развијају мишеви након интравенске апликације конканавалина А, Con A (енгл. *concanavalin A*) има доста сличности са фулминантним хепатитисом код људи па се користи као експериментални модел за проучавање акутног оштећења јетре које у основи има имунске механизме [2].

Предмет овог истраживања је испитавање потенцијалног хепатопротективног ефекта новосинтетисане смеше дипропил полисулфида у експерименталном моделу акутног инфламацијског оштећења јетре изазваног применом конканавалина А.

Зато су у уводном делу описани познати механизми настанка оштећења јетре након примене конканавалина А и познати биолошки ефекти органосумпорних једињења.

1.1. Експериментални модел акутног, инфламацијског оштећења јетре

Реч **лектин**, лат. *legere*, у преводу значи селектовати или изабрати [3]. Лектини представљају фамилију протеина која реверзибилно, високим афинитетом везује угљене хидрате [4].

Конканавалин А (енгл. *concanavalin A*, Con A) је лектин изолован из биљака рода *Canavalia*, најчешће из врсте *Canavalia ensiformis*. Првобитно га је изоловао из пасуља Sumner 1919 [5] а касније је показао да аглутинира еритроците [6] и таложи различите полисахариде [7]. Овај протеин је први лектин пречишћен у чистом, кристалном облику и самим тим први доступан комерцијално. Користи се у истраживањима биологије ћелија више од 50 година, као агониста рецептора за инсулин и као поликлонски активатор Т лимфоцита [8].

Con A има специфично везујуће место за угљене хидрате α -D-манозу, метил α -D-манопиранозу, α -D-глукозу и метил- α -D-глукозу, D-фруктозу, N-ацетил D-глукозамин и сличне моносахариде [9][10]. Моносахарид највеће компатибилности за везујуће место Con A је α -аномер D-манозе.

Tiegs и њене колеге су 1992. године описали експериментални модел акутног инфламацијског оштећења јетре мишева изазваног применом Con A [11]. Овај модел болести има одређене карактеристике болести јетре код људи у чијој основи су имунски механизми, као што је аутоимунски хепатитис [12].

Схема 1.

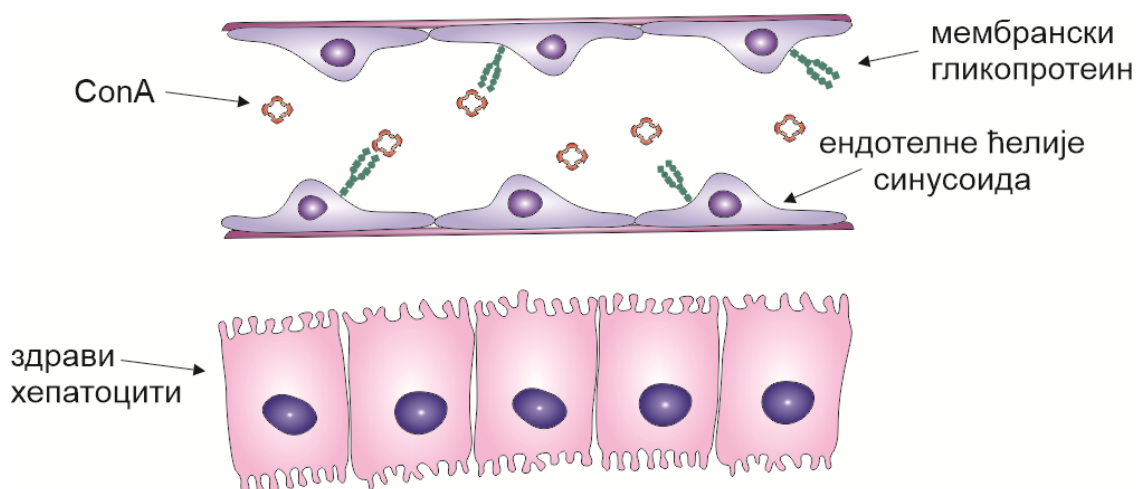


Схема 1. Селективно везивање Con A за SEC јетре

Интравенска инјекција Con A изазива цитокинску олују у јетри мишева са активацијом и пролиферацијом Т лимфоцита која не зависи од антигена. Ово резултује озбиљним

некротичким оштећењем хепатоцита, ослобађањем аланин и аспартат трансминаза из хепатоцита и порастом концентрације ових ензима у крви. Con A након интравенске апликације изазива оштећење јетре, без оштећења других органа.

Показано је да је за развој оштећења јетре конканавалином А неопходно слободно место за везивање угљених хидрата, јер коадминистрација Con A и α -D-манозида или метил α -D-манопиранозида мишевима, није изазвала оштећења јетре типично за раније показано оштећење јетре изазвано само лектином Con A. Примена других лектина (*Succinyl Con A* и *Vicia faba* лектини) који имају исто место везивања није изазвала оштећење, што је указало на то да везујуће место, као ни аглутинациона активност, није оно што одређује хепатотоксични потенцијал Con A [11].

Схема2.

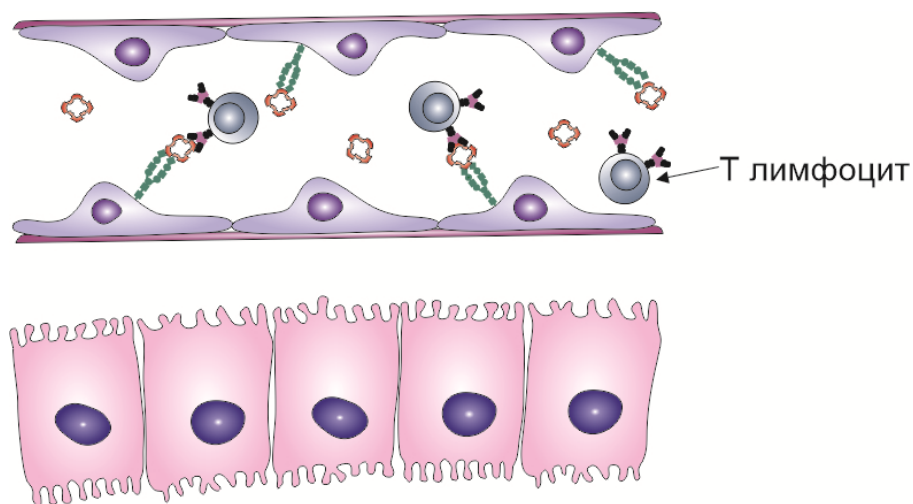


Схема 2. Con A неспецифично активира Т лимфоците

Након интравенске инјекције Con A се селективно акумулира у јетри, везујући се примарно за ендотелне ћелије синусоида (енгл. *Sinusoidal endothelial cells*, SEC), које облажу мале крвне судове јетре (Схема 1). Con A везан за SEC затим зауставља путујуће Т лимфоците и омогућава унакрсно повезивање њихових Т ћелијских рецептора (енгл. *T-cell receptor*, TCR) [13]. На тај начин делује као везујућа компонента која омогућава котрљање и активацију лимфоцита, који затим пролазе кроз ендотел у паренхим јетре чиме започиње процес инфламације (Схема 2). За активацију Т лимфоцита неопходни су и други сигнали [14], [15] које обезбеђују управо SEC јетре и Купферове ћелије. Важност аксесорске функције SEC потврђује и откриће да су „нок аут“ мишеви којима недостају гени за адхезионе молекуле заштићени од оштећења јетре изазваног интравенском апликацијом Con A, или је оштећење значајно мање. Показано је да се леукоцити везују за SEC јетре већ четири сата по интравенској апликацији Con A, а да је ендотел синусоида јетре оштећен 8 сати после примене Con A [11].

Схема 3.

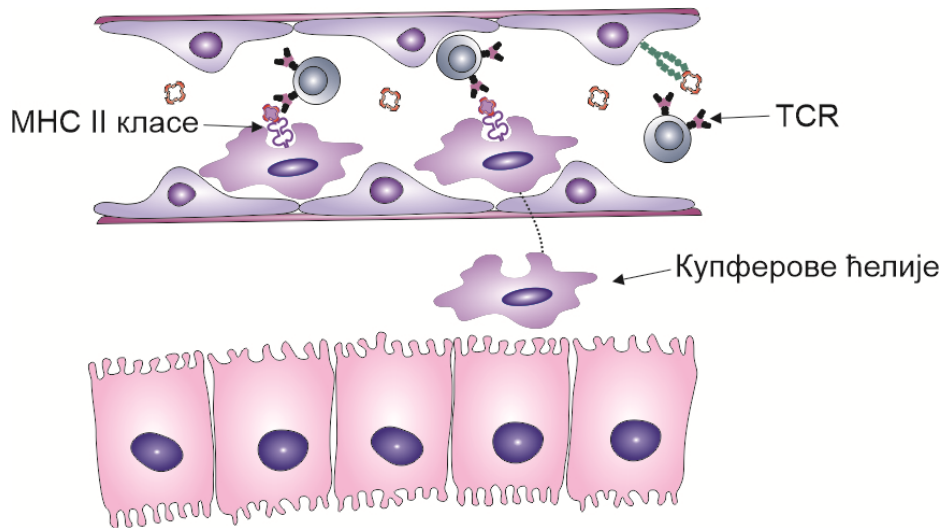


Схема 3. Con A везује и активира Купферове ћелије

Con A се везује и за MHC II молекуле Купферових ћелија које се налазе између ендотелних ћелија синусоида [16]–[18]. Тако везан за MHC II молекуле Купферових ћелија, Con A омогућава успостављање контакта Т лимфоцита и Купферових ћелија и активацију Т лимфоцита, без обзира на антигенску специфичност TCR-а (Схема 3). Активиране Купферове ћелије продукују велике количине проинфламацијских цитокина, пре свега TNF- α , који подстичу активацију и диференцијацију CD4+T лимфоцита у инфламацијске помагачке ћелије [19]. Активирани CD4+T лимфоцити продукују инфламацијске цитокине, TNF- α и INF- γ и играју кључну улогу у оштећењу баријерне функције SEC [14], [18] што онда омогућава додатни улазак поликлонски активираних CD4+ и CD8+ Т лимфоцита у субендотелни простор.

Схема 4.

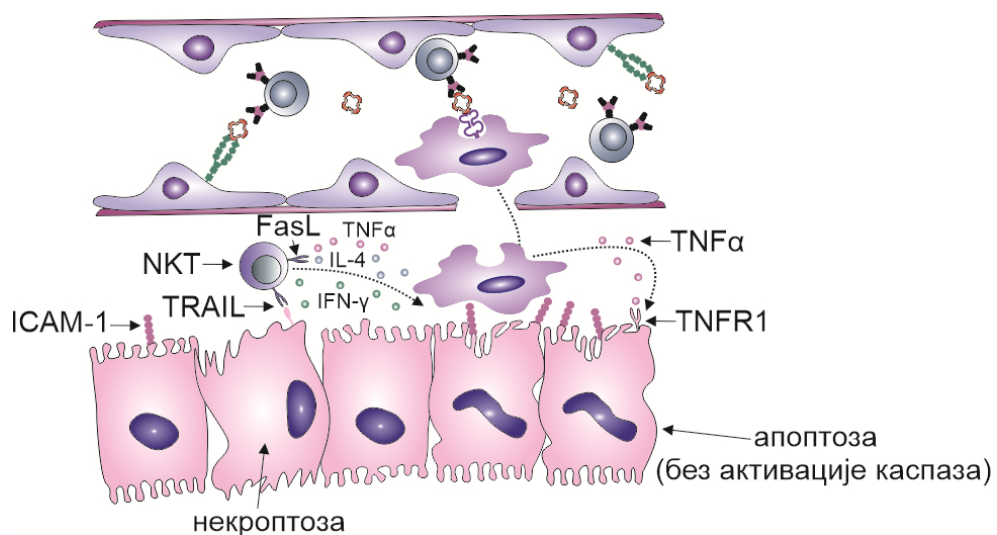


Схема 4. Различити механизми који учествују у оштећењу хепатоцита

Кључни догађај у индукцији оштећења јетре је сарадња НКТ ћелија (енгл. *Natural Killer T cell*, НКТ), Т лимфоцита и Купферових ћелија, а у самом оштећењу хепатоцита главну улогу играју активирани помагачки Т лимфоцити и НКТ ћелије које, или директним цитотоксичким ефектом, или индиректно продукцијом цитокина (TNF- α , INF- γ , IL-17, IL-4) оштећују хепатоците (Схема 4).

Схема 5.

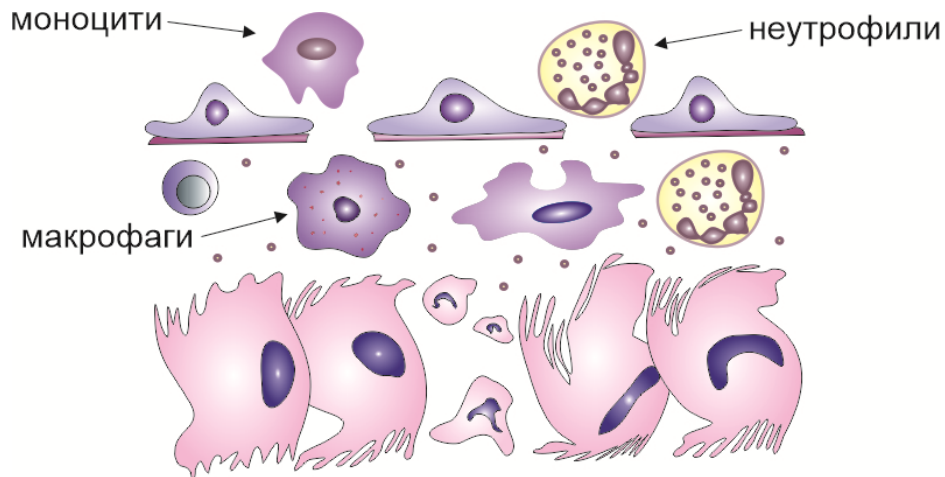


Схема 5. Оштећење хепатоцита услед продукције цитокина и инфилтрације јетре ћелијама имунског система

Код мишева се након интравенске инјекције Con A развија фулминантни хепатитис, већ 8 сати након апликације, без захватања иједног другог органа (Схема 5). Ову рану фазу хепатитиса карактерише озбиљно оштећење хепатоцита. Већ 5 сати након примене Con A у јетри мишева могу да се детектују бројна апоптотска телашца, кариорекса (фрагментација једра), који претходе скоку концентрације трансминаза у серуму [20]–[22]. Током првих 8 сати од примене Con A скоро да нема уочљивих знакова некротичке смрти хепатоцита, и у почетним догађајима током оштећења јетре изазваним Con A највероватније учествује механизам апоптозе [23]. Међутим, TNF- α , који веома рано по апликацији Con A продукују ћелије које су укључене у развој оштећења јетре, може да стимулацијом молекула TRAIL (енгл. *TNF-related apoptosis inducing ligand*, TRAIL) и RIP1 (енгл. *receptor-interacting protein 1*, RIP1) или RIP3 киназе активира некроптозу хепатоцита [24], [25], а некроптоза је увек праћена стимулацијом инфламацијског одговора [26].

1.1.1. Улога Купферових ћелија у развоју Con A хепатитиса

Резидентни макрофаги јетре, познати као Купферове ћелије, представљају прву линију одбране у синусоидама јетре, које су у директном контакту са свим врстама микроорганизама и осталим узроцима оштећења. Купферове ћелије фагоцитишу и разграђују егзогене продукте бактерија и оштећења, али су и важан извор различитих

медијатора инфламације [27]. Значај Купферових ћелија у експерименталном хепатитису изазваном конканавалином А доказује чињеница да елиминација Купферових ћелија штити јетре мишеве од оштећења које изазива примена Con A [19]. Међутим, показано је да деплеција Купферових ћелија само делимично смањује продукцију цитокина као што су TNF- α (али не утиче на концентрацију овог цитокина у плазми), INF- γ и IL-2, што указује на то да су осим Купферових ћелија извор ових цитокина и друге ћелије [19]. Осим тога, *Knolle* и сарадници су установили да поред Купферових ћелија и SEC секретују IL-1 и IL-6, цитокине који подстичу инфламацију [28], што указује да и SEC играју важну улогу у оштећењу јетре [16]. Могуће је да су важнији извор IL-6 Купферове ћелије, јер је деплеција Купферових ћелија удружена са значајним смањењем концентрације IL-6 у плазми мишева којима је интравенски апликован Con A [19]. Осим тога, продукција и ослобађање супероксида ROS (енгл. *Reactive Oxygen Species*) значајно је смањена након деплеције Купферових ћелија [29].

Con A везан за молекуле II класе MHC на Купферовим ћелијама и SEC, омогућава активацију CD4+T лимфоцита независно од антигена, што је праћено њиховом пролиферацијом и диференцијацијом у ефекторске помагачке лимфоците, Th1, Th2, Th17 и регулаторне Т лимфоците, Treg. Такође, Con A се везује и за CD1d молекул на Купферовим ћелијама што подстиче активацију NKT ћелија у јетри. NKT ћелије након активације продукују TNF- α , INF- γ и IL-4, цитокине који се увек детектују у јетри мишева којима је индукован Con A хепатитис и који играју кључну улогу у развоју хепатоцелуларне апоптозе и некрозе [30].

1.1.2. Улога Т лимфоцита у развоју Con A хепатитиса

Иако је показано да је Con A парцијално токсичан за хепатоците *in vitro*, већина *in vivo* студија показује да су лимфоцити кључне ћелије у индукцији и прогресији оштећења јетре у моделу хепатитиса изазваним интравенском применом Con A. Бројне студије су доказале да су присуство и функционални интегритет Т лимфоцита неопходни за развој оштећења јетре, јер имунодефицијентни мишеви, атимични мишеви, мишеви третирани имunosупресивним лековима (као што су циклоспорин, FK506 или кортикостероиди) не развијају хепатитис након примене Con A [11]. Прецизније, за настанак оштећења јетре неопходни су CD4+T лимфоцити, а не CD8+T лимфоцити, јер је показано да администрација моноклонских антитела специфичних за молекулу CD4 скоро потпуно превенира оштећење јетре изазвано интравенском применом Con A, док примена моноклонских антитела специфичних за гликопротеин CD8 не пружа овакву заштиту [31]. Ипак, деплеција и CD4+ и CD8+ Т лимфоцита пре примене Con A показује бољи протективни ефекат и праћена је још мањим оштећењем јетре у поређењу са ефектом деплеције само CD4+T лимфоцита [32]. На основу тога је закључено да је активација помагачких CD4+ Т лимфоцита конканавалином А неопходна за започињање имунског одговора у јетри и за развој оштећења паренхима јетре [11], као и да Con A на неки начин активира и цитотоксичке CD8⁺ Т лимфоците који доприносе оштећењу јетре, али да њихова улога у том процесу није пресудна.

Активирани NKT и Th1 лимфоцити продукују TNF- α и INF- γ , који поред директног ефекта на хепатоците, делују повратно и на Купферове ћелије, које стимулисане овим цитокинима, додатно продукују бројне хемокине и цитокине. Th2 лимфоцити и NKT ћелије продукују IL-4 и IL-5 који привлаче неутрофиле и еозинофиле у јетру. Th17

лимфоцити које се такође налазе у јетри након индукције Con A хепатитиса продукују IL-17 који остварује индиректни хепатотоксички ефекат и то стимулацијом дендритских ћелија и неутрофила. Treg индукују имуносупресију и толеранцију [33].

Један од механизма којим Т лимфоцити остварују директан цитотоксички ефекат на хепатоците је **Fas-FasL интеракција**. Fas (APO-1, CD95) је тип I интегралних мембранских протеина који припадају TNF фамилији рецептора и који стимулишу сигналне путеве који ћелију уводе у смрт. Fas је експримиран на активираним лимфоцитима и различитим ткивима, као што су јетра, плућа, црева, кожа. Fas лиганд (FasL) је тип II интегралних мембранских протеина који припадају TNF фамилији, који је експримиран на активираним Т лимфоцитима и NK ћелијама. Показано је да стимулација спленоцита комбинацијом Con A и IL-2, *in vitro*, подстиче експресију FasL на овим ћелијама [30]. Међутим, мишеви који нису имали функционалан Fas протеин развијали су Con A хепатитис [34]. Са друге стране, показано је да је експресија Fas и РНК значајно повећана у јетрама мишева који имају хепатитис, а значајно мања код мишева којима недостаје ген за INF- γ [35]. Иако има студија са супротстављеним резултатима о значају директног цитотоксичког деловања лимфоцита интеракцијом **FasL са Fas молекулом на хепатоцитима** [36][37], чињеница је да је хепатитис изазван применом Con A код FasL- или Fas- дефицијентних мишева блажи и да је концентрација аминотрансфераза мања код мишева који су примили и неутралишуће анти-FasL антитело [38]. Међутим, блокада TNF- α моноклонским антителима је ефикасније заштитила јетру од оштећења, у поређењу са применом блокирајућег анти-FasL антитела. Ватанабе и сарадници су показали да је можда најзначајнији цитотоксички ефекат Т лимфоцита у Con A хепатитису посредован **перфоринима и гранзимима**, јер је показано потпуно одсуство оштећења јетре код мишева који су третирани и инхибитором перфорина [36][39]. Такође, у истој студији је показан и значај адхезионих молекула за развој Con A хепатитиса, оштећење јетре може да се инхибира применом анти-ICAM-1 (енгл. *Intercellular Adhesion Molecule*) и -LFA-1 (енгл. *Lymphocyte function-associated antigen 1*) антитела, док примена анти-VCAM-1 (енгл. *Vascular cell adhesion protein 1*) и VLA-4 (енгл. *Very Late Antigen-4*) антитела нема заштитни ефекат [36].

1.1.3. Улога NKT ћелија у развоју Con A хепатитиса

NKT ћелије имају важне улоге у индуковању оштећења јетре након интравенске примене Con A, како сарађујући са конвенционалним Т лимфоцитима, макрофагима, тако и директно, кроз ефекторске механизме као што су Fas-FasL интеракција, систем перфорина и гранзима, као и деловањем цитокина INF- γ , IL-4, TNF- α [40]. Након активације, NKT ћелије ослобађају велике количине Th1 (INF- γ и TNF- α) и Th2 цитокина (IL-4, IL-5, и IL-13), али и антиинфламацијског цитокина IL-10 [130]. У јетри мишева, а нарочито у синусоидима доминирају инваријантне, I NKT ћелије, које чине више од 50% свих интрахепатичних лимфоцита миша [41]. I NKT ћелије експримирају семи-инваријантни α TCR, који се састоји од β ланца који кодирају различити гени, док α ланац кодира конзервирани ген, V α 14 [42]. I NKT ћелије могу да брзо по активацији продукују смешу цитокина који учествују у диференцијацији Т лимфоцита ка Th1 или Th2 ћелијама. Ослобађајући INF- γ , NKT ћелије индиректно индукују смрт хепатоцита форсирајући Th1 одговор и конвертујући CD8+Т лимфоците у цитотоксичке Т лимфоците. Након администрације Con A, на површини хепатичких NKT ћелија уочава

се повећавање експресија **FasL** што указује да и NKT ћелије делују директно цитотоксички на хепатоците интеракцијом **Fas-FasL** [43]. Новије студије показују значај TRAIL молекула, који експримирају ове ћелије, у механизму оштећења јетре [44] о чему ће бити речи касније у тексту.

Значај NKT ћелија у патогенези **Соп А** хепатитиса показан је у студијама у којима су коришћени мишеви са дефицијенцијом NKT ћелија. Мишеви којима недостаје ген који кодира CD1d молекул, маркер NKT ћелија, заштићени су скоро потпуно од оштећења које изазива **Соп А** [2], [44]. Адоптивним трансфером мононуклеарних ћелија јетре које садрже функционалне NKT ћелије, мишевима са делецијом гена за CD1d молекул, омогућено је да развију болест након примене **Соп А** [44]. Значај NKT ћелија за развој **Соп А** хепатитиса доказују и чињенице да нокаут мишеви којима недостаје ген за IL-4, или мишеви третирани анти-IL-4 моноклонским антителима, или V α 14 нокаут мишеви, не развијају хепатитис. Значај IL-4, који продукују V α 14 NKT ћелије активирани **Соп А**, у патогенези хепатитиса је у аутокрином деловању на V α 14 NKT ћелије, које стимулисане овим цитокином повећавају експресију гранзима B и FasL, молекула који учествују у директном цитотоксичком деловању NKT ћелија на хепатоците [2]. Показано је да V α 14 NKT ћелије, у одсуству конвенционалних Т лимфоцита, могу да остваре улогу ефекторских ћелија и омогуће развој хепатитиса [2]. Иако NKT ћелије играју једну од важнијих улога у патогенези хепатитиса, показано је да активирани NKT ћелије већ четири сата након администрације **Соп А** подлежу апоптози изазваној Fas-FasL интеракцијом [49].

1.1.4. Цитокини и развој **Соп А** хепатитиса

Цитокини који су значајно укључени у патогенезу **Соп А** хепатитиса су INF- γ , IL-2, IL-4, IL-6 и TNF- α , али кључну улогу ипак имају TNF- α и INF- γ . У току првог сата од инјектовања **Соп А**, максималну концентрацију у јетри достижу TNF- α , INF- γ и IL-4, што прати и продукција IL-2 и IL-12. У јетри није детектована промена концентрације IL-6 и IL-10. Концентрација IL-10 је изражено мања у јетри у поређењу са концентрацијом овог цитокина у плазми. Цитокини који први достижу максималну концентрацију у плазми, већ након првог сата од апликације **Соп А**, су TNF- α и IL-10, а након два сата максимум концентрације у плазми достиже и IL-4. Цитокини INF- γ , IL-2 и IL-6 достижу максималну концентрацију у плазми три сата након апликовања **Соп А**, а након њих IL-12 [30].

1.1.4.1. TNF- α

TNF- α игра важну улогу у оштећењу јетре након апликације **Соп А**, коју остварује стимулацијом већег броја сигналних путева, који још увек нису потпуно разјашњени. TNF- α у јетри након апликације **Соп А** продукују у највећем броју Купферове ћелије и у мањем проценту CD4+ Т лимфоцити, међутим Купферове ћелије не утичу на концентрацију TNF- α у серуму [19].

Фундаменталну улогу у развоју хепатитиса има акумулација инфламацијских ћелија у јетри. Осим што директно индукује смрт хепатоцита активацијом TNFR1, TNF- α стимулише експресију инфламацијских протеина, цитокина и адхезионих молекула, одговорних за инфилтрацију јетре инфламацијским ћелијама. Показано је да претретман мишева антителима који блокирају Е-, Р- селектине, ICAM1/2, VCAM-1 не може у потпуности да спречи развој Con A хепатитиса, али значајно инхибира акумулацију кључне популације ћелија, CD4+Т лимфоцита, у јетри [45]. И други инфламацијски цитокини (INF- γ , TNF- α , IL-1 и IL-6) повећавају експресију адхезионог молекула ICAM-1 на хепатоцитима *in vitro* чиме повећавају адхезију Т лимфоцита за хепатоците [46]. Значајно повећање експресије ICAM-1 на синусоидама, централној и портним венама уочено је 6 сати након апликације Con A, а максимална експресија је забележена у периоду од 8 до 24 сата након апликације Con A. Повећање експресије VCAM-1 и Е-селектина се уочава 6 сати, а максимални ниво достиже 8 сати након апликације Con A [45].

Велике количине TNF- α које се ослобађају из Купферових ћелија су цитотоксичне за хепатоците, али немају исти ефекат на ендотелне ћелије синусоида, показано је да примена антисерума за TNF- α није спречила смрт SEC [16]. TNF- α остварује директан цитотоксички ефекат на хепатоците везујући се за два различита трансмембранска рецептора TNFR1 (TNF рецептор тип 1, р55) и TNFR2 (TNF рецептор тип 2, р75). Везивање TNF за ове рецепторе активира различите интрацелуларне путеве. TRADD (*TNF receptor 1-associated death domain protein*), који се везује за цитоплазматски домен рецептора за TNF- α , важан је за активацију свих ових путева. Након активације рецептора за TNF- α , три протеина, FADD (енгл. *Fas-associated protein with death domain*), TRAF2 (енгл. *TNF receptor-associated factor 2*) и RIP могу да се вежу за TRADD [47].

Апоптоза започиње везивањем TNF- α за TNFR1, који у цитоплазматском делу рецептора има такозвани домен смрти „*death domain*“. Домен смрти регрутује друге протеине, као што је FADD и удружује рецепторе смрти тиме активирајући иницијаторску каспазу 8. Иако каспаза 8 може директно да активира нисходне ефекторске каспазе као што је каспаза 3 и изазове оштећење ћелија, ова активација је често блокирана у ћелијама типа II, као што су хепатоцити, помоћу инхибитора апоптозе, *X-linked inhibitor-of-apoptosis*, који се везује за каспазу 3. Зато је за индукцију смрти неопходно да каспаза 8, заобилазним путем активира митохондријски пут апоптозе и каспазу 9, како би ћелија ушла у апоптозу. Друга два протеина, TRAF2 и RIP су значајни за активацију сигналних путева који се завршавају транслокацијом NF- κ B у једро и активацијом Jun киназе, JNK (енгл. *c-Jun N-terminal kinases*). Везивање TNF- α за TNFR2, за последицу има активацију само TRAF2-зависних сигналах путева, а не и FADD-зависну апоптозу [47], [48].

Значај TNF- α као медијатора који учествује у развоју хепатитиса након интравенске примене Con A доказује податак да примена анти-TNF- α антитела комплетно блокира оштећење ћелија јетре, што указује на кључну улогу TNF- α у индукцији смрти хепатоцита у овом моделу [20], [49]. У случају Con A хепатитиса, удружена сигнализација са оба рецептора за TNF- α је неопходна за индукцију смрти хепатоцита јер је показано да су TNFR1- и TNFR2- дефицијентни мишеви резистентни на оштећење јетре изазвано конканавалином А [47], [50]. Улога TNFR1 је највероватније директнија у индуковању апоптозе хепатоцита, док је TNFR2 есенцијалан у комуникацији међу лимфоцитима, индукује експресију INF- γ и индиректно активира TNFR1 [22], [51].

Упркос томе што је јасно показано да TNF- α игра улогу у оштећењу хепатоцита, показано је и да се каспазе 3, 8 и 9 не активирају у јетри након примене Con A, нити има активације митохондријског пута апоптозе у хепатоцитима. Осим тога ни инхибиција молекула FADD није утицала на смањење оштећења паренхиме јетре [52]. Ови резултати указују на то да Con A индукује FADD-независно оштећење хепатоцита [52]. У складу са тим резултатима, ни инхибитор широког спектра каспаза *benzoyloxycarbonyl-val-ala-asp-fluoromethylketone* (zVADfmk), не спречава оштећење изазвано Con A. Међутим, показано је да је делеција гена за JNK удружена са инхибицијом митохондријског пута апоптозе у хепатоцитима, али су ови мишеви и даље подложни некротичком оштећењу хепатоцита након примене Con A [52]. Подаци да нема значајног смањења концентрације ALT у серуму, ни значајног смањења оштећења јетре детектованог хистолошким анализама код JNK1- и JNK2-дефицијентних мишева третираних Con A, указују на то да некроза или некроптоза играју значајнију улогу од апоптозе у оштећењу јетре у Con A моделу хепатитиса [52].

Раније студије су показале да NF- κ B може да спречи апоптозу у различитим типовима ћелија. Међутим, у хепатоцитима се максимална фрагментација ДНК уочава у исто време, након примене Con A, када и транслокација NF- κ B, што указује да се интрацелуларна каскада која за резултат има индукцију апоптозе активира много раније у поређењу са активацијом NF- κ B и да NF- κ B својом продуженом кинетиком није у могућности да спречи апоптозу хепатоцита и оштећење јетре [22].

Чињенице да Con A не активира каспазе и да инхибитори пан-каспазе не штите јетру од оштећења, затим масивно ослобађање ALT и морфолошке карактеристике оштећених хепатоцита указују да је некроптоза главни механизам ћелијске смрти (природа смрти је некроза, а не апоптоза с обзиром да активност каспаза није идентификована у тренутку када је ниво ензима јетре највећи, иако је детектабилно разлагање ДНК).

Док је пут апоптозе релативно познат [53], веома мало се зна о некрози хепатоцита у контексту токсичности TNF- α , иако је познато да је у другим типовима ћелија повезана са реактивним врстама кисеоника, ROS.

Како знамо да су Т лимфоцити и цитокин TNF- α главни учесници у процесу оштећења јетре изазваног интравенском апликацијом Con A, очекивано би било да главни вид смрти хепатоцита буде апоптоза, али су новије студије ипак показале да је у овом моделу хепатитиса најчешћи вид смрти хепатоцита **некроптоза** [54]. Некроптоза је програмирана некротска смрт ћелија која зависи од RIP1/RIP3 киназа. Има одређена својства програмиране ћелијске смрти као што је поремећај потенцијала митохондрија и фрагментација једра, али је на крају увек праћена неконтролисаним деградацијом ћелија и ослобађањем садржаја цитоплазме [55].

У јетрама мишева третираних Con A уочена је значајна експресија RIP1 и RIP3 киназа, а мишеви са делецијом гена за RIP3 показују резистенцију на развој болести [56]. Међутим, резултати различитих студија о ефектима различитих инхибитора RIP1 киназе, нису усаглашени [56]–[59].

Новије студије показују учешће молекула TRAIL и RIP1/RIP3 сигналног пута у индукцији некроптозе хепатоцита у Con A хепатитису [60], [61]. Добро је познато да TRAIL стимулише сигнале који индукују апоптозу ћелија, међутим у ћелијама хуманог колоректалног карцинома, HT29, и ћелијама хепатоцелуларног карцинома, HepG2, показано је да кисела екстрацелуларна средина преусмерава сигнале са молекула

TRAIL од индукције апоптозе ка регулисаној некрози тј. некроптози која зависи од RIPK1. Кисела екстрацелуларна средина се појављује у различитим патолошким стањима као што су канцер и инфламација [62]. Ћелије које експримирају молекул TRAIL и играју кључну улогу у индукцији смрти хепатоцита процесом некроптозе у моделу Con A хепатитиса су NKT ћелије [2], [40], [43], [44], [60], [61]. Блокирање активности молекула TRAIL *in vivo* штити јетру мишева од оштећења изазваног инјекцијом Con A [61]. Већ је претходно споменуто да су мишеви са дефицијенцијом CD1d молекула, маркера NKT ћелија које имају кључну улогу у процесу оштећења јетре, скоро потпуно заштићени од оштећења које изазива Con A [2].

Код људи, TRAIL интеррагује са барем четири мембранска рецептора који припадају TNF фамилији рецептора. TRAIL рецептор 1 (TRAIL-R1 или *death receptor 4*, DR4) и TRAIL рецептор 2 (TRAIL-R2, *death receptor 5*, TRICK2 или KILLER) имају цитоплазматске домене смрти и могу да активирају и каспазе и NF-κB. Друга два рецептора TRAIL-R3 (DcR1) и TRAIL-R4 (DcR2) имају скраћене домене смрти. Они нису способни да активирају каспазну каскаду али могу да активирају NF-κB и блокирају апоптозу. TRAIL код мишева активира апоптозу везујући се само за TRAIL-R2 [61]. Фрагментација ДНК и формирање апоптотских телашаца који јасно указују на механизам програмиране смрти хепатоцита су видљиви у хепатоцитима већ 5 сати након инјектовања Con A и претходе повећању трансаминаза.

1.1.4.2. INF-γ

Осим цитокина TNF-α, у патогенези хепатитиса изазваног Con A важну улогу има INF-γ [21]. Цитокини TNF-α и INF-γ делују синергистички у овом моделу болести. Експерименти у којима су блокирани ефекти ова два цитокина применом моноклонских антитела јасно су потврдили да су оба цитокина неопходна за развој Con A хепатитиса, при чему недостатак једног цитокина, други цитокин не може да надомести [21]. Хепатитис је значајно блажи код нокаут мишева којима недостаје ген за INF-γ [35].

Постоји неколико потенцијалних механизма којим INF-γ може да учествује у процесу оштећења ћелија и ткива. Ови механизми укључују активацију функције макрофага, укључујући синергистичку стимулацију продукције NO заједно са TNF-α, директну индукцију цитотоксичности лимфоцита и директну активацију гена чији производи учествују у сигналним каскадама које за резултат имају смрт ћелије [63].

Активност INF-γ је регулисана преко активације сигналног пута JAK/STAT. Након везивања INF-γ за рецептор на ћелијама, активирају се тирозин киназе (JAK1 и JAK2) удружене са рецептором за INF-γ (INFG1 и INFG2) што изазива фосфорилацију и активацију различитих молекула STAT (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription*). Активирани STAT1 димеризује и транслоцира се у једро где активира транскрипцију неколико гена, укључујући *IFN regulatory factor-1* (IRF-1). IRF-1 је транскрипциони фактор који контролише транскрипцију многих гена чији производи остварују антивирусне и проапоптотске ефекте. Мишеви са дефицијенцијом INF-γ или молекула STAT1 развијају значајно мање оштећење јетре изазвано конканавалином А што указује на то да INF-γ/STAT1 сигнална каскада има важну улогу у овом моделу хепатитиса [64]. Код мишева са дефицијенцијом INF-γ или молекула STAT1 показана је

значајно смањена активација CD4+T и NKT ћелија, ћелија које директним цитотоксичким ефектом изазивају смрт хепатоцита [64]. Хепатоцити IRF-1-дефицијентних мишева су комплетно резистентни на ефекте Con A судећи по три различита обележја апоптозе као што је ослобађање LDH, фрагментација ДНК и активација каспазе-3 [37], [65].

Con A стимулише продукцију INF- γ углавном у NKT ћелијама и CD4+T лимфоцитима, а продуковани INF- γ циља хепатоците, SEC и Купферове ћелије у којима активира STAT1/IRF-1 пут. Дакле, INF- γ /STAT1/IRF-1 пут поред улоге у индукцији ћелијске смрти има улогу и проинфламацијског сигнала. Продукт IRF-1 гена стимулише експресију молекула VCAM-1, ICAM-1, хемокина CXCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL11 што све заједно омогућава регрутовање лимфоцита, неутрофила и еозинофила у јетру који појачавају оштећење које на крају резултује развојем хепатитиса [65]. Способност да повећају експресију хемокина на хепатоцитима и различитих адхезионих молекула на SEC и Купферовим ћелијама, INF- γ и TNF- α остварују синергистички [65]. На овај начин можемо да објаснимо инфилтрацију додатних леукоцита, као што су неутрофили у јетру.

1.1.4.2.1 Значај неутрофила и макрофага у Con A хепатитису

Активација и регрутовање неутрофила је важан корак у патогенези Con A хепатитиса. Четири сата након администрације Con A, највећи део популације регрутованих леукоцита чине неутрофили, док мали део чине T лимфоцити. Con A може да директно везује неутрофиле, што резултује повећањем експресије адхезионих молекула (L-селектина, интегрина-2) и продукције ROS. Неутрофили доприносе оштећењу јетре директно ослобађањем садржаја својих гранула које оштећују ткиво и индиректно промовишући регрутацију T лимфоцита. Такође, активирани неутрофили повећавају продукцију различитих медијатора INF- γ , TNF- α и IL-4, које продукују и T лимфоцити и који су важни у развоју хепатитиса [66]. Деплеција неутрофила значајно смањује регрутовање CD4+T лимфоцита у јетру и тако ублажава оштећење јетре [67].

Неутрофили, као и макрофаги производе **реактивне врсте кисеоника**: O₂⁻, NO и H₂O₂. Реактивне врсте кисеоника су убиквитарни сигнални молекули који имају многобројне функције као што су одбрана домаћина, раст ћелије, ћелијска сигнализација и регулација експресије гена. Међутим, прекомерне количине ROS изазивају ћелијски стрес, који је узрок тешких обољења као што су аутоимунске болести и канцер.

NADPH оксидазе (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*, NOX) су фамилија ензима чија је једина позната функција производња ROS у многим ћелијама [68]. Сигнална каскада коју покрећу стрес, хормони, вазоактивни агенси и цитокини (TNF- α , IL-1 β) контролише експресију и активност ових ензима. NADPH комплекс ензима се састоји од најмање пет субјединица, мембранских gp91^{phox} и p22^{phox} хомодимера и цитоплазматских p40^{phox}, p47^{phox} и p67^{phox} [69]. ROS који настаје активношћу NADPH оксидазе доприноси различитим обољењима јетре као што су алкохолни хепатитис, хронични хепатитис C, холестатско обољење јетре и фиброза јетре [70]–[72]. Током каснијих фаза оштећења, NADPH оксидаза промовише репарацију ткива промовишући ангиогенезу и пролиферацију ћелија [73]. NADPH оксидаза преноси електроне од NADPH до молекулског кисеоника, продукујући

супероксид ($O_2^{\cdot -}$) у цитоплазми, који је веома реактиван и у већим количинама оштећује ћелије. Ензим **супероксид дисмутаза** брзо конвертује $O_2^{\cdot -}$ до H_2O_2 који је мање реактиван и који се даље под дејством каталаза конвертује у воду [70]. Супероксид дисмутаза, дакле, представља прву линију одбране од оштећења које изазива ROS. У ћелијама сисара постоје три изоформе ензима супероксид дисмутазе: SOD1 (Cu, Zn супероксид дисмутаза) која је присутна у цитоплазми, SOD2 (Mn супероксид дисмутаза) присутна у митохондријама и екстрацелуларна SOD3 (Cu, Zn супероксид дисмутаза). Сви ови ензими каталишу исту реакцију дисмутације супероксидног аниона у молекуларни кисеоник и водоник пероксид [74], [75] и тиме смањују ниво супероксидног аниона.

Азот моноксид (NO) је мали, биоактивни липофилни молекул који дифундује кроз ћелијску мембрану и контролише многе физиолошке функције у организму [76], [77]. Једини начин синтезе NO је из аминокиселине L-аргинин уз помоћу ензима азот оксид синтетазе (енгл. *nitric oxide synthases*, NOS), који каталише оксидацију L-аргинина у L-цитрулин [78]. Једна од три изоформи NOS је **индуцибилна NOS** (*inducible NOS*, iNOS или тип 2). У имунском систему iNOS/NO има и регулаторне и ефекторске улоге. Регулаторна улога подразумева имуносупресивне ефекте, инхибицију пролиферације лимфоцита и модулацију цитокинског одговора. Друга категорија подразумева имунопатолошке ефекте (деструкцију ткива) и имунопротективне ефекте (убијање патогена микроорганизама и апоптозу аутореактивних Т лимфоцита) [79].

Ћелије имунског система у стању мировања немају iNOS, међутим бројни ванћелијски стимулуси могу да активирају различите сигналне путеве који могу да покрену његову продукцију [80]. Проинфламацијски цитокини, као што су TNF- α , IL-1 β и INF- γ [81], могу да активирају синтезу NO помоћу индукције iNOS у различитим типовима ћелија као што су макрофаги, дендритске ћелије, неутрофили, хепатоцити итд [82], [83].

1.1.4.3. IL-17

IL-17 стимулише у различитим ћелијама продукцију проинфламацијских цитокина и хемокина који мобилишу неутрофиле и на тај начин координише процес инфламације у ткиву [84]. Рецептор за IL-17, IL-17R је присутан на скоро свим ћелијама и ткивима, а не само ћелијама имунског система [85]. Експресија IL-17 је значајно повећана у ткиву јетре након индукције Соп А хепатитиса [86]. Продукују га пре свега CD4+Т лимфоцити и NKT ћелије [87]. У овом моделу болести показано је да IL-17 стимулише Купферове ћелије да продукују IL-6 и TNF- α [88]. Осим тога, показано је да IL-17 повећава експресију IL-2 у интрахепатичким CD4+Т лимфоцитима, који активира НК ћелије да оштећују јетру [86]. Значај IL-17 у патогенези Соп А хепатитиса показана је експериментима у којима је блокада IL-17 и рецептора за IL-17 ублажила оштећење јетре, док је прекомерна експресија овог цитокина изазвала масивну некрозу хепатоцита [39], [86], [87], [89].

1.1.4.4. IL-6

IL-6, цитокин чију продукцију стимулише IL-17, али који је такође неопходан за диференцијацију CD4+T лимфоцита у Th17 ћелије [90], у Con A хепатитису може да има про- и анти- инфламацијске функције. Блокада класичног сигналног пута који покреће везивање IL-6 за свој рецептор у моделу Con A хепатитиса имала је хепатопротективни ефекат, који је делимично остварен немогућношћу мобилизације неутрофила [91] и смањеном продукцијом TNF- α [49]. Код нокаут мишева којима недостаје ген за INF- γ и који су прилично резистентни на оштећење које изазива Con A детектована је значајно мања концентрација IL-6 у серуму и ниво иРНК IL-6 у слезини [92]. Међутим, IL-6 дефицијентни мишеви су подложнији развоју болести, што указује на то да ендогени IL-6 има протективну улогу, тј. IL-6 који је присутан пре индуковања Con A хепатитиса као и IL-6 продукован у почетним фазама развоја оштећења јетре активира заштитни пут. Наставак продукције IL-6 након ове почетне фазе индукције хепатитиса, активира друге сигналне путеве који за резултат имају оштећење хепатоцита [49], [92].

1.1.4.5. Tregs

Јетра, као део имунског система мукозе, има јединствену способност модулације имунског одговора. Ендотелне ћелије синусоида јетре преусмеравају („*shifting*“) локални имунски одговор ка толеранцији. У стању инфламације, SEC јетре доприносе продукцији IL-10 и на тај начин супримирају Th1 одговор након примена Con A [93]. Регулаторни Т лимфоцити (енгл. *regulatory T cells*, Treg) имају незаменљиву улогу у спречавању реакције на сопствене антигене и у сузбијању прекомерних имунских реакција штетних по домаћина. Treg настају у тимусу као функционално зрела субпопулација Т лимфоцита, а такође могу настати из наивних Т лимфоцита на периферији [94].

У хепатитису изазваном Con A, најважнији извор антитинфламацијског цитокина, IL-10, који игра најважнију улогу у индукцији толеранције, су CD4+CD25+ Treg лимфоцити и Купферове ћелије [95]. CD4+CD25+Foxp3 Treg лимфоцити су важни у периферној имунској толеранцији и инхибирају развој аутоимунских болести и одбацивање графта [96], [97]. Адоптивни трансфер Treg лимфоцита значајно смањује оштећење јетре и инфламацију [98], модулацијом баланса Treg и Th17 лимфоцита [99].

Поред IL-10 и цитокини IL-6 и IL-22 активацијом STAT3 и индукцијом експресије антиапоптотских и антиоксидантних молекула остварују протективну улогу у Con A хепатитису [64], [100], [101].

1.2. Органосумпорна једињења

Биљке рода *Allium*, као што су бели лук (лат. *Allium sativum*), црни лук (лат. *Allium cepa*) и празилук (лат. *Allium porrum*), користе се у исхрани од давнина. Бели лук у преводу са латинског, значи „гајени лук” што нам указује на то да је једна од најстаријих биљака које је човек култивисао. Осим у исхрани, ове биљке се користе и као традиционалан лек у народној медицини и фитотерапији [102]. У народној медицини и враџбинама бели лук међу свим биљкама има највећи значај. За њега је карактеристична пословица у којој он опомиње човека:

„*Ти мене чувај од нокта, а ја ћу тебе од свакога зла*“ [103]

Бројна сумпорна једињења су одговорна за мирис и укус белог лука као и за „плач“ изазван резањем црног лука [104]. Ова једињења су такође одговорна за медицинска својства која се одувек приписују белом и црном луку. Једним именом их називамо органосумпорним једињењима, ОСЈ [105].

У нетретираним ткивима ових биљака присутни су алк(ен)ил цистеин сулфоксиди. Природа алкил група сулфоксида варира у зависности од *Allium* врсте. Бели лук садржи највише алил цистеин сулфоксида, док црни лук, празилук и влашац садрже пропил- и проп-1-енил цистеин сулфоксида [106].

Када се ткиво ових биљака оштети, сецкањем или жвакањем, активира се ензим алиназа, сулфоксиди се ензимски трансформишу до тиосулфината, који су примарне компоненте ових биљака, одговорне за укус. Тиосулфинати су пронађени у свим *Allium* врстама које су истражене, разликују се по структури и количини прекурсора. Тиосулфинати се разлажу, посебно на високој температури, или метаболизмом *in vivo* [107], до комплексне смеше једињења у којој преовладавају моносулфиди, дисулфиди, трисулфиди и тетрасулфиди [108].

S-алилцистеин сулфоксид, кога називамо алин, је најзаступљеније ОСЈ у целим главицама белог лука, лоцирано у цитоплазми и прекурсор је многих органосумпорних продуката. Када се наруши структура белог лука, ензим алиназа се ослобађа из вакуола и каталише трансформацију алина у алицин [109]. Алицин, који је нестабилан, веома се брзо конвертује до великог броја сумпорних једињења, као што су диалил сулфид (енгл. *diallyl sulfide*, DAS), диалил дисулфид (енгл. *diallyl disulfide*, DADS) и диалил трисулфид (енгл. *diallyl trisulfide*, DATS) и других једињења као што је ајоен.

Главни тиосулфинат црног лука је S-пропенилцистеин сулфоксид, позициони изомер алина. Крајњи продукт његовог разлагања је смеша у којој преовладавају пропил деривати, дипропил дисулфид (енгл. *dipropyl disulfide*, DPDS) и дипропил трисулфид (енгл. *dipropyl trisulfide*, DPDS) [110].

У белом и црном луку углавном могу да се детектују органосумпорна једињења која садрже до пет атома сумпора, док су сулфиди са шест или више атома сумпора присутни у веома малим, недетектабилним концентрацијама [111].

Садржај ових једињења се мења током култивације и чувања биљака. Зависи и од порекла биљке, методе обраде, као и услова екстракције (температуре, времена и поларности растварача) [106][112][113].

Научна истраживања ових биљака започињу у другој половини 19. века радом Луја Пастера који је први 1858. године показао антибактеријска својства белог лука [114]. Данас су многобројне студије потврдиле антибактеријска, антивирусна, антифунгална и антипаразитарна својства белог лука [115]. Бели лук је ефикасан против широког спектра грам-позитивних, грам-негативних и ацидо-алкохол-резистентних („*acid-fast*“) бактерија. Показано је антибактеријско дејство белог лука на врсте: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium* [109], *Escherichia coli* [116], *Klebsiella* [117], *Clostridium botulinum* [118] и *Helicobacter pylori* [119]. Антивирусно дејство белог лука је показано на хуманом риновирусу, цитомегаловирусу, херпес симплекс и инфлуенца вирусу. Бели лук је ефикасан у лечењу честих гљивичних инфекција изазваних *Candida-om albicans* и *Aspergillus flavus-om*. Показао је и обећавајуће ефекте као антипаразитарни агенс у лечењу болести које изазивају *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* и *Plasmodium species* [120].

Данас знамо да су за већину биолошких ефеката ових биљака заслужна органосумпорна једињења. Бројним студијама је потврђено да органосумпорна једињења имају широк спектар биолошких активности [121]: антимикробна [111], [115], антиканцерогена [122]–[127], антиоксидантна [128], кардиопротективна [129]–[132], антиагрегациона [133], хепатопротективна [134].

1.2.1. Познати ефекти органосумпорних једињења на функцију јетре

Заштитни ефекти примене различитих формулација белог лука (свежи бели лук, уљани раствори, екстракти белог лука, изолованих или синтетисаних ОСЈ) показани су у различитим моделима обољења јетре. Бели лук ублажава оксидативни стрес изазван алкохолом [135]–[137] и различитим хемикалијама [138], превенира настанак масне јетре и цирозе јетре [139].

Свеже припремљени хомогенат белог лука штити јетру од оштећења изазваног изониазидом и рифампицином [140]. Примена белог лука и DAS заштитила је јетру од акутног оштећења јетре изазваног ацетаминофеном и другим лековима [138], [141]–[143]. Превентивна примена уљаног раствора белог лука [144], високе дозе DADS и DATS [145] спречиле су оштећење јетре изазвано хепатотоксинима, угљен тетраклоридом као и галактозамином и доксорубицином [146]. DATS је умањио оштећење јетре изазвано тровањем арсеном [147]. Водени екстракт белог лука штити јетру од исхемијско/реперфузијског оштећења јетре [148] и настанка фиброзе [139].

У литератури је до сада забележено да екстракти белог лука као и ОСЈ белог лука наведене ефекте остварује модулацијом активности ензима и секреције цитокина, стимулацијом активације макрофага и фагоцитозе и способношћу блокирања слободних радикала [149], [150].

Органосумпорна једињења повећавају активност ензима II фазе (антиоксидативних ензима), важних за детоксикацију канцерогена: глутатион-S-трансферазе (енгл. *glutathione S-transferases*, GST) [151], [152], хинон редуктазе [153]–[155], каталазе [150], глутатион пероксидазе, супероксид дисмутаза [156] и епокси хидралазе [145], [147], [157]–[160]. Заштитни ефекат остварују и инхибирајући ензиме I фазе, као што је цитохром P450 (енгл. *cytochromes* P450, CYP) фамилија ензима [143], [161], [162] који активирају многе хемијске карциногене. Пропил деривати за разлику од алил форми су показали значајно слабије претходно наведене активности или су били неактивни.

Примена DAS, DADS и DATS повећала је активност и осталих детоксикујућих ензима, као што је никотинамид аденин динуклеотид фосфат [NAD(P)H]-зависна хинон оксидоредуктаза, кроз активацију *nuclear factor E-related factor 2*, Nrf2 чиме индукује ензиме који метаболишу ксенобиотику. DATS индукује интрацелуларну акумулацију ROS која може да активира Nrf2 кроз оксидацију остатака цистеина [163]. Nrf2 је главни регулатор ћелијског редокс баланса [164]. У условима оксидативног стреса, Nrf2 се активира, транслоцира у једру и интерагује са *antioxidant response element*, ARE чиме промовише експресију цитопротективних гена: антиоксидантних ензима и детоксикујућих ензима II фазе [165].

1.2.2. Антиоксидативни ефекти органосумпорних једињења

Различите компоненте белог лука, блокирањем егзогено генерисаних хидрокси радикала, способне су да знатно смање оксидативно оштећење јетре [166]. Са друге стране, OCS могу да индукују настанак ROS у дозно зависном маниру у ћелијама канцера и овај ефекат је такође приписан терапеутском дејству белог лука. Могуће је да ROS играју улогу преносиоца сигнала од ћелија тумора до ћелија имунског система подстичући тако одбрамбене механизме имунског система (имуномодулаторно дејство белог лука) [167].

Оксидативни стрес је и последица продукције NO који настаје у реакцији коју каталише индуцибилна NO синтетаза (енгл. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS), iNOS. Показано је да DAS, DADS и DATS као и друга једињења која потичу од белог лука могу да смање продукцију NO и проинфламацијских цитокина у различитим типовима макрофага, леукемијским и макрофагима стимулираним липополисахаридом (енгл. *Lipopolysaccharide*, LPS) [129], [168], [169]. Ова једињења спречавају експресију iNOS инхибирајући активацију MAP киназе (MAPK од енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) и транскрипционог фактора NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [163], [170] и тиме инхибирајући транскрипцију гена за проинфламацијске цитокине TNF-α, IL-6, IL-12 и IL-1β [171] али и антиинфламацијског IL-10 [163].

Показано је да алицин, једна од активних компоненти белог лука и прекурсор алил сулфида, може да спречи оштећење јетре изазвано применом Cop A код мишева, делујући имуномодулаторно на Т лимфоците и адхезионе молекуле као и инхибирајући активност NF-κB [172].

Сви ови подаци, узети у обзир заједно, указују на корист различитих формулација белог лука у превенцији обољења јетре.

Сви до сада споменути ефекти приписују се алил сулфидима, пре свега диалил дисулфиду и диалил трисулфиду јер се већина експерименталних студија фокусира на њихове ефекте. О пропил сулфидима, засићеним дериватима алил сулфида, има веома мало података и још увек нису познати њихови терапијски ефекти.

Познато је да се **дипропил дисулфид** примењен орално детектује у желуцу пацова где се трансформише у пропил меркаптан који доспева до јетре. У јетри се формирају метаболити пропил меркаптана: метилпропил сулфид, метилпропил сулфоксид и метилпропил сулфон [173]. Иако дат орално дипропил дисулфид не доспева у истој форми до јетре, показано је у *in vitro* систему да се дипропил дисулфид у цитосолу хепатоцита трансформише у пропил меркаптан, једињење које након оралне примене дипропил дисулфида настаје у желуцу и онда доспева до јетре [174].

Већ смо напоменули да су антиинфламацијски ефекти различитих органосумпорних једињења показани у културама макрофага стимулираних липополисахародом [171][169][163]. Међу њима једна студија је показала способност **пропил дисулфида** да инхибира продукцију проинфламацијских цитокина, IL-1 β , TNF- α , IL-6, инактивацијом транскрипционог фактора NF- κ B, а да регулацијом експресије индуцибилне NO синтетазе инхибира продукцију NO [129]. Антиоксиданту активност органосумпорна једињења, међу којима и **дипропил дисулфид** и **дипропил сулфид**, остварују повећавајући експресију ензима фазе II у јетри, *UDP-glucuronyltransferase*, *glutathione S-transferase* и *quinone reductase* [157] [126] и инхибирајући ензимску активност CYP2E1, CYP2A6, CYP1A1 изоформи цитохрома P450 (енгл. *cytochrome P450*, CYP) [128], [175], [176].

Број атома сумпора у молекулу органосулфида игра кључну улогу у биолошкој активности. Додатак једног атома сумпора значајно повећава јачину њихове антимицробне, антиоксидативне и антитуморске активности [128], [171], [177], [178] .

На основу ових података можемо очекивати да органосумпорна једињења богатија атомима сумпора имају већи потенцијал евентуалног терапијског дејства.

У овој студији смо испитивали антиинфламацијске ефекте смеше дипропил полисулфида, који у својој структури имају од 2 до 11 атома сумпора, *in vivo* у моделу акутног хепатитиса изазваног конканавалином А. Ова смеша је синтетисана на Хемијском факултету Универзитета у Београду (лабораторија професора Манојловића). Једињења са више од шест атома сумпора није могуће детектовати и изоловати из природног белог лука, али се очекује да испоље знатно јачу биолошку активност.

2.ЦИЉ РАДА

Основни циљ истраживања је испитивање потенцијалног антиинфламацијског и хепатопротективног ефекта смеше дипропил полисулфида у моделу акутног хепатитиса мишева изазваног интравенском апликацијом конканавалина А.

У складу са основним циљем постављени су и следећи експериментални задаци:

1. Испитати утицај оралне примене смеше дипропил полисулфида на фенотип интрахепатичних Т лимфоцита и ћелија које презентују антигене.
2. Процењом хистолошких и серумских параметара утврдити утицај претретмана смешом дипропил полисулфида на тежину хепатитиса изазваног конканавалином А.
3. Анализирати утицај оралне примене смеше дипропил полисулфида пре апликације Соп А на експресију про- и анти- оксидативних ензима у јетри.
4. Испитати утицај претретмана смешом дипропил полисулфида на активацију ендотела и профил цитокина у јетри мишева са Соп А хепатитисом.
5. Анализирати утицај претретмана смешом дипропил полисулфида на састав и фенотипске карактеристике имунских ћелија које инфилтришу јетру мишева са Соп А хепатитисом.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Синтеза смеше дипропил полисулфида (DPPS)

Хемикалије коришћене за анализу течне хроматографије високих перформанси (енгл. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) су ацетонитрил (чистоће > 99,9%, *Sigma-Aldrich* за HPLC), тетрахидрофуран (чистоће > 99,9%, *Sigma Aldrich* за HPLC) и вода (HPLC *Plus grade water*, *Sigma-Aldrich*). Филтери за шприцеве (25mm, PTFE мембрана 0,45 μ m) су набављени од *Agilent Technologies*.

Калијум полисулфид (р.а., *Carl Roth*) са благим вишком сумпора сипан је у фласк у ком се налазила пет пута већа запремина тетрахидрофурана ($\geq 99,5\%$, за синтезу *Carl Roth*) у који је додата 2% v/v дестилована вода. Рефлуksiони кондензатор је стављен на фласк и реакциона смеша је рефлуksована 12 сати. Након тога, раствор је остављен да се хлади и у охлађен раствор је, кап по кап, додата једнака количина пропил бромида (99% *Acros Organics*) уз снажно мешање. Након мешања, реакциона смеша је поново рефлуksована 12 сати. Добијена смеша је смештена у левак за одвајање и органски слој је издвојен и испран три пута са 10% раствором натријум хлорида. Органски растварач је упарен и у фласку је остала смеша полисулфида. Дужина ланца сумпора зависи од времена рефлуksа у првом кораку синтезе.

3.2. Аналитички поступак

Течна хроматографија високих перформанси са детекцијом низа фотодиода (енгл. *photodiode array detection*, DAD) изведена је употребом *Thermo Ultimate 3000 RS* на аналитичкој колони *SupelcosilTM LC-18-DB* (150mm \times 4,6mm, 3 μ m; *Sigma-Aldrich*) на 37°C. Мобилна фаза састојала се од воде као компоненте А и 3% тетрахидрофурана/97% ацетонитрила као компоненте В. Хроматографско испирање је спроведено при протоку од 1mL/min у моду градијента: 0 - 10 минута од 30% до 70% В, 10 - 35 минута 70% В, 35 - 40 минута од 70% до 30% В, 40 - 50 минута 30% В. Детектор је сетован на 240nm. Инјекциона запремина била је 20 μ L. Анализа података извршена је помоћу софтвера *Chromeleon*, v6.8 (*ThermoFisher Scientific*, Бремен, Немачка).

За препаративну HPLC коришћен је исти градијент елуента, као и за HPLC анализу, како би се раздвојила једињења која чине синтетисану смешу. Раздвајање једињења праћено је детектором DAD, а елуент са раздвојеним једињењима сакупуљао се у одвојеним стакленим епруветама. Комбиновани раствори за свако од одвојених једињења су упарени до сува на воденом купатилу у керамичким посудама. Након испаравања, анализирани су добијене супстанце са бројем атома сумпора у својој структури већим од 7, помоћу *Elementar Vario-EL III CHNS-O* (Ханау, Немачка) анализатора.

Добијени резултати ових анализа су: једињење 8 (C 21,12%, H 4,06%, N 0%, S 74,82%), једињење 9 (C 19,18%, H 3,78%, N 0%, S 77,04%), једињење 10 (C 17,8%, H 3,41%, N 0%, S 78,79%), једињење 11 (C 16,49%, H 3,11 %, N 0%, S 80%). На основу ових резултата, који одговарају дипропил полисулфидима са 8, 9, 10 и 11 атома сумпора, може се закључити да смо успели да добијемо дипропил полисулфиде са једанаест атома сумпора. Полисулфиди са мањим бројем атома сумпора идентификовани су поређењем са уљаним раствором белог лука (*Sigma Aldrich*) коришћењем HPLC-DAD.

3.3. Мишеви, индукција хепатитиса и третман смешом DPPS

3.3.1. Смеша DPPS.

За *in vivo* експерименте коришћен је 50% раствор смеше DPPS у маслиновом уљу због бољих органолептичких својстава у поређењу са чистим DPPS и потпуне растворљивости смеше у маслиновом уљу. Доза је изабрана према претходним извештајима о терапијском ефекту диалил дисулфида и диалил сулфида *in vivo* у моделу инфекције мишева метицилин резистентним сојем *Staphylococcus aureus*-a [179].

3.3.2. Експерименталне животиње.

У експериментима су коришћени мужјаци мишева соја C57BL/6, тежине око 18 ± 22 g, старости 6 до 8 недеља. Мишеви су одгајани у Виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Све поступке на животињама одобрио је Етички комитет Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и спровођени су у складу са смерницама Националног института за здравље и третман лабораторијских животиња.

Укупно 269 животиња је насумично подељено у четири групе:

- 1) нетретирани мишеви
- 2) Con A: група у којој је мишевима интравенски апликован конканавалин А (Con A од енгл. *concanavalin A*) у дози 12,5mg/kg растворен у 200 μ L физиолошког раствора
- 3) DPPS: мишеви којима је орално апликовано 20 μ L раствора смеше дипропил полисулфида концентрације 50%
- 4) DPPS + Con A: група у којој је мишевима 6 сати пре интравенске примене 12,5mg/kg Con A орално апликовано 20 μ L 50% раствора смеше.

Број група је варирао у зависности од експеримента.

- За анализу ефекта орално примењене смеше DPPS на фенотип ћелија имунског система у јетри, мишеви су подељени у две групе: 1. нетретирани и 2. третирани смешом DPPS, 8 мишева по групи.
- За анализу серумских трансминаза и хистолошке анализе, мишеви су подељени у четири групе: 1. нетретирани са 7 мишева у групи, док су групе 2. DPPS, 3. DPPS + Con A и 4. Con A имале по 28 мишева у групи. Свака од ове три групе је даље подељена у четири подгрупе за четири различита времена жртвовања.
- За TUNEL анализу мишеви су подељени у четири групе: 1. нетретирани мишеви, 2. DPPS, 3. DPPS + Con A и 4. Con A. У свакој групи је било по 6 мишева.
- За PCR анализу 15 мишева је подељено у три групе: 1. DPPS, 2. DPPS + Con A и 3. Con A.
- За ELISA тестове мишеви су били подељени у четири групе: 1. нетретирани, 2. DPPS, 3. DPPS + Con A и 4. Con A са 14 мишева по групи, али је свака група даље подељена у две групе за два различита времена жртвовања.
- За анализу моноклеарних ћелија јетре, проточном цитометријом, мишеви су подељени у четири групе: 1. нетретирани, 2. третирани DPPS, 3. третирани DPPS и Con A и 4. Con A са 6 мишева по групи.

Мишеви су жртвовани 2, 4, 6, 8, 12 и 24 сата након инјектовања Con A. Узимани су узорци крви и истовремено је сакупљана јетра.

3.4. Одређивање концентрације трансминаза у серуму

Концентрације аспартат аминотрансферазе (енгл. *aspartate aminotransferase*, AST) измерени су 2, 4, 12 и 24 сата након инјектовања Con A спектрофотометријском методом, коришћењем аутоматизованог биохемијског анализатора (*automated biochemistry analyzer*) Olympus AU 400 (*Olympus Diagnostica GmbH*, Хамбург, Немачка) и реагенса Olympus AU, према упутствима произвођача, изражени у U/L.

3.5. Хистологија јетре и TUNEL бојење

Јетре су фиксирани 4% параформалдехидом и затим су направљени парафински калупи од којих су микротомом добијени исечци дебљине 5 μ m. Исечци су затим обојени хематоксилином и еозином (*H&E*) и анализирани под *low-power* светлосним микроскопом (*BX51; Olympus*) опремљеним дигиталном камером.

Апоптоза хепатоцита одређена је бојењем исечка јетре TUNEL (енгл. *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nickend labeling*) методом. Парафински исечци обојени су помоћу *Cell Death Detection Kit*, POD (Roche) према упутствима произвођача. 3,3'-диаминобензидин, DAB је додат као супстрат за пероксидазу како би једра апоптотичних ћелија добила типичну браон боју. Исечци су затим обојени хематоксилином и фотомикрографисани дигиталном камером постављеном на светлосни микроскоп. TUNEL-позитивна једра (браон боје) квантификована су под увећањем $\times 400$ у пет насумичних поља а подаци су изражени као средња вредност броја позитивних ћелија по видном пољу.

3.6. Мерење цитокина

Након екстирпације, део јетре, тежине 100mg, хомогенизован је у 0,5mL PBS-а (енгл. *Phosphate Buffered Saline*). Добијени хомогенати су центрифугирани на 14000G, 10 минута, на температури од 4°C, супернатанти су премештени у чисте епрувете за микроцентрифугу и чувани на -20°C. Концентрације цитокина у супернатантима јетре су одређени помоћу мишјих *Duoset enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) китова за TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 и IL-17 (R&D Systems) према упутствима произвођача.

3.7. Изолација мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија

Изолација мононуклеарних ћелија из јетре је спроведена као што је раније описано [180]. Мононуклеарне ћелије изоловане из јетре су ресуспендоване у FACS пуферу (PBS са 5mM EDTA и 0,2% BSA) и инкубиране 30 минута на 4°C у присуству флуорохромом-конјугованих анти-мишјих CD4, CD8, CD69, CD25, FoxP3, F4/80, CD86, CD206, CD11c антитела или одговарајућих изотипских контрола.

За унутарћелијско бојење, ћелије су инкубиране 4 сата на 37°C у присуству 50ng/ml форбол 12-миристанат 13-ацетата (PMA) (*Sigma-Aldrich*), 1 μ g/ml јономицина (*Sigma-Aldrich*) и *Golgi Stop* (*BD Biosciences*).

Након инкубације са PMA и јономицином, ћелије су фиксиране и пермеабелизоване помоћу *BD Cytofix/Cytoperm* пуфера (*BD Biosciences*). Након фиксирања и пермеабелизације, ћелије су инкубиране са антимишјим антителима INF- γ , IL-17 и IL-10. Изотипске контроле су коришћене за подешавање „гејтова“ (енгл. *gates*). Експресија површинских и унутарћелијских антигена је анализирана помоћу проточног цитометра *FACSCalibur Flow Cytometer* (*BD Biosciences*). Анализа очитаних резултата је урађена у програму *FlowJo* (*Tree Star*).

3.8. Екстракција РНК и *Real-Time* qRT-PCR

Из ткива јетри мишева екстрахована је РНК коришћењем TRIzol-а (*Invitrogen*, Карлсбад, Калифорнија). Укупна РНК (~2 μ g) је уз помоћ реверзне транскриптазе преписана у комплементарну ДНК и то коришћењем *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*-а (*Thermo Fisher Scientific*). За qRT-PCR коришћен је *Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*), специфични прајмери презентовани у Табели 1. и *Mastercycler ep realplex* (*Eppendorf*, Хамбург, Немачка). Релативна експресија гена је израчуната помоћу формуле $2^{-(C_t - C_{tactin})}$, где C_t представља праг циклуса испитиваног гена а C_{tactin} представља вредност прага циклуса „housekeeping“ гена (*GAPDH*).

Табела 1. Прајмери коришћени за *Real-Time* qRT-PCR

ЦИЉНИ ГЕН	СЕКВЕНЦЕ
ICAM-1	<i>forward</i> 5'-CAATTTCTCATGCCGCACAG-3', <i>reverse</i> 5'-AGCTGGAAGATCGAAAGTCCG-3'
VCAM-1	<i>forward</i> 5'-TGAACCCAAACAGAGGCAGAGT-3', <i>reverse</i> 5'-GGTATCCCATCACTTGAGCAGG-3'),
PECAM-1	<i>forward</i> 5'-CAAACAGAAACCCGTGGAGATG-3', <i>reverse</i> 5'-ACCGTAATGGCTGTTGGCTTC-3'
P-селектин	<i>forward</i> 5'-TCATCCCGGTGAAGCAATGT3', <i>reverse</i> 5'-TGGAGAACGCAAGGACAGGTAT-3'
p47 ^{phox}	<i>forward</i> 5'-ATGACCTCAATGGCTTCACC-3', <i>reverse</i> 5'-CTATCTGGAGCCCCCTTGACA-3'
p67 ^{phox}	<i>forward</i> 5'-CTATCAGCTGGTTCCCACGA-3', <i>reverse</i> 5'-GCAGTGGCCTACTTCCAGAG-3'
iNOS	<i>forward</i> 5'-CGAAACGCTTCACTTCCAA-3', <i>reverse</i> 5'-TGAGCCTATATTGCTGTGGCT-3'
SOD1	<i>forward</i> 5'-AATGTGTCCATTGAAGATCGTGTGA-3', <i>reverse</i> 5'-GCTTCCAGCATTTCAGTCTTTGTA-3'
SOD2	<i>forward</i> 5'-AGGGCCTGTCCCATGATGTC-3', <i>reverse</i> 5'-AGAAACCCGTTTGCCTCTACTGAA-3'
SOD3	<i>forward</i> 5'-GGGTCTGTCCCTGTACTTCACCAGAG-3', <i>reverse</i> 5'-CTGACATGGTCCAGGTGACAGAG-3'
GAPDH	<i>forward</i> 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3', <i>reverse</i> 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'

3.9. Статистичка анализа

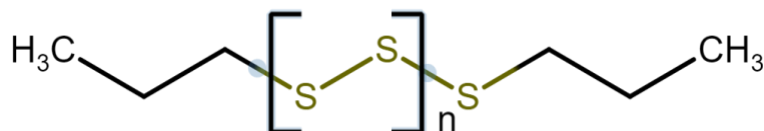
Подаци су представљени као средња вредност \pm SD или средња вредност \pm SEM. Статистичка значајност је одређена студентовим т-тестом независних узорака (енгл. *independent sample Student t-test*) и ANOVA, као и Ман Витнијевим тестом (енгл. *Mann-Whitney U-test*) или Краскал Волисовим тестом (енгл. *Kruskal-Wallis*). Статистичка значајност је претпостављена за $p < 0,05$. За статистичке анализе је коришћен програм SPSS 13.0.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Орална примена смеше дипропил полисулфида стимулише у јетри активацију и регулаторни фенотип ћелија које презентују антиген

Испитивана смеша у свом саставу садржи биолошки активна једињења белог, црног лука и других *Allium* врста, као што су дипропил дисулфид, дипропил трисулфид, дипропил тетрасулфид али и полисулфиде чија је концентрација у овим биљкама недетектабилна па их је немогуће изоловати. Ови полисулфиди имају већи број атома сумпора у својој структури, од 6 (дипропил хептасулфид) до 11 (дипропил ундекасулфид) (Слика 1).

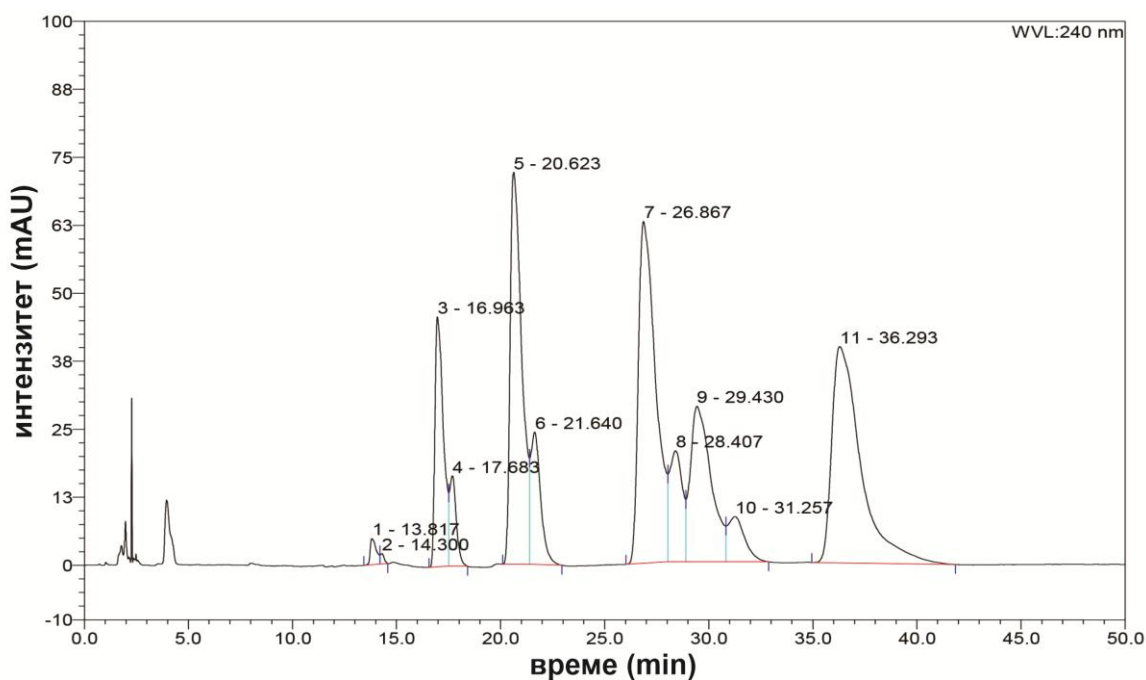
Слика 1



Слика 1. Структурна формула дипропил полисулфида. Број атома сумпора у структури ових једињења може бити од 1 до 11, па је $n = 0 - 5$. ($n = 0$ дипропил моносулфид; $n = 0,5$ дипропил дисулфид; $n = 1$ дипропил трисулфид; $n = 1,5$ дипропил тетрасулфид; $n = 2$ дипропил пентасулфид; $n = 2,5$ дипропил хексасулфид; $n = 3$ дипропил хептасулфид; $n = 3,5$ дипропил октасулфид; $n = 4$ дипропил нонасулфид; $n = 4,5$ дипропил декасулфид; $n = 5$ дипропил ундекасулфид)

Однос количина ових полисулфида у смеси је различит. Као што можемо видети на Сlici 2. највећи је проценат дипропил ундекасулфида (25,39%), затим дипропил хептасулфида (24,27%) и дипропил пентасулфида (20,99%). У умереној количини су присутни дипропил трисулфид (8,48%), дипропил тетрасулфид (4,26%), дипропил хексасулфид (5,11%), дипропил октасулфид (4,62%), дипропил нонасулфид (5,11%) а у минималној количини дипропил дисулфид (0,51%) и дипропил декасулфид (1,26%) (Слика 1).

Слика 2



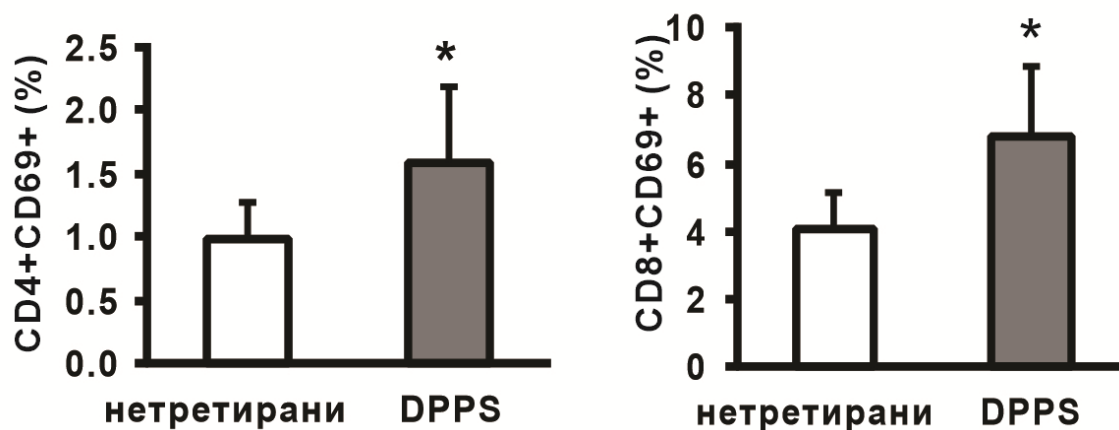
Слика 2. HPLC хроматограм различитих дипропил полисулфида у новосинтетисаној смеси.

У до сада објављеној литератури нема пуно података о својствима као ни биолошким ефектима дипропил полисулфида.

Познато је да се дипропил дисулфид брзо метаболише у јетри након оралне примене и да има веома малу биорасположивост, неизмењен не доспева у системску циркулацију [173]. Метаболити дипропил дисулфида, који у својој структури садрже сумпор, се такође и акумулирају у јетри [173]. Сви метаболити дипропил дисулфида су идентификовани и у јетрама пацова које су перфундоване овим једињењем [174]. На основу ових чињеница као и познатих имуномодулацијских својстава деривата свежег белог лука и екстракта „остарелог“ белог лука (енгл. *aged garlic extract*, AGE), продукта продужене екстракције свежег белог лука натопљеног у водени/етанолни раствор, (богатог органосумпорним једињењима) [181], најпре смо анализирали ефекте оралне примене смеше полисулфида на фенотип ћелија имунског система у јетри.

Наше анализе су показале да смеша дипропил полисулфида не утиче на састав ћелија имунског система у јетри, већ утиче на њихов фенотип. Ефекат на промену фенотипа ћелија јетре уочљив је шест сати након што су мишеви третирани испитиваном смешом (Графикони 1, 2 и 3). Орална примена смеше дипропил полисулфида значајно је повећала проценат активираних CD69 позитивних CD4⁺ и CD8⁺ ћелија у јетри (Графикон 1).

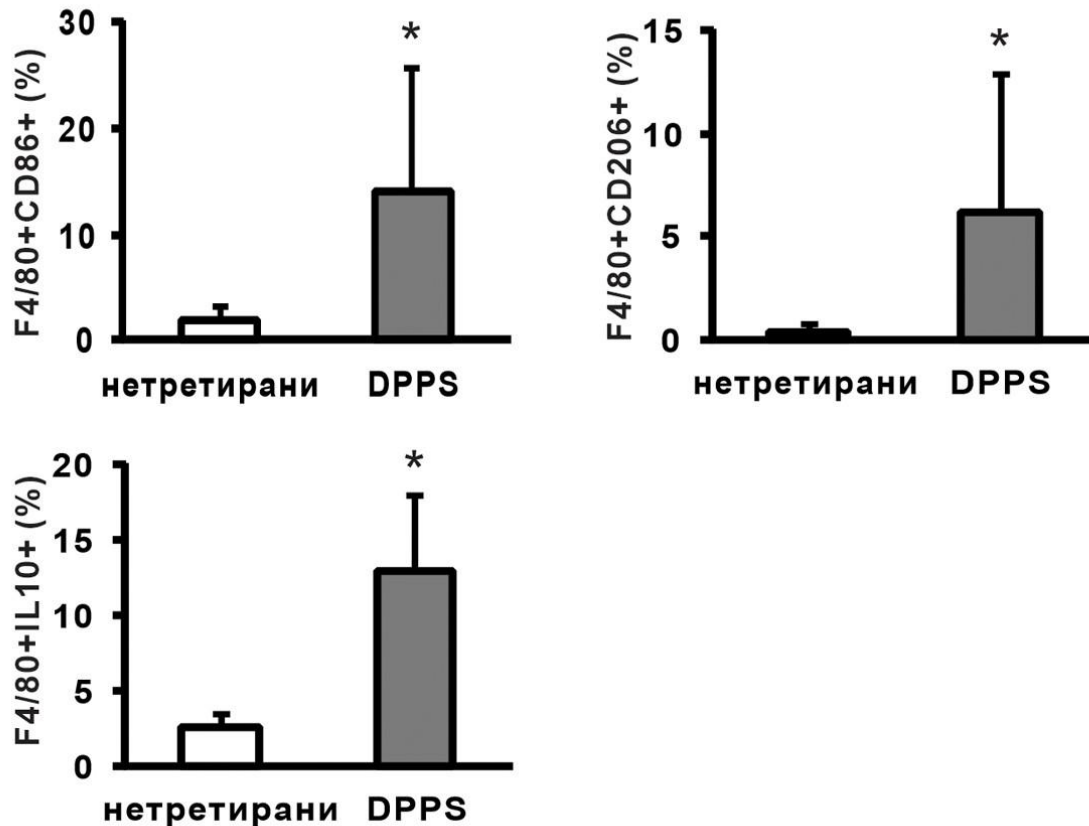
Графикон 1



Графикон 1. Процент активираних CD69 позитивних CD8+ и CD4+ ћелија одређен проточном цитометријом моноклеарних ћелија изолованих из јетри нетретираних мишева ($n = 6$) и јетри мишева третираних смешом DPPS и жртвованих 6 сати након оралне примене смеше ($n = 6$). Подаци су презентовани као средња вредност+SD (* $p < 0,05$; *two tailed, unpaired Student's t-test*)

Такође, у јетри мишева третираних смешом дипропил полисулфида детектован је и већи проценат F4/80+ макрофага који експримирају маркере класичне (CD86), али и алтернативне (CD206) активације (Графикон 2). Детектован је и значајно већи проценат регулаторних, IL-10 позитивних, макрофага (Графикон 2).

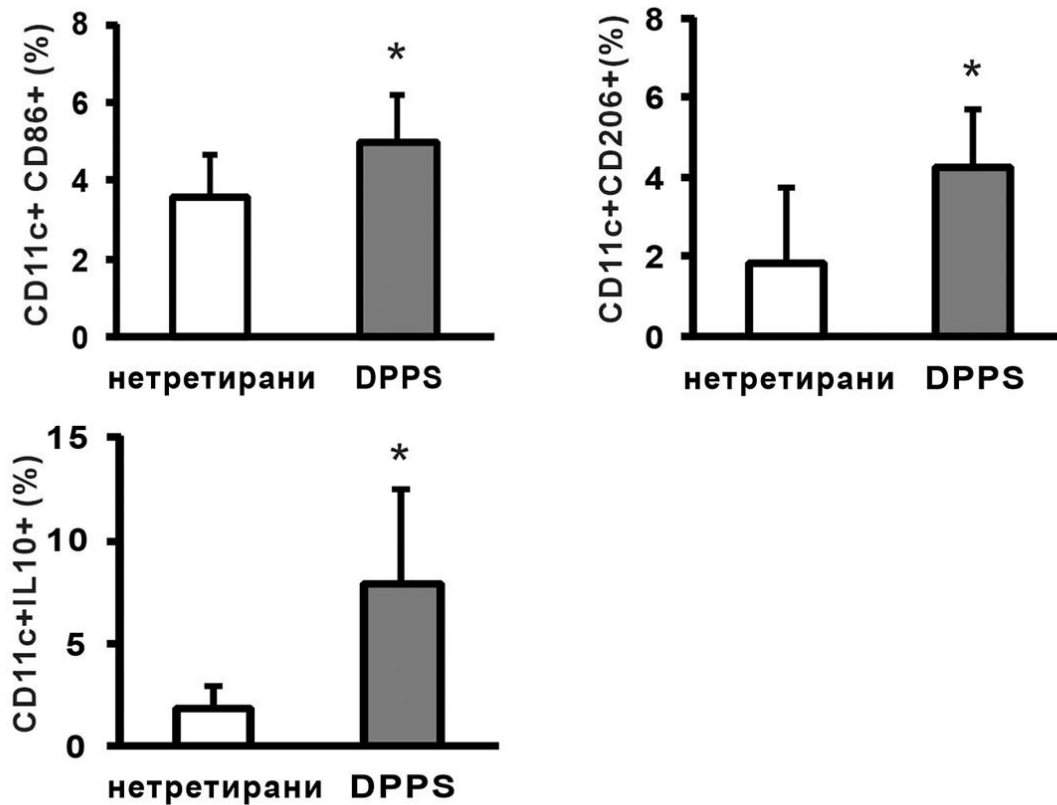
Графикон 2



Графикон 2. Процент F4/80+ макрофага који експримирају маркер класичне (CD86) и алтернативне активације (CD206) и антиинфламацијски цитокин IL-10, одређени анализом проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри нетретираних мишева (n = 6) и из јетри мишева третираних смешом DPPS и жртвованих након 6 сати (n = 6). Подаци су презентовани као средња вредност+SD (* $p < 0,05$; two tailed, unpaired Student's t-test).

Примена смеше дипропил полисулфида утиче и на фенотип дендритских ћелија. Детектован је значајно већи проценат активираних (CD86 и CD206 позитивних) CD11c+ дендритских ћелија као и дендритских ћелија које експримирају IL-10 у јетрама третираних мишева (Графикон 3).

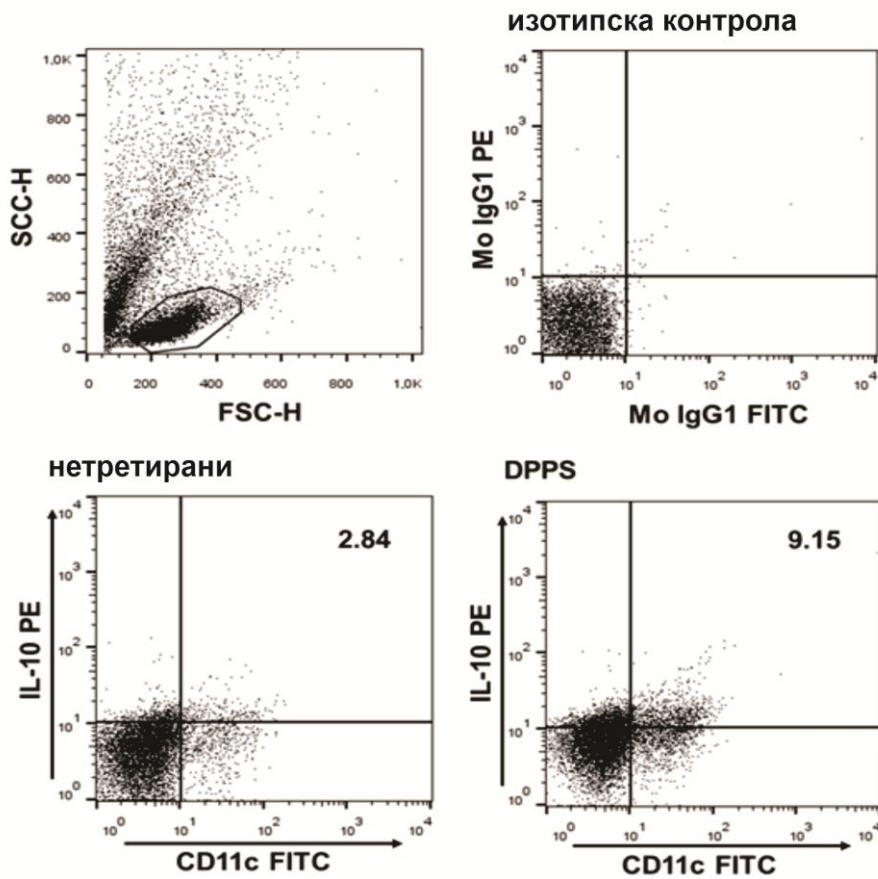
Графикон 3



Графикон 3. Процент CD11+ дендритских ћелија које експримирају маркер класичне (CD86) и алтернативне активације (CD206) и антиинфламацијски цитокин IL-10, одређени анализом проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри нетретираних мишева (n= 6) и из јетри мишева третираних смешом DPPS и жртвованих након 6 сати (n= 6). Подаци су презентовани као средња вредност+SD (* $p < 0,05$; two tailed, unpaired Student's t-test).

Стратегија гејтовања дупло позитивних CD11c+CD86+, CD11c+CD206+ и CD11c+IL-10+ ћелија је приказана на Слици 3.

Слика 3



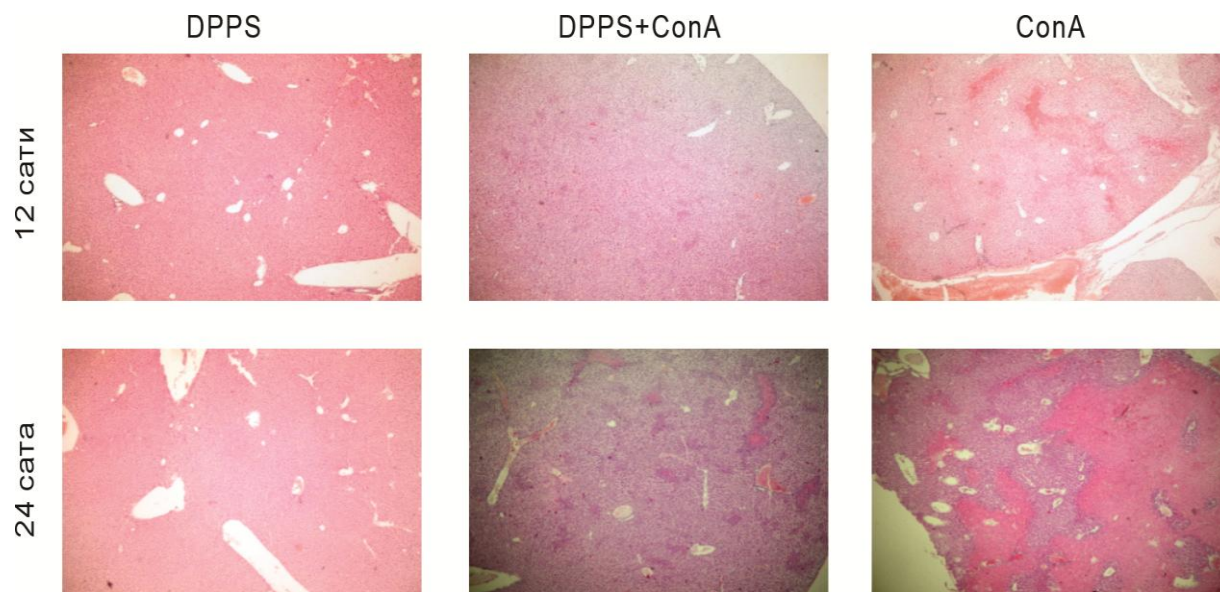
Слика 3. Стратегија гејтовања дупло позитивних CD11c+CD86+, CD11c+CD206+ и CD11c+IL-10+ ћелија.

4.2. Претретман смешом дипропил полисулфида остварује хепатопротективне ефекте у Con A хепатитису

Након што смо показали да орална примена смеше полисулфида индукује имуносупресивну средину у јетри, желели смо да испитамо потенцијални хепатопротективни ефекат ове смеше у акутном хепатитису изазваном Con A.

Наша студије је показала да мишеви који су примили једну оралну дозу смеше DPPS, а којима је шест сати након тога и.в. апликован Con A, имају значајно мање оштећење јетре (Фигура 4; Сlike 4 и 5). Јетре мишева третираних смешом DPPS имају само жаришта инфламације, 12 сати након примене Con A, што је видљиво на слици 3, док јетре мишева којима је апликован само Con A имају видљива значајна поља некрозе (Слика 4). Разлика између мишева третираних и нетретираних смешом DPPS, а којима је апликован Con A, је још видљивија 24 сата након инјектовања Con A (Слика 4). У јетрама мишева третираних смешом DPPS постоје жаришта инфламације и неколико малих жаришта некрозе, док је код нетретираних мишева могуће видети уједињена поља некрозе која обухватају већи део ткива јетре, 24 сата након инјектовања Con A (Слика 4). Није било оштећења ткива јетре у групи мишева третираних само смешом DPPS (Слика 4).

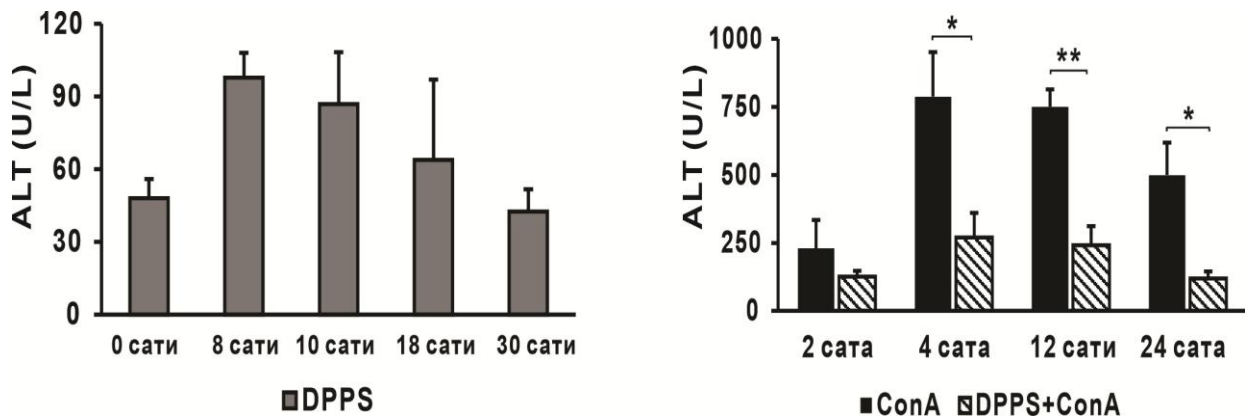
Слика 4



Слика 4. Превентивна примена смеше DPPS смањује оштећења јетре у акутном хепатитису изазваном Con A. Репрезентативни исечци јетре обојени стандардним патохистолошким бојењем (H&E) укалупљених парафином.

Као што је приказано на Графикону 4 примена само смеше DPPS није утицала на повећање концентрације ALT у серуму, али је зато анализом концентрације ALT у серуму мишева третираних овом смешом пре инјекције Con A потврђено значајно смањење оштећења јетре. Благо повећање концентрације ALT у серуму мишева код којих је примењена само смеша DPPS уочљива је 8 и 10 сати након третмана овом смешом, са враћањем на базални ниво након 18 сати (Графикон 4). Концентрација ALT у серуму је значајно мања у групи мишева третираних смешом DPPS у односу на нетретиране мишеве 4, 12 и 24 сата након инјектовања Con A (Графикон 4).

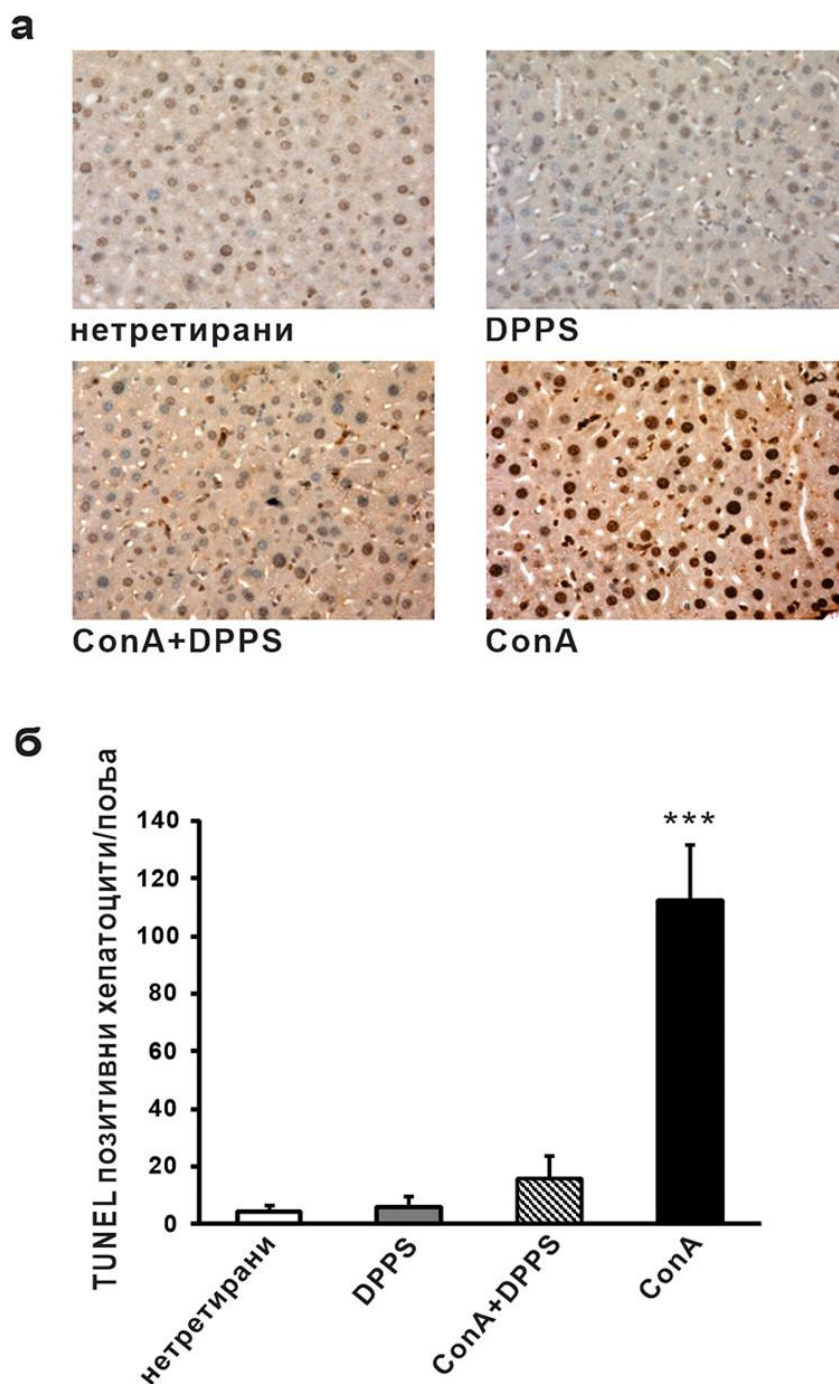
Графикон 4



Графикон 4. Претретман смешом DPPS значајно смањује концентрацију ALT у серуму. Концентрација аланин трансферазе одређена у серуму мишева 2, 4, 12 и 24 сата након инјектовања Con A ($n = 7$ у свакој групи) презентована као средња вредност+SD (** $p < 0,005$; * $p < 0,05$; two tailed, unpaired Student's t-test).

За детаљнију анализу ефеката смеше DPPS на оштећење јетре изазвано Con A, коришћен је TUNEL есеј. Као што је показано на Графикону 5, у јетрама мишева третираних смешом DPPS уочљив је мањи број TUNEL позитивних (браон једра) хепатоцита у односу на јетре нетретираних мишева, шест сати након инјектовања Con A. У јетрама мишева третираних само смешом DPPS није уочено повећање броја хепатоцита са кондензацијом једра (Графикон 5а). Превентивна примена смеше DPPS значајно ($p < 0,001$) смањује број TUNEL позитивних хепатоцита у групи мишева третираних Con A (Графикон 5б).

Графикон 5

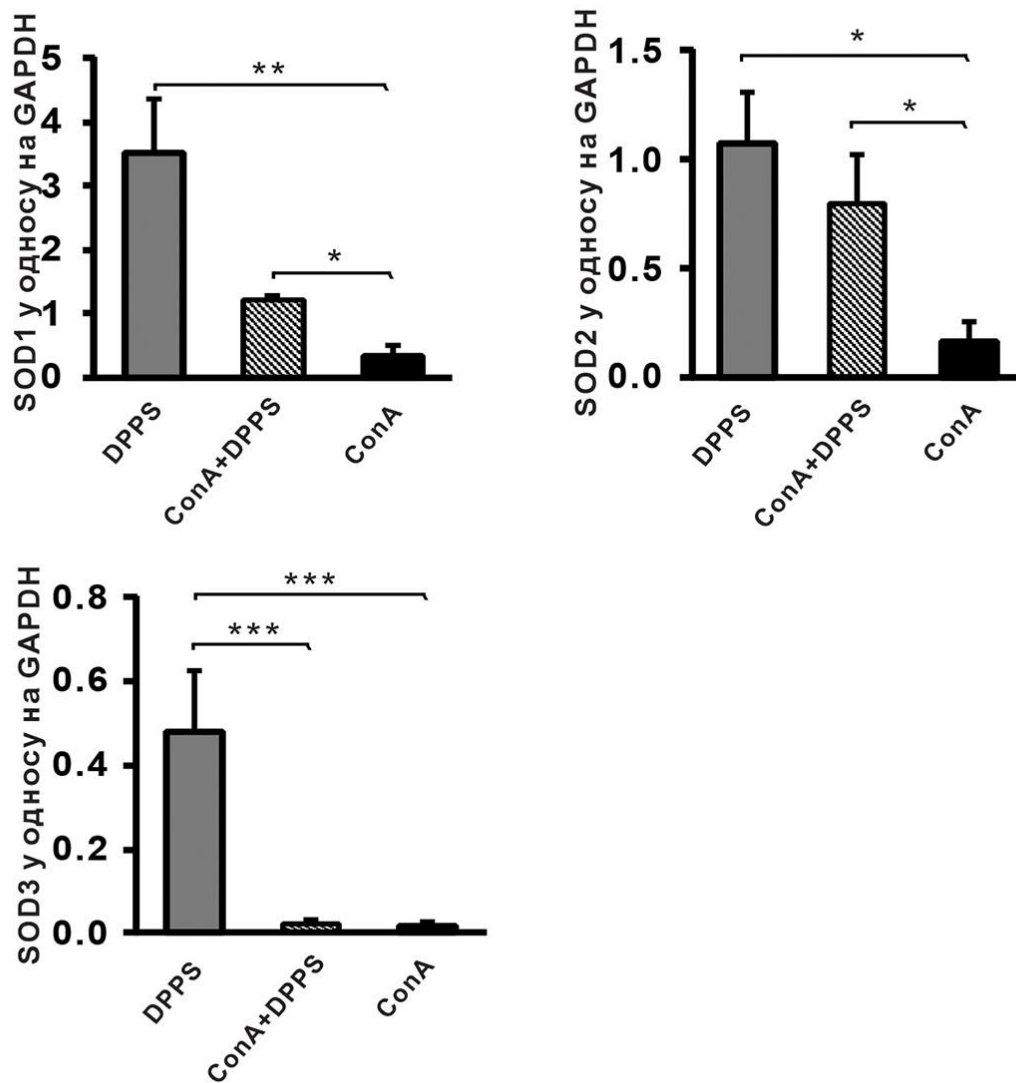


Графикон 5. Смеша дипропил полисулфида супримира смрт хепатоцита изазвану интравенском применом Con A. а) репрезентативни исечци јетре обојени TUNEL методом 6 h након апликације Con A и б) квантитативна анализа броја апоптотичних хепатоцита: TUNEL-позитивна једра (браон) су избројена у пет насумичних поља и подаци су сумирани као средња вредност позитивних ћелија +SD (** $p < 0,005$; ANOVA).

Како је смањена експресија индуцибилне азот оксид синтетазе (енгл. *inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS)[182] и комплекса NADPH оксидазе[183] (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH oxidase complex) услед примене органосумпорних једињења повезана са антиинфламацијским и заштитним ефектом на ткива, док је спречавање инфламацијског процеса повезано са повећаним присуством супероксид дисмутазе [184], анализирали смо експресију ових ензима у јетрама мишева третираних смешом DPPS.

Експресија интрацелуларних антиоксидативних ензима SOD1 ($p < 0,01$) и SOD2 ($p < 0,05$) као и екстрацелуларног SOD3 ($p < 0,001$) у ткиву јетре мишева превентивно третираних смешом DPPS је значајно већа у односу на експресију ових ензима у ткиву јетре мишева који су примили само Con A, 8 сати након инјектовања Con A (Графикон 6). Значајно већа ($p < 0,05$) експресија (иРНК) ензима SOD1 и SOD2 детектована је у јетрама мишева третираних смешом DPPS а затим и Con A у односу на групу мишева која је третирана само Con A, док није пронађена повећана експресија ензима SOD3 (Графикон 6).

Графикон 6

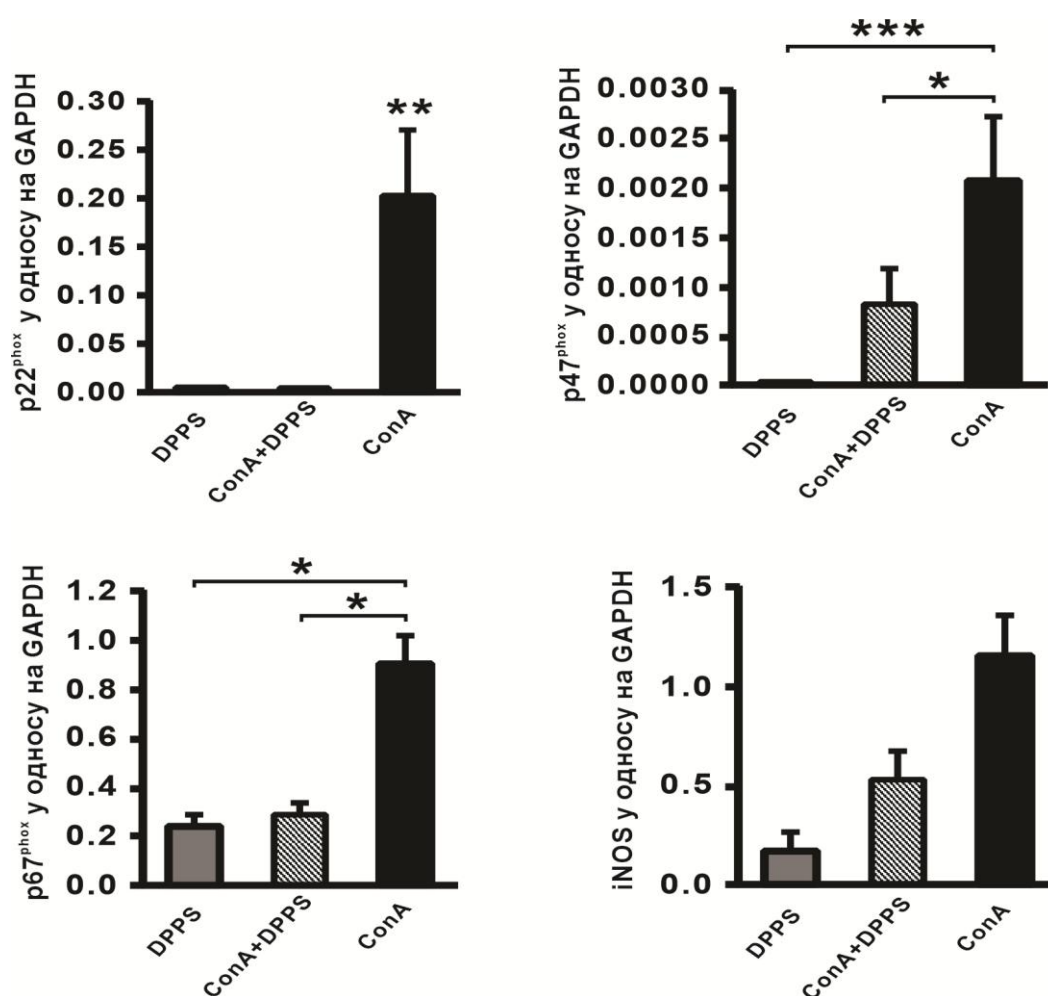


Графикон 6. Претретман мешом DPPS значајно повећава експресију антиоксидативних ензима у јетри мишева са Con A хепатитисом. Експресија ензима SOD1, SOD2 и SOD3, ниво иРНК, у јетри одређена је квантитативном *real-time* qRT-PCR методом, 8 сати након апликације Con A (n= 5). GAPDH је коришћен као унутрашња контрола. Подаци су приказани као средња вредност+SE (***) <math><0,001</math>; **) <math><0,005</math>; *) <math><0,05</math>; *Kruskal-Wallis test*).

Након тога смо анализирали ефекат превентивне примене смеше DPPS на ниво иРНК неколико форми комплекса NADPH оксидазе, p27^{phox}, p47^{phox}, p65^{phox} и iNOS у ткиву јетре.

Као што је показано на Графикону 7 превентивна примена смеше DPPS значајно је смањила експресију ензима комплекса NADPH оксидазе, p27^{phox}, p47^{phox} и p65^{phox} у ткиву јетре. Овај ефекат на ензиме који учествују у фагоцитози анализиран је у јетрама 8 сати након инјектовања Con A. Експресија iNOS је такође смањена у јетрама мишева који су превентивно примили смешу DPPS у односу на мишеве који су примили само Con A, међутим ова разлика није статистички значајна (Графикон 7).

Графикон 7

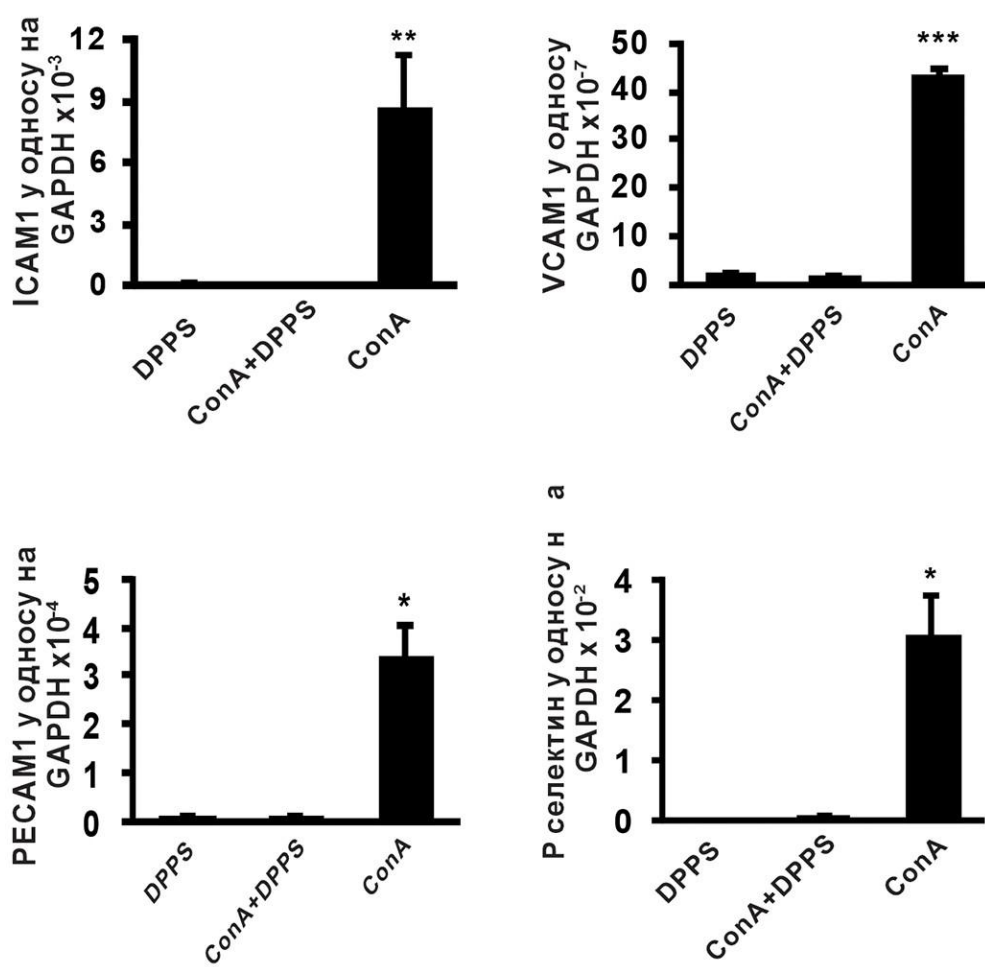


Графикон 7. Претретман смешом DPPS значајно смањује експресију оксидативних ензима у јетри мишева са Con A хепатитисом. Експресија p27^{phox}, p47^{phox}, p65^{phox} и iNOS, ниво иРНК у јетри одређена *real-time* qRT-PCR методом са GPDH као унутрашњом контролом, 8 сати након апликације Con A (n= 5). Подаци су приказани као средња вредност+SE (***)p < 0,001; **p <0,005; *p <0,05; *Kruskal-Wallis test*).

4.3. Смеша дипропил полисулфида делује антиинфламацијски у јетри мишева са Соп А хепатитисом

Познато је да повећана експресија адхезионих молекула има кључну улогу у инфламацијским процесима као и у хепатитису изазваном Соп А [184]. Због тога смо анализирали експресију иРНК адхезионих молекула ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 и P-селектина у јетрама мишева којима је превентивно апликована смеша DPPS пре апликације Соп А, у групи мишева којима је апликован само Соп А и у групи мишева који само примили дозу DPPS. Као што је показано на Графикону 8, ниво иРНК свих тестираних гена је значајно смањен превентивним третманом смеше DPPS. Осим тога, експресија ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 и P-селектина у јетрама мишева који су третирани најпре DPPS-ом а затим и Соп А, није била већа у поређењу са експресијом иРНК ових молекула у јетрама мишева третираних само смешом DPPS (Графикон 8).

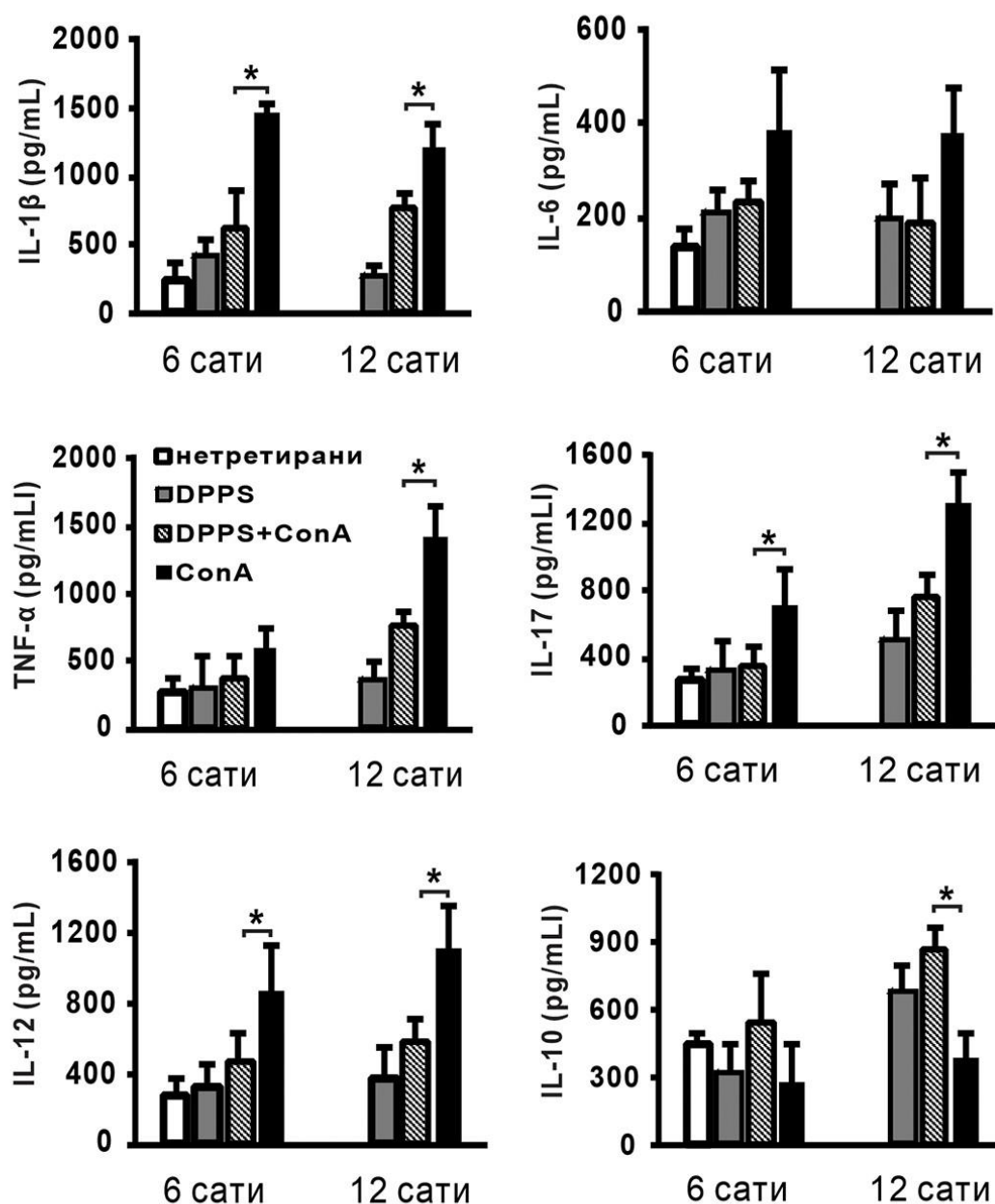
Графикон 8



Графикон 8. Претретман смешом DPPS значајно смањује експресију адхезионих молекула у јетри мишева са Con A хепатитисом. Експресија иРНК ICAM1, VCAM1, PECAM1 и P селектина у јетрама одређена *real-time* qRT-PCR методом са GAPDH као контролом, 8 сати након инјектовања Con A (n= 5) презентована као средња вредност+SE SE (***p <0,001; **p <0,005; *p <0,05; ANOVA test).

С обзиром на то да инјектовање Соп А прати значајна продукција инфламацијских цитокина у јетри (5), испитали смо како примена смеше DPPS утиче на концентрацију (про)инфламацијских цитокина и антиинфламацијског цитокина IL-10 у хомогенатима ткива јетре. Ефекат на продукцију цитокина смо испитивали 6 и 12 сати након инјектовања Соп А (Графикон 9). Примена смеше DPPS није утицала на продукцију IL-6 у јетри (Графикон 9). Продукција IL-1 β , IL-12 и IL-17 је значајно смањена у јетрама мишева превентивно третираних смешом DPPS. Забележили смо и значајну продукцију TNF- α у јетри, 12 сати након инјектовања Соп А. Превентивна примена смеше DPPS значајно је редуковала продукцију овог цитокина (Графикон 9). Са друге стране, превентивна примена смеше DPPS значајно је повећала продукцију антиинфламацијског цитокина IL-10 у јетрама мишева третираних Соп А (Графикон 9). IL-10 је важан за индукцију толеранције у Соп А хепатитису [95]. Осим тога, примена само смеше DPPS значајно је повећала продукцију IL-10 у поређењу са групом нетретираних мишева (Графикон 9).

Графикон 9



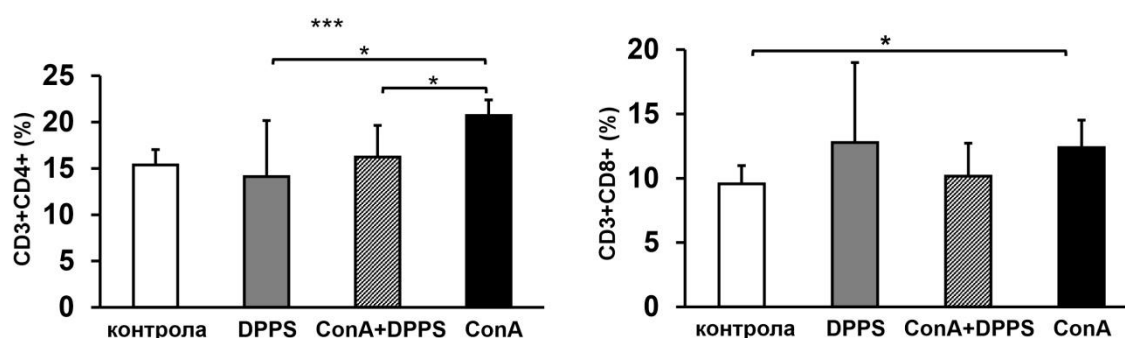
Графикон 9. Претретман смешом DPPS значајно смањује концентрацију инфламацијских цитокина у хомогенатима јетре мишева са Con A хепатитисом. Концентрације IL-1β, IL-6, IL-12, IL-17, TNF-α и IL-10 у хомогенатима ткива јетре 6 и 12 сати након апликације Con A одређене су ELISA методом и презентоване као средња вредност+SD (*p < 0,05; ANOVA test).

4.4. Смеша полисулфида повећава проценат регулаторних Т лимфоцита и смањује проценат ћелија које продукују IL-17 у јетри

Примена Con A регрутује инфламацијске лимфоците у јетру, који посредством проинфламацијских цитокина изазивају оштећење хепатоцита [11]. Анализом моноклеарних ћелија проточном цитометријом, анализирали смо утицај дипропил полисулфида на процентуалну заступљеност CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита, ћелија које имају кључну улогу у патогенези Con A хепатитиса.

На Графикону 10 се уочава да је проценат CD4⁺ Т лимфоцита статистички значајно мањи у јетри у групи мишева који су пре примене Con A примили и дипропил полисулфид у поређењу са групом мишева којима је апликован само Con A. Штавише, у групи мишева која је примила дипропил полисулфид пре Con A у јетри није уочен пораст процента CD4⁺ и Т лимфоцита у односу на групу нетретираних мишева (Графикон 10). Такође сама примена дипропил полисулфида не утиче на процентуалну заступљеност CD4⁺ и Т лимфоцита у јетри (Графикон 10). Процент CD8⁺ Т лимфоцита је мањи у јетри мишева који су пре примене Con A примили и дипропил полисулфид у поређењу са групом мишева којима је апликован само Con A, али та разлика није статистички значајна (Графикон 10). Значајно је повећан проценат CD8⁺ Т лимфоцита у јетри Con A мишева у поређењу са групом нетретираних мишева (Графикон 10).

Графикон 10

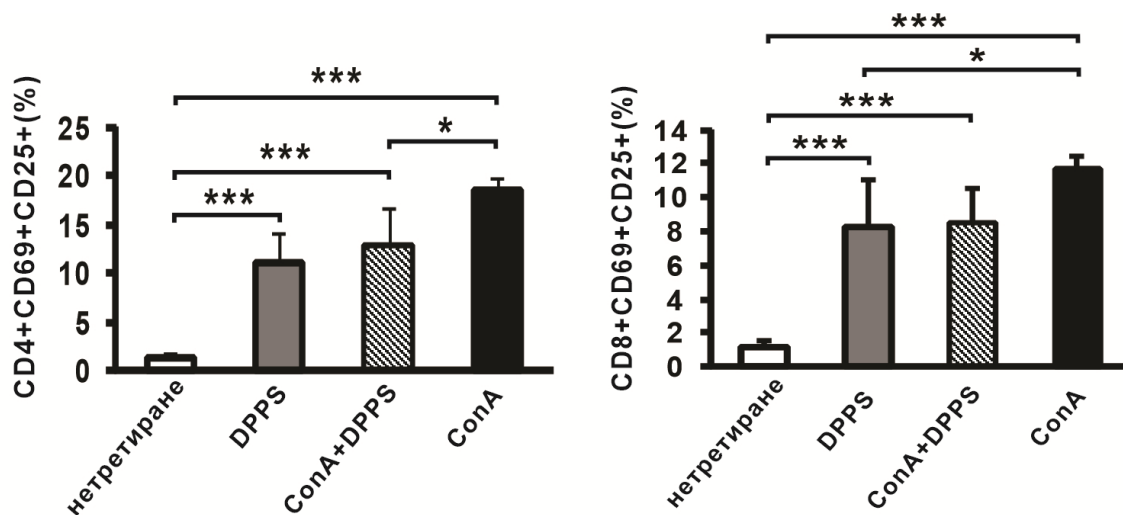


Графикон 10. Претретман смешом DPPS значајно смањује проценат CD4⁺ Т лимфоцита у јетри мишева са Con A хепатитисом. Приказан је проценат активираних CD3+CD4⁺ и CD3+CD8⁺ Т лимфоцита одређених проточном цитометријом моноклеарних ћелија изолованих из јетри, 8 сати након апликације Con A (n=6). Подаци су приказани као средња вредност+SD (***p <0,001; *p <0,05; ANOVA est).

Испитали смо и ефекат примене смеше DPPS на профил инфламацијских ћелија у јетри.

Као што је показано на Графикону 11 значајно је повећан проценат активираних лимфоцита у јетрама мишева третираних смешом DPPS, чак и 14 сати након третмана DPPS. Процент активираних CD25+CD69+CD8+ ћелија је сличан у групи мишева третираних смешом DPPS, третираних смешом DPPS и Con A и третираних само Con A, док је проценат активираних CD25+CD69+CD4+ ћелија значајно већи у групи мишева третираних само Con A у поређењу са групом мишева којима је апликован дипропил полисулфид пре интравенске инјекције Con A (Графикон 11).

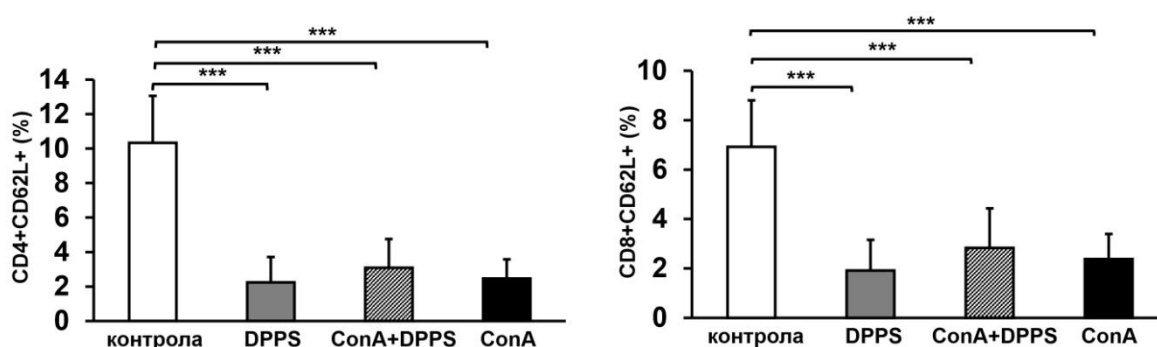
Графикон 11



Графикон 11. Претретман смешом DPPS значајно смањује проценат активираних CD4+ ћелија у јетри мишева са Con A хепатитисом. Приказан је проценат активираних CD25+CD69+ CD4+ и CD8+ ћелија одређених проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри, 8 сати након апликације Con A (n=6). Подаци су приказани као средња вредност+SD (***p < 0,001; *p < 0,05; ANOVA test).

Такође, орална примена смеше дипропил полисулфида значајно смањује проценат наивних CD4+CD62L+ и CD8+CD62L+ ћелија у јетри мишева (Графикон 12). На Графикону 12 који приказује проценте наивних CD4+ и CD8+ ћелија уочава се „слика у огледалу“ Графикона 11. Проценти наивних CD4+ и CD8+ ћелија су слични у обе групе мишева које су примале дипропил полсисулфид и у групи мишева који су примали само Con A и значајно су мањи у поређењу са процентима наивних CD4+ и CD8+ ћелија у групи нетретираних мишева (Графикон 12).

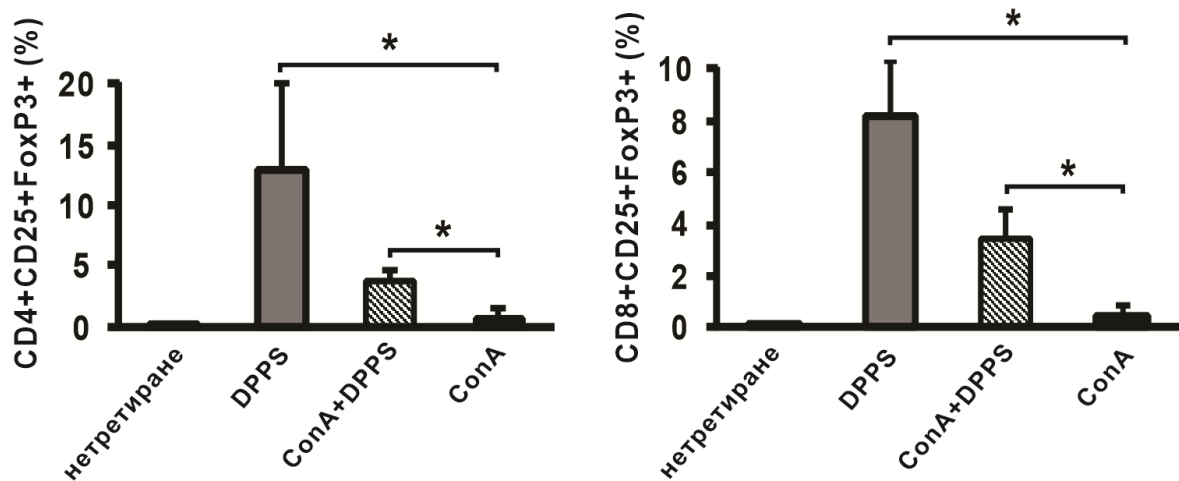
Графикон 12



Графикон 12. Третман смешом DPPS значајно смањује проценат наивних CD4+ и CD8+ ћелија у јетри мишева. Приказан је проценат наивних CD4+CD62L+ и CD8+CD62L+ ћелија одређених проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри, 8 сати након апликације Con A (n=6). Подаци су приказани као средња вредност+SD (***p < 0,001; ANOVA test).

Како је уочено да је у јетрама мишева са Con A хепатитисом који су претретирани смешом дипропил полисулфида већа заступљеност активираних CD4+ и CD8+ ћелија, ћелија које играју значајну улогу у патогенези ове експерименталне болести, даље је анализиран фенотип ових ћелија. Даље је показано да је примена смеше DPPS значајно повећала проценат регулаторних CD4+CD25+FоxP3+ и CD8+CD25+FоxP3+ ћелија у јетри (Графикон 13). Процент регулаторних лимфоцита је значајно већи у јетрама мишева који су превентивно третирани смешом DPPS у поређењу са групом мишева третираних само Con A (Графикон 13). Није уочена значајна разлика у проценту регулаторних лимфоцита у јетри међу групама мишева третираних само смешом DPPS и групе мишева третираних смешом DPPS а затим и Con A (Графикон 13).

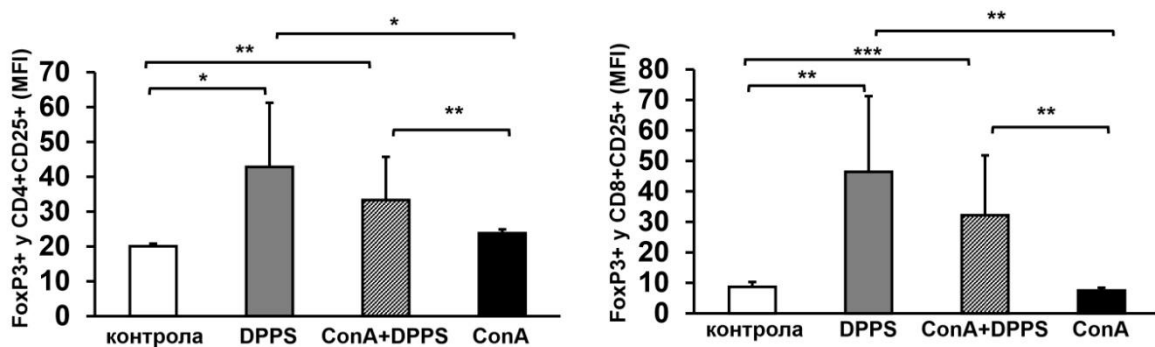
Графикон 13



Графикон 13. Третман смешом DPPS значајно повећава проценат регулаторних CD4+ и CD8+ ћелија у јетри мишева са Con A хепатитисом. Приказан је проценат регулаторних CD25+FоxP3+CD4+ и CD25+FоxP3+CD8+ ћелија одређених проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри, 8 сати након апликације Con A (n= 6). Подаци су приказани као средња вредност+SD (*p < 0,05; ANOVA test).

Даљом анализом је показана статистички значајно већа експресија FoxP3 молекула (изражена као MFI, *mean fluorescence intensity*) у популацији CD4+CD25+ и CD8+CD25+ ћелија у јетри у групама мишева који су третирани смешом дипропил полисулфида (и група DPPS и група DPPS+Con A) у поређењу са нетретираним и мишевима са Con A хепатитисом (Графикон 14). Међу групама DPPS и DPPS+Con A нема статистички значајне разлике у експресији FoxP3 молекула у обе испитиване популације ћелија, CD4+CD25+ и CD8+CD25+ (Графикон 14). Дакле, смеша дипропил полисулфида примењена орално не само да повећава проценат регулаторних ћелија у јетри (Графикон 13), него повећава и експресију транскрипционог фактора FoxP3 у регулаторним ћелијама и тако појачава супресивне функције регулаторних ћелија [185].

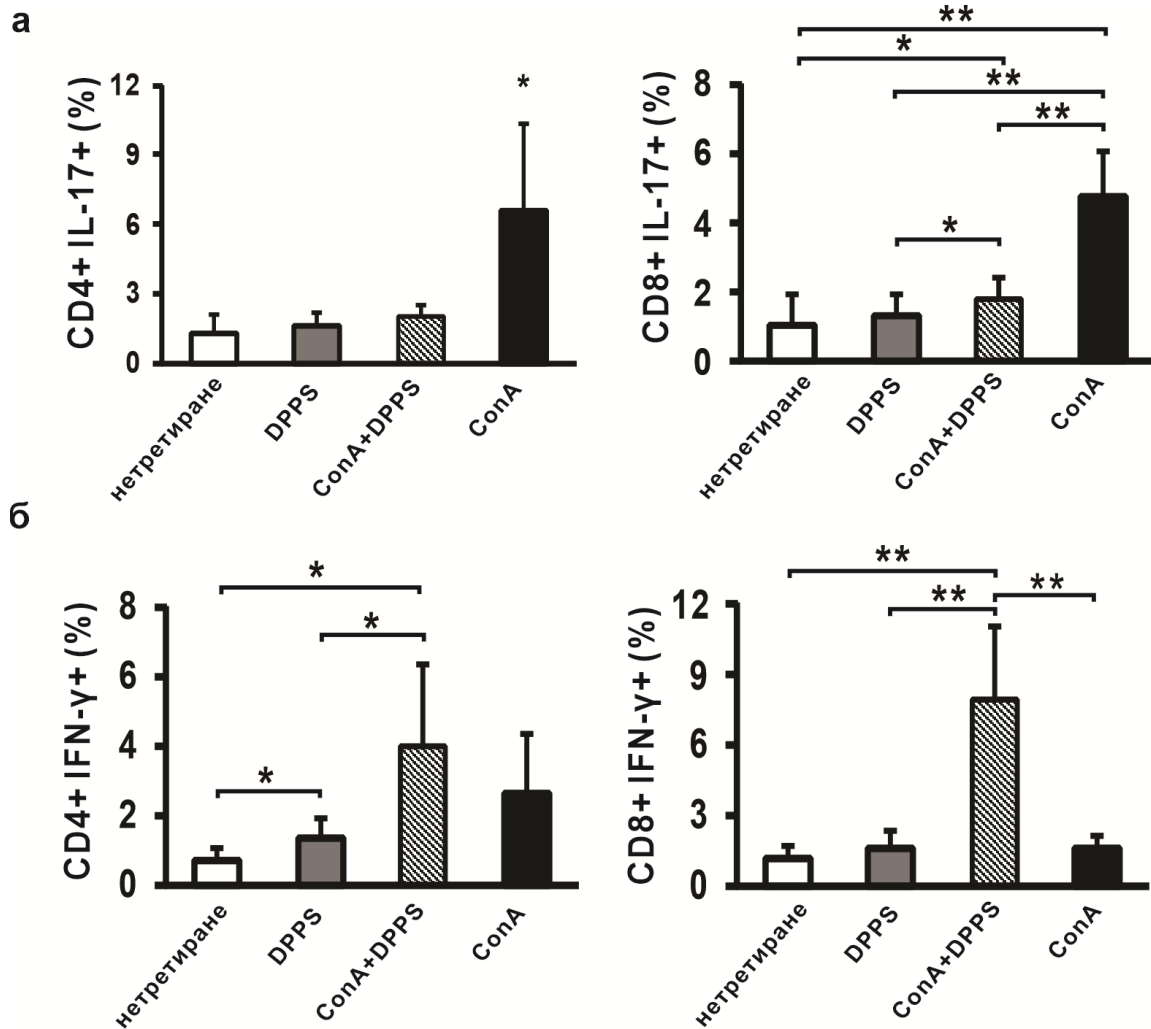
Графикон 14



Графикон 14. Третман смешом DPPS значајно повећава експресију FoxP3 у регулаторним ћелијама у јетри мишева. Приказана је експресија FoxP3, изражена као MFI, *mean fluorescence intensity* у популацији CD4+CD25+ и CD8+CD25+ ћелија одређених проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри, 8 сати након апликације Con A (n= 6). Подаци су приказани као средња вредност+SD (*p < 0,05; ANOVA test).

Превентивна примена смеше DPPS значајно је смањила проценат CD4+ и CD8+ ћелија које експримирају IL-17 (Графикон 15a), док је повећала проценат INF- γ позитивних CD4+ и CD8+ ћелија (Графикон 15б) у јетри, 8 сати након инјектовања Con A.

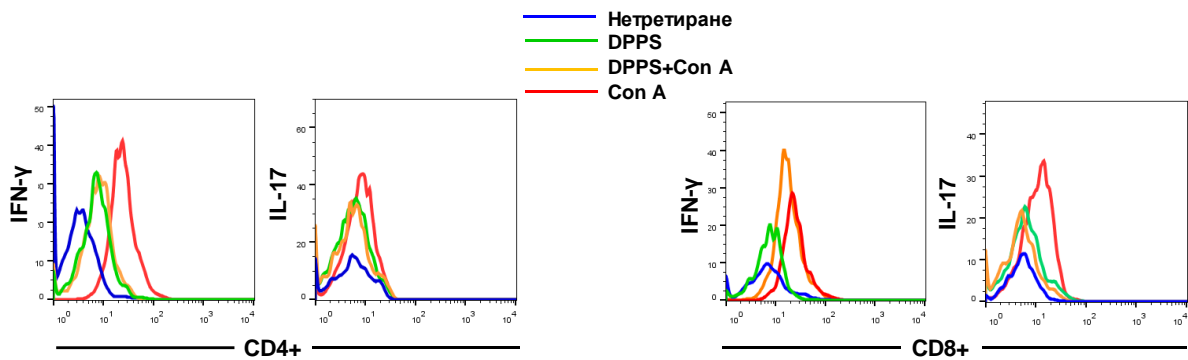
Графикон 15



Графикон 15. Претретман смешом DPPS значајно смањује проценат инфламацијских CD4+ и CD8+ ћелија у јетри мишева са Con A хепатитисом. Процент активираних IL-17+ (a) и INF- γ + (б) CD4+ и CD8+ ћелија одређених проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри, 8 сати након апликације Con A (n= 6). Подаци су приказани као mean+SD (**p < 0,005; *p < 0,05; ANOVA test).

Експресија инфламацијских цитокина IFN- γ и IL-17 у оквиру CD4+ и CD8+ популација ћелија у јетри је такође смањена у групи мишева третираних смешом дипропил полисулфида пре инјекције Con A (Слика 5).

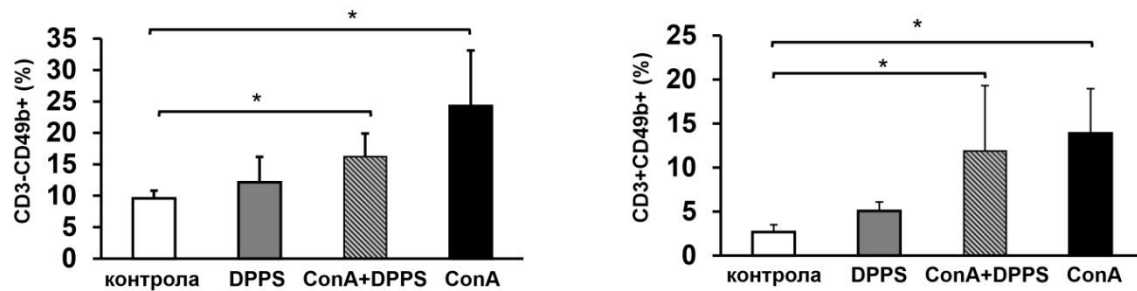
Слика 5



Слика 5. Експресија инфламацијских цитокина у популацији CD4+ и CD8+ ћелија смањена је у јетрама мишева третираних дипропил полисулфидом. Репрезентативни хистограми приказују експресију инфламацијских цитокина IFN- γ и IL17+ у оквиру популација CD4+ CD8+ ћелија.

Као што је наведено у уводу, у патогенези Con A хепатитиса одређену улогу играју и NK, а нарочито NKT ћелије, па је даље анализирано да ли смеша дипропил полисулфида примењена пре апликације Con A делује и на заступљеност и карактеристике ових ћелија у јетри. Резултати овог истраживања указују да смеша DPPS не утиче на процентуалну заступљеност NK и NKT ћелија у јетри (Графикон 16). Процент и NK и NKT ћелија је значајно већи и у јетрама мишева третираних само конканавалином А и у групи мишева који су пре инјекције Con A третирани смешом дипропил полисулфида у поређењу са групом нетретираних мишева (Графикон 16). Процент NK ћелија у јетри мањи је у групи DPPS+Con A у поређењу са групом Con A, али та разлика није статистички значајна.

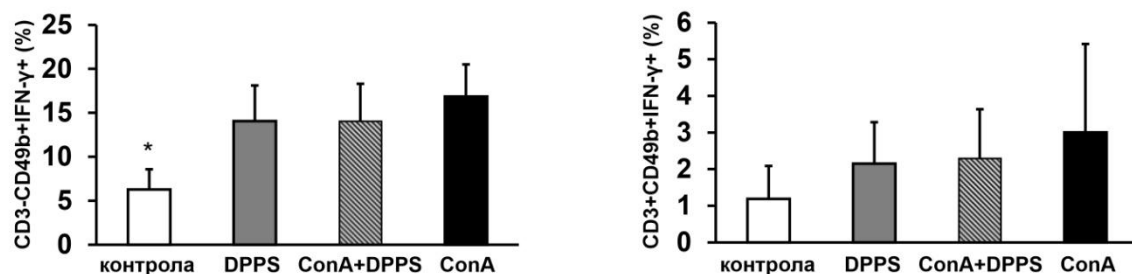
Графикон 16



Графикон 16. Претретман смешом DPPS не мења проценат НК и NKT ћелија у јетри мишева са Con A хепатитисом. Процент НК и NKT ћелија одређен проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри, 8 сати након апликације Con A (n= 6). Подаци су приказани као mean+SD (*p < 0,05; ANOVA test).

Даљом анализом фенотипа интрахепатичних НК и NKT ћелија није уочена значајна разлика у проценту ових ћелија које експримирају IFN- γ међу претходно наведеним групама мишева (Графикон 17).

Графикон 17



Графикон 17. Претретман смешом DPPS не мења проценат инфламацијских НК и NKT ћелија у јетри мишева са Con A хепатитисом. Процент IFN- γ позитивних НК и NKT ћелија одређен проточном цитометријом мононуклеарних ћелија изолованих из јетри, 8 сати након апликације Con A (n= 6). Подаци су приказани као mean+SD.

5. ДИСКУСИЈА

У досадашњим студијама показани су хепатопротективни ефекти различитих органосумпорних једињења, као и различитих форми екстракта биљака из рода *Allium* које су богате органосумпорним једињењима, у различитим моделима оштећења јетре, токсинима, хемијским супстанцама, цитостатицима, исхемијско/реперфузионим повредама. У овим студијама испитивана су различита ОСЈ, најчешће различите форме алил сулфида, али података о могућим протективним ефектима пропил сулфида у обољењима јетре нема. Позната је антиоксидантна активност ОСЈ [126], [128], [157], [175], [176] а показана је и антиинфламацијска активност пропил сулфида у култури макрофага [129].

Како је познато да број атома сумпора у молекулу ОСЈ утиче на биолошку активност и да повећање броја атома сумпора значајно повећава јачину активности [128], [171], [177], [178], наш циљ је био да по први пут испитамо ефекте новосинтетисане смеше дипропил полисулфида [34] у моделу фулминантног хепатитиса који се развија код мишева након интравенске инјекције Cop A и у чијој основи су имунски механизми.

5.1. Превентивна примена дипропил полисулфида смањује експресију адхезионих молекула у јетри мишева са Cop A хепатитисом

Наши резултати показују да превентивна примена смеше DPPS, 6 сати пре инјекције Cop A, значајно смањује ниво ALT-а у серуму, инхибира смрт хепатоцита и значајно смањује оштећење јетре. Превентивна примена смеше DPPS значајно смањује ниво иРНК адхезионих молекула као што су ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 и P-селектина, као и концентрацију инфламацијских цитокина у хомогенатима јетре, а повећава концентрацију антиинфламацијског IL-10 у јетри. Резултати указују и на то да смеша DPPS у јетри повећава проценат активираних лимфоцита чији је фенотип регулаторни, док снижава проценат инфламацијских CD4⁺ и CD8⁺ ћелија. Испитивана смеша такође смањује експресију ензимског комплекса NADPH оксидазе и повећава експресију SOD ензима у јетри. Овакви резултати указују на то да смеша дипропил полисулфида има протективни ефекат у хепатитису изазваном Cop A (Схема 6).

Интравенска администрација Cop A, митогена Т лимфоцита, снажно стимулише инфлукс лимфоцита у јетру мишева, што за последицу има масивну некрозу јетре [35]. Овако настали хепатитис је мишји модел акутног или фулминантног оштећења јетре посредованог ћелијама имунског система [1, 2]. Експресија адхезионих молекула је рани догађај у инфламацијској каскади која промовише атракцију, адхеренцију и субендотелну миграцију мононуклеара. Адхезиони молекули имају важну улогу у развоју инфламацијског и имунског одговора у јетри мишева након апликације Cop A. Студије на ICAM-1 нокаут мишевима показале су да ICAM-1 учествује у патогенези Cop A хепатитиса и то тако што регулише инфилтрацију јетре леукоцитима и даљу

продукцију цитокина [36]. Сличан резултат је показан и за Р-селектин, јер мишеви са дефицијенцијом Р-селектина развијају значајно блажи облик Соп А хепатитиса [37]. Експресија VCAM-1 је значајно повећана код мишева који развијају хепатитис након инјектовања Соп А [38], док је улога PECAM-1 у трансмиграцији леукоцита током инфламације јетре добро позната [39].

У овој студији показали смо да смеша различитих DPPS значајно смањује експресију ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 и Р-селектина на нивоу иРНК (Графикон 8). Наши резултати су у складу са другим студијама које показују да је смањена експресија адхезионих молекула у јетрама мишева третираних различитим супстанцама које ублажавају оштећење јетре изазвано Соп А [40-42].

Наши резултати су такође у складу са резултатима студије у којој је испитиван имуномодулацијски ефекат алицина, органосумпорног једињења које се налази у белом луку, у којој је показано да алицин смањује оштећење јетре изазвано Соп А, а да је то праћено инхибицијом адхезије Т лимфоцита за екстрацелуларни матрикс и ендотелне ћелије и смањењем експресије адхезионих молекула ICAM-1 и VCAM-1 у јетри [172].

Такође, у складу са нашим резултатима је налаз студије *Hobauer*-а и сарадника који су показали да екстракт белог лука инхибира миграцију леукоцита кроз слој ендотелних ћелија *in vitro* [186]. Показано је и да орално примењен уљани раствор белог лука спречава интестинално оштећење изазвано ендотоксином и то тако што супримира експресију ICAM-1 у инфламацијским лезијама што за последицу има смањену активацију и инфлукс неутрофила у запаљенско подручје [187].

5.2. Превентивна примена дипропил полисулфида смањује концентрацију инфламацијских citoкина у јетри мишева са Соп А хепатитисом

У складу са смањеном експресијом адхезионих молекула у јетрама мишева третираних смешом дипропил полисулфида пре примене Соп А, у хомогенатима јетре ових мишева детектована је и смањена концентрација инфламацијских цитокина IL-1 β , TNF- α , IL-12 и IL-17 (Графикон 9). Оштећење јетре изазвано Соп А је повезано са ослобађањем великих количина проинфламацијских цитокина који изазивају оштећење хепатоцита, њихову апоптозу и некрозу [43-46]. Међу овим цитокинима, TNF- α и IL-1 β могу бити кључни медијатори у развоју хепатитиса изазваног Соп А. Показано је да су TNF- α дефицијентни мишеви [4] као и мишеви код којих недостаје ген који кодира NLRP3 и каспазу-1, а који последично не продукују IL-1 β [43] скоро потпуно заштићени од оштећења јетре узрокованог интравенском применом Соп А. Претходна студија показује да органосумпорно једињење белог лука, алицин, смањује продукцију TNF- α и експресију адхезионих молекула у хепатитису изазваног Соп А и на тај начин умањује оштећење јетре [47]. Наши резултати су у складу са претходним студијама, јер превентивна примена смеше DPPS значајно смањује концентрацију TNF- α и IL-1 β у јетрама мишева третираних Соп А (Графикон 9), експресију адхезионих молекула (Графикон 8) и на тај начин смањује оштећење јетре (Слика 4, Графикони 4 и 5).

5.3. Смеша дипропил полисулфида смањује експресију оксидативних, а повећава експресију антиоксидативних ензима у јетри мишева са Соп А хепатитисом

Купферове ћелије, неутрофили и хепатоцити у хепатитису индукованом Соп А продукују супероксид, молекула који промовише продукцију инфламацијских цитокина и апоптозу хепатоцита [188]. Главни извор реактивних врста кисеоника су реакције посредоване комплексом ензима NADPH оксидазе, који се састоји од најмање шест субјединица, мембранских $gp91^{phox}$ и $p22^{phox}$ хомодимера и цитоплазматских $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ и $p67^{phox}$ [69]. SOD је ензим који има улогу *scavenger*-а (скупљача) супероксидних анјона, та тако игра главну улогу у одржавању баланса између оксидације и антиоксидације (инхибиције оксидације) и заштите ћелија од оштећења.

У до сада објављеним студијама је показано да органосумпорна једињења DATS, DADS и DAS индукују експресију антиоксидативних ензима (ензима II фазе) *heme oxygenase-1* (HO-1) и *NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1* (NQO1) у хуманим епителним ћелијама црева [189] као и у хуманим ћелијама хепатома, HepG2, и то нарочито DATS, а да те ефекте остварују активацијом ARE (енгл. *Antioxidant Response Element*) и акумулацијом протеина Nrf2 (енгл. *Nuclear Erythroid 2-related Factor 2*) [190]. Показано је и да антиоксидативни потенцијал OCL зависи од броја атома сумпора, да је већи што је број атома сумпора у једињењу већи (DATS > DADS > DAS) [189]. Иако је ефекат алил сулфида на NQO1 потврђен у више студија, исти ефекат није показан за њихове засићене деривате, пропил сулфиде, DPDS и DPS [155]. Liu и сарадници су такође показали да DADS и DATS супримирају експресију ензима iNOS и на нивоу протеина, и на нивоу иРНК као и продукцију NO, након стимулације макрофага липополисахаридом, највероватније инхибирајући активацију NF- κ B [191] [192].

Уљани раствор белог лука, DATS, ајоен и алицин директно активирају флуks Ca^{2+} у неутрофиле и инхибирају спонтану и стимулисану продукцију реактивних једињења кисеоника у неутрофилима [193].

Показана је и значајна способност DPDS да скупља реактивна једињења кисеоника у HL-60 и HepG2 ћелијама и да тако супримира апоптозу ових ћелија [194].

У овој студији смо показали да превентивна примена смеше DPPS значајно повећава експресију антиоксидантних SOD1, SOD2 и SOD3 протеина (Графикон 6) а значајно смањује експресију $p22^{phox}$, $p47^{phox}$ и $p67^{phox}$ протеина (Графикон 7) у јетри мишева третираних Соп А. Ови резултати су у складу и са раније објављеним подацима да су заштитни ефекти S-алилцистеина посредовани повећаном експресијом SOD али и смањеном експресијом NADPH оксидазе $p22^{phox}$ и $gp91^{phox}$ [50]. Такође, хепатопротективни ефекат сумпорног једињења, алицина, у експерименталном моделу оштећења јетре код риба, посредован је повећањем активности SOD [51]. Ова открића као и резултат да смеша DPPS смањује експресију проинфламацијских цитокина (Графикон 9) потврђују хепатопротективни ефекат оралне примене смеше DPPS у моделу оштећења јетре мишева изазваном Соп А (Графикони 4 и 5, Слика 4).

5.4. Смеша дипропил полисулфида повећава проценат регулаторних Т лимфоцита а смањује проценат Th17 ћелија у јетри мишева са Cop A хепатитисом

Регулаторни Т лимфоцити супримирају инфламацију, регулишу активност имунског система и доприносе ублажавању болести посредованих имунским системом [52]. Показано је да адаптивни трансфер Т регулаторних лимфоцита значајно смањује оштећење јетре у хепатитису изазваном Cop A модулишући баланс Treg и Th17 лимфоцита [98]. Имуносупресивни цитокин IL-10 је кључан у изазивању толеранције у Cop A хепатитису, а продукују га CD4+CD25+ Treg и Купферове ћелије [95]. Tregs контролишу аутореактивне Т лимфоците *in vivo*, а њихова дисфункција или смањење броја повезани су са развојем различитих аутоимунских болести код животиња и људи. Показано је да су Tregs заједно са Купферовим ћелијама есенцијални извор IL-10 који је одговоран за индукцију толеранције у Cop A хепатитису [95]. Претретман конканавалином А у циљу индукције толеранције у јетри повезан је са, пре квалитативном него квантитативном променом Т регулаторних лимфоцита који продукују веће количине антиинфламацијског цитокина [95].

Превентивна примена смеше дипропил полисулфида значајно повећава проценат FoxP3+ регулаторних CD4+ и CD8+ лимфоцита у јетрама мишева којима је индукован Cop A (Графикон 11) повећава проценат активираних CD69+CD25+ Т лимфоцита (Графикон 10), и смањује проценат инфламацијских IL-17+ и INF- γ + Т лимфоцита (Графикон 12). Значајан налаз је и повећање експресије транскрипционог фактора FoxP3 у CD4+CD25+ и CD8+CD25+ ћелијама (Графикон 14). Како примена смеше DPPS повећава проценат Tregs лимфоцита, а смањује проценат инфламацијских Т лимфоцита у јетри, можемо претпоставити да ова смеша остварује заштитни ефекат и променом имунског одговора у јетри. У складу са повећаним процентом регулаторних Т лимфоцита у јетрама мишева третираних смешом DPPS као и мишева третираних смешом DPPS и Cop A, већи је и проценат F4/80+ макрофага (Графикон 2) и CD11c+ дендритских ћелија који експримирају IL-10 у јетрама мишева третираних смешом DPPS (Графикон 3) и већа је концентрација протеина IL-10 у ткиву јетре (Графикон 9), с обзиром да је познато да IL-10 индукује регулаторни фенотип Т лимфоцита [54]. Постоје и студије које показују супротан ефекат различитих органосумпорних једињења на продукцију IL-10 [55]. Ипак, примена екстракта белог лука значајно повећава продукцију IL-10, а смањује продукцију TNF- α у ћелијама плаценте које су претходно стимулисане LPS-ом [56]. На основу ових резултата можемо закључити да заштитни ефекат смеше DPPS у хепатитису изазваном Cop A може бити приписан промени Treg/Th17 баланса у корист Tregs.

У складу са нашим резултатима су и резултати студије у којој је показано да уљани раствор белог лука инхибира инфламацијски процес код мишева који су на дијети са високим садржајем масти, повећавањем активације регулаторних Т лимфоцита и продукције антиинфламацијских цитокина IL-10 и TGF- β [195] и смањењем продукције проинфламацијских цитокина INF- γ и TNF- α [196].

Коначно, резултати ове студије показују да смеша дипропил полисулфида значајно смањује акутно инфламацијско оштећење јетре изазвано интравенском применом Cop A. Протективни ефекат смеше дипропил полисулфида удружен је са атенуацијом смрти хепатоцита, смањењем продукције инфламацијских медијатора и регротовања

леукоцита у јетру, променом баланса између про- и анти- оксидативних ензима у корист антиоксидативних и стимулацијом Т регулаторних ћелија у јетри (Схема 6).

Ови резултати указују да би синтетисана смеша дипропил полисулфида могла да буде потенцијални терапеутик са хепатопротективним дејством у акутним инфламацијским болестима јетре и указују на потребу даљег испитивања ове смеше.

Схема 6.

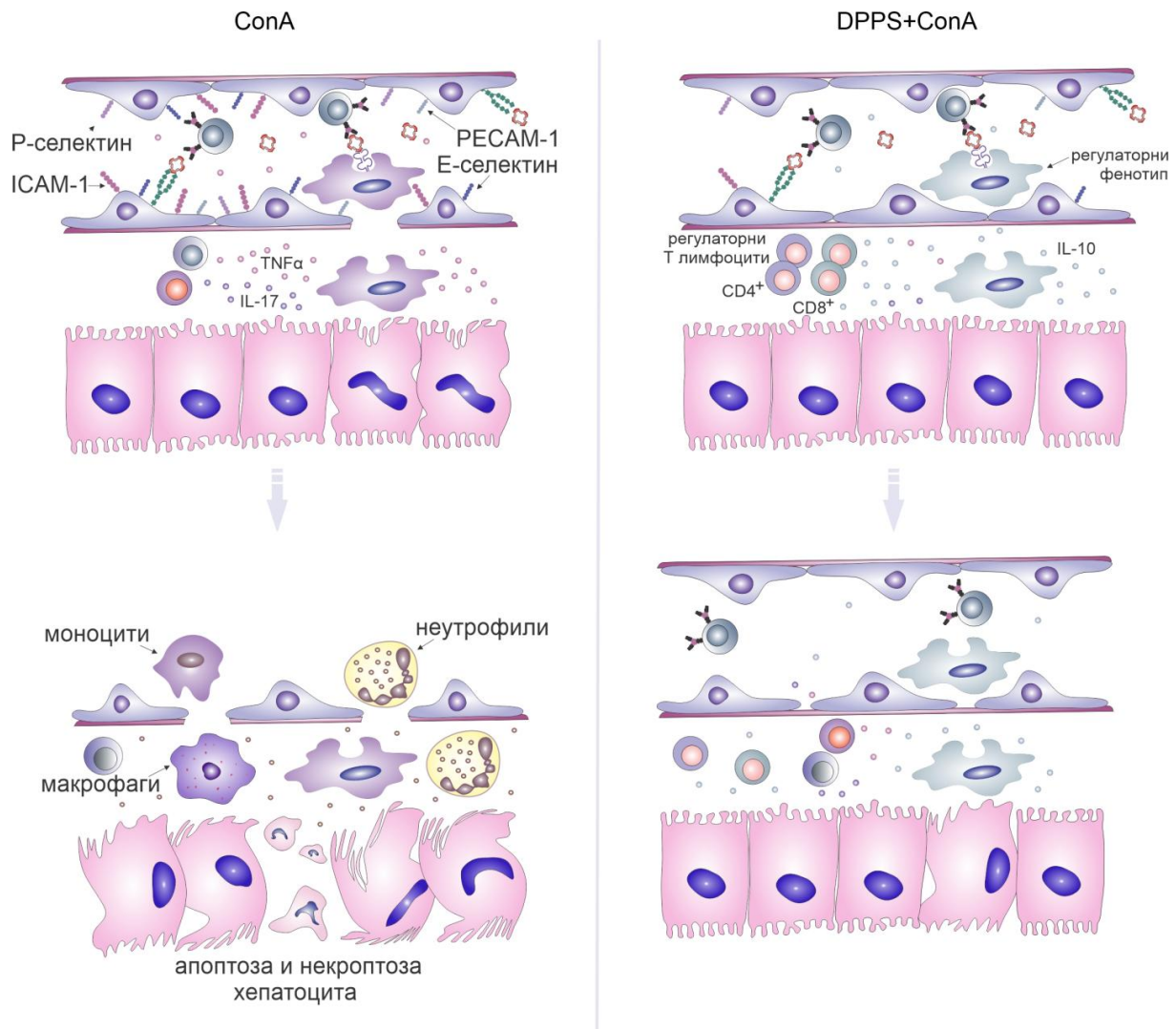


Схема 6. Хепатопротективни ефекат смеше дипропил полисулфида у Con A хепатитису. Con A се након интравенске инјекције акумулира у јетри, селективно се везује за ендотелне ћелије синусоида, зауставља Т лимфоците присутне у циркулацији, изазива њихово котрљање по ендотелу, а унакрсним повезивањем Т ћелијских рецептора Т лимфоцита индукује активацију ових ћелија. Con A се везује и за MHC II молекуле Купферових ћелија и омогућава успостављање контакта Т лимфоцита и Купферових ћелија и активацију Т лимфоцита, без обзира на антигенску специфичност TCR-а, али и активацију Купферових ћелија. Активиране Купферове ћелије продукују инфламацијске цитокине, од којих је најважнији TNF- α , који даље подстиче активацију Т лимфоцита који продукују INF- γ који повратно додатно активира

Купферове ћелије. Цитокини које продукују ова два типа ћелија, на првом месту TNF- α , активирају ендотел синусоида јетре, тј. индукују експресију адхезивних молекула на ендотелним ћелијама. Активирани ендотел даље омогућава додатни улазак у субендотелни простор поликлонски активираних CD4+ и CD8+ Т лимфоцита и осталих ћелија имунског система, које директним или индиректним механизмима учествују у процесима оштећења хепатоцита и развоју хепатитиса (слика лево). Орална примена DPPS индукује регулаторни фенотип ћелија које презентују антигене (и Купферових ћелија) у јетри, које продукују антиинфламацијски IL-10 и које након апликације Con A индукују регулаторни фенотип у активираним Т лимфоцитима. Регулаторни лимфоцити продукују мање инфламацијских цитокина а више IL-10, па изостаје и повратна активација Купферових ћелија цитокинима инфламацијских Т лимфоцита. Због мање продукције инфламацијских цитокина (TNF- α) смањена је и активација ендотела синусоида што смањује инфлукс ћелија имунског система у јетру које учествују у оштећењу хепатоцита. Коначни резултат примене DPPS пре интравенске инјекције Con A, је значајно мање оштећење паренхима јетре (слика десно).

6. ЗАКЉУЧЦИ

Претретман смешом дипропил полисулфида смањује оштећење јетре C57BL/6 мишева изазвано интравенском инјекцијом Con A. Орална примена смеше дипропил полисулфида пре индукције Con A хепатитиса значајно смањује смрт хепатоцита, оштећење паренхима јетре и концентрацију аланин трансферазе у серуму. Терапијски ефекат претретмана смешом дипропил полисулфида у Con A хепатитису остварен је: индукцијом регулаторног фенотипа ћелија које презентују антигене у ткиву јетре; инхибицијом активације ендотела у јетри, што за последицу има смањење инфламације, а што се огледа у смањеној концентрацији инфламацијских цитокина и смањеним процентом инфламацијских CD4⁺ и CD8⁺ ћелија у ткиву јетре; смањењем експресије про- и повећањем експресије анти- оксидативних ензима чиме се постиже хепатопротективни ефекат.

Закључци проистичу из наведених експерименталних налаза:

1. Претретман смешом дипропил полисулфида повећава проценат активираних и регулаторних макрофага и дендритских ћелија у јетри.
2. Претретман смешом дипропил полисулфида значајно смањује хистолошке и серумске параметре оштећења јетре изазвано интравенском применом Con A.
3. Смеша дипропил полисулфида значајно смањује експресију (ниво иРНК) молекула ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 и P-селектина у ткиву јетре мишева са Con A хепатитисом, што указује на супресију активације ендотела у јетри.
4. Смеша дипропил полисулфида значајно смањује концентрацију инфламацијских цитокина TNF- α , IL-1 β , IL-12 и IL-17, а повећава концентрацију антиинфламацијског IL-10 у ткиву јетре мишева са Con A хепатитисом.
5. Претретман смешом дипропил полисулфида смањује експресију p22^{phox}, p47^{phox} и p67^{phox}, а повећава експресију SOD1, SOD2 и SOD3 ензима што указује на хепатопротективни ефекат ове смеше.
6. Смеша дипропил полисулфида у јетри мишева са Con A хепатитисом повећава проценат регулаторних, а смањује проценат CD4⁺ и CD8⁺ ћелија које експримирају IL-17.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Lee WM. Acute liver failure. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(1):36-45.
2. Kaneko Y, Harada M, Kawano T, et al. Augmentation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med*. 2000;191(1):105-114.
3. Lis H. SN. Lectins. In: *Encyclopedia of Immunology*. 1998;1535–1541.
4. Goldstein IJ., Winter HC. PRD. Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates. In: *New Comprehensive Biochemistry*. 1997;403–474.
5. Sumner JB. “The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*.” *J Biol Chem*. 1919;(38):137.
6. Sumner JB. and Howell SF. “The non-identity of jack bean agglutinin with crystalline urease.” *J Immunol*. 1935;29:133.
7. Sumner JB., and Howell SF. “The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A.” *J Bacteriol*. 1936;32:227.
8. Powell AE, Leon MA. Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. *Exp Cell Res*. 1970;62(2-3):315-325.
9. Goldstein IJ, Hollerman CE, Smith EE. Protein-Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides. *Biochemistry*. 1965;4(5):876-883.
10. Goldstein IJ., Reichert CM., and Misaki A. “Interaction of concanavalin A with model substrates.” *Ann NY Acad Sci*. 1974;234:283–296.
11. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest*. 1992;90(1):196-203.
12. Ye T, Wang T, Yang X, et al. Comparison of Concanavalin a-Induced Murine Autoimmune Hepatitis Models. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(3):1241-1251.
13. Weiss A, Shields R, Newton M, Imboden J. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene - PubMed. *J Immunol*. 1987;138(7):2169-2176.
14. Ando Y, Yasuoka C, Mishima T, et al. Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2014;50(4):313-320.
15. Ahmann GB, Sachs DH, Hodes RJ. Requirement for an Ia-bearing accessory cell in Con A-induced T cell proliferation. *J Immunol*. 1978;121(5):1981-1989.
16. Knolle PA, Gerken G, Löser E, et al. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A - Induced hepatic injury in mice. *Hepatology*. 1996;24(4 I):824-829.
17. Tsui TY, Obed A, Siu YT, et al. Carbon monoxide inhalation rescues mice from fulminant hepatitis through improving hepatic energy metabolism. *Shock*. 2007;27(2):165-171.
18. Zhang X, Wei HX, Rui S, Wei H, Tian Z. Opposite effects of high and low doses of

- interleukin-2 on T cell-mediated hepatitis in mice (interleukin-2 on hepatitis). *Hepatol Int.* 2010;4(3):641-648.
19. Schümman J, Wolf D, Pahl A, et al. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am J Pathol.* 2000;157(5):1671-1683.
 20. Künstle G, Hentze H, Germann PG, Tiegs G, Meergans T, Wendel A. Concanavalin a hepatotoxicity in mice: Tumor necrosis factor-mediated organ failure independent of caspase-3-like protease activation. *Hepatology.* 1999;30(5):1241-1251.
 21. Kusters S, Gantner F, Künstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology.* 1996;111(2):462-471.
 22. Trautwein C, Rakemann T, Brenner DA, et al. Concanavalin A-induced liver cell damage: Activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice. *Gastroenterology.* 1998;114(5):1035-1045.
 23. Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-Mediated hepatic injury in mice: The role of tumor necrosis factor. *Hepatology.* 1995;21(1):190-198.
 24. Zheng SJ, Wang P, Tsabary G, Chen YH. Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation. *J Clin Invest.* 2004;113(1):58-64.
 25. Beraza N, Malato Y, Sander LE, et al. Hepatocyte-specific NEMO deletion promotes NK/NKT cell- and TRAIL-dependent liver damage. *J Exp Med.* 2009;206(8):1727-1737.
 26. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature.* 2015;517(7534):311-320.
 27. Tsutsui H, Nishiguchi S. Importance of kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):7711-7730.
 28. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10).
 29. Nakashima H, Kinoshita M, Nakashima M, et al. Superoxide produced by Kupffer cells is an essential effector in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2008;48(6):1979-1988.
 30. Wang HX, Liu M, Weng SY, et al. Immune mechanisms of Concanavalin a model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(2):119-125.
 31. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Tacke F. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim.* 2015;49:12-20.
 32. Lv K, Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q. Galectin-9 ameliorates Con A-induced hepatitis by inducing CD4(+)CD25(low/int) effector T-Cell apoptosis and increasing regulatory T cell number. *PLoS One.* 2012;7(10).
 33. Zheng ZY, Weng SY, Yu Y. Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J Gastroenterol.* 2009;15(46):5776-5783.
 34. Leist M, Gantner F, Künstle G, et al. The 55-kD tumor necrosis factor receptor and CD95 independently signal murine hepatocyte apoptosis and subsequent liver failure. *Mol Med.* 1996;2(1):109-124.
 35. Tagawa Y SK, Iwakura Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating

- apoptosis of hepatocytes - PubMed. *J Immunol.* 1997;159(3):1418-1428.
36. Watanabe Y, Morita M, Akaike T. Concanavalin A induces perforin-mediated but not Fas-mediated hepatic injury. *Hepatology.* 1996;24(3):702-710.
 37. Kano A, Haruyama T, Akaike T, Watanabe Y. IRF-1 is an essential mediator in IFN- γ -induced cell cycle arrest and apoptosis of primary cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(3):672-677.
 38. Seino KI, Kayagaki N, Takeda K, Fukao K, Okumura K, Yagita H. Contribution of Fas ligand to T cell-mediated hepatic injury in mice. *Gastroenterology.* 1997;113(4):1315-1322.
 39. Nagata T, Mckinley L, Peschon JJ, Alcorn JF, Aujla SJ, Kolls JK. Requirement of IL-17RA in Con A Induced Hepatitis and Negative Regulation of IL-17 Production in Mouse T Cells. *J Immunol.* 2008;181(11):7473-7479.
 40. Toyabe S, Seki S, Iiai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, Hiraide H, Uchiyama M, Abo T. Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol.* 1997;153(3):1537-1542.
 41. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med.* 2000;192(5):741-753.
 42. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: Development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:535-562.
 43. Dennert G, Aswad F. The role of NKT cells in animal models of autoimmune hepatitis. *Crit Rev Immunol.* 2006;26(5):453-473.
 44. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(10):5498-5503.
 45. Wolf D, Hallmann R, Sass G, et al. TNF- α -Induced Expression of Adhesion Molecules in the Liver Is Under the Control of TNFR1—Relevance for Concanavalin A-Induced Hepatitis. *J Immunol.* 2001;166(2):1300-1307.
 46. Morita M, Watanabe Y, Akaike T. Inflammatory cytokines up-regulate intercellular adhesion molecule-1 expression on primary cultured mouse hepatocytes and T-lymphocyte adhesion. *Hepatology.* 1994;19(2):426-431.
 47. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):45-65.
 48. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF- α -induced liver injury: Role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(4):583-589.
 49. Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, et al. T cell activation-associated hepatic injury: Mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med.* 1994;179(5):1529-1537.
 50. Küsters S, Tiegs G, Alexopoulou L, et al. In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur J Immunol.* 1997;27(11):2870-2875.
 51. Fotin-Mlecsek M, Henkler F, Samel D, Reichwein M, Hausser A, Parmryd I, Scheurich P, Schmid AJ, Wajant H. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion

- of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci.* 2002;115(13):2757-2770.
52. Ni HM, Chen X, Ding WX, Schuchmann M, Yin XM. Differential roles of JNK in ConA/GalN and ConA-induced liver injury in mice. *Am J Pathol.* 2008;173(4):962-972.
 53. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005;54(7):1024-1033.
 54. Saeed WK, Jun DW. Necroptosis: An emerging type of cell death in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(35):12526-12532.
 55. Moreno-Gonzalez G, Vandenabeele P, Krysko D V. Necroptosis: A novel cell death modality and its potential relevance for critical care medicine. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194(4):415-428.
 56. Deutsch M, Graffeo CS, Rokosh R, et al. Divergent effects of RIP1 or RIP3 blockade in murine models of acute liver injury. *Cell Death Dis.* 2015;6(5):1-11.
 57. Zhou Y, Dai W, Lin C, et al. Protective effects of necrostatin-1 against concanavalin A-induced acute hepatic injury in mice. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:706156.
 58. Le Cann F, Delehouzé C, Leverrier-Penna S, et al. Sibiriline, a new small chemical inhibitor of receptor-interacting protein kinase 1, prevents immune-dependent hepatitis. *FEBS J.* 2017;284(18):3050-3068.
 59. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Filliol A, et al. The chemical inhibitors of cellular death, PJ34 and Necrostatin-1, down-regulate IL-33 expression in liver. *J Mol Med.* 2015;93(8):867-878.
 60. Jouan-Lanhouet S, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, et al. TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ.* 2012;19(12):2003-2014.
 61. Zheng SJ, Wang P, Tsbary G, Chen YH. Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation. *J Clin Invest.* 2004;113(1):58-64.
 62. Meurette O, Huc L, Rebillard A, Le Moigne G, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) induces necrosis-like cell death in tumor cells at acidic extracellular pH. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005:379-387.
 63. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-189.
 64. Hong F, Jaruga B, Kim WH, et al. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in T cell-mediated hepatitis: Regulation by SOCS. *J Clin Invest.* 2002;110(10):1503-1513.
 65. Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. IFN- γ /STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: A critical role of IRF-1. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287(5 50-5).
 66. Gideon HP, Phuah J, Junecko BA, Mattila JT. Neutrophils express pro- and anti-inflammatory cytokines in granulomas from Mycobacterium tuberculosis-infected cynomolgus macaques. *Mucosal Immunol.* 2019;12(6):1370-1381.
 67. Bonder CS, Ajuebor MN, Zbytniuk LD, Kubes P, Swain MG. Essential Role for Neutrophil Recruitment to the Liver in Concanavalin A-Induced Hepatitis. *J Immunol.* 2004;172(1):45-53.

68. Tang Y, Long J, Liu J. Hyperglycemia-Associated Oxidative Stress Induces Autophagy: Involvement of the ROS-ERK/JNK-p53 Pathway. In: *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. 2014:105-115.
69. Bedard K, Krause K. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;1:245-313.
70. Paik YH, Kim J, Aoyama T, De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. *Antioxidants Redox Signal*. 2014;20(17):2854-2872.
71. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest*. 2003;112(9):1383-1394.
72. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(1):5-23.
73. Boudreau HE, Emerson SU, Korzeniowska A, Jendrysik MA, Leto TL. Hepatitis C Virus (HCV) Proteins Induce NADPH Oxidase 4 Expression in a Transforming Growth Factor β -Dependent Manner: a New Contributor to HCV-Induced Oxidative Stress. *J Virol*. 2009;83(24):12934-12946.
74. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2018;12(3):88-93.
75. Mondola P, Damiano S, Sasso A, Santillo M. The Cu, Zn Superoxide Dismutase: Not Only a Dismutase Enzyme. *Front Physiol*. 2016;7(NOV):594.
76. Sonar SA, Lal G. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol*. 2019;10:710.
77. Bogdan C. The Function of Nitric Oxide in the Immune System. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. ; 2000:443-492.
78. Nathan C, Xie Q wen. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78(6):915-918.
79. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51:443-452.
80. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256(5054):225-228.
81. Taylor B S Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochem*. 1998;63(7):766-781.
82. Tsujino M, Hirata Y, Imai T, et al. Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin- 1β in cultured rat cardiocytes. *Circulation*. 1994;90(1):375-383.
83. Kaibori M, Okumura T, Sato K, Nishizawa M, Kon M. Inducible nitric oxide synthase expression in liver injury: Liver protective effects on primary rat hepatocytes. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2015;14(2):77-83.
84. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. 2019;50(4):892-906.
85. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21(4):467-476.

86. Huang J, Yuan Q, Zhu H, et al. IL-17C/IL-17RE Augments T Cell Function in Autoimmune Hepatitis. *J Immunol*. 2017;198(2):669-680.
87. Yan S, Wang L, Liu N, Wang Y, Chu Y. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunol Cell Biol*. 2012;90(4):421-428.
88. de Carvalho PGC, Custódio LA, Conchon-Costa I, et al. Concanavalin-A induces IL-17 production during the course of *Candida albicans* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64(2):273-279.
89. Xu M, Morishima N, Mizoguchi I, et al. Regulation of the development of acute hepatitis by IL-23 through IL-22 and IL-17 production. *Eur J Immunol*. 2011;41(10):2828-2839.
90. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.
91. Malchow S, Thaiss W, Jänner N, et al. Essential role of neutrophil mobilization in concanavalin A-induced hepatitis is based on classic IL-6 signaling but not on IL-6 trans-signaling. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2011;1812(3):290-301.
92. Tagawa YI, Matthys P, Heremans H, et al. Bimodal role of endogenous interleukin-6 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *J Leukoc Biol*. 2000;67(1):90-96.
93. Neumann K, Rudolph C, Neumann C, Janke M, Amsen D, Scheffold A. Liver sinusoidal endothelial cells induce immunosuppressive IL-10-producing Th1 cells via the Notch pathway. *Eur J Immunol*. 2015;45(7):2008-2016.
94. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-787.
95. Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology*. 2007;45(2):475-485.
96. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease. *IUBMB Life*. 2015;67(2):88-97.
97. Jonuleit H, Schmitt E. The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. *J Immunol*. 2003;171(12):6323-6327.
98. Huang H, Deng Z. Adoptive transfer of regulatory T cells stimulated by Allogeneic Hepatic Stellate Cells mitigates liver injury in mice with concanavalin A-induced autoimmune hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;512(1):14-21.
99. Eisenstein EM, Williams CB. The Treg/Th17 cell balance: A new paradigm for autoimmunity. *Pediatr Res*. 2009;65.
100. Klein C, Wüstefeld T, Assmus U, et al. The IL-6–gp130–STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell–mediated liver injury. *J Clin Invest*. 2005;115(4):860-869.
101. Radaeva S, Sun R, Pan HN, Hong F, Gao B. Interleukin 22 (IL-22) Plays a Protective Role in T Cell-mediated Murine Hepatitis: IL-22 Is a Survival Factor for Hepatocytes via STAT3 Activation. *Hepatology*. 2004;39(5):1332-1342.
102. Majewski M. *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. 2014;65(1):1-8.

103. Veselin Čajkanović. Rečnik Srpskih Narodnih Verovanja. 1994;5-8.
104. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am.* 1985;252(3):114-119.
105. Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev.* 1996;16(1):111-124.
106. Block E. The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium* - Implications for the Organic Chemistry of Sulfur. *Angew Chemie Int Ed English.* 1992;31(9):1135-1178.
107. Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper FH. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver. *Planta Med.* 1992;58(4):301-305.
108. Martins N, Petropoulos S, Ferreira ICFR. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chem.* 2016;211:41-50.
109. Cavallito CJ, Bailey JH. Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. *J Am Chem Soc.* 1944;66(11):1950-1951.
110. Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *J Chromatogr A.* 2006;1112(1-2):3-22.
111. Kim JW, Huh JE, Kyung SH, Kyung KH. Antimicrobial Activity of Alk(en)yl Sulfides Found in Essential Oils of Garlic and Onion. *Food Science Biotechnol.* 2004;13(2):235-239.
112. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am.* 1985;252(3):114-119.
113. Meyers M. An Herb Society of America Fact Sheet. *Middle East.* 2006;44094(440):1-2.
114. Petrovska B, Cekovska S. Extracts from the history and medical properties of garlic. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(7):106-110.
115. Casella S, Leonardi M, Melai B, Fratini F, Pistelli L. The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the in vitro antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L., and leek, *Allium porrum* L. *Phyther Res.* 2013;27(3):380-383.
116. Johnson MG, Vaughn RH. Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. *Appl Microbiol.* 1996;17(6):903-905.
117. Tsao SM, Yin MC. In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47(5):665-670.
118. De Wit JC, Notermans S, Gorin N, Kampelmacher EH. Effect of Garlic Oil or Onion Oil on Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Meat Slurry. *J Food Prot.* 1979;42(3):222-224.
119. O'Gara EA, Hill DJ, Maslin DJ. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(5):2269-2273.
120. Ullah F, Ayaz M, Sadiq A, et al. Potential role of plant extracts and phytochemicals against foodborne pathogens. *Appl Sci.* 2020;10(13).
121. Yun HM, Ban JO, Park KR, et al. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacol Ther.* 2014;142(2):183-195.
122. Powolny AA, Singh S V. Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl

- trisulfide and related Allium vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer Lett.* 2008;269(2):305-314.
123. Saud SM, Li W, Gray Z, et al. Diallyl Disulfide (DADS), a Constituent of Garlic, Inactivates NF-KB and Prevents Colitis-Induced Colorectal Cancer by Inhibiting GSK-3 β . *Cancer Prev Res.* 2016;9(7):607-615.
124. Sumiyoshi H, Wargovich MJ. Chemoprevention of 1, 2-Dimethylhydrazine-induced Colon Cancer in Mice by Naturally Occurring Organosulfur Compounds. *Cancer Res.* 1990;50(16):5084-5087.
125. Hosono T, Hosono-Fukao T, Inada K, et al. Alkenyl group is responsible for the disruption of microtubule network formation in human colon cancer cell line HT-29 cells. *Carcinogenesis.* 2008;29(7):1400-1406.
126. Sparnins VL, Barany G, Wattenberg LW. Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo[a]pyrene-induced neoplasia and glutathione s-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis.* 1988;9(1):131-134.
127. Bianchini F, Vainio H. Allium vegetables and organosulfur compounds: Do they help prevent cancer? *Environ Health Perspect.* 2001;109(9):893-902.
128. Tsai CW, Liu KL, Lin CY, Chen HW, Lii CK. Structure and function relationship study of allium organosulfur compounds on upregulating the Pi class of glutathione S-transferase expression. *J Agric Food Chem.* 2011;59(7):3398-3405.
129. Chu C-C, Wu W-S, Shieh J-P, Chu H-L, Lee C-P, Duh P-D. The Anti-Inflammatory and Vasodilating Effects of Three Selected Dietary Organic Sulfur Compounds from Allium Species. *J Funct Biomater.* 2017;8(1):5.
130. Ried K. Garlic lowers blood pressure in hypertensive individuals, regulates serum cholesterol, and stimulates immunity: An updated meta-analysis and review. *J Nutr.* 2016;146(2):389S-396S.
131. Bradley JM, Organ CL, Lefer DJ. Garlic-derived organic polysulfides and myocardial protection. *J Nutr.* 2016;146(2):403S-409S.
132. Chan JYY, Yuen ACY, Chan RYK, Chan SW. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phyther Res.* 2013;27(5):637-646.
133. Yeh YY, Liu L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: Human and animal studies. *J Nutr.* 2001;131(3s):989s-93s.
134. Yun HM, Ban JO, Park KR, et al. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacol Ther.* 2014;142(2):183-195.
135. Zeng T, Guo FF, Zhang CL, et al. The anti-fatty liver effects of garlic oil on acute ethanol-exposed mice. *Chem Biol Interact.* 2008;176(2-3):234-242.
136. Nencini C, Franchi GG, Cavallo F, Micheli L. Protective effect of Allium neapolitanum Cyr. versus Allium sativum L. on acute ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *J Med Food.* 2010;13(2):329-335.
137. Chen LY, Chen Q, Zhu XJ, et al. Diallyl trisulfide protects against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis via a hydrogen sulfide-mediated mechanism. *Int Immunopharmacol.* 2016;36:23-30.
138. Yang CS, Chhabra SK, Hong JY, Smith TJ. Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic.

Journal of Nutrition. 2001; 131(3s):1041s-5s.

139. Gedik N, Kabasakal L, Şehirli Ö, et al. Long-term administration of aqueous garlic extract (AGE) alleviates liver fibrosis and oxidative damage induced by biliary obstruction in rats. *Life Sci*. 2005;76(22):2593-2606.
140. Pal R, Vaiphei K, Sikander A, Singh K, Rana S V. Effect of garlic on isoniazid and rifampicin-induced hepatic injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2006;12(4):636-639.
141. Hu JJ, Yoo JSH, Lin M, Wang EJ, Yang CS. Protective effects of diallyl sulfide on acetaminophen-induced toxicities. *Food Chem Toxicol*. 1996;34(10):963-969.
142. Kalantari H, Salehi M. The protective effect of garlic oil on hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice and comparison with N-acetylcysteine. *Saudi Med J*. 2002;22(12):1080-1084.
143. Lin MC, Wang EJ, Patten C, et al. Protective effect of diallyl sulfone against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Biochem Toxicol*. 1996;11(1):11-20.
144. Eun YP, Sung HK, Myong SK, et al. Garlic oil and DDB, comprised in a pharmaceutical composition for the treatment of patients with viral hepatitis, prevents acute liver injuries potentiated by glutathione deficiency in rats. *Chem Biol Interact*. 2005;155(1-2):82-96.
145. Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T, Ariga T. Diallyl trisulfide protects rats from carbon tetrachloride-induced liver injury. *J Nutr*. 2009;139(12):2252-2256.
146. Fanelli SL, Castro GD, Toranzo EG, Castro JA. Mechanisms of the preventive properties of some garlic components in the carbon tetrachloride-promoted oxidative stress. Diallyl sulfide; diallyl disulfide; allyl mercaptan and allyl methyl sulfide. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1998;102(2):163-174.
147. Sumedha NC, Miltonprabu S. Diallyl trisulfide ameliorates arsenic-induced hepatotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2015;34(5):506-525.
148. Şener G, Şehirli özer, Ipçi Y, et al. Aqueous garlic extract alleviates ischaemia-reperfusion-induced oxidative hepatic injury in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(1):145-150.
149. Rose P, Whiteman M, Moore PK, Yi ZZ. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: The chemistry of potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep*. 2005;22(3):351-368.
150. Sundaresan S, Subramanian P. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by S-allylcysteine. *Mol Cell Biochem*. 2008;310(1-2):209-214.
151. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem Toxicol*. 2001;39(6):563-569.
152. Hatono S, Jimenez A, Wargovich MJ. Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis*. 1996;17(5):1041-1044.
153. Munday R, Munday CM. Low doses of diallyl disulfide, a compound derived from garlic, increase tissue activities of quinone reductase and glutathione transferase in the gastrointestinal tract of the rat. *Nutr Cancer*. 1999;34(1):42-48.

154. Munday R, Munday CM. Relative activities of organosulfur compounds derived from onions and garlic in increasing tissue activities of quinone reductase and glutathione transferase in rat tissues. *Nutr Cancer*. 2001;40(2):205-210.
155. Singh SV, Pan SS, Srivastava SK, et al. Differential induction of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase by anti-carcinogenic organosulfides from garlic. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;244(3):917-920.
156. Gudi VA, Singh SV. Effect of diallyl sulfide, a naturally occurring anti-carcinogen, on glutathione-dependent detoxification enzymes of female CD-1 mouse tissues. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(6):1261-1265.
157. Munday R, Munday JS, Munday CM. Comparative effects of mono-, di-, tri-, and tetrasulfides derived from plants of the Allium family: Redox cycling in vitro and hemolytic activity and Phase 2 enzyme induction in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(9):1200-1211.
158. Rana SV, Pal R, Vaiphei K, Sharma SK, Ola RP. Garlic in health and disease. *Nutr Res Rev*. 2011;24(1):60-71.
159. Fukao T, Hosono T, Misawa S, Seki T, Ariga T. The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food Chem Toxicol*. 2004;42(5):743-749.
160. Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, Siess MH, Le Bon AM. Antimutagenic activity of organosulfur compounds from Allium is associated with phase II enzyme induction. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2001;495(1-2):135-145.
161. Brady JF, Ishizaki H, Fukuto JM, et al. Inhibition of Cytochrome P-450 2E1 by Diallyl Sulfide and Its Metabolites. *Chem Res Toxicol*. 1991;4(6):642-647.
162. Park KA, Kweon S, Choi H. Anticarcinogenic effect and modification of cytochrome P450 2E1 by dietary garlic powder in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2002;35(6):615-622.
163. You S, Nakanishi E, Kuwata H, et al. Inhibitory effects and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds on the production of inflammatory mediators. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(11):2049-2060.
164. Tang W, Jiang YF, Ponnusamy M, Diallo M. Role of Nrf2 in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(36):13079-13087.
165. Zhang YKJ, Wu KC, Klaassen CD. Genetic Activation of Nrf2 Protects against Fasting-Induced Oxidative Stress in Livers of Mice. *PLoS One*. 2013;8(3).
166. Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem*. 1995;148(2):183-189.
167. Schäfer G, Kaschula C. The Immunomodulation and Anti-Inflammatory Effects of Garlic Organosulfur Compounds in Cancer Chemoprevention. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014;14(2):233-240.
168. Shin IS, Hong J, Jeon CM, et al. Diallyl-disulfide, an organosulfur compound of garlic, attenuates airway inflammation via activation of the Nrf-2/HO-1 pathway and NF-kappaB suppression. *Food Chem Toxicol*. 2013;62:506-513.
169. Chang HP, Huang SY, Chen YH. Modulation of cytokine secretion by garlic oil derivatives is associated with suppressed nitric oxide production in stimulated macrophages. *J Agric Food Chem*. 2005;53(7):2530-2534.

170. Liu KL, Chen HW, Wang RY, Lei YP, Sheen LY, Lii CK. DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*. 2006;54(9):3472-3478.
171. Lee HH, Han MH, Hwang HJ, et al. Diallyl trisulfide exerts anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages by suppressing the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway. *Int J Mol Med*. 2015;35(2):487-495.
172. Bruck R, Aeed H, Brazovsky E, Noor T, Hershkovich R. Allicin, the active component of garlic, prevents immune-mediated, concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Liver Int*. 2005;25(3):613-621.
173. Germain E, Semon E, Siess MH, Teyssier C. Disposition and metabolism of dipropyl disulphide in vivo in rat. *Xenobiotica*. 2008;38(1):87-97.
174. C Teyssier MHS. Metabolism of dipropyl disulfide by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver - PubMed. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(6):648-654.
175. García A, Haza AI, Arranz N, Delgado ME, Rafter J, Morales P. Organosulfur compounds alone or in combination with vitamin C protect towards N-nitrosopiperidine- and N-nitrosodibutylamine-induced oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chem Biol Interact*. 2008;173(1):9-18.
176. Munday R, Munday CM. Induction of Phase II Enzymes by Aliphatic Sulfides Derived from Garlic and Onions: An Overview. *Methods Enzymol*. 2004;382(1996):449-456.
177. Bose C, Guo J, Zimniak L, et al. Critical role of allyl groups and disulfide chain in induction of Pi class glutathione transferase in mouse tissues in vivo by diallyl disulfide, a naturally occurring chemopreventive agent in garlic. *Carcinogenesis*. 2002;23(10):1661-1665.
178. Na HK, Kim EH, Choi MA, Park JM, Kim DH, Surh YJ. Diallyl trisulfide induces apoptosis in human breast cancer cells through ROS-mediated activation of JNK and AP-1. *Biochem Pharmacol*. 2012;84(10):1241-1250.
179. Tsao SM, Hsu CC, Yin MC. Garlic extract and two diallyl sulphides inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in BALB/cA mice. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(6):974-980.
180. Blom KG, Rahman Qazi M, Noronha Matos JB, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M. Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(2):320-329.
181. Rodrigues C, Percival SS. Immunomodulatory effects of glutathione, garlic derivatives, and hydrogen sulfide. *Nutrients*. 2019;11(2).
182. Kim KM, Chun SB, Koo MS, et al. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(7):747-756.
183. Swart PJ, Hirano T, Kuipers ME, et al. Targeting of superoxide dismutase to the liver results in anti-inflammatory effects in rats with fibrotic livers. *J Hepatol*. 1999;31(6):1034-1043.
184. Kawasuji, A. Hasegawa M, Horikawa M, Fujita T, Matsushita Y, Matsushita T,

- Fujimoto M, Steeber D A, Tedder T F, Takehara K SS. L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 regulate the development of Concanavalin A-induced liver injury. *J Leukoc Biol.* 2006;79(4):696-705.
185. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature.* 2007;445(7129):771-775.
186. Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Kaye AD, Frost EAM. Effects of Garlic Extract (*Allium Sativum*) on Neutrophil Migration at the Cellular Level. *Hear Dis.* 2001;3(1):14-17.
187. Kuo CH, Lee SH, Chen KM, Lii CK, Liu CT. Effect of garlic oil on neutrophil infiltration in the small intestine of endotoxin-injected rats and its association with levels of soluble and cellular adhesion molecules. *J Agric Food Chem.* 2011;59(14):7717-7725.
188. Nakashima, H.; Kinoshita, M.; Nakashima, M.; Habu, Y.; Shono, S.; Uchida, T.; Shinomiya, N.; Seki S. Superoxide produced by Kupffer cells is an essential effector in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2008;(48):1979–88.
189. Kim S, Lee HG, Park SA, et al. Keap1 cysteine 288 as a potential target for diallyl trisulfide-induced Nrf2 activation. *PLoS One.* 2014;9(1).
190. Chen C, Pung D, Leong V, et al. Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: Effect of chemical structure and stress signals. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(10):1578-1590.
191. Liu KL, Chen HW, Wang RY, Lei YP, Sheen LY, Lii CK. DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF- κ B activation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem.* 2006;54(9):3472-3478.
192. Ippoushi K, Itou H, Azuma K, Higashio H. Effect of naturally occurring organosulfur compounds on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Life Sci.* 2002;71(4):411-419.
193. Schepetkin IA, Kirpotina LN, Khlebnikov AI, Balasubramanian N, Quinn MT. Neutrophil Immunomodulatory Activity of Natural Organosulfur Compounds. *Molecules.* 2019;24(9):1809.
194. García A, Morales P, Arranz N, Delgado ME, Rafter J, Haza AI. Antiapoptotic effects of dietary antioxidants towards N-nitrosopiperidine and N-nitrosodibutylamine-induced apoptosis in HL-60 and HepG2 cells. *J Appl Toxicol.* 2009;29(5):403-413.
195. Lestari SR, Rifa'i M. Regulatory T cells and anti-inflammatory cytokine profile of mice fed a high-fat diet after single-bulb garlic (*Allium sativum* L.) oil treatment. *Trop J Pharm Res.* 2018;17(11):2157-2162.
196. Lestari SR, Atho'illah MF, Christina YI, Rifa'i M. Single garlic oil modulates T cells activation and proinflammatory cytokine in mice with high fat diet. *J Ayurveda Integr Med.* 2020;11(4):414-420.

8. Биографија

Драгана (Ђорђевић) Арсенијевић

Магистар фармације

Рођена 23.05.1990. године у Приштини. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила у Крагујевцу. Интегрисане академске студије Фармације, универзитета у Крагујевцу уписала 2009/2010. Успешно завршила 2013/2014 године са просечном оценом 8,69. Школске 2014/2015 уписала Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Положила усмени докторски испит, оцена 9.

Од 2016. године обавља посао сарадника у настави на предмету Основи физичке хемије.

Активно учествује у извођењу експеримената у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

Члан је Српског друштва за имунологију, молекулску имунологију и регенеративну медицину.

Библиографија

1. **Djordjevic D**, Milovanovic J, Jurisevic M, Stojanovic B, Cvetkovic O, Pergal M, Ristic E, Vojvodic D, Milos S, Manojlovic D, Milovanovic M, Arsenijevic N. Anti-tumor effect of n-propyl polysulfides mixture in vitro. *Ser J Exp Clin Res.* 2019; 20 4:295-300
2. **Arsenijevic D**, Stojanovic B, Milovanovic J, Arsenijevic A, Simic M, Pergal M, Kodranov I, Cvetkovic O, Vojvodic D, Ristanovic E, Manojlovic D, Milovanovic M, Arsenijevic N. Hepatoprotective Effect of Mixture of Dipropyl Polysulfides in Concanavalin A-Induced Hepatitis. *Nutrients.* 2021; 22;13(3):1022.
3. Konovalov B, Živković M, Milovanović J, **Djordjević D**, Arsenijević A, Vasić I, Janjić G, Franich A, Manojlović D, Skrivanj S, Milovanović M, Djuran M, Rajković S Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction studies of new dinuclear platinum(ii) complexes with an aromatic 1,5-naphthyridine bridging ligand: DNA binding mode of polynuclear platinum(ii) complexes in relation to the complex structure. *Dalton Trans* 2018;47(42):15091-15102.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Драгана Арсенијевић, изјављујем да докторска

дисертација под насловом:

Антиинфламацијска активност смеше дипропил полисулфида у експерименталном моделу акутног хепатитиса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, маја 2021. године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Драгана Арсенијевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Антиинфламацијска активност смеше дипропил полисулфида у експерименталном моделу акутног хепатитиса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, маја 2021. године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>