



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Наталиа С. Соловјова

**АНТИИНФЛАМАЦИЈСКИ И
ХЕПАТОПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКАТ
ЛИОФИЛИЗОВАНЕ КОЗЈЕ СУРУТКЕ У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ
АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2026. година



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Natalia S. Solovjova

**ANTIINFLAMACIJSKI I
HEPATOPROTEKTIVNI EFEKAT
LIOFILIZOVANE KOZJE SURUTKE U
EKSPERIMENTALNOM MODELU
AKUTNOG HEPATITISA**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2026. godina



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Natalia S. Solovjova

**ANTI-INFLAMMATORY AND
HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF
LYOPHILIZED GOAT WHEY IN AN
EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE
HEPATITIS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2026. year

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Наталиа Соловјова
Датум и место рођења: 07.07.1963. Кемерово, СССР
Садашње запослење: предавач, АССБ, Одсек Висока здравствена школа струковних студија
Докторска дисертација
Наслов: Антиинфламацијски и хепатопротективни ефекат лиофилизоване козје сурутке у експерименталном моделу акутног хепатитиса
Број страница: 80
Број слика: 23 (3 схеме, 2 табеле, 12 графикана, 6 слика)
Број библиографских података: 318
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: Проф. др Јелена Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације:
Број IV-03-181/18; Датум 18.03.2024.

Identifikaciona stranica doktorske disertacije

Autor	
Ime i prezime: Natalia Solovjova	
Datum i mesto rođenja: 07.07.1963. Kemerovo, SSSR	
Sadašnje zaposlenje: predavač, ASSB, Odsek Visoka zdravstvena škola strukovnih studija	
Doktorska disertacija	
Naslov: Antiinflamacijski i hepatoprotektivni efekat liofilizovane kozje surutke u eksperimentalnom modelu akutnog hepatitisa	
Broj stranica: 80	
Broj slika: 23 (3 sheme, 2 tabele, 12 grafikona, 6 slika)	
Broj bibliografskih podataka: 318	
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu	
Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke	
Mentor: Prof. dr Jelena Milovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Histologija i embriologija	
Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije:	
Broj IV-03-181/18; Datum 18.03.2024.	

Identifikaciona stranica doktorske disertacije na engleskom jeziku

Author
Name and surname: Natalia Solovjova
Date and place of birth: 07.07.1963. Kemerovo, USSR
Current employment: Lecturer, Academy of Applied Studies Belgrade, College of Health Sciences
Doctoral Dissertation
Title: Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lyophilized goat whey in an experimental model of acute hepatitis
No. of pages: 80
No. of images: 23 (3 schemes, 2 tables, 12 graphs, 6 images)
No. of bibliographic data: 318
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac
Scientific area: Medical sciences
Mentor: Prof. dr Jelena Milovanović, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac within the scientific field of Histology and Embryology
Topic Application Date:
12.10.2023.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:
Number IV-03-181/18; Date 18.03.2024.

Посвећујем мом оцу Сергеју, мами Нини и ћерки Јекатерини

САЖЕТАК

Имунски посредовани хепатитис, укључујући аутоимунску форму болести, представља озбиљан клинички ентитет који карактерише прогресивна деструкција паренхима јетре. Протеини сурутке познати су по својим антиинфламацијским ефектима, а козја сурутка поседује специфичан биоактивни профил који нуди супериорну дигестибилност и нижи алергени потенцијал у поређењу са крављом сурутком. Ова студија имала је за циљ да испита хепатопротективни ефекат и имуномодулаторне механизме лиофилизоване козје сурутке (LGW) у експерименталном моделу акутног хепатитиса индукованог конканавалином А. У истраживању су коришћени мишеви сојева BALB/c и C57BL/6, којима је LGW апликована перорално током пет узастопних дана пре индукције хепатитиса. Претходни третман са LGW значајно ублажава ConA-индукован хепатитис код оба соја мишева, што је потврђено значајно смањеном концентрацијом трансаминаза у серуму и очувањем хистолошке структуре паренхима јетре. LGW је индуковала значајну модулацију имунског одговора у јетри, смањењем продукције Th1/Th17 цитокина (IFN- γ и IL-17), уз симултано повећану продукцију антиинфламацијског IL-10. Третман LGW-ом је индуковао толерогени фенотип дендритских ћелија јетре карактерисан експресијом маркера толерогености CD206⁺, као и IL-10 што је било у директној корелацији са значајном експанзијом регулаторних Т ћелија. Ови резултати сугеришу да LGW ефикасно индукује толерогено стање имунских ћелија у јетри и тако супримира инфламацијски процес. Ови налази указују на значајан фармаколошки и нутритивни потенцијал лиофилизоване козје сурутке као функционалне хране и агенса који би могао да се користи у превенцији и адјувантном лечењу имунски посредованих инфламацијских болести јетре.

Кључне речи: лиофилизована козја сурутка; ConA; хепатопротекција; дендритске ћелије; регулаторне Т ћелије; функционална храна

ABSTRACT

Immune-mediated hepatitis, including the autoimmune form, represents a serious clinical entity characterized by progressive destruction of the liver parenchyma. Whey proteins are known for their anti-inflammatory effects, but goat whey possesses a specific bioactive profile offering superior digestibility and lower allergenic potential compared to cow's whey. This study aimed to investigate the hepatoprotective effect and immunomodulatory mechanisms of lyophilized goat whey (LGW) in an experimental model of acute hepatitis induced by concanavalin A (ConA). In this study, BALB/c and C57BL/6 mice were orally administered LGW (1 g/kg/day) for five consecutive days prior to hepatitis induction. Pretreatment with LGW significantly attenuated ConA-induced hepatitis in both mouse strains, as evidenced by a marked reduction in the serum transaminases and the preservation of the histological architecture of the liver parenchyma. LGW induced a significant modulation of the intrahepatic immune response by suppressing the production of Th1/Th17 cytokines (IFN- γ and IL-17), alongside a simultaneous increase in the production of the anti-inflammatory IL-10. Furthermore, LGW treatment induced a tolerogenic phenotype of intrahepatic dendritic cells, characterized by the expression of the tolerogenic marker CD206⁺ and IL-10 production, which directly correlated with a significant expansion of regulatory T cells. These results suggest that LGW effectively induces a tolerogenic state of intrahepatic immune cells, thereby suppressing the inflammatory process. Our findings highlight the significant pharmacological and nutritional potential of lyophilized goat whey as a functional food and an agent for the prevention and adjunct management of immune-mediated inflammatory liver diseases.

Keywords: lyophilized goat whey protein; ConA; hepatoprotection; dendritic cells (DC); regulatory T cells (Treg); functional food

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Епидемиолошки профил и клинички значај АИХ: глобални трендови и еволуција схватања болести	1
1.2. Класификација аутоимунског хепатитиса: Серолошки и клинички фенотипови	2
1.2.1. Тип 1 АИХ (класични облик одраслих).....	2
1.2.2. Тип 2 АИХ (педијатријски/агресивни облик)	3
1.3. Генска основа и прекид имунске толеранције.....	4
1.3.1. Улога HLA система и презентације антигена.....	4
1.3.2. Клиничка корелација генетских варијанти.....	4
1.3.3. Молекулска мимикрија и поремећај имунорегулације	4
1.4. Имунопатогенеза и ћелијски механизми оштећења јетре	5
1.4.1. Иницијација и интрахепатична активација лимфоцита	5
1.4.2. Ћелијски дисбаланс: Th1/Th17 ефектори наспрам Treg	5
1.4.3. Механизми амплификације: <i>Bystander Activation</i>	6
1.5. Механизми ефекторске фазе, улога Fas/FasL сигнализације у индукцији апоптозе хепатоцита.....	6
1.5.1. Динамика хиперекспресије Fas рецептора на хепатоцитима.....	6
1.5.2. Интрацелуларна каскада и улога митохондрија.....	6
1.5.3. Финална деградација и хистолошка корелација	6
1.6. Имунорегулаторна динамика цитокина у АИХ, молекулски механизми пропагације ткивног оштећења.....	7
1.6.1. Th1 осовина, IFN- γ као примарни иницијатор имунопатологије	7
1.6.2. TNF- α као кључни медијатор системске инфламације и апоптотичке сигнализације путем домена смрти	8
1.6.3. Th17 осовина, IL-17 као медијатор неутрофилне инфилтрације и профиброгенезе	8
1.6.4. Дефицит регулаторних цитокина, улога IL-10 и Treg у слому имунске хомеостазе.....	9
1.7. Експериментални модел хепатитиса индукован конканавалином А	10
1.7.1. Молекулска природа и порекло ConA.....	10
1.7.2. Патогенетски механизам ConA хепатитиса.....	10
1.7.2. Кинетика хепатоцелуларног оштећења, биохемијска и временска карактеризација	11
1.7.3. Динамика морфолошких лезија у ConA моделу: прогресија инфламацијског инфилтрата ка масивној деструкцији паренхима	12
1.7.4. Компаративна предност ConA модела у односу на токсиколошке моделе (CCl4 и APAP)	12

1.8. Лиофилизована козја сурутка, LGW (eng. <i>Lyophilized Goat Whey</i>): нутритивни састав и имунопротективни механизми	13
1.8.1. Протеински профил козје сурутке и биолошки активни макромолекули ..	14
1.8.2. Биоактивни пептиди и аминокиселине, механизми детоксикације	15
1.8.3. Модулација цитокинске мреже и Th1/Th2 равнотеже	15
1.8.4. Компаративна супериорност козје у односу на крављу сурутку	16
1.8.5. Технологија лиофилизације: Очување терапеутског индекса	17
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	20
2.1 Циљеви студије	20
2.2. Хипотезе студије	20
3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ	21
3.1. Експерименталне животиње	21
3.2. Карактеризација и порекло лиофилизоване козје сурутке (LGW)	21
3.3. Експериментални дизајн и расподела група	22
3.3.1. Експериментални протокол за BALB/с сој	22
3.3.2. Експериментални модел за C57BL/6 сој	23
3.4. Динамика узорковања	24
3.5. Биохемијски параметри хепатоцелуларног оштећења	24
3.6. Квантификација цитокина у ткиву јетре (ELISA)	24
3.7. Патохистолошка евалуација ткива јетре	24
3.7.1. Фиксација и калупљење ткива	24
3.7.2. Микротомија и припрема препарата	25
3.7.3. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	25
3.7.4. Визуелизација и полуквантитативна хистопатолошка евалуација	25
3.8. Изолација моноклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија	25
3.8.1. Површинско (екстрацелуларно) маркирање ћелија	26
3.8.2. Интрацелуларно бојење цитокина и транскрипционих фактора	26
3.8.3. Аквизиција података и анализа	26
3.9. Статистичка анализа података	26
4. РЕЗУЛТАТИ	27
4.1. Верификација хепатопротективног ефекта LGW-а код BALB/с соја мишева	27
4.1.1. Одређивање оптималне дозе LGW-а	27
4.1.2. Хистолошка потврда хепатопротективног ефекта LGW-а	29
4.2. Динамички приказ хепатопротективног ефекта LGW-а код C57BL/6 соја мишева	31
4.2.1. Анализа телесне масе и релативне тежине јетре	31
4.2.2. Хистопатолошка анализа јетре и заштитни ефекат LGW-а након 24 h	33
4.2.3. Квантификација степена оштећења паренхима јетре	35

4.2.4. Анализа активности аминотрансфераза у серуму	36
4.3. LGW модулише продукцију про- и анти- инфламацијских цитокина у ткиву јетре	37
4.4. Ефекат LGW-а на заступљеност проинфламацијских и антиинфламацијских субпопулација Т лимфоцита у јетри.....	38
4.4.1. Утицај LGW-а на заступљеност Т лимфоцита који експримирају IFN- γ у паренхиму јетре	38
4.4.2. Утицај LGW-а на заступљеност IL-17 ⁺ Т лимфоцита у јетри	39
4.4.3. LGW подстиче експанзију регулаторних (IL-10 ⁺) Т ћелија у јетри током ConA индукованог хепатитиса.....	41
4.5. Ефекат LGW-а на активациони статус и регулаторни фенотип лимфоцита јетре	42
4.5.1. Модулација експресије раног активационог маркера CD69 на Т лимфоцитима јетре.....	42
4.5.2. Утицај LGW-а на заступљеност FoxP3 ⁺ регулаторних Т ћелија у јетри	43
4.5.3. LGW фаворизује експанзију FoxP3 ⁺ IL-10 ⁺ регулаторних Т ћелија.....	45
4.6. Утицај превентивне суплементације LGW-ом на дендритиске ћелије јетре	46
4.6.1. Фенотипска карактеризација и матурациони статус дендритиских ћелија јетре након суплементације LGW-ом.....	47
4.6.2. LGW повећава проценат регулаторних дендритских ћелија у јетри мишева	49
5. ДИСКУСИЈА	52
5.1. Анализа дозно-зависног ефекта лиофилизоване козје сурутке на акутно оштећење јетре	52
5.2. Модулација цитокинске мреже и Т ћелијског одговора под дејством LGW-а..	54
5.3. Модулација DC–Treg осовине под дејством LGW-а као механизам активне имунске толеранције	55
6. ЗАКЉУЧАК	59
7. СКРАЋЕНИЦЕ.....	60
8. ЛИТЕРАТУРА	62

1. УВОД

Инфламацијски и имунски посредовани хепатитиси

Аутоимунски хепатитис (АИХ од енг. *autoimmune hepatitis*) дефинише се као хронично инфламацијско обољење паренхима јетре чија је етиологија још увек недовољно разјашњена (1). Ову болест карактерише губитак имунске толеранције на сопствене антигене експримиране у хепатоцитима, што узрокује прогресивну деструкцију ткива јетре (2). Дијагностички се препознаје по присуству специфичних аутоантитела, хипергамаглобулинемији (повишен ниво IgG), повишеним вредностима трансаминаза у серуму и типичном хистопатолошком налазу интерфејс хепатитиса (*interface hepatitis*) (3). Клинички ток болести је изузетно хетероген, варирајући од потпуно асимптоматског стања до акутне инсуфицијенције јетре са високом стопом mortalитета (4). Од АИХ чешће обољевају особе женског пола, а може да се развије у било ком животном добу (5). Основа патогенезе лежи у неконтролисаној активацији Т лимфоцита и прекомерној продукцији проинфламацијских цитокина као што су TNF- α и IFN- γ (6). Код оболелих од АИХ који немају адекватан одговор на терапију, хронична упала јетре неминовно води ка фибрози, цирози и у крајњем исходу хепатоцелуларном карциному (7). Стандардни третман се већ деценијама ослања на снажну имunosупресивну терапију, која је често повезана са бројним нежељеним ефектима (8). Због своје сложености, АИХ захтева персонализовани приступ који све чешће укључује и имунонутритивне стратегије (1, 4). Разумевање овог обољења је од кључног значаја за развој нових терапијских агенаса, укључујући испитивање ефеката супстанци природног порекла као што је лиофилизована козја сурутка.

1.1. Епидемиолошки профил и клинички значај АИХ: глобални трендови и еволуција схватања болести

Аутоимунски хепатитис је деценијама посматран као релативно ретко обољење, примарно карактеристично за млађу женску популацију у западним земљама. Међутим, епидемиолошке студије из последњих година показују да за ову болест не постоје географске, етничке нити строге старосне границе (4). Ова промена епидемиолошких карактеристика АИХ наметнула је потребу за ревизијом дијагностичких критеријума и дубљим разумевањем фактора који иницирају имунски одговор на хепатоците (9). Клинички значај АИХ огледа се у чињеници да нелечена болест неминовно води ка терминалној инсуфицијенцији јетре, што захтева доживотни медицински надзор (7).

1.1.1. Епидемиологија и демографски профил

Историјски гледано, први радови о овој болести из 70-их и 80-их година прошлог века сугерисали су ниску преваленцу и то углавном у популацији Северне Европе (10). Насупрот томе, најновије мета-анализе и систематски прегледни чланци указују на то да преваленца АИХ у Европи и Северној Америци сада износи између 15 и 25 случајева на 100.000 становника (11). Посебно је интересантан пораст инциденце у земљама где је болест раније била реткост, попут азијско-пацифичког региона, што указује да је фактор животне средине један од битних етиолошких фактора (3, 12).

Резултати истраживања указују на то да промене у микробиому изазване начином живота и изложеност специфичним ксенобиотицима делују као окидачи код генски предиспонираних индивидуа (14, 15). Данас знамо да инциденца расте за приближно 2% годишње на глобалном нивоу, што АИХ чини значајно већим јавноздравственим изазовом у групи хроничних болести јетре (16). Овакав тренд раста додатно оптерећује здравствене системе због високих трошкова лечења и мониторинга пацијената (17). Еколошки фактори, укључујући загађење и конзумацију прерађене хране, такође се разматрају као потенцијални модулатори епигенских промена који фаворизују развој аутоимунских поремећаја (18).

Иако класична литература наглашава да је болест чешћа у женској популацији, са односом полова који варира од 3:1 до чак 4:1, савремени клинички подаци указују на све

учесталије дијагностиковање АИН код мушкараца (5). Код мушког пола болест често има агресивнији иницијални ток, са мањим бројем карактеристичних аутоантитела, што може одложити постављање тачне дијагнозе (19).

Још значајнија промена односи се на старосну дистрибуцију појављивања болести. Док су ране студије указивале да се болест првенствено јавља у у периоду од 15. до 40. године живота, скорије студије потврђују бимодалну дистрибуцију појављивања (20, 21). Први пик се јавља код деце и младих, често као Тип 2 АИН са присутним anti-LKM-1 антителима, док се други, све израженији пик, бележи у постменопаузалном периоду, између 50. и 70. године живота (9, 22). У неким европским кохортама, више од 20% пацијената је старије од 65 година у тренутку постављања дијагнозе (20, 21). Код старијих пацијената, болест се често презентује подмукло, са већ развијеном цирозом у моменту прве биохемијске анализе (21, 23). Оваква старија популација пацијената представља посебан изазов због већег броја коморбидитета и осетљивости на нежељене ефекте имunosупресива (24). Све већа учесталост болести код особа треће доби сугерише да старење имунског система (имуносенесценција) игра важну улогу у губитку регулације аутореактивних лимфоцита (25). Рано препознавање ових атипичних клиничких слика кључно је за правовремено увођење терапије и спречавање леталног исхода (26). Такође, појава АИН у позним годинама често је удружена са другим системским аутоимунским поремећајима, као што су реуматоидни артритис или хипотиреоидизам (7). Ова комплексност додатно наглашава потребу за персонализованим приступом сваком пацијенту (27). Коначно, разумевање демографских померања омогућава боље планирање ресурса за трансплантацију јетре, која остаје једина опција за терминалне стадијуме болести (28).

1.2. Класификација аутоимунског хепатитиса: Серолошки и клинички фенотипови

Савремена класификација АИН-а примарно се заснива на профилу циркулишућих аутоантитела, што омогућава прецизнију стратификацију пацијената и предвиђање тока болести (9, 29). Иако је патохистолошки налаз (тзв. *interface hepatitis*) кључни дијагностички налаз за све облике АИН, серолошка подела на Тип 1 и Тип 2 рефлектује озбиљне разлике у генској основи, старосној доби болесника и дугорочној прогнози (9, 30). Разумевање ових разлика је од кључног значаја за клиничке лекаре, јер сваки фенотип захтева специфичан приступ у праћењу и прилагођавању терапије. Ови подтипови имају различиту имунопатогенезу али исти исход, деструкцију паренхима јетре (9).

1.2.1. Тип 1 АИН (класични облик одраслих)

Тип 1 је најзаступљенија форма болести, која чини приближно 80% свих случајева АИН-а широм света (9, 31). Овај облик се може дијагностиковати у свим старосним групама, мада најчешће погађа одрасле особе средње доби (32).

Главни дијагностички маркери Типа 1 је налаз следећих аутоантитела: ANA (енг. *antinuclear antibodies*) и SMA (енг. *anti-smooth muscle antibodies*), посебно оних која су специфична за F-actin (14, 33). Такође, anti-SLA/LP (енг. *anti-soluble liver antigen/liver-pancreas*) антитела су високо специфична за овај тип и често су повезана са тежим клиничким током и повећаним ризиком од релапса након прекида терапије (34). Анализа имунофлуоресценцом ANA антитела може да покаже различите обрасце флуоресценције, што понекад указује на преклапање са другим системским реуматским болестима (35). Налаз anti-SMA антитела је посебно значајан јер титар ових антитела често корелира са степеном активности упале у самој јетри (36). Код значајног броја пацијената, ова антитела могу бити једини дијагностички налаз у раним фазама болести (37). Поред тога, обавезан биомаркер Типа 1 АИН је повећана концентрација имуноглобулина класе G, IgG (енг. *Immunoglobulin G*) у серуму (38).

Већина пацијената са Типом 1 АИН показује одличан почетни одговор на стандардну имunosупресивну терапију (24, 39). Ипак, болест је склона подмуклим рецидивима, чак и када су биохемијски параметри у границама нормале. Дугорочна прогноза код ових пацијената у великој мери зависи од тога колико се брзо постигне потпуна хистолошка ремисија (7). Овај фенотип је

често удружен са алелима HLA-DR3 и HLA-DR4, MHC локуса, што додатно потврђује његову специфичну имуногенску позадину (30, 40).

1.2.2. Тип 2 АИХ (педијатријски/агресивни облик)

Тип 2 АИХ је знатно ређи, чинећи око 10% до 20% случајева, а примарно погађа децу и младе одрасле особе, често женског пола (9). Овај облик се често карактерише већим ризиком од акутне инсуфицијенције јетре и захтева агресивнији медицински надзор (41). Дефинише се присуством anti-LKM-1 (енг. *anti-liver-kidney microsomal type 1*) или anti-LC1 (енг. *anti-liver cytosol type 1*) антитела у серуму (9, 42). За разлику од Типа 1, налази серума пацијената са Типом 2 АИХ су скоро увек негативни на ANA и anti-SMA антитела (9). Главни антиген за anti-LKM-1 антитело је ензим CYP2D6, док је за anti-LC1 антитело то FTCD (енг. *formiminotransferase cyclodeaminase*), што су специфични протеини ткива јетре (43, 44). Титар ових антитела је обично врло висок у моменту дијагнозе и може се користити за праћење ефикасности лечења (42). Код деце, нивои IgG могу бити чак и у границама нормале, што може заварати клиничаре ако се не ураде специфични серолошки тестови (45).

Тип 2 АИХ је познат по експлозивном почетку и брзој прогресији ка цирози, често унутар само пар месеци од првих симптома (46). Ремисија се теже постиже, а покушаји смањења дозе лекова скоро увек резултирају скоком трансаминаза. Екстрахепатичне аутоимунске манифестације, попут дијабетеса мелитуса типа 1 и витилига, знатно су чешће код овог типа (9, 46, 47). Генска повезаност са алелом HLA-DR7 указује такође указује да Тип 2 АИХ има потпуно различит патофизиолошки механизам у поређењу са Типом 1 (48). Због агресивне природе Типа 2 АИХ, истраживања алтернативних додатака исхрани имају посебан значај за ове пацијенте који су изложени деценијској имуносупресији. Овај тип болести представља велики изазов за педијатријску хепатологију и захтева сталну потрагу за нетоксичним терапијским решењима (49, 50). Рано препознавање Типа 2 АИХ може да направи кључну разлику између успешног опоравка и потребе за хитном трансплантацијом јетре (24).

Табела 1. Упоредни приказ клиничких, серолошких и генетских карактеристика аутоимунског хепатитиса Типа 1 и Типа 2.

Карактеристика	Тип 1 АИХ	Тип 2 АИХ
Примарна популација	Одрасли (сва животна доба)	Деца и млади
Аутоантитела	ANA, anti-SMA, anti-SLA/LP	anti-LKM-1, anti-LC1
Имуноглобулини	Изражена хипергамаглобулинемија	IgG може бити нормалан
Клинички ток	Често подмукао, добар одговор на терапију	Агресиван, брза прогресија ка цирози
HLA асоцијација	HLA-DR3, HLA-DR4	HLA-DR7

Легенда: ANA – антинуклеарна антитела; SMA – антитела на глатку мускулатуру; LKM-1 – антитела на микрозоме јетре и бубрега типа 1; LC1 – антитела на цитосол јетре типа 1; SLA/LP – антитела на растворљиви антиген јетре/јетре-панкреаса; HLA – хумани леукоцитни антиген.

У Табели 1 сумиране су главне разлике између два основна серолошка фенотипа аутоимунског хепатитиса. Док се Тип 1 карактерише примарним присуством anti-ANA и anti-SMA антитела и типично погађа одраслу популацију, Тип 2 представља агресивнији облик болести са специфичним anti-LKM-1 и anti-LC1 антителима, доминантно заступљен у педијатријској популацији. Ове разлике нису само дијагностичке природе, већ рефлектују и различиту имуногенску подлогу дефинисану специфичним HLA алелима, што директно детерминише терапијски одговор и дугорочну прогнозу болесника.

1.3. Генска основа и прекид имунске толеранције

У основи аутоимунског хепатитиса лежи комплексан и вишеслојни губитак имунске толеранције на сопствене антигене хепатоцита, што представља централни патофизиолошки догађај у развоју болести (51). Овај процес је резултат међудејства генске предиспозиције и изложености специфичним факторима спољашње средине, што кулминира неуспехом контролних механизма имуности (9, 52, 53).

1.3.1. Улога HLA система и презентације антигена

Генска предиспозиција за развој АИХ првенствено је повезана са локусом главног комплекса хистокомпатибилности (енг. *Major Histocompatibility Complex* – МНС), који је код људи познат као HLA (енг. *Human Leukocyte Antigen*) систем (30). Смештен на кратком краку хромозома 6, овај регион карактерише највећа густина гена у људском геному, чији су производи кључни за регулацију имунског одговора.

Код пацијената са АИХ типа 1, најјача повезаност утврђена је са алелима HLA-DRB1*0301 и HLA-DRB1*0401 (30, 54, 55). Ови алели кодирају МНС молекуле II класе који се експримирају на површини антиген-презентујућих ћелија (APC). Молекулска истраживања су идентификовала да специфична аминокиселинска секвенца унутар „дјепа” за везивање пептида ових молекула омогућава висок афинитет везивања аутоантигена хепатоцита (56). Када се ови сопствени пептиди презентују аутореактивним Т лимфоцитима, они се погрешно интерпретирају као страни антигени, што активира имунски одговор који би код здравих особа био сузбијен механизмима периферне толеранције (51).

1.3.2. Клиничка корелација генетских варијанти

Важно је истаћи да генски профил директно детерминише клинички ток болести:

- DRB1*0301: корелира са агресивнијим обликом болести, ранијим почетком и лошијим терапијским одговором (57, 58).
- DRB1*0401: учесталије се повезује са блажом клиничком сликом и бољим одговором на кортикостероиде, типично код старијих болесника (58).
- DRB1*07: има доминантну улогу код пацијената са АИХ типа 2, што додатно потврђује генску дивергентност ова два типа болести (59).

1.3.3. Молекулска мимикрија и поремећај имунорегулације

Хипотеза о молекулској мимикрији представља један од кључних етиопатогенетских модела за објашњење механизма иницијације аутоимунског одговора и прогресије болести (53, 60). Овај феномен се заснива на структурној сличности између егзогенних патогена (вируса или бактерија) и ендогених протеина јетре. Најочигледнији пример је код АИХ типа 2, где постоји значајна сличност између ензима CYP2D6 и антигена вируса *Herpes simplex* тип 1 (HSV-1) или вируса хепатитиса C (HCV) (61-63).

Међутим, сама мимикрија није довољна за развој хроничне болести без паралелног поремећаја супресивних механизма. Код пацијената са АИХ документован је значајан пад у броју и функцији регулаторних Т лимфоцита (Tregs), који су одговорни за обуздавање аутореактивних клонова (51, 64). Овај функционални дефицит омогућава несметану активацију Th17 и Th1 ефекторских ћелија, које луче проинфламацијске цитокине и регрутују макрофаге и неутрофиле у паренхим јетре (65, 66). Повећана продукција IL-17 додатно погоршава стање индукујући фиброгенезу, стварајући зачарани круг перзистентне упале и деструкције ткива (67, 68).

1.4. Имунопатогенеза и ћелијски механизми оштећења јетре

Аутоимунски хепатитис карактерише специфичан облик имунске патолошке реакције који настаје као последица интрахепатичне дисрегулације и слома имунске толеранције. У физиолошким условима, јетра је програмирана да одржава стање активне имунске хомеостазе и енергије према дијетарним и бактеријским антигенима из портне циркулације (69-71). Овај имуносупресивни миље примарно детерминишу резидентне Купферове ћелије, синусоидне ендотелне ћелије (енгл. *Liver Sinusoidal Endothelial Cells* – LSEC) и специфична популација регулаторних Т лимфоцита (Treg, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) (72, 73).

У патолошким условима АИХ, имуносупресивни микроамбијент се трансформише у изразито инфламацијски. Овај процес је праћен нумеричким и функционалним дефицитом Treg популација, што омогућава неконтролисану активацију и пролиферацију ефекторских Т ћелија (Th1 и Th17) (74). Сопствени хепатоцити постају примарна мета деструктивног одговора посредованог цитотоксичким Т лимфоцитима (CD8⁺), који инфилтришу паренхим (71, 73).

Хистопатолошки корелат овог процеса започиње у портним трактовима и прогресивно захвата лобуларне структуре, пролазећи кроз тзв. интерфејс зону (75). Ово резултира карактеристичном сликом интерфејс хепатитиса (*interface hepatitis*), где лимфоплазмоцитни инфилтрат нарушава интегритет граничне плоче (*limiting plate*). Резултат овог пробоја је лимфоцитна инфилтрација дубоко у лобулусе, праћена некрозом хепатоцита и почетним фазама фиброгенезе (75-77).

1.4.1. Иницијација и интрахепатична активација лимфоцита

За разлику од типичних имунских одговора који почињу у секундарним лимфним органима, код АИХ значајну улогу у започињању имунске реакције играју синусоидне ендотелне ћелије јетре, LSEC (72) (78). Као високоспецијализовани ендотел са јединственом фенестрираном структуром, LSEC делују као примарна баријера између системске циркулације и хепатоцита (79). Током ConA-индукованог оштећења, LSEC су међу првим метама патолошког одговора, када губе фенестрираност и повећавају експресију адхезивних молекула, што олакшава екстравазацију лимфоцита у паренхим (80). Ове ћелије поседују јединствен капацитет да делују као нетипичне антиген-презентујуће ћелије унутар самог органа (80). LSEC директно излажу специфичне ауто-пептиде јетре (попут CYP2D6 код Типа 2 или SLA/LP код Типа 1) наивним CD4⁺ лимфоцитима (81). Код генски предиспонираних особа, овај контакт, уместо толеранције, иницира патолошку активацију. Нарушена микросредина узрокује аберантну експресију адхезивних молекула, пре свега ICAM-1 и VCAM-1, на површини ендотела и хепатоцита (82). Формирањем имунске синапсе омогућава се стабилна физичка веза између Т лимфоцита и циљног хепатоцита, што представља критичну тачку преласка из латентне фазе у активну цитотоксичку деструкцију (83, 84).

1.4.2. Ћелијски дисбаланс: Th1/Th17 ефектори наспрам Treg

- Фундаментални поремећај у патогенези АИХ лежи у дубоком дисбалансу између проинфламацијских ефекторских ћелија и регулаторних механизма:
- Доминација Th1 и Th17 одговора: CD4⁺ Т-помагачки лимфоцити, једном активирани, оркестрирају инфламацијски одговор путем секреције великих количина IFN- γ . Овај цитокин индукује огромну експресију HLA класе II на самим хепатоцитима, чиме они постају директне мете Т лимфоцитима (85, 86). Паралелно са Th1 одговором, специфично се унутар лобулуса акумулирају Th17 лимфоцити. IL-17 који продукују ове ћелије не само да појачава инфламацију, већ и директно активира Купферове и звездасте ћелије јетре (енг. *Hepatic Stellate Cells* – HSCs), чиме се поставља основа за брзу прогресију ка фибрози (67, 87).
- Функционални дефицит Treg: иако су регулаторни Т лимфоцити присутни у инфилтрату, они су код оболелих од АИХ дисфункционални. Поремећај у CTLA-4 сигналном путу и смањена продукција супресорских цитокина попут IL-10 онемогућавају адекватно гашење имунског одговора (88). Овај губитак локалне контроле

омогућава самоодрживост инфламацијске каскаде и прогресивно пропадање паренхима (9).

1.4.3. Механизми амплификације: *Bystander Activation*

Прогресија АИХ додатно је компликована механизмом познатим као *bystander activation* (89). Изразито проинфламацијско микроокружење, засићено цитокинима попут IL-12 и IL-18, неспецифично активира околне лимфоците који нису специфични за аутоантигене јетре (90, 91). Ови пасивни посматрачи се укључују у имунску/инфламацијску реакцију, ослобађајући додатне ефекторске молекуле који изазивају масивно колатерално оштећење здравог паренхима. Управо овај феномен објашњава зашто АИХ може за врло кратко време прећи из асимптоматског стања у фулминантни хепатитис са акутном инсуфицијенцијом јетре.

1.5. Механизми ефекторске фазе, улога Fas/FasL сигнализације у индукцији апоптозе хепатоцита

У завршној, ефекторској фази аутоимунског хепатитиса, примарни начин деструкције паренхима јетре није пасивна некроза, већ активно индукована апоптоза посредована специфичним рецепторима смрти (92). Спољашњи пут апоптозе представља кључни моменат имунопатолошког процеса у којем Т лимфоцити, путем директног контакта са мембраном хепатоцита, активирају каспазну каскаду и изазивају оштећење ткива (93).

1.5.1. Динамика хиперекспресије Fas рецептора на хепатоцитима

Код здравих особа, хепатоцити експримирају веома ниске, готово недетектабилне нивое Fas рецептора (CD95), чиме су природно заштићени од аутоагресије (92). Међутим, у проинфламацијском микроокружењу карактеристичном за АИХ, под синергистичким дејством високих концентрација цитокина, првенствено IFN- γ и TNF- α , нагло се повећава експресија Fas рецептора на мембрани хепатоцита (92, 94). Ова појава значајно подиже осетљивост паренхима на апоптотске сигнале које носе активирани CD8⁺ цитотоксички Т лимфоцити и Th1 ћелије, које на својој површини појачано експримирају Fas лиганд (FasL или CD178) (95).

1.5.2. Интрацелуларна каскада и улога митохондрија

Везивање FasL за Fas рецептор индукује тримеризацију рецептора и формирање специфичног протеинског комплекса познатог као DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) (96). Формирани комплекс омогућава регрутацију прокаспазе-8, која након аутокаталитичке протеолизе прелази у своју активну форму. Тиме каспаза-8 преузима улогу централног молекулског покретача низводне каспазне каскаде. Будући да хепатоцити припадају тзв. ћелијама Типа II, сигнал генерисан преко DISC комплекса није довољно снажан за директну активацију ефекторских каспаза (97). Стога је неопходна амплификација сигнала путем митохондрија. Путем активације Bid протеина и његове конверзије у *truncated* облик (tBid), каспаза-8 омогућава пропагацију сигнала до митохондријалне мембране (98). Овај процес резултује нарушавањем мембранског интегритета и ефлуksom цитохрома c, чиме се покреће финална фаза апоптотичке каскаде (99, 100).

1.5.3. Финална деградација и хистолошка корелација

Ослобођени цитохром c у цитосолу формира апоптозом, који активира ефекторске каспазе 3, 6 и 7 (101). Ови ензими катализују коначну деградацију структурних протеина и фрагментацију једарне ДНК, што резултује карактеристичном пикнозом и кондензацијом цитоплазме хепатоцита (102, 103). Хистолошки, овај процес резултује трансформацијом хепатоцита у интензивно еозинофилна, округла тела позната као Каунсилманова (*Councilman*)

или ацидофилна тела, која представљају патогномоничан маркер активности АИХ (9, 104). За разлику од некрозе, овај вид програмиране ћелијске смрти омогућава да имунопатолошки процес остане строго локализован на хепатоците. Очувањем интегритета ћелијске мембране спречава се ефлукс интрацелуларног садржаја. Специфично паковање ћелијског материјала у апоптотичка тела онемогућава ослобађање проинфламацијских DAMP молекула (енг. *Damage-Associated Molecular Patterns*), који би иначе изазвали колатералну деструкцију ткива (105, 106).

1.6. Имунорегулаторна динамика цитокина у АИХ, молекулски механизми пропагације ткивног оштећења

Цитокински профил представља кључни фактор у развоју АИХ, јер директно одређује смер и јачину имунски посредованог оштећења јетре. Као централни регулатори, цитокини омогућавају прелаз са почетног губитка толеранције на прогресивно и самоодрживо оштећење ткива. Сталан поремећај равнотеже ка проинфламацијским медијаторима ствара токсично окружење, у ком неколико кључних сигналних путева (првенствено Th1 и Th17) игра кључну улогу у трајном пропадању хепатоцита (51, 107).

1.6.1. Th1 осовина, IFN- γ као примарни иницијатор имунопатологије

Интерферон-гама (IFN- γ) игра кључну улогу у имунопатогенези аутоимунског хепатитиса (108). Док у вирусним хепатитисима овај цитокин делује као кључни антивирусни агенс који омогућава елиминацију патогена, у АИХ његова неконтролисана продукција узрокује прекид природног толерогеног стања јетре. Значај IFN- γ се рефлектује кроз хијерархијско деловање на три кључна молекулска нивоа:

1. Индукција аберантне експресије МНС II. Најзначајнија патогенетска специфичност IFN- γ у току развоја АИХ јесте његова способност да путем JAK-STAT сигналног пута покрене транскрипцију гена за МНС молекуле друге класе (HLA-DR) унутар самих хепатоцита (108). У физиолошким условима, хепатоцити, као и све остале ћелије са једром експримирају само МНС I класе. Међутим, под утицајем IFN- γ , хепатоцит се трансформише у атипичну антиген-презентујућу ћелију (108). Овај процес омогућава директну презентацију интрацелуларних аутоантигена (попут CYP2D6) помагачким CD4⁺ Т лимфоцитима (109). Ово је кључни молекулски догађај који затвара зачарани круг, јер активирани Т лимфоцити повратно продукују још веће количине IFN- γ , аутоампликујући хроничну упалу (110).

2. Контрола хемотаксе и портна инфилтрација. IFN- γ делује као главни регулатор портне инфилтрације тако што стимулише ћелије јетре (ендотелне ћелије и хепатоците) на продукцију специфичних хемокина из породице CXC, првенствено CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) и CXCL11 (I-TAC) (111). Ови молекули имају висок афинитет за CXCR3 рецепторе на површини активираних Т лимфоцита и Th1 ћелија у системској циркулацији. Овај специфични хемоатрактантни профил директно детерминише формирање интерфејс хепатитиса, тако што прецизно усмерава екстравазацију и миграцију лимфоцитног инфилтрата из портних простора ка дубини паренхима јетре (112).

3. Активација ефекторских цитотоксичких механизма и интерцелуларна адхезија. Поред презентације и регрутације, IFN- γ директно модулише цитотоксички потенцијал имунских ћелија. Значајно појачава експресију адхезивног молекула ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) на мембрани хепатоцита, чиме се драстично повећава стабилност имунске синапсе (113). Такође, IFN- γ делује на цитотоксичке CD8⁺ Т лимфоците и NK ћелије, стимулишући их на хиперпродукцију перфорино и гранзима В (114). У овом контексту, IFN- γ практично спушта праг потребан за деструкцију ћелије, чиме хепатоците чини подложним апоптози чак и при веома ниским концентрацијама специфичног антигена.

1.6.2. TNF- α као кључни медијатор системске инфламације и апоптотичке сигнализације путем домена смрти

Фактор некрозе тумора-алфа (TNF- α) представља један од најмоћнијих ефекторских цитокина у патогенези аутоимунског хепатитиса. Овај медијатор директно детерминише судбину хепатоцита, покрећући специфичне сигналне путеве који ћелију неповратно усмеравају ка програмираној смрти (115, 116). У микроокружењу јетре код АИХ, TNF- α делује као активни медијатор који повезује упалу у портном простору са паренхимском деструкцијом кроз неколико специфичних путева:

1. Сигнализација путем TNFR1 и иницијација апоптозе. Хепатоцити код пацијената са АИХ показују абнормално високу експресију рецептора за TNF типа 1 (TNFR1) (117). Везивање TNF- α за овај рецептор регрутује адапторске протеине (попут TRADD и FADD) и активира унутарћелијски домен смрти (*death domain*). Овај процес покреће каскаду каспаза независно од Fas пута, али са истим леталним исходом по ћелију. Овај механизам је одговоран за појаву фокалне некрозе коју патолози идентификују у биопсијама јетре, где групе хепатоцита пропадају под директним налетом цитокиноског удара (117-119).

2. Индукција оксидативног стреса и митохондријална дисфункција. Специфичност TNF- α у патогенези АИХ огледа се и у његовом утицају на метаболизам и оксидативни статус хепатоцита. Овај цитокин индукује прекомерну продукцију реактивних врста кисеоника (ROS) унутар митохондрија ћелија јетре, што за резултат има пероксидацију липида и тешко оштећење ћелијских мембрана (120-122). Поред директног оштећења, TNF- α блокира и регенеративну способност јетре тако што инхибира пролиферацију преосталих здравих хепатоцита, чиме се онемогућава брза репарација ткива након имунског оштећења (123).

3. Појачавање хемотаксе. TNF- α је главни стимулатор за експресију адхезивних молекула попут Е-селектина и VCAM-1 на синусоидним ендотелним ћелијама јетре (LSEC) (124). Без деловања овог цитокина, лимфоцити који круже крвотоком не би могли да се зауставе, вежу за ендотел и продру у ткиво јетре. Додатно, TNF- α стимулише Купферове ћелије на лучење секундарних цитокина (IL-1 и IL-6), чиме се ствара самоодрживи циклус упале који је веома тешко прекинути без агресивне имуносупресивне терапије (125).

Релевантност за ConA модел и истраживање сурутке. У експерименталном моделу хепатитиса изазваном конканавалином А (ConA), TNF- α је један од примарних цитокина чија се системска концентрација значајно повећава већ након 90 минута, што претходи масивној некрози паренхима. С обзиром на то да биоактивни састојци лиофилизоване козје сурутке, попут лактоферина, поседују способност модулације проинфламацијских сигнала у макрофагима, праћење нивоа овог цитокина представља поуздан индикатор за евалуацију хепатопротективног дејства суплемента у овом моделу.

1.6.3. Th17 осовина, IL-17 као медијатор неутрофилне инфилтрације и профиброгенезе

Док се IFN- γ дефинише као примарни ефектор акутне цитотоксичности, интерлеукин-17 делује као кључни молекулски модификатор структуре јетре који значајно потенцира прогресију фиброгенних процеса ка цирози јетре (67). Патогенетска специфичност Th17 имунског одговора у оквиру АИХ огледа се у његовој бивалентној улози: перзистенцији акутне инфламације и симултаној индукцији хроничне фиброзе паренхима.

1. Масовна регрутација неутрофила и резистенција на терапију.

Једна од најзначајнијих карактеристика IL-17 је способност да стимулише хепатоците и епителне ћелије жучних путева на продукцију снажних хемотаксних фактора из СХС породице, пре свега CXCL1, CXCL2 и CXCL8 (IL-8) (126, 127). Ови хемокини привлаче неутрофиле из системске циркулације директно у паренхим јетре. Присуство интензивног неутрофилног

инфилтрата клинички корелира са акутним егзацербацијама и тежим облицима АИХ. Истраживања су показала да висок ниво IL-17 може изазвати смањење осетљивости глюкокортикоидних рецептора унутар лимфоцита, што објашњава феномен резистенције на стандардну терапију кортикостероидима код појединих пацијената (128).

2. Директна активација звездастих ћелија (HSC) и синтеза екстрацелуларног матрикса.

За разлику од Th1 цитокина, IL-17 поседује директну молекулску везу са процесом фиброгенезе. Рецептори за овај цитокин (IL-17RA) експимирани у су у значајној мери на површини звездастих ћелија јетре, HSC. Везивање IL-17 за ове рецепторе активира сигналне путеве који трансформишу мирне HSC у активне миофибробласте (67, 129). Ови активирани миофибробласти масовно синтетишу колаген типа I и III, што објашњава зашто пацијенти са доминантним Th17 профилом значајно брже развијају фиброзу у поређењу са онима код којих преовладава чист Th1 одговор (67).

3. Синергија са проинфламацијским цитокинима.

У микроокружењу јетре, IL-17 остварује снажну синергију са TNF- α и IL-6. Ова комбинација цитокина драматично појачава продукцију реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species* – ROS) и додатно регрутује макрофаге, стварајући самоодрживо жариште које онемогућава спонтану регенерацију ткива (130). У ConA експерименталном моделу, експлозивни скок IL-17 један је од главних предиктора масивне некрозе, што га чини идеалним биомаркером за процену имуномодулаторног ефекта потенцијалних терапеутика (131).

1.6.4. Дефицит регулаторних цитокина, улога IL-10 и Treg у слому имунске хомеостазе

Функционални колапс регулаторних механизма представља одлучујући патофизиолошки догађај у прогресији аутоимунског хепатитиса. Док проинфламацијски цитокини (IFN- γ , TNF- α , IL-17) детерминишу обим и јачину инфламацијског одговора, супресивна дисфункција регулаторних Т лимфоцита и дефицит интерлеукина-10 онемогућавају реституцију имунске толеранције, чиме се фаворизује перзистентна аутодеструкција паренхиме (51).

У здравој јетри, популација CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ регулаторних ћелија константно сузбија потенцијалне аутореактивне одговоре (51, 69). Код пацијената са АИХ, овај заштитни механизам је двоструко компромитован. Прво, примећена је смањена експресија транскрипционог фактора FOXP3, што Treg чини функционално немоћним пред агресивним Th1 и Th17 ефекторским ћелијама (132). Друго, у микроокружењу богатом цитокинима попут IL-6, ове ћелије показују изражену патолошку пластичност и често се трансформишу у тзв. „ex-Treg” које заправо почињу да секретују проинфламацијске цитокине, чиме се додатно продубљује поремећај имунске толеранције (133, 134).

Оваква функционална дестабилизација регулаторних лимфоцита директно резултује дефицитом интерлеукина-10, кључног антиинфламацијског цитокина задуженог за супресију проинфламацијске каскаде. У условима смањене биорасположивости IL-10, изостаје инхибиција антиген-презентујућих ћелија и макрофага, што омогућава несметану експанзију аутореактивних Т ћелија и перзистентно лучење цитотоксичких медијатора (135).

IL-10 је најважнији антиинфламацијски медијатор који примарно продукују Treg и макрофаги M2 фенотипа (136, 137). Његова пресудна улога у јетри остварује се кроз неколико нивоа:

1. Инхибиција презентације антигена: IL-10 директно смањује експресију МНС II и костимулаторних молекула на дендритским ћелијама, чиме се супримира инфламацијски одговор (138, 139).

2. Супресија цитокинске олује: снажно инхибира транскрипцију и продукцију TNF- α и IFN- γ , делујући као природни противтег имунској агресији (140).

3. Резолуција инфламације: овај цитокин олакшава транзицију из деструктивне фазе у процес репарације ткива. Субнормални нивои IL-10 код оболелих

представљају примарни узрок хроничитета и самоодрживости инфламације, чиме се онемогућава спонтана резолуција инфламацијског процеса (51, 141).

Сходно томе, патогенеза АИХ се не може посматрати искључиво као хиперактивација ефекторског инфламацијског имунског одговора, већ као неуспех имунорегулаторне хомеостазе. Управо у овом сегменту лежи терапијски потенцијал биоактивних једињења способних да модулишу цитокински миље, што може бити кључно за обнову супресивне функције Treg и поновно успостављање имунске равнотеже у оштећеној јетри.

1.7. Експериментални модел хепатитиса индукован конканавалином А

Индукција оштећења јетре конканавалином А представља најрелевантнији претклинички модел за евалуацију имуномодулаторних и хепатопротективних ефеката нових супстанци (142, 143). Овај модел се сматра супериорним јер не изазива директну хемијску токсичност, већ покреће комплексне имунске путеве који су готово идентични онима код хуманог аутоимунског хепатитиса (144, 145).

1.7.1. Молекулска природа и порекло ConA

Конканавалин А, ConA (*Concanavalin A*) је лектин изолован из биљке *Canavalia ensiformis* (енг. *Jack bean*), који поседује специфичан афинитет везивања за остатке α -D-манозе и α -D-глукозе (146). Биолошка активност овог молекула директно зависи од његове структуре. При физиолошким вредностима рН, ConA постоји као тетрамер са четири идентична везивна места за шећере (147). Свака подјединица садржи специфична места за везивање металних јона, првенствено калцијума (Ca^{2+}) и мангана (Mn^{2+}), који су неопходни за стабилизацију конформације и повећање афинитета за гликозидне остатке.

Високи афинитет ConA према разгранатим триманозидним структурама чини га изузетно ефикасним у препознавању и унакрсном повезивању (*cross-linking*) гликопротеина који су густо распоређени на површини Т лимфоцита (148). За разлику од класичних активатора Т лимфоцита који захтевају претходну активацију антиген-презентујућих ћелија и приказивање антигена у имуногеном контексту, ConA у иницијацији имунског одговора делује као директан агониста Т ћелијског рецепторског комплекса (149). Овај лектин практично симулира сигнал препознавања антигена (стимулација и Т ћелијског рецептора и костимулаторних рецептора), изазивајући поликлонску активацију Т лимфоцита без обзира на њихову примарну антигенску специфичност (150).

Наведене карактеристике дефинишу ConA као селективни имунски модел који искључује неспецифичну хемијску цитотоксичност и фокусира се на циљану активацију ефекторских механизма карактеристичних за аутоимунску патологију. Структурна стабилност тетрамера у раствору омогућава да интравенска администрација резултује брзом системском дистрибуцијом и униформним оштећењем хепатичних лобулуса (142, 149). Овакав приступ обезбеђује високу репродукцибилност модела, неопходну за евалуацију хепатопротективног дејства биоактивних нутријената.

1.7.2. Патогенетски механизам ConA хепатитиса

Процес оштећења јетре инициран конканавалином А одвија се кроз две функционално повезане фазе које заједно резултују фулминантним губитком функционалног паренхима.

1. Активација Т лимфоцита и иницијација цитокинске проинфламацијске каскаде.

Након везивања за TCR комплекс и костимулаторни молекул CD28, ConA индукује структурне промене ћелијске мембране које омогућавају масивни прилив јона калцијума (Ca^{2+}) из екстрацелуларног простора и ендоплазматског ретикулума у цитосол (149, 151). Овај нагли скок интрацелуларне концентрације калцијума активира калцинеурин-зависну дефосфорилацију транскрипционог фактора NFAT, као и

активацију NF-κB (152, 153). Транслокација ових фактора у једро покреће интензивну транскрипцију гена за проинфламацијске медијаторе који преплављују синусоиде јетре. У овој раној фази, IL-2 делује као аутокрини фактор који стимулише хиперпролиферацију активираних ефекторских Т ћелија (154). Нагла експанзија имунског одговора узрокује колапс локалне имунорегулације, што резултује брзим наглим падом супресивних сигнала (IL-10) и оставља паренхим јетре без природне заштите (155).

2. Улога Купферових ћелија, оксидативни стрес и митохондријални колапс. Активација Купферових ћелија (резидентних макрофага јетре) представља секундарну фазу која значајно амплификује примарна оштећења иницирана лимфоцитима (156). Под дејством IFN-γ, ови макрофаги ослобађају високе концентрације фактора некрозе тумора (TNF-α), који везивањем за TNFR1 рецептор на хепатоцитима индукује активацију каспазних каскада и путева ћелијске смрти (157). Симултано са овим процесом, хиперпродукција реактивних врста кисеоника и супероксидних радикала узрокује брзу деплецију интрацелуларних залиха глутатиона (158). Губитак антиоксидативног капацитета излаже хепатоците интензивној липидној пероксидацији, што дестабилизује митохондријалне мембране и резултује ефлуksom цитохрома c у цитосол. Овакав митохондријални колапс представља критичну тачку након које патолошки процес постаје иреверзибилан (159).

1.7.2. Кинетика хепатоцелуларног оштећења, биохемијска и временска карактеризација

Еволуција оштећења јетре у ConA моделу одликује се строго дефинисаном хронологијом, што омогућава високу репродуцибилност експеримената и прецизну евалуацију терапијског ефекта биоактивних супстанци кроз три критичне фазе:

1. Рана фаза: молекуларна иницијација (1–4 сата)

У овом иницијалном периоду, паренхим пролази кроз фазу интензивне имунске сензитизације. Кључни патофизиолошки догађај је нагли пораст серумског TNF-α, који свој максимум достиже већ након 90–120 минута (160). Иако је проинфламацијска каскада већ покренута, активности ензима јетре (ALT и AST) у овој фази остају у границама физиолошких вредности или показују само благи тренд раста. Ово указује на чињеницу да је структурни интегритет мембране хепатоцита још увек очуван, упркос масивној интрахепатичној активацији Т лимфоцита и Купферових ћелија (144, 160).

2. Интермедијарна фаза: амплификација оштећења и цитолиза (4–12 сати)

Ова фаза представља кулминацију патолошког процеса и критични период у ком се детерминише степен преживљавања паренхима. Серумске концентрације IFN-γ и IL-17 достижу врхунац, индукујући масивну инфилтрацију неутрофила и мононуклеарних ћелија (161, 162). Нарушава се селективна пермеабилност ћелијских мембрана, што резултује експоненцијалним скоком активности трансаминаза. Специфичност овог модела огледа се у томе што активност AST често превазилази ALT, што одражава примарну дисфункцију митохондрија и оштећење дубоких слојева паренхима под дејством оксидативног стреса. Ово представља кључни терапијски прозор у ком биоактивне компоненте могу да испоље свој максимални антиоксидативни и хепатопротективни ефекат уколико се примене терапијски, превенирајући неповратно пропадање ћелија (163, 164).

3. Касна фаза: Фулминантна деструкција и метаболички колапс (12–24 сата)

Након 12 сати, оштећење прогредира у иреверзибилну фазу фулминантне некрозе. Вредности ALT могу достићи екстремно високе вредности (преко 10.000 U/L), што је објективни индикатор масивне, конфлуентне некрозе (71, 142). Поред трансаминаза, бележи се значајан пораст лактат-дехидрогеназе (LDH), као и скок укупног

билирубина, што указује на секундарно оштећење билијарног епитела и потпуни колапс хомеостатских и ендокриних функција јетре. Ова тачка представља коначни биохемијски профил деструкције пре активирања механизма спонтане регенерације (165, 166).

1.7.3. Динамика морфолошких лезија у ConA моделу: прогресија инфламацијског инфилтратата ка масивној деструкцији паренхима

Микроскопска анализа ткива јетре након апликације ConA открива сложену патохистолошку слику која верно репродукује кључне карактеристике хуманог аутоимунског хепатитиса.

- Интерфејс хепатитиса и портна инфилтрација.

Једна од најзначајнијих карактеристика ConA хепатитиса је појава интерфејс хепатитиса (енг. *interface hepatitis*). Портни простори постају густо инфилтрисани мононуклеарним ћелијама, првенствено активираним Т лимфоцитима и макрофагима, који пробијају граничну плочу и агресивно продиру у дубину паренхима јетре (71, 167). Овај процес праћен је едемом портних трактова и деструкцијом хепатоцита који су у директном контакту са инфламацијским инфилтратом.

- Феномен сателитозе и апоптотичка тела.

Карактеристичан микроскопски налаз у ConA моделу хепатитиса је сателитоза, феномен при којем група активираних лимфоцита интимно окружује појединачни, још увек витални хепатоцит (142, 168). Ова блиска интерцелуларна интеракција представља морфолошки корелат Fas/FasL-зависне апоптозе, при чему ефекторске ћелије делују као директни молекулски егзекутори, индукујући каскаду програмиране смрти у циљној ћелији (169, 170). Хистолошки се овај процес манифестује појавом ацидофилних, тзв. *Councilman*-ових тела, која представљају кондензоване и еозинофилне фрагменте апоптотичких хепатоцита (171).

- Зонална и конфлуентна некроза.

Прогресијом оштећења, појединачна фокална некротична жаришта коалесцирају, формирајући поља масивне конфлуентне некрозе. Ове промене доминантно захватају центрилобуларне зоне (око централних вена) и перипорталне просторе (Зона 1 и Зона 3 Рапапортовог ацинуса), што указује на специфичну метаболичку и имунску рањивост ових сегмената паренхима (71, 142). У овој фази, разара се нормална цитоархитектура лобулуса, што је праћено појавом интрасинусоидалних хеморагија и микротромбоза.

1.7.4. Компаративна предност ConA модела у односу на токсиколошке моделе (CCl₄ и APAP)

Селекција ConA модела за евалуацију терапијског потенцијала нутритивних биоактивних супстанци заснована је на специфичним патофизиолошким карактеристикама који га чине супериорним у односу на конвенционалне токсиколошке моделе, попут оних индукованих угљен-тетрахлоридом (CCl₄) или ацетаминофеном (APAP):

Имунска vs. директна метаболичка токсичност

За разлику од CCl₄ и APAP-а, који изазивају оштећење јетре путем директне метаболичке токсичности и генерисања реактивних метаболита (попут N-ацетил-р-бензохинон имида, NAPQI, или слободних радикала) који изазивају некрозу без примарног учешћа имунског система, ConA модел је апсолутно зависан од присуства и функције Т лимфоцита (142, 172). Примарно учешће адаптивног имунског система у овом моделу потврђено је у експерименталним условима на атимичним (*nude*) мишевима, код којих администрација ConA не изазива патолошке промене у паренхиму јетре (142). Наведена специфичност позиционира ConA хепатитиса као аутентични имунски посредован модел хуманог аутоимунског хепатитиса, где је деструкција хепатоцита секундарна консеквенца губитка имунске толеранције.

Диференцијална вредност модела у евалуацији имуномодулаторних супстанци

Избор адекватног експерименталног модела је критичан за испитивање једињења чији примарни механизам деловања обухвата регулацију цитокинске мреже и модулацију диференцијације Т лимфоцита. У токсиколошким моделима изазваним СС14 или ацетаминофеном, биоактивни нутритивни модулатори би испољили превасходно свој неспецифични антиоксидативни капацитет, чиме би се занемарио њихов сложенији патофизиолошки утицај на адаптивну имуност. Насупрот томе, ConA модел омогућава прецизну анализу имуномодулаторног капацитета испитиване супстанце. Ово подразумева способност супстанце да супримира хиперактивацију ефекторских Т ћелија, модулише проинфламацијски цитокински профил и фаворизује реституцију регулаторних механизма путем рестаурације нивоа IL-10 (9). Овакав приступ омогућава дефинисање мултимодалног механизма деловања који превазилази оквире хемијске неутрализације токсина, пружајући дубљи увид у терапијски потенцијал нутритивних једињења у контексту аутоимуности.

Хистоморфолошка и патогномонична подударност

Само ConA модел успешно репродукује тзв. *interface hepatitis* и портну инфилтрацију лимфоцитима, што су кључни патогномонични знаци аутоимунског оштећења код људи (142). Модели са парацетамолом изазивају чисту центрилобуларну некрозу без карактеристичног напада имунских ћелија на граничну плочу паренхима (173, 174). Стога, коришћење ConA модела омогућава да се хепатопротективни ефекат сурутке потврди кроз смањење специфичне имунске агресије, а не само кроз опште смањење ћелијског пропадања.

Кратка временска динамика и репродуктивност

За разлику од хроничних токсичних модела који захтевају вишенедељну примену супстанци и често резултују адаптацијом организма, ConA изазива фулминантно оштећење у врло кратком и предвидивом временском прозору (8–24 сата) (143, 142). Ово омогућава прецизно мерење заштитног ефекта испитиване супстанце пре него што се укључе механизми спонтане фиброгенезе или регенерације који би могли да замаскирају стварни ефекат третмана.

1.8. Лиофилизована козја сурутка, LGW (eng. *Lyophilized Goat Whey*): нутритивни састав и имунопротективни механизми

Козја сурутка се кроз историју народне медицине издвојила као „златни стандард” природне терапијске потпоре код различитих паренхимских обољења јетре. Међутим, тек савремена имунофармакологија и напредне протеомичке анализе откривају прецизан молекулски мозаик који стоји у основи овог хепатопротективног дејства (175-177). Као комплексна биолошка течност која настаје као нуспроизвод у технолошком процесу коагулације казеина и производње сира, сурутка представља концентрат виталних материја млека (178). Она садржи преко 200 специфичних биоактивних компоненти, укључујући протеине високе биолошке вредности, сложене олигосахариде, липиде и микроелементе који директно модулишу антиоксидативне и одбрамбене механизме домаћина (179, 180).

Посебна специфичност козје сурутке, у поређењу са крављом, огледа се у њеном уникатном саставу који је филогенетски ближи хуманом млеку, што омогућава већу биорасположивост и бољу имунску толеранцију (181-183). Биоактивни протеини сурутке, попут лактоферина и имуноглобулина, поседују изражену термолабилност, због чега конвенционалне методе пастеризације често за последицу имају њихову иреверзибилну денатурацију и губитак терапеутског индекса (184). Као сублимациони процес сушења из смрзнутог стања при екстремно ниском притиску, лиофилизација омогућава уклањање воде уз потпуно очување кватернарне структуре и нативне конформације макромолекула (185, 186).

Лиофилизована форма козје сурутке не дефинише се искључиво као нутритивни суплемент, већ као комплексан систем за биоиспоруку биоактивних пептида (187) који модулишу кључне имунске чек-поинт тачке унутар микроваскуларне мреже синусоида јетре (188, 189). Оваква дефиниција почива на способности протеина сурутке да формирају заштитне нано-структуре које чувају терапеутски индекс молекула и усмеравају их ка специфичним рецепторима, чиме се оптимизује имуномодулаторни и антиоксидативни одговор домаћина.

Напредна технологија прераде који условљава очување нативне структуре молекула сурутке и омогућава високу биорасположивост активних компоненти, што је предуслов за прецизну евалуацију имуномодулаторних ефеката у комплексним претклиничким моделима.

1.8.1. Протеински профил козје сурутке и биолошки активни макромолекули

Протеински профил козје сурутке представља софистициран биолошки систем чија функционалност примарно зависи од очувања нативне конформације и терцијарне структуре молекула (190, 191). За разлику од казеина, протеини сурутке су глобуларне природе и поседују висок садржај есенцијалних аминокиселина, али и специфичне биолошке домене који им омогућавају улогу активних имуномодулатора.

Бета-лактоглобулин (β -LG): главни носилац имуномодулације и репарације

Као најзаступљенији протеин козје сурутке, β -LG поседује јединствену просторну структуру познату као *lipocalin fold* (192). Овај хидрофобни „деп” унутар молекула омогућава везивање и транспорт малих хидрофобних лиганда, попут ретинола и масних киселина, чиме се директно потпомаже метаболичка стабилност хепатоцита (193). Поред транспорта, β -LG је богат извор аминокиселина са разгранатим ланцима (BCAA), пре свега леуцина. Након ензимске хидролизе, ови пептиди активирају mTOR (енг. *mammalian target of rapamycin*) сигнални пут, који је кључни регулатор синтезе протеина и ћелијског раста, чиме се убрзава регенерација паренхиме јетре (194).

Алфа-лактоалбумин (α -LA): примарни супстрат за реституцију ендогеног антиоксидативног система

α -лактоалбумин је кључни протеин за одржавање редокс равнотеже унутар јетре. Он представља најбогатији природни извор цистеина, аминокиселине која садржи сулфхидрилну (-SH) групу и представља ограничавајући фактор за синтезу глутатиона (*(γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine; GSH)*). С обзиром на то да ConA индукује масивну деплецију GSH кроз продукцију реактивних врста кисеоника, висок унос α -LA омогућава хепатоцитима да превазиђу оксидативни стрес и спрече пероксидацију мембранских липида (195, 196). Додатно, козји α -LA показује висок степен хомологије са хуманим протеином, што смањује ризик од нежељених имунских реакција током суплементације (181).

Лактоферин (Lf): кључни имуномодулаторни протеин у превенцији системског инфламацијског одговора

Лактоферин је мултифункционални гликопротеин са израженим афинитетом за јоне гвожђа (Fe^{3+}). У контексту аутоимунског хепатитиса, Lf делује као снажан имуносупресор тако што директно инхибира транслокацију NF- κ B транскрипционог фактора у једро имунских ћелија. Овом блокадом се драматично смањује експресија гена за проинфламацијске цитокине, првенствено TNF- α и IFN- γ , чиме се зауставља каскада која води ка фулминантној некрози (197, 198). Такође, везивањем слободног гвожђа, лактоферин онемогућава Фентонову реакцију, чиме се превентивно спречава настанак најразорнијих хидроксилних радикала у синусоидима јетре (199, 200).

Имуноглобулини (IgG1, IgA, IgM): системска имунска потпора

Фракција имуноглобулина у лиофилизованом сурутци пружа критичну подршку кроз два механизма. Прво, они неутралишу антигене и патогене у гастроинтестиналном тракту, чиме се значајно смањује транслокација ендотоксина у портни крвоток (тзв. „осовина црева-јетра”). Друго, ови макромолекули модулишу активност Т лимфоцита и NK ћелија, спречавајући њихову претерану деструктивну активност усмерену ка хепатоцитима (196, 201). Посебна предност имуноглобулина козјег порекла је њихова стабилност и мања молекулска маса у поређењу са крављим панданима, што олакшава њихову функционалну интеграцију у имунски систем домаћина (202).

1.8.2. Биоактивни пептиди и аминокиселине, механизми детоксикације

Осим макромолекула протеина, лиофилизована козја сурутка представља примарни извор биоактивних пептида мале молекулске масе и слободних аминокиселина који служе као директно метаболичко гориво за интрацелуларну репарацију и детоксикацију хепатоцита:

Синтеза глутатиона и спречавање каспазне каскаде

Примарни хепатопротективни механизам козје сурутке заснива се на њеном капацитету да значајно поспешу биосинтезу ендогеног глутатиона. Козја сурутка се одликује високом концентрацијом L-цистеина у облику цистина (димера цистеина повезаног дисулфидним мостом), који показује изражену резистенцију на дејство пепсина и химотрипсина у дигестивном тракту. Након апсорпције и транспорта, овај стабилни облик цистеина ефикасно прелази мембрану хепатоцита и служи као доминантни лимитирајући фактор за интрацелуларну синтезу GSH (195, 203).

Одржавање адекватних залиха GSH током ConA индукованог оштећења јетре је критично, јер омогућава правовремену неутрализацију реактивних врста кисеоника и превенира отварање митохондријалних пора за прелазну пермеабилност (mPTP *mitochondrial Permeability Transition Pore*). Тиме се директно инхибира ефлукс цитохрома c и супримира активација егзекуторских каспаза (каспазе-9 и каспазе-3), што ефикасно блокира прогресију хепатоцита ка програмираној ћелијској смрти (204).

Хелаторно дејство пептида и супресија Фентонове реакције

Кратколанчани пептиди изоловани из козје сурутке поседују изражен афинитет према прелазним металима. Ови пептиди делују као природни хелатори који везују слободне јоне гвожђа (Fe^{2+}) и бакра (Cu^{2+}) у синусоидима јетре. Овај процес је од виталног значаја за спречавање Фентонове реакције, у којој слободно гвожђе катализује претварање водоник-пероксида (H_2O_2) у високореактивни хидроксилни радикал (OH) (205). Пошто је хидроксилни радикал најдеструктивнији покретач липидне пероксидације мембрана, хелаторна активност сурутке омогућава очување структурног интегритета хепатоцита чак и у условима масивне инфламације.

BCAA аминокиселине и анаболичка репарација паренхима

Аминокиселине са разгранатим ланцима (BCAA - леуцин, изолеуцин и валин) из козје сурутке имају специфичан пут метаболизма, оне заобилазе примарну деградацију у мишићима и бивају усмерене директно у јетру током стресних стања. Ове аминокиселине служе као сигнални молекули који спречавају протеолизу и катаболизам сопствених протеина јетре током акутне упале (206, 207). Леуцин, посебно, стимулише рибозомалну биогенезу, омогућавајући брзо зацељивање микронекротичних поља изазваних лимфоцитном агресијом. Присуство ових аминокиселина у нативном облику (захваљујући лиофилизацији) гарантује њихову брзу инкорпорацију у новосинтетисане албумине и протеине акутне фазе, чиме се одржава колоидно-осмотски притисак и спречава едем ткива (208)

1.8.3. Модулација цитокинске мреже и Th1/Th2 равнотеже

Протеини и пептиди лиофилизоване козје сурутке не делују само као пасивни нутријенти, већ као активни биолошки лиганди који репрограмирају сигнализацију унутар макрофага и лимфоцита. Њихово дејство је мултицентрично и обухвата кључне тачке контроле инфламацијског одговора:

Супресија NF- κ B пута и прекид инфламацијске каскаде

Кључни молекулски механизам којим лактоферин и специфични пептиди сурутке остварују антиинфламацијско дејство је инхибиција транскрипционог фактора NF- κ B (197). У

СопА-индукованом моделу хепатитиса, овај фактор делује као примарни интрацелуларни медијатор који иницира транскрипцију гена за TNF- α и друге ефекторне цитокине (144).

Биоактивне компоненте сурутке спречавају фосфорилацију и протеолитичку деградацију I κ B инхибиторног протеина, чиме се онемогућава дисоцијација NF- κ B комплекса и његова последична нуклеарна транслокација (197). Задржавањем NF- κ B у инактивној форми унутар цитоплазме, блокира се експресија проинфламацијских гена, што резултује значајном редукцијом системских концентрација цитокина и прекидом повратног аутоамплификационог циклуса карактеристичног за изражен инфламацијски одговор (209).

Преусмеравање имунског одговора са Th1/Th17 ка Th2 профилу

Имуномодулаторни ефекат козје сурутке огледа се у њеној способности да фаворизује прелазак имунског одговора са проинфламацијског Th1 профила (који лучи IFN- γ) ка заштитном Th2 профилу (188). Биоактивни молекули сурутке инхибирају синтезу IL-12 у антиген презентујућим ћелијама, што директно сузбија диференцијацију наивних Т ћелија у деструктивне ефекторске Th1 лимфоците (196). Додатно, новије студије указују на то да сурутка може селективно инхибирати STAT3 сигнални пут, чиме се блокира развој Th17 линије и продукција IL-17 (210). С обзиром на то да је IL-17 кључан за регрутацију неутрофила и покретање фиброгенезе, његова супресија је од пресудног значаја за очување микроархитектуре јетре (67).

Јачање IL-10 сигнала и M2 поларизација макрофага

Коначно, компоненте сурутке стимулишу продукцију IL-10, који представља најважнији регулаторни цитокин у јетри. Путем активације специфичних нуклеарних рецептора, првенствено PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), сурутка индукује фенотипску транзицију Купферових ћелија и макрофага из проинфламацијског M1 у регулаторни M2 фенотип (209). Ове M2 ћелије не само да ослобађају велике количине антиинфламацијског IL-10, већ активно учествују у чишћењу дебрија апоптотичких хепатоцита и стимулишу лучење фактора раста неопходних за регенерацију ткива (211).

1.8.4. Компаративна супериорност козје у односу на крављу сурутку

Упркос широкој индустријској примени кравље сурутке, деривати козјег млека поседују специфичан биохемијски профил који нуди диференцијалне терапијске предности у домену имуномодулације и хепатопротекције. Ова супериорност је детерминисана јединственом физичко-хемијском структуром и микронутритивним саставом који показује већи степен структурне хомологије са хуманим млеком у поређењу са крављим еквивалентом:

Специфични физичко-хемијски аспекти и кинетика апсорпције

Суштинска предност козје сурутке дефинисана је већ на нивоу њене примарне физичке структуре. Диперзија масних глобула у козјем млеку карактерише се природно мањим дијаметром (просечно испод 2 μ m) у поређењу са крављим еквивалентом ($> 3 \mu$ m), што обезбеђује знатно већу специфичну површину за активност липолитичких и дигестивних ензима (212).

Протеини козје сурутке у киселој средини желуца формирају коагулум ниске тензије и високе порозности, за разлику од компактне структуре карактеристичне за кравље млеко. Ова специфична реолошка карактеристика омогућава убрзану протеолизу и ефикасније ослобађање биоактивних пептида. Наведена кинетика апсорпције омогућава транслокацију активних компоненти до синусоида јетре у критичном временском интервалу (212).

Олигосахаридни профил: модулација осовине црева-јетра и пребиотски ефекат

Козја сурутка се одликује значајно већом концентрацијом комплексних олигосахарида чија је молекулска структура високо хомологна олигосахаридима хуманог млека (213). Ови молекули функционишу као растворљиви рецептори мамци за патогене микроорганизме у лумену црева, чиме компетитивно инхибирају њихову адхезију за интестинални епител (214).

Редукцијом бактеријске транслокације и последичног прилива ендотоксина путем портне вене, козја сурутка индиректно супримира прелиминарну активацију Купферових ћелија. Овакав механизам доприноси успостављању хомеостатског микроамбијента у јетри, чиме се значајно ублажава интензитет могућег каснијег инфламацијског одговора (214, 215).

Минерална хомеостаза и биодоступност антиоксидативних кофактора

За разлику од кравље сурутке, козја сурутка обезбеђује супериорну биодоступност есенцијалних микроелемената, првенствено селена (Se) и цинка (Zn). У матриксу козје сурутке, ови минерали су примарно присутни у облику органских комплекса везаних за пептиде ниске молекулске масе, што фацилитира њихов трансмембрански транспорт у хепатоците (216).

Селен представља есенцијални кофактор за каталитичку активност глутатион-пероксидазе (GPx), док цинк игра структурну и функционалну улогу у металоензиму супероксид-дизмутази (SOD). Оваква нативна синергија олигоелемената и биоактивних протеина у козјој сурутци омогућава холистичко јачање интрацелуларне антиоксидативне мреже јетре. Овај интегрисани ефекат значајно превазилази потенцијал изолованих минералних суплемената или кравље сурутке у контексту неутрализације оксидативног стреса (217).

Низак алергени потенцијал и имунска толеранција

Значајна предност је и минимално присуство α -казеина у козјим млечним производима. Овај протеин је главни покретач инфламацијских реакција и хиперсензибилитета код особа које конзумирају кравље млеко. Смањењем укупног инфламацијског оптерећења организма, козја сурутка омогућава имунском систему да остане хомеостатски стабилан (181, 218).

Док кравље млеко садржи високе концентрације овог високоалергеног протеина, козја варијанта доминантно садржи β -казеин и α s1-казеин, чија је структура знатно ближа протеинском профилу хуманог млека (219). Изражена редукција алергеног потенцијала директно резултује смањењем укупног системског инфламацијског оптерећења организма. Елиминацијом континуиране имунске иритације коју изазива α -казеин, козја сурутка омогућава имунском систему да очува хомеостатску стабилност и фокусира ефекторске механизме на специфичне патолошке изазове, уместо на неспецифичне одговоре на нутритивне антигене (181, 219).

1.8.5. Технологија лиофилизације: Очување терапеутског индекса

Избор методе прераде сирове козје сурутке представља критичну детерминанту за стабилност и финалну биолошку активност препарата. Да би се испитали стварни имуномодулаторни ефекти, неопходно је применити технологију која не ремети деликатну протеинску архитектуру. У том смислу, лиофилизација се издваја као супериорна метода у односу на конвенционалне поступке термичке обраде.

Леофилизација, односно сушење из смрзнутог стања, заснива се на физичком принципу сублимације, директном преласку леда у гасовито стање у условима високог вакуума (220). Елиминацијом течне фазе, протеини сурутке су поштеђени излагања међуфазном површинском напону и капиларним силама које се јављају приликом конвенционалних метода евапорације. Ове силе су примарни узрочници иреверзибилне денатурације и нарушавања секундарне и терцијарне структуре осетљивих полипептидних ланаца (185, 221). Овај технолошки поступак омогућава термолабилним молекулама, попут лактоферина и имуноглобулина, да задрже своју специфичну кватернарну структуру и нативну конформацију (222). Очување просторне архитектуре молекула представља фундаментални предуслов за њихово препознавање и везивање за специфичне рецепторе на имунским ћелијама домаћина, чиме се осигурава пун биолошки ефекат сурутке у комплексним имунским моделима (221).

За разлику од индустријске методе сушења распршивањем (*Spray-drying*), која подразумева експозицију сурутке струји врелог ваздуха на температурама често вишим од 150°C, лиофилизација се спроводи у условима екстремно ниских температура. Овакав технолошки приступ у потпуности елиминише термичку денатурацију термолабилних компоненти, омогућавајући очување до 98% изворне антиоксидативне активности сурутке (223, 224).

Поред очувања нативне структуре, одсуство високих температура превенира иницијацију *Maillard*-ове реакције (неензимско потамњивање), која представља комплексну хемијску

интеракцију између редукујућих шећера (лактозе) и слободних аминок-група лизина (225). Избегавањем стварања ових штетних продукта гликације, добија се супстанца максималне чистоће која не изазива додатно метаболичко оптерећење хепатоцита. Ово је од круцијалног значаја у условима већ постојећег оштећења паренхима јетре, где би присуство нуспроизвода термалног третмана могло додатно потенцирати инфламацијски одговор (226).

Фармакокинетички профил лиофилизата

Технолошки аспект лиофилизације резултира формирањем јединствене микропорозне структуре која подсећа на сунђерасту хидрофилну матрицу. У контакту са дигестивним соковима, овакав структурни облик омогућава моменталну рехидратацију, чиме се биоактивне компоненте сурутке враћају у своју изворну, растворљиву и биолошки активну форму. Овако висока стопа солубилизације обезбеђује супериорну фармакокинетику: кључне аминокиселине, превасходно цистеин и аминокиселине разгранатог ланца (BCAA), апсорбују се великом брзином, достижући портни крвоток и паренхим јетре већ у интервалу од 30–60 минута након апликације (221, 227). Оваква динамичка биоиспука заштитних фактора је од кључног значаја за супресију раних фаза инфламацијске каскаде, омогућавајући правовремену неутрализацију оксидативног стреса пре наступања иреверзибилних оштећења хепатоцита.

Биолошка стабилност и прецизност дозирања

Леофилизована сурутка карактерише се минималним садржајем резидуалне влаге (испод 3%), што обезбеђује високу микробиолошку стабилност и превенира ензимску деградацију и оксидацију липида током трајања експерименталног протокола. Поред очувања интегритета узорка, оваква физичка форма омогућава значајно концентрисање биоактивних фактора у редукованој маси супстрата (222).

Наведена карактеристика је технички императив у претклиничким студијама на мишијим моделима. Концентровани облик леофилизата омогућава прецизну апликацију високих терапијских доза путем интрагастричне сонде, уз минималан волуметријски терет. Коришћење нативне, течне сурутке било би неоствариво због физиолошких ограничења капацитета желуца експерименталних животиња, чиме се леофилизација намеће као супериорна метода за постизање циљаних концентрација нутријената.

Синергистички ефекат леофилизоване козје сурутке у хепатопротекцији

Спој супериорног биохемијског профила козје сурутке и напредне методе леофилизације резултира формирањем биотехнолошког супстрата са високим терапијским потенцијалом. Оваква формулација не представља само концентровани извор нутријената, већ интелигентан систем за модулацију имуноског одговора у условима акутног оштећења јетре.

Очувањем нативне структуре биоактивних пептида и обезбеђивањем њихове брзе системске биорасположивости, леофилизована козја сурутка делује на више нивоа: од неутрализације оксидативног стреса и супресије NF-κB сигналног пута, до директне заштите митохондријалног интегритета. Управо овај мултимодални приступ омогућава ефикасну превенцију прогресије инфламације ка иреверзибилној некрози паренхима, чиме се потврђује оправданост њене примене као моћног хепатопротективног агенса у савременим претклиничким протоколима.

1.9. Методолошка прилагођавања и ревизија експерименталних задатака

Током реализације експерименталног дела истраживања, извршена су одређена прилагођавања првобитног плана дефинисаног у пријави докторске дисертације. Ове измене су резултат објективних техничких ограничења и донете су са циљем одржавања високог нивоа прецизности и репродуктивности научних података.

Првобитни план истраживања предвиђао је детаљну анализу експресије гена за проинфламацијске цитокине путем RT-qPCR методе. Међутим, током фазе изолације укупне РНК из узорак ткива јетре третираних конканавалином А, установљена је недовољна

концентрација и оштећен интегритет изолованог генетског материјала. Оваква појава је директна последица екстремно високе интрацелуларне активности ендогених RN-аза и масивне конфлуентне некрозе која карактерише овај модел хепатитиса (као што је описано у поглављу 1.7.3.), што у одређеним условима онемогућава добијање РНК адекватног квалитета за прецизну квантификацију.

С обзиром на немогућност даљег понављања изолације РНК под идентичним условима, а у циљу очувања методолошке ригорозности, фокус истраживања је преусмерен на проширену анализу протеинских биомаркера. Квантификација цитокина на протеинском нивоу сматра се релевантнијом за процену системског имунског одговора и терапијског ефекта лиофилизата.

Сходно наведеном, финални циљеви и хипотезе рада су редефинисани тако да одражавају ове техничке корекције, стављајући акценат на функционалне биохемијске и патоморфолошке параметре који на највернији начин осликавају ефекат лиофилизоване козје сурутке на ConA индуковано оштећење јетре.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1 Циљеви студије

Основни циљ истраживања је испитивање потенцијалног антиинфламацијског и хепатопротективног ефекта лиофилизоване козје сурутке у моделу акутног хепатитиса мишева изазваног интравенском апликацијом конканавалина А.

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

1. Евалуација утицаја LGW-а на тежину хепатитиса анализом серумских биомаркера оштећења јетре и хистопатолошких параметара.
2. Испитивање профила цитокина у хомогенату јетре мишева третираних ConA након претретмана сурутком.
3. Анализа утицаја LGW-а на заступљеност Th1 и Th17 лимфоцита у запаљенском инфилтрату јетре применом проточне цитометрије.
4. Квантификација CD4+FoxP3+ и CD8+FoxP3+ регулаторних Т ћелија у ткиву јетре након примене LGW-а.
5. Карактеризација фенотипских карактеристика дендритских ћелија након примене LGW-а.

2.2. Хипотезе студије

Орална суплементација лиофилизованом козјом сурутком превентивно, ублажава оштећење јетре изазвано код мишева интравенском инјекцијом ConA, смањујући биохемијске и хистопатолошке маркере упале.

Специфичне хипотезе

1. Петодневна примена LGW значајно смањује активност серумских трансаминаза и чува структуру ткива јетре редукцијом некрозе и инфламације.
2. Хепатопротективни ефекат LGW-а је независан од генотипске основе домаћина.
3. Механизам заштите LGW-а посредован је супресијом проинфламацијске Th1/Th17 осовине и повећаном продукцијом IL-10 у јетри.
4. LGW индукује експанзију регулаторних Т ћелија унутар инфламацијског инфилтрата јетре.
5. LGW подстиче формирање толерогеног фенотипа дендритских ћелија који омогућава успостављање локалне имунске толеранције.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

3.1. Експерименталне животиње

У истраживању су коришћени одрасли мужјаци мишева сојева BALB/c и C57BL/6, старости између 8 и 10 недеља, почетне телесне масе 20–22 g. Експерименталне животиње (почетни парови) су обезбеђене из узгајалишта Војномедицинске академије у Београду, а затим су гајени у Виваријуму Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Животиње су иницијално смештене у групе (до 5 јединки по кавезу) у стандардне поликарбонатне кавезе типа *Eurostandard Type II*, уз строго контролисане микроклиматске услове. Светлосни режим, циркадијални циклус 12 h светло / 12 h мрак; амбијентална температура: $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; релативна влажност ваздуха: $50 \pm 10\%$.

Свим животињама је омогућен слободан приступ стандардној лабораторијској храни и дестилованој води (*ad libitum*). Пре почетка експерименталног протокола, спроведен је период аклиматизације у трајању од 7 дана под идентичним амбијенталним условима.

Након преласка у експерименталну фазу, мишеви су смештени појединачно (*individual housing*) ради омогућавања прецизног мониторинга уноса суплемената и пооштрене контроле варијабли. Током трајања студије није забележен морталитет нити потреба за искључивањем животиња из експеримента ради хуманог завршавања експеримента (*humane endpoints*); стога су све животиње (100%) обухваћене финалном статистичком анализом.

3.2. Карактеризација и порекло лиофилизоване козје сурутке (LGW)

За потребе ове студије, лиофилизована козја сурутка (LGW) комерцијално је набављена од произвођача „Koza Nostra“ (Гуњаци, Србија). Коришћени суплемент представља стандардизовани дериват козјег млека, добијен контролисаним технолошким процесом лиофилизације који осигурава очување нативног биохемијског профила сировине. Специфични састав коришћене LGW карактерише се високом концентрацијом следећих биоактивних компоненти:

- Протеинске фракције: висок удео лактоферина и имуноглобулина са очуваном структурном конфигурацијом;
- Аминокиселински профил: богата заступљеност аминокиселина разгранатог ланца (BCAA - *branched-chain amino acids*);
- Липидни састав: доминација средњеланчаних триглицерида (MCT - *medium-chain triglycerides*);
- Микронутритивни комплекс: висока биорасположивост есенцијалних минерала (Ca, Mg, P, K, Zn) и витамина В комплекса.

Стандардизовани поступак дехидратације сублимацијом омогућио је минималан садржај резидуалне влаге, чиме је осигурана стабилност антиоксидативног капацитета и структурни интегритет комплексних олигосахарида хомологних хуманим млечним олигосахаридима.

3.3. Експериментални дизајн и расподела група

У истраживање је укључено укупно 136 експерименталних животиња, од чега је 24 миша соја BALB/c и 112 мишева соја C57BL/6. Све животиње су насумично подељене у експерименталне групе применом методе једноставне рандомизације. Величина узорка ($n=6$ и $n=8$ по подгрупи) детерминисана је на основу претходних истраживања имунски посредованог хепатитиса, како би се обезбедила адекватна статистичка снага теста.

3.3.1. Експериментални протокол за BALB/c сој

Мишеви соја BALB/c коришћени су за тестирање дозе лиофилизоване козје сурутке. Леофилизована козја сурутка је примењивана *per os*, 5 дана за редом сваког дана (у две дозе 0,25 mg/kg и 1 mg/kg) пре интравенске примене ConA у дози 12,5 mg/kg, Схема 1.

Схематски приказ превентивног третмана LGW и индукције хепатитиса

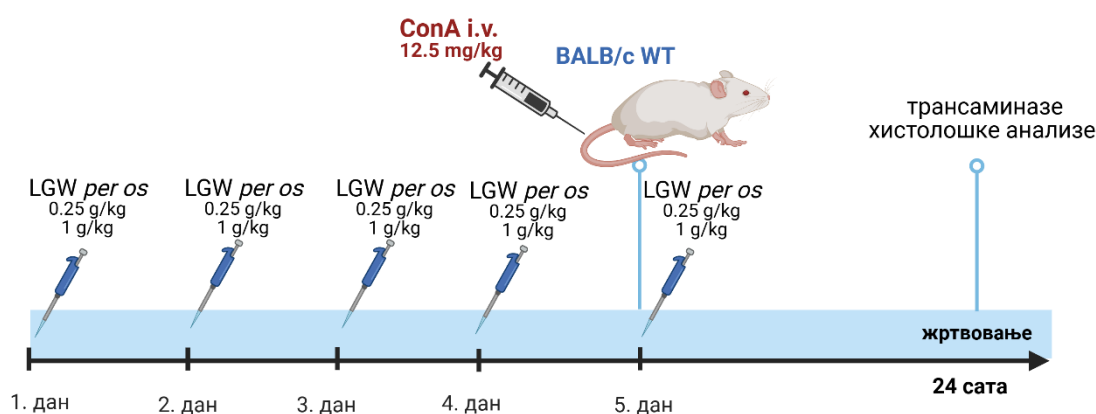


Схема 1. Приказ превентивног третмана леофилизованом козјом сурутком, у две дозе, BALB/c мишева (креирано у BioRender-у)

Мишеви соја BALB/c ($n=24$) подељени су у три експерименталне групе ($n=8$ по групи):

1. Контролна група: нетретиране животиње.
2. ConA група: животиње су примиле једнократну интравенску инјекцију конканавалина А (ConA, 12,5 mg/kg раствореног у 200 μ L физиолошког раствора) кроз репну вену (*v. caudalis*).
3. LGW + ConA група: животиње су претходно третиране леофилизованом козјом сурутком (LGW: 0,25 g/kg и 1 g/kg /дневно раствореном у 100 μ L дестиловане воде) током пет узастопних дана пре апликације ConA.

3.3.2. Експериментални модел за C57BL/6 сој

За испитивање кинетике имунског одговора коришћени су мишеви соја C57BL/6. Лиофилизована козја сурутка примењивана је *per os*, 5 дана за редом сваког дана (доза 1 mg/kg) пре интравенске примене ConA у дози 12,5 mg/kg. Динамика узорковања након индукције хепатитиса приказана је на Схеми 2.

Протокол превентивна апликације LGW и кинетика узорковања након ConA апликације

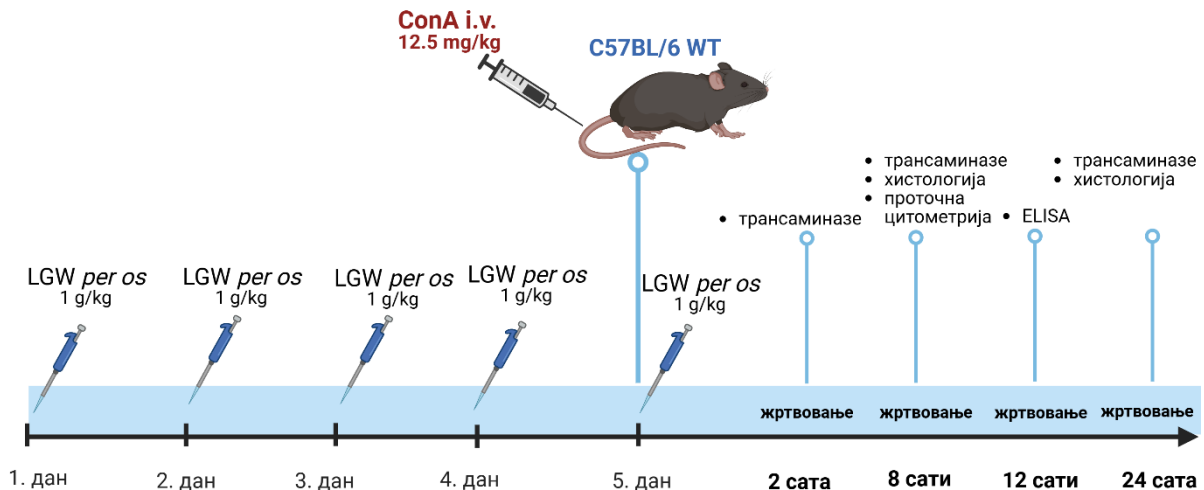


Схема 2. Приказ превентивног третмана лиофилизованом козјом сурутком и динамика узорковања код C57BL/6 мишева (креирано у BioRender-y)

Животиње соја C57BL/6 (n=112) подељене су у четири основне групе:

- Контролна група (n=20): 8 животиња за хистолошку анализу, 6 за ELISA тест и 6 за проточну цитометрију.
- LGW група (n=20): мишеви су примали LGW (1 g/kg/дневно) орално током пет дана; расподела за анализе је идентична контролној групи.
- ConA група (n=36): индукована једнократном интравенском инјекцијом ConA (12,5 mg/kg). Животиње су жртвоване у различитим временским тачкама (2 h, 8 h и 24 h) ради праћења динамике оштећења.
- LGW + ConA група (n=36): петодневни третман са LGW претходио је индукцији ConA хепатитиса. Животиње су жртвоване у истим временским тачкама као и претходна група.

За процену имуномодулаторног ефекта LGW, коришћене су две групе C57BL/6 мишева (контролна и третирана са LGW). Животиње су жртвоване 24 h након администрације финалне дозе LGW, што временски одговара тренутку планиране индукције хепатитиса у главном експерименталном протоколу.

3.4. Динамика узорковања

Жртвовање експерименталних животиња спроведено је у дефинисаним временским интервалима (2 h, 8 h 12 h и 24 h) након апликације ConA, у складу са етичким стандардима за рад са лабораторијским животињама.

Након жртвовања, прикупљена је крв ради детерминације активности серумских трансаминаза. Непосредно након тога, извршена је потпуна екстирпација јетре, која је даље процесорирана за следеће анализе:

- Хистопатолошки преглед (8 h и 24 h након примене ConA);
- Молекулске анализе (квантификација цитокина на нивоу протеина (ELISA), 12 након примене ConA;
- Имунофенотипизација: изолација моноклеарних ћелија јетре (за анализу проточном цитометријом (8 h након примене ConA).

3.5. Биохемијски параметри хепатоцелуларног оштећења

Активност серумских трансаминаза — аспартат аминотрансферазе (AST) и аланин аминотрансферазе (ALT) — мерена је у три временске тачке (2 h, 8 h и 24 h) након инјекције ConA. Анализа је извршена методом стандардне спектрофотометрије на аутоматском биохемијском анализатору *Olympus AU 400 (Olympus Diagnostica GMBH, Hamburg, Germany)*, према протоколу произвођача.

3.6. Квантификација цитокина у ткиву јетре (ELISA)

За детерминацију интрахепатичне концентрације цитокина, узорци ткива јетре (200 mg) подвргнути су механичкој хомогенизацији у 1 mL фосфатно-пуферованог физиолошког раствора (PBS, *phosphate-buffered saline*). Хомогенат је центрифугиран на $14,000 \times g$ током 10 min на температури од 4°C, након чега су добијени супернатанти изоловани и чувани на -80°C до тренутка анализе.

Квантификација проинфламацијских (TNF- α , IFN- γ , IL-17) и антиинфламацијског (IL-10) цитокина извршена је применом комерцијалних DuoSet ELISA сетова за мишје антигене (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*), стриктно према протоколу произвођача. Сви узорци су анализирани у дубликатима, а интензитет бојења (оптичка густина) мерен је спектрофотометријски на микротитар читачу на таласној дужини од 575 nm. Концентрације су изражене у пикограмима по милиграму ткива (pg/mg).

3.7. Патохистолошка евалуација ткива јетре

За патохистолошку анализу коришћени су узорци јетре издвојени у временским тачкама од 8 h и 24 h након апликације ConA.

3.7.1. Фиксација и калупљење ткива

Након екстирпације, узорци јетре фиксирани су у 4% параформалдехиду (припремљеном из комерцијалног 37-40% формалдехида) у трајању од најмање 24 h на собној температури. Фиксација је омогућила превенцију аутолизе и очување изворне морфологије ћелија путем формирања метиленских мостова између протеинских ланаца. Након испирања текућом водом, извршена је постепена дехидратација ткива у растућим концентрацијама етанола (70%, 96% и 100%). Просветљавање узорака и уклањање

алкохола спроведено је потапањем у ксилол, након чега је уследила инфилтрација течним парафином у термостату на температури од 50–60°C. Ткиво је калупљено у парафинаске блокове коришћењем стандардних касета и металних калупа.

3.7.2. Микротомија и припрема препарата

Парафински блокови су сечени на ротационом микротому на пресеке дебљине 5 μm . Пресеци су исправљени у воденом купатилу на 45°C, монтирани на предметна стакла и сушени 12 h у термостату на 56°C ради боље адхезије ткива.

3.7.3. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Хистолошки пресеци су бојени стандардном методом хематоксилин-еозин према етаблираним протоколима (*Heidenhain; Gurr*). Кратак преглед процедуре обухвата: експозицију формалдехидном пуферу (10 s), након чега следи бојење Mayer-овим хематоксилином (2 минута) и контрастирање алкохолним еозином (1 минут); дехидратација у серији алкохола растуће концентрације (85%, 96%, апсолутни етанол) и просветљавање у смеси ксилол-етанол (1:1), а затим у чистом ксилолу; препарати су конзервисани наношењем Канада балзама и прекривени покровним стаклима.

3.7.4. Визуелизација и полуквантитативна хистопатолошка евалуација

Визуелизација обојених препарата и фотодокументација извршене су коришћењем светлосних микроскопа високих перформанси *Olympus BX51 (Tokyo, Japan)* и *Leica DM2500 (Wetzlar, Germany)*. Дигитални записи високе резолуције прикупљени су помоћу камере *Leica Flexacam i5*, док је за прецизну дигиталну обраду и мерење коришћен софтверски пакет *Leica Application Suite X*.

Хистопатолошку евалуацију и градирање оштећења паренхима извршила су два независна истраживача применом „слепо” методе (*blinded analysis*), без претходног увида у припадност узорака експерименталним групама. Степен структурне деорганизације и некрозе јетре квантификован је на скали од 0 до 4, према модификованим критеријумима (142, 228):

- Скор 0: физиолошки налаз – потпуно одсуство инфламацијског инфилтрата и некротичних промена;
- Скор 1: присуство инфламације ограничено на портне просторе, без пратеће деструкције хепатоцита;
- Скор 2: блага фокална некроза карактерисана појавом спорадичних, појединачних некротичних хепатоцита унутар лобулуса;
- Скор 3: тешка фокална некроза са формирањем конфлуентних група дегенерисаних и некротичних хепатоцита;
- Скор 4: дифузна деструкција паренхима или формирање премошћавајућих (*bridging*) некроза.

Средња вредност скорa за сваку групу добијена је анализом најмање десет насумично одабраних видних поља по препарату,

3.8. Изолација мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија

Изолација инфилтришућих мононуклеарних ћелија јетре спроведена је према стандардизованом протоколу описаном у претходним студијама (229). Након изолације,

ћелије су ресуспендоване у FACS пуферу (PBS суплементисан са 5 mM EDTA и 0,2% BSA) и припремљене за имунофенотипизацију.

3.8.1. Површинско (екстрацелуларно) маркирање ћелија

Суспензија мононуклеарних ћелија инкубирана је са специфичним моноклонским антителима конјугованим са одговарајућим флуорохромима специфичних за следеће мишје антигене: CD3, CD4, CD8, CD69, CD25, CD86, CD206 и CD11c. Сва примарна антитела и одговарајуће изотипске контроле коришћени су у финалном разблажењу 1:100. Након инкубације у мраку (20 min на +4°C), ћелије су испране хладним пуфером за бојење (*Staining Buffer*, BD) центрифугирањем на $400 \times g$ током 5 минута. Талог ћелија је ресуспендован у 350 μ L пуфера и непосредно након тога анализиран на проточном цитометру *FACSCalibur* (BD Biosciences).

3.8.2. Интрацелуларно бојење цитокина и транскрипционих фактора

За детекцију интрацелуларне продукције цитокина спроведена је *ex vivo* стимулација ћелија коришћењем комбинације форбол 12-миристат 13-ацетата (PMA), јономицина и *Golgi Stop* инхибитора транспортних протеина (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Након стимулације, извршена је фиксација и пермеабилizација ћелијске мембране применом специфичних пуфера, што је омогућило продор антитела у унутрашњост ћелије. Ћелије су инкубирани са флуоресцентно обележеним анти-мишјим антителима специфичним за IFN- γ , IL-17 и IL-10. На исти начин су припремљене и ћелије бојене антителом специфичним за FoxP3, само без претходне стимулације.

3.8.3. Аквизиција података и анализа

За сваки узорак прикупљено је најмање 20.000 догађаја (*events*) унутар примарног региона (*gate*) мононуклеарних ћелија, дефинисаног на основу параметара величине (FSC) и грануларности (SSC). Аквизиција и примарна обрада података извршене су помоћу софтвера *CELLQUEST* (BD), док је финална анализа спроведена у програму *FlowJo* (Tree Star).

3.9. Статистичка анализа података

Сви експериментални подаци приказани су као средња вредност + стандардна девијација (SD). Пре приступања компаративној анализи, извршена је процена нормалности расподеле података применом *Shapiro-Wilk* теста. У зависности од дистрибуције података и хомогености варијанси, коришћени су следеће статистичке методе:

параметарски тестови: за поређење више експерименталних група примењена је једнофакторска анализа варијансе (one-way ANOVA), након чега је спроведен *Tukey-ев post hoc* тест за вишеструка поређења. За директно поређење две независне групе коришћен је Студентов t-тест (*Student's t-test*).

Непараметарски тестови: У случајевима ненормалне расподеле података примењен је *Kruskal-Wallis* тест, уз накнадни *Mann-Whitney U* тест за појединачне компарације.

Статистички значајна разлика дефинисана је за вредности $p < 0,05$. Све статистичке калкулације спроведене су у софтверском пакету SPSS v. 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

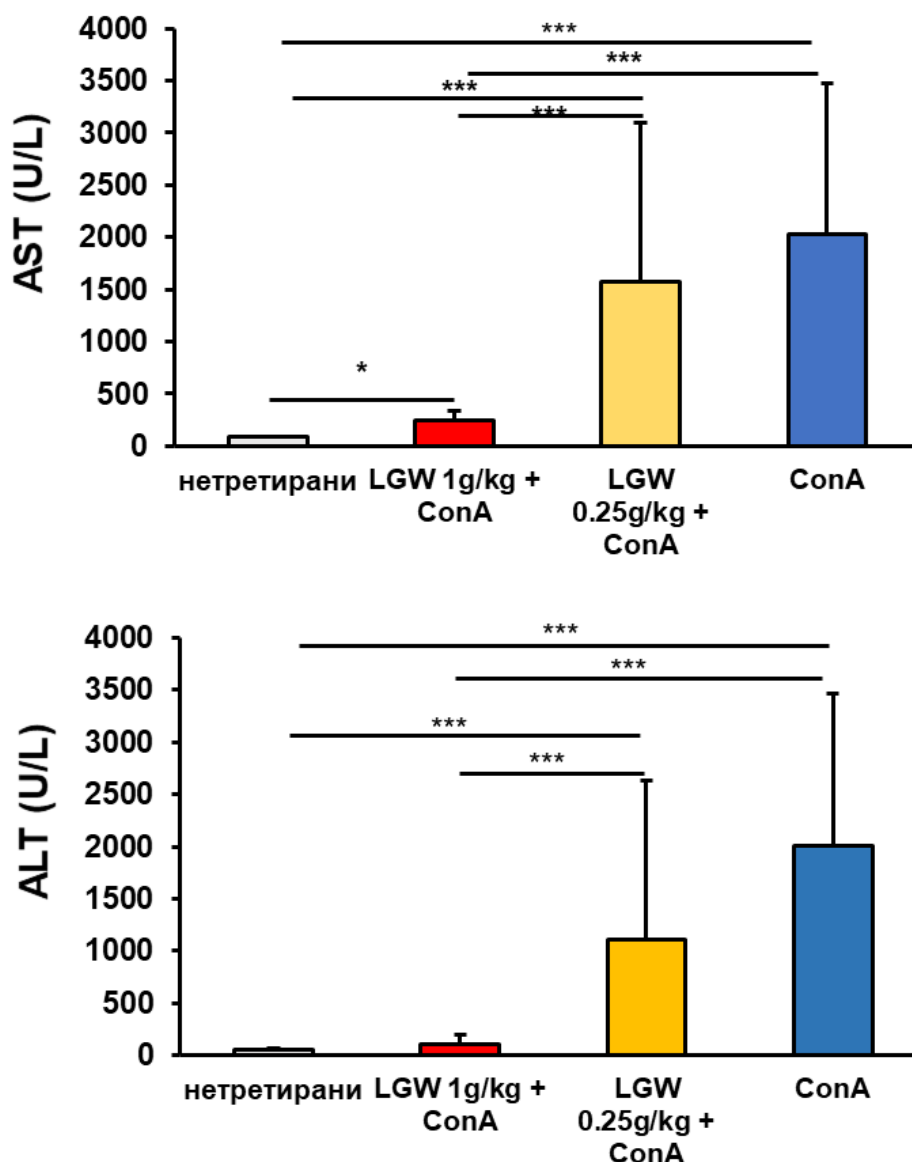
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Верификација хепатопротективног ефекта LGW-а код BALB/с соја мишева

Како бисмо истражили хепатопротективни потенцијал лиофилизоване козје сурутке, користили смо модел ConA-хепатитиса. Експериментални модел хепатитиса изазван је код BALB/с мишева који показују минималне варијације у хистолошким и серумским маркерима оштећења јетре.

4.1.1. Одређивање оптималне дозе LGW-а

Пре почетка главног истраживања, спроведен је пробни експеримент са циљем да се дефинише најефикаснија терапијска доза LGW-а. Испитиван је ефекат две различите концентрације препарата: нижа доза од 0,25 g/kg и виша доза од 1 g/kg телесне масе. Анализом серумских биохемијских параметара (Графикон 1), уочен је јасан дозно-зависни хепатопротективни ефекат. Доза лиофилизоване козје сурутке од 1 g/kg давана орално пет дана пре примене конканавалина А показала се као далеко ефикаснија, јер је скоро потпуно спречила скок AST-а и ALT-а. Нивои ових ензима су остали врло ниски, готово на нивоу нетретиране контролне групе, што указује на снажну заштиту паренхима јетре. Примена лиофилизоване козје сурутке у дози од 0,25 g/kg само је делимично ублажила ефекат ConA. Вредности AST-а и ALT-а су и даље биле веома високе у поређењу са контролом, што значи да ова количина препарата није довољна за адекватну заштиту. Ови резултати недвосмислено потврђују да је доза од 1 g/kg оптимална за постизање максималне заштите паренхима јетре од имунски посредованог оштећења и она је изабрана за даљи ток истраживања.



Графикон 1. Третман LGW-ом дозно-зависно смањује нивое трансаминаза у серуму BALB/с мишева третираних конканавалином А.

Биохемијском анализом утврђено је да примена ConA изазива драстичан скок активности аминотрансфераза (ALT и AST) у серуму, што је јасан показатељ тешког акутног оштећења јетре. Насупрот томе, претходни третман LGW-ом показао је значајан хепатопротективни ефекат који директно зависи од примењене дозе. Виша доза (1 g/kg) се показала као супериорна, јер је скоро потпуно супримирала пораст трансаминаза. Код ове групе мишева, нивои ензима су задржани на вредностима које су приближне нетретираној контролној групи, чиме је обезбеђена снажна заштита паренхима јетре. Нижа доза (0,25 g/kg) само је делимично ублажила дејство ConA, при чему су вредности ALT и AST остале значајно повишене у односу на контролу. Подаци су приказани као средње вредности + SD; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ у односу на ConA групу. Ови резултати потврђују високу терапијску ефикасност заштите јетре постигнуте дозом од 1 g/kg.

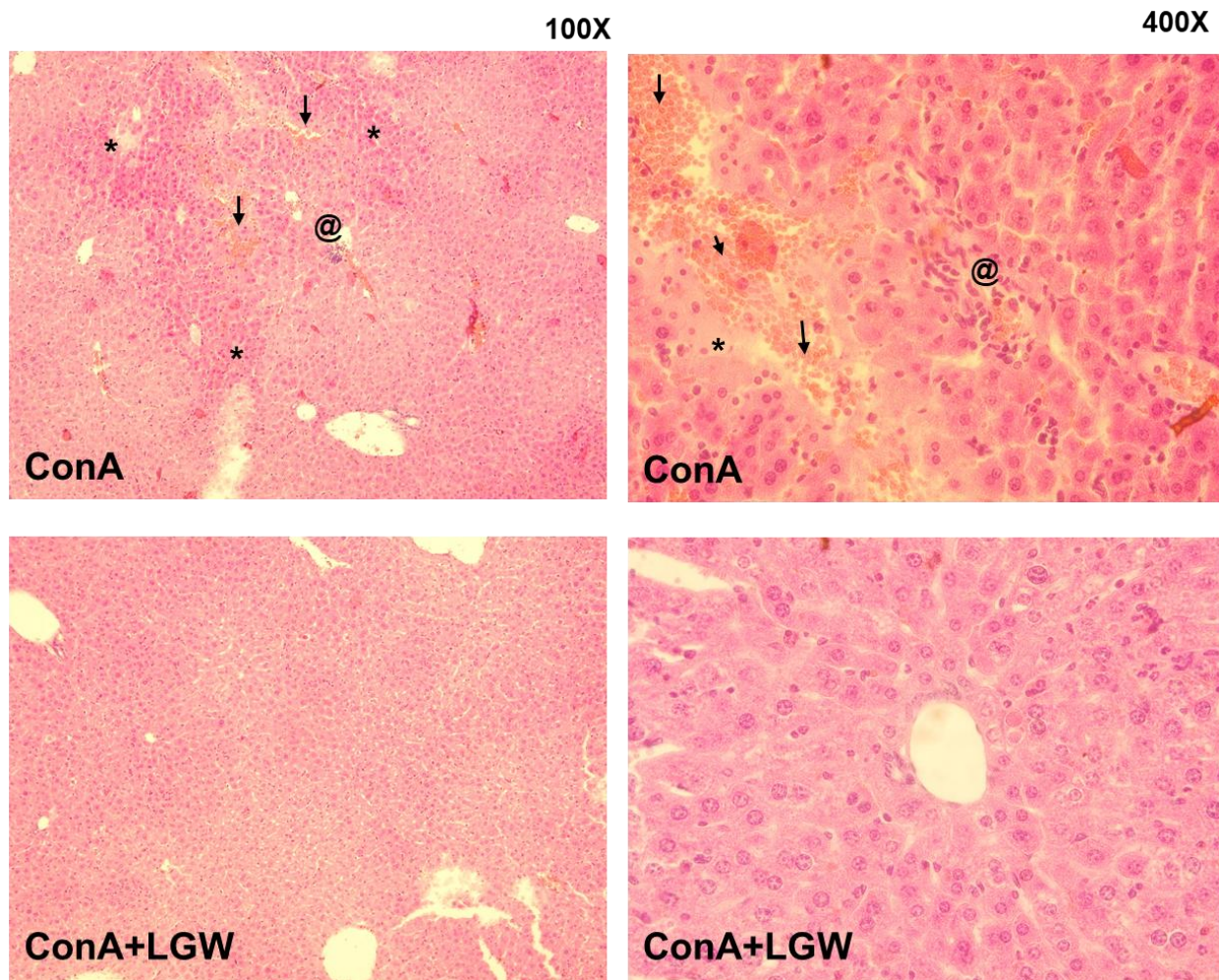
4.1.2. Хистолошка потврда хепатопротективног ефекта LGW-а

Хистолошка анализа приказа пресека јетре, обојених Н&Е методом (Слика 1), недвосмислено потврђује резултате биохемијске анализе. Сlike очуваности ткива код животиња третираних оптималном дозом LGW-а (1 g/kg) у потпуној су супротности са тешким оштећењима уоченим код позитивне ConA контроле.

У групи мишева која је примила искључиво ConA, на оба нивоа увеличања (100X и 400X), уочава се тотални губитак нормалне структуре паренхима јетре. Паренхим је прожет обимним, конфлуентним подручјима некрозе (означено звездицама), где су границе ћелија потпуно нејасне, а једра фрагментисана или потпуно одсутна. Такође, присутна је масивна, дифузна инфилтрација инфламацијским ћелијама (означено са @), која нарушава целовитост ткива. Додатно, уочавају се јасне зоне хеморагије (крварења, означено стрелицама), што указује на тешко васкуларно оштећење услед акутног хепатитиса.

Насупрот томе, код мишева који су претретирани дозом LGW-а (1 g/kg) која је претходно показала ефикасност у заштити јетре, током пет дана пре апликације ConA, хистолошка слика показује значајно другачији, скоро потпуно очуван статус ткива. Ткиво задржава своју нормалну структуру, са јасно уочљивим хепатоцитима, радијално распоређеним у односу на централну вену. Код ове групе нису уочена обимна некротична поља, већ само спорадична, минимална инфилтрација запаљенским ћелијама, чија заступљеност не нарушава интегритет ткива. Очување артеријских и венских крвних судова, без знакова хеморагије, указује на то да је претходни третман LGW-ом успео да спречи васкуларне промене изазване ConA-ом.

Ови хистопатолошки налази савршено корелирају са претходно описаним падом серумских трансаминаза. Потврђујући да је лиофилизована козја сурутка (доза од 1 g/kg) остварила снажан, скоро потпун заштитни ефекат, ефикасно спречавајући како морфолошка оштећења, тако и функционални крах паренхима јетре.



Слика 1. Третман LGW-ом (доза од 1 g/kg) ублажава оштећење јетре код BALB/с мишева третираних конканавалином А.

Репрезентативни прикази пресека јетре, обојени Н&Е методом (увеличања 100× и 400×), 24 сата након примене ConA. У групи која је примила искључиво ConA видљива су озбиљна оштећења јетре, која се огледају у опсежним зонама некрозе (означено звездицама), инфилтрацији инфламацијских ћелија (означено са @) и зонама хеморагије (означено црним стрелицама). С друге стране, петодневни третман LGW-ом (у дози од 1 g/kg) значајно је сузбио ове патолошке промене, очувавши скоро нормалну структуру ткива и интегритет хепатоцита.

4.2. Динамички приказ хепатопротективног ефекта LGW-а код C57BL/6 соја мишева

Након почетних испитивања, заштитни потенцијал LGW-а додатно је евалуиран на C57BL/6 соју мишева. Овај сој је одабран због своје високе осетљивости и стабилног имунског одговора у оквиру ConA модела, чиме се развијају патохистолошке лезије које блиско oponaшају хумани аутоимунски хепатитис, што омогућава прецизну евалуацију терапијског потенцијала испитиваног препарата. Како би се стекао детаљан увид у динамику развоја оштећења и ефикасност превентивног третмана сурутком, ефекат сурутке праћен је кроз три кључна временска интервала (2 h, 8 h и 24 h), почевши од анализе основних физиолошких параметара.

4.2.1. Анализа телесне масе и релативне тежине јетре

Анализа основних физиолошких параметара, приказаних у Табели 2, потврдила је стабилност експерименталног модела кроз све посматране временске интервале. Током трајања протокола, ни у једној експерименталној групи није забележен статистички значајан пад телесне масе, што директно указује на одсуство акутне системске токсичности примењеног ConA или било каквог негативног утицаја петодневне суплементације LGW-ом на опште здравствено стање животиња.

Посебно је значајно истаћи да је релативна маса јетре остала уједначена у свим групама ($p > 0,05$), чиме је потврђено да у раним фазама овог модела имунски посредованог оштећења јетре (до 24 h) не настаје масивни едем или хепатомегалија, упркос присуству јасних биохемијских знакова оштећења. Овако висока хомогеност унутар експерименталних група на почетку и крају експеримента сугерише да су уочене промене у хистолошким и биохемијским параметрима искључиво последица примењених третмана, а не варијација у физиолошком статусу јединки.

Табела 2. Основни физиолошки параметри експерименталних група: телесна маса и релативна тежина јетре.

Подаци су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD) за сваку експерименталну групу (n=8). Релативна маса јетре израчуната је као процентуални удео масе органа у односу на укупну телесну масу животиње на крају експерименталног периода. Статистичком анализом (one-way ANOVA) није утврђена значајна разлика између испитиваних група ($p > 0,05$), што указује на одсуство акутне системске токсичности третмана и стабилност експерименталног модела.

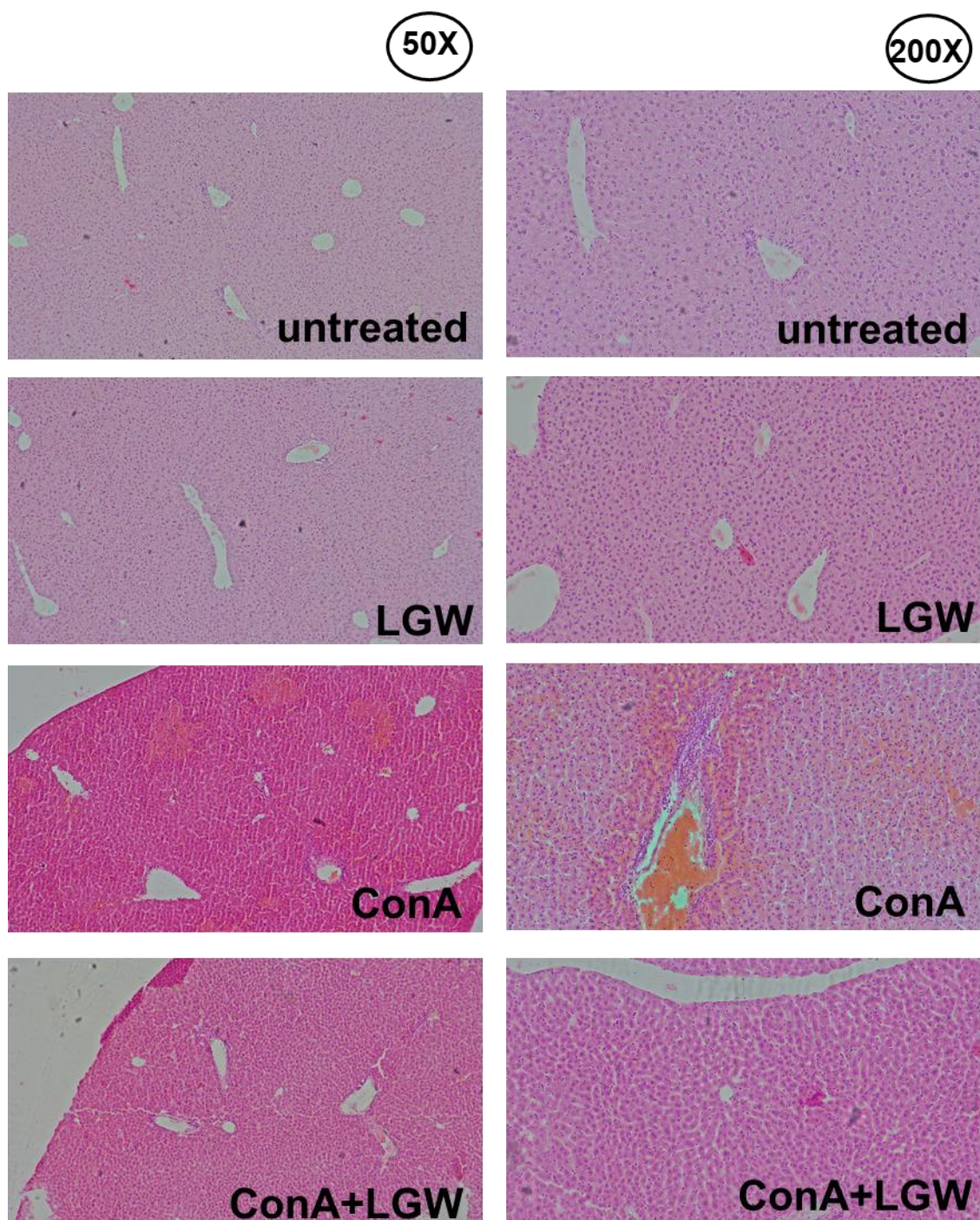
Време (h)	Експериментална група	Почетна телесна маса (g)	Телесна маса на крају експеримента (g)	Релативна маса јетре (%)
/	Нетретирани	24,24 $\pm$ 1,64	25,01 $\pm$ 1,14	5,59 $\pm$ 0,24
	LGW (контрола)	20,57 $\pm$ 1,92	21,56 $\pm$ 0,82	4,86 $\pm$ 0,82
2 h	ConA	24,67 $\pm$ 0,99	24,54 $\pm$ 1,12	5,53 $\pm$ 0,29
	LGW + ConA	24,85 $\pm$ 1,55	24,33 $\pm$ 1,25	5,72 $\pm$ 0,18
8 h	ConA	20,90 $\pm$ 1,46	20,73 $\pm$ 1,31	5,50 $\pm$ 0,75
	LGW + ConA	22,54 $\pm$ 1,46	21,70 $\pm$ 1,22	5,37 $\pm$ 0,55
24 h	ConA	20,61 $\pm$ 0,92	19,15 $\pm$ 1,52	5,40 $\pm$ 0,32
	LGW + ConA	20,21 $\pm$ 1,25	19,31 $\pm$ 2,45	5,37 $\pm$ 0,38

4.2.2. Хистопатолошка анализа јетре и заштитни ефекат LGW-а након 24 h

Детаљним прегледом хистолошких препарата јетре C57BL/6 мишева, 24 h након индукције хепатитиса применом ConA, уочавају се екстензивне морфолошке алтерације које потврђују тежак степен оштећења паренхима. У оквиру ConA групе доминирају широко распрострањена поља некрозе хепатоцита, која захватају значајан део лобулуса, доминантно у перицентралним и медиозоналним зонама (Слика 2). Унутар ових некротичних зона запажа се изражена ацидофилија цитоплазме уз потпуни губитак типичне архитектуре хепатоцита, док су промене на једрима јасно видљиве у форми пикнозе, кариорексе и кариолизе. Ове деструктивне промене праћене су масивном интралобуларном инфилтрацијом моноклеарних инфламацијских ћелија, које су густо дистрибуиране око централних вена и унутар оштећених подручја.

Насупрот томе, претходни петодневни третман са LGW (1 g/kg) испољио је значајан заштитни ефекат, што се огледа у очувању структурног интегритета ткива јетре (ConA+LGW група, Слика 2). Код животиња претретираних сурутком, паренхим је у великој мери очуван, са одсуством екстензивних некротичних поља карактеристичних за нетретирану контролу. Уочавају се само минимална, спорадична некротична жаришта и дискретне инфламацијске ћелије, док већина хепатоцита задржава уредну морфологију са јасно дефинисаним једрима.

Ови резултати недвосмислено потврђују да превентивна примена LGW-а ефикасно супримира прогресију имунски посредованог оштећења јетре и чува функционалност паренхима чак и 24 h након деловања штетног агенса.



Слика 2. Третман LGW-ом (доза од 1 g/kg) ублажава оштећење јетре код C57BL/6 мишева третираних конканавалином А.

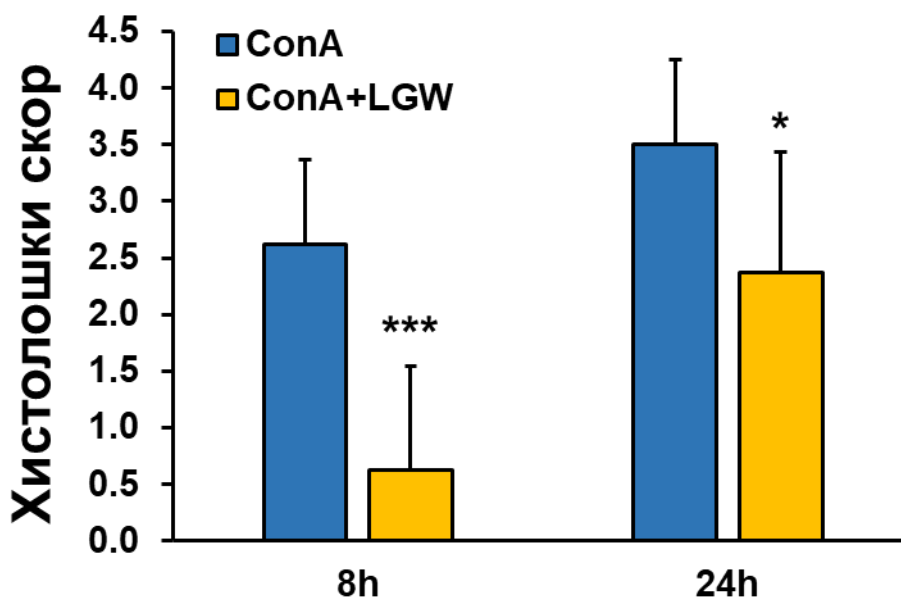
Репрезентативни прикази пресека јетре, обојени Н&Е методом (увеличања 50× и 200×), 24 сата након примене ConA.

4.2.3. Квантификација степена оштећења паренхима јетре

Ради прецизне објективизације хепатопротективног ефекта LGW-а, спроведена је квантификација морфолошких промена анализом хистолошког скорa (Графикон 2). Резултати недвосмислено показују да интензитет оштећења паренхима јетре код животиња које су примиле само ConA значајно прогредира током времена, достижући највише вредности након 24 h.

Већ у осмом сату након индукције хепатитиса, у ConA групи уочава се висока вредност хистолошког скорa, што рефлектује почетни талас некрозе и инфламације. Насупрот томе, претходни петодневни третман са LGW (1 g/kg) значајно је смањив степен оштећења у овој временској тачки. Статистичка анализа показује врло високу значајност разлике између ConA и ConA+LGW групе у осмом сату ($p < 0,001$), чиме се потврђује да сурутка снажно инхибира рану фазу имунски посредоване деструкције хепатоцита.

Иако се након 24 h у обе групе бележи пораст вредности скорa у односу на осми сат, заштитни ефекат LGW-а остаје перзистентан. У овој касној фази експеримента, хистолошки скор код животиња претретираних сурутком је статистички значајно нижи у поређењу са ConA контролом ($p < 0,05$). Овакви подаци указују на то да LGW не само да ефикасно супримира почетни инфламацијски одговор, већ пружа и континуирану структурну заштиту паренхима током критичног периода од 24 сата.



Графикон 2. Утицај LGW-а на вредности хистолошког скорa код C57BL/6 мишева 8 h и 24 h након индукције хепатитиса.

Хистолошки скор је одређиван на основу степена некрозе и инфламаторне инфилтрације паренхима јетре. Резултати су приказани као средња вредност + стандардна девијација (SD). Статистичка значајност разлике ConA+LGW у односу на одговарајућу ConA групу означена је звездицама: *** ($p < 0,001$) за временску тачку од 8 h и * ($p < 0,05$) за временску тачку од 24 h (Student's t-test).

Квантитативно смањење хистолошког скорa у групи са претходним третманом лиофилизованом козјом сурутком представља директну потврду хепатопротективног

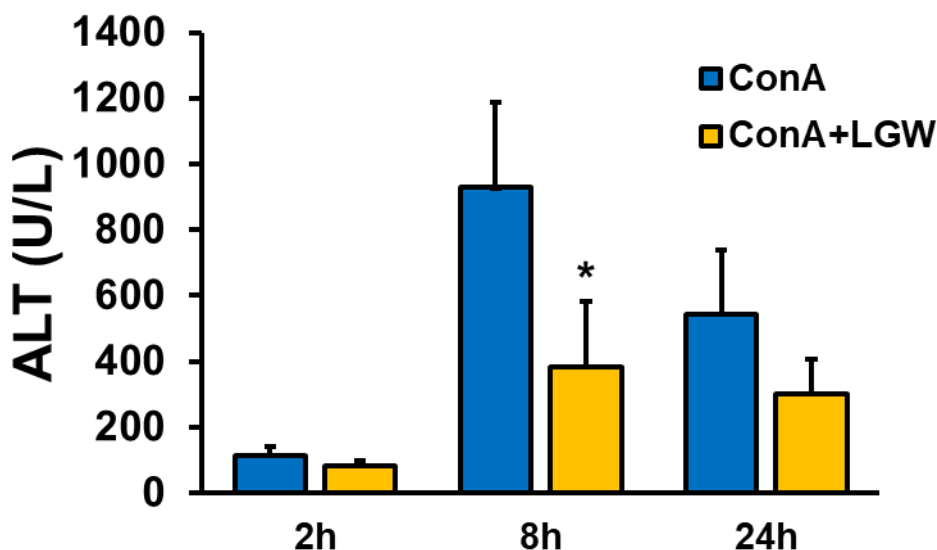
потенцијала испитиваног препарата, што је у корелацији са претходно описаним хистолошким налазима и очувањем структуре органа (Слика 2).

4.2.4. Анализа активности аминотрансфераза у серуму

Ради испитивања системског ефекта LGW-а на интегритет хепатоцита, спроведена је анализа активности аланин аминотрансферазе у серуму током 24-сатног експерименталног периода (Графикон 3). Резултати биохемијске анализе указују на јасну динамику оштећења, која у потпуности прати претходно описане хистолошке промене.

У раној фази, 2 сата након индукције, вредности ALT остају у оквирима физиолошких граница у свим испитиваним групама. Овај налаз потврђује постојање латентног периода неопходног за развој имунски посредоване деструкције паренхима. Међутим, након 8 сати, код животиња из ConA групе настаје изражен скок активности овог ензима, што представља биохемијски корелат масивне некрозе хепатоцита уочене на хистолошким препаратима.

Насупрот томе, превентивна суплементација LGW-ом изазива статистички значајну супресију ослобађања ALT у циркулацију већ у осмом сату ($p < 0,05$). Иако активност ензима у овој групи животиња бележи пораст у односу на почетне вредности, она остаје знатно нижа у поређењу са групом ConA. Овај податак потврђује да испитивана сурутка ефикасно чува пермеабилност мембране хепатоцита и спречава екстензивно изливање цитосолних ензима у раним фазама упалног процеса.



Графикон 3. Динамика активности ALT у серуму C57BL/6 мишева након индукције хепатитиса и ефекат превентивне примене LGW-а

Активност аланин аминотрансферазе (ALT) изражена је у интернационалним јединицама по литру (U/L). Резултати су приказани као средња вредност + стандардна девијација (SD). Статистички значајна разлика ConA+LGW групе у односу на ConA групу у истој временској тачки означена је звездицом * ($p < 0,05$) (Student's t-test).

Након 24 сата, уочава се тренд природног пада активности ALT у обе групе, што се може приписати постепеној резолуцији почетног инфламацијског таласа или покретању регенеративних механизма јетре. Ипак, вредности код животиња које су примале LGW и даље показују нижи тренд у односу на ConA групу, што сугерише

перзистентан заштитни ефекат током читавог посматраног периода. Сумирано, биохемијски профил потврђује да петодневни третман LGW-ом (1 g/kg) доприноси већој отпорности паренхима јетре C57BL/6 мишева на акутни имунски стрес изазван конканавалином А.

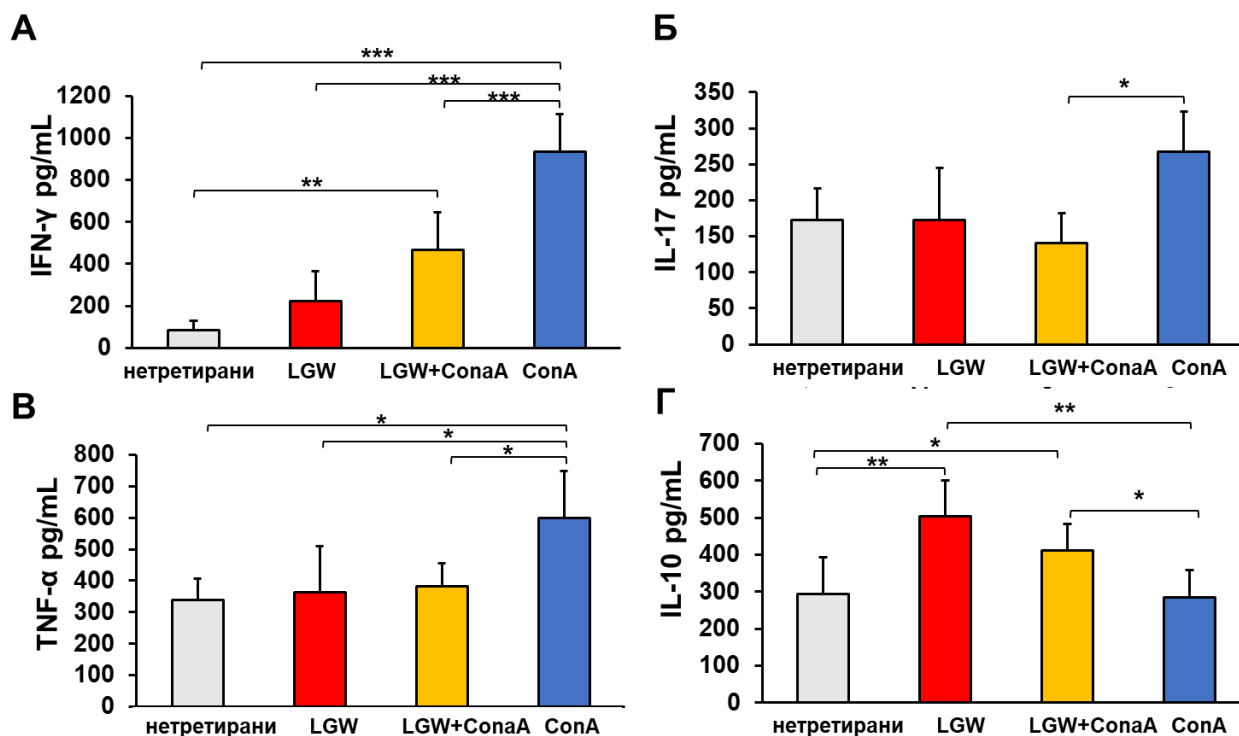
4.3. LGW модулише продукцију про- и анти- инфламацијских цитокина у ткиву јетре

Ради дубљег разумевања молекулских механизма који леже у основи оствареног хепатопротективног ефекта лиофилизоване козје сурутке, анализиран је цитокински профил у хомогенатима јетре C57BL/6 мишева у временској тачки од 12 h након индукције хепатитиса применом ConA.

Ублажавање инфламацијског оштећења јетре код животиња претходно третираних LGW-ом (1 g/kg) показало је значајну корелацију са редукцијом интрахепатичне продукције кључних проинфламацијских цитокина. Концентрације TNF- α , IFN- γ и IL-17 у хомогенатима јетре биле су статистички значајно ниже у LGW+ConA групи у поређењу са животињама које су примиле само ConA (Графикон 4А, Б, В).

Посебно је значајан пад концентрације IFN- γ , који се сматра једним од главних ефекторских медијатора у овом моделу хепатитиса, чиме се потврђује да превентивна суплементација лиофилизованом козјом сурутком успешно инхибише патолошку активацију имунских ћелија у паренхиму јетре. Насупрот томе, концентрација антиинфламацијског цитокина IL-10 статистички је значајно већа у LGW+ConA групи у поређењу са групом мишева третираних само конканавалином А (Графикон 4Г).

Интересантно је истаћи да је сама администрација LGW-а код здравих животиња значајно повећала базалну концентрацију IL-10 у ткиву јетре у поређењу са нетретираним контролама. Овакав налаз сугерише снажан базални имуномодулаторни ефекат испитиваног препарата, који потенцијално припрема ткиво јетре за предстојећи инфламацијски стрес кроз фаворизовање антиинфламацијског микроокружења. Сумирано, ови резултати указују на то да LGW остварује свој заштитни ефекат кроз прецизну редукцију проинфламацијског одговора уз истовремену стимулацију протективних имунских механизма посредованих цитокином IL-10.



Графикон 4. LGW ублажава инфламацију јетре индуковану применом ConA. Концентрације (А) IFN- γ , (Б) IL-17, (В) TNF- α и (Г) IL-10 у хомогенатима ткива јетре, 12 h након инјекције ConA, мерени ELISA методом. Подаци су приказани као средња вредност + SD (n = 6 мишева по групи); *** p < 0,001; ** p < 0,005; * p < 0,05, између назначених група.

4.4. Ефекат LGW-а на заступљеност проинфламацијских и антиинфламацијских субпопулација Т лимфоцита у јетри

Будући да су инфламацијски цитокини које продукују регрутовани лимфоцити кључни покретачи некрозе хепатоцита, у следећем кораку истраживања анализиран је фенотип мононуклеарних ћелија изолованих из јетре. Применом проточне цитометрије, испитан је утицај петодневне превентивне суплементације лиофилизованом козјом сурутком на проценат заступљености специфичних субпопулација Т лимфоцита одговорних за патогенезу и резолуцију инфламације.

Анализа је обухватила интрацелуларну експресију ефекторских цитокина (IFN- γ и IL-17) као маркера проинфламацијског одговора, али и експресију IL-10 као главног индикатора регулаторне и хепатопротективне функције лимфоцита. Резултати добијени овом методом омогућавају прецизну идентификацију ћелијских популација чија је активност модулисана применом LGW-а, чиме се додатно расветљава имунска основа уоченог терапијског ефекта.

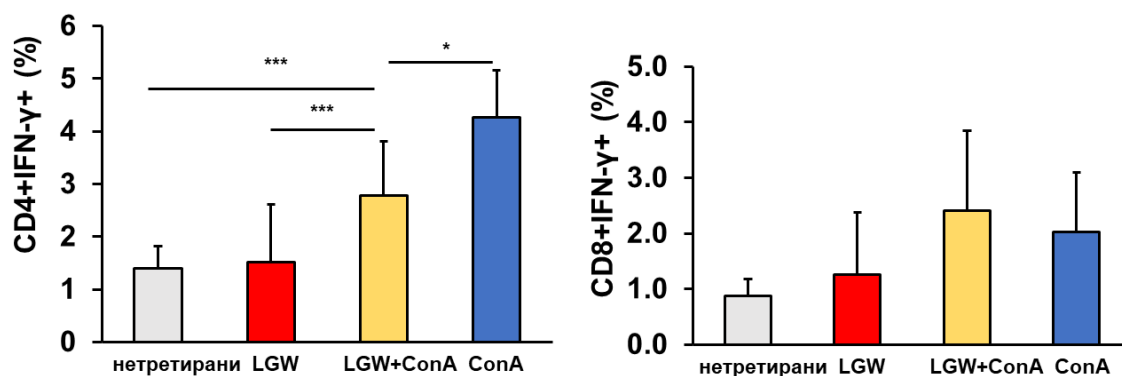
4.4.1. Утицај LGW-а на заступљеност Т лимфоцита који експримирају IFN- γ у паренхиму јетре

Како би се прецизније дефинисао ћелијски извор проинфламацијског одговора, примењена је метода проточне цитометрије за анализу интрацелуларне експресије IFN- γ у субпопулацијама Т лимфоцита изолованих из јетре (Графикон 5). Анализа

процентуалног удела $\text{IFN-}\gamma^+$ ћелија пружа директан увид у ефекторску активност стечене имуности током експерименталног хепатитиса.

Резултати показују да системска администрација ConA изазива драматичан пораст процентуалног учешћа $\text{IFN-}\gamma^+$ ћелија унутар обе испитиване популације лимфоцита у поређењу са нетретираним животињама (Графикон 5). Посебно изражена акумулација забележена је у популацији помагачких Т ћелија ($\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$), где су вредности достигле свој максимум код животиња које су примиле само ConA ($p < 0,001$). Овај податак је у потпуној сагласности са претходно утврђеним повећаном концентрацијом овог цитокина у хомогенату ткива, потврђујући да су CD4^+ Т ћелије примарни ефектори имунски посредоване деструкције хепатоцита у овом моделу.

Превентивна петодневна суплементација LGW-ом статистички је значајно супримирао Th1 и Tc1 одговор. Код животиња из LGW+ConA групе, уочено је изражено смањење процента $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ лимфоцита у поређењу са ConA контролном групом ($p < 0,001$). Сличан заштитни тренд, са значајним смањењем инфилтрације проинфламацијских ћелија, примећен је и у популацији цитотоксичких Т ћелија ($\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$), где је примена сурутке резултовала нижим процентуалним уделом ових ћелија у односу на животиње третиране само конканавалином А ($p < 0,05$).



Графикон 5. Ефекат LGW-а на процентуални удео $\text{IFN-}\gamma^+$ Т ћелија у јетри C57BL/6 мишева. Процентуални удео $\text{CD4}^+\text{IFN-}\gamma^+$ и $\text{CD8}^+\text{IFN-}\gamma^+$ лимфоцита укупне популације мононуклеарних ћелија изолованих из јетре, одређен методом проточне цитометрије. Резултати су приказани као средња вредност + SD. Статистичка значајност разлике између група означена је подебљаним симболима: *** ($p < 0,001$); * ($p < 0,05$) (One-way ANOVA).

Ови налази недвосмислено сугеришу да LGW остварује свој хепатопротективни потенцијал кроз директну модулацију ћелијске имуности, специфично инхибишући активацију и регрутовање Т лимфоцита који експримирају $\text{IFN-}\gamma$. На тај начин се ефикасно лимитира интензитет упалног процеса и спречава екстензивна некроза паренхима јетре, чиме се потврђује снажна имуномодулаторна улога испитиваног препарата.

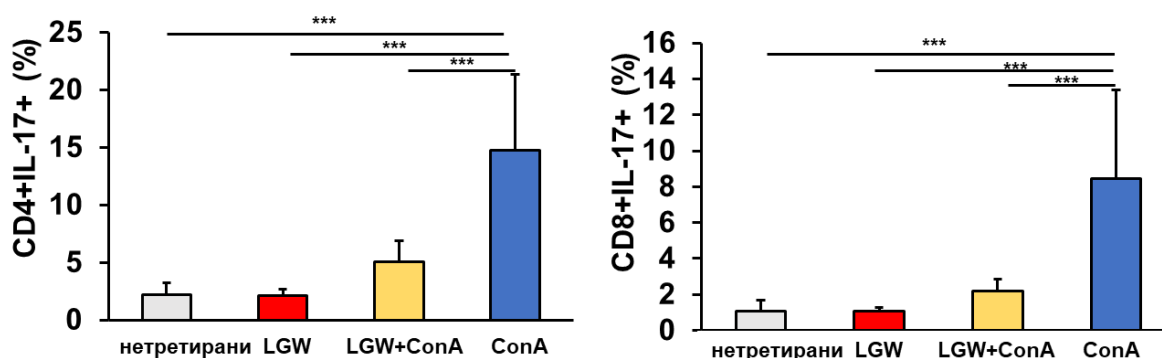
4.4.2. Утицај LGW-а на заступљеност IL-17^+ Т лимфоцита у јетри

Поред Th1 одговора, значајан аспект имуномодулаторног деловања LGW-а анализиран је кроз испитивање заступљености IL-17^+ Т лимфоцита. Цитокин IL-17 игра кључну улогу у пропагацији акутне инфламације јетре путем регрутовања неутрофила и појачавања дејства других проинфламацијских медијатора.

Резултати проточне цитометрије открили су да примена ConA индукује енорман пораст процентуалног удела IL-17⁺ ћелија унутар обе испитиване популације. Код животиња третираних само са ConA, забележена је масивна акумулација и помагачких (CD4⁺IL-17⁺) и цитотоксичких (CD8⁺IL-17⁺) Т ћелија у поређењу са нетретираним контролним групама ($p < 0,001$).

Превентивна суплементација LGW-ом остварила је супериоран супресивни ефекат на ову инфламацијску каскаду. У групи LGW+ConA, проценат CD4⁺IL-17⁺ лимфоцита био је статистички значајно нижи у поређењу са групом мишева која је примила само ConA ($p < 0,001$) (Графикон 6). Сличан, високо значајан тренд редукције забележен је и у популацији цитотоксичких Т ћелија што се види на Графикону 6, где је видљиво да примена сурутке готово потпуно анулирала пораст CD8⁺ ћелија које експримирају IL-17 ($p < 0,001$).

Овако изражена редукција заступљености Т ћелија које експримирају IL-17 указује на то да LGW делује као снажан инхибитор Th17-посредоване инфламације. Способност лиофилизоване козје сурутке да прецизно модулише овај специфичан сегмент ћелијске имуности омогућава ефикасно спречавање прогресије оштећења паренхима јетре, што представља један од најважнијих механизма његове хепатопротективне активности.



Графикон 6. Ефекат LGW-а на процентуални удео IL-17⁺ Т ћелија у јетри C57BL/6 мишева.

Процентуални удео CD4⁺IL-17⁺ и CD8⁺IL-17⁺ лимфоцита укупне популације мононуклеарних ћелија изолованих из јетре, 12 h након инјекције ConA, одређен методом проточне цитометрије. Резултати су приказани као средња вредност + SD. Статистичка значајност разлике између група означена је подебљаним симболима: *** ($p < 0,001$) (One-way ANOVA).

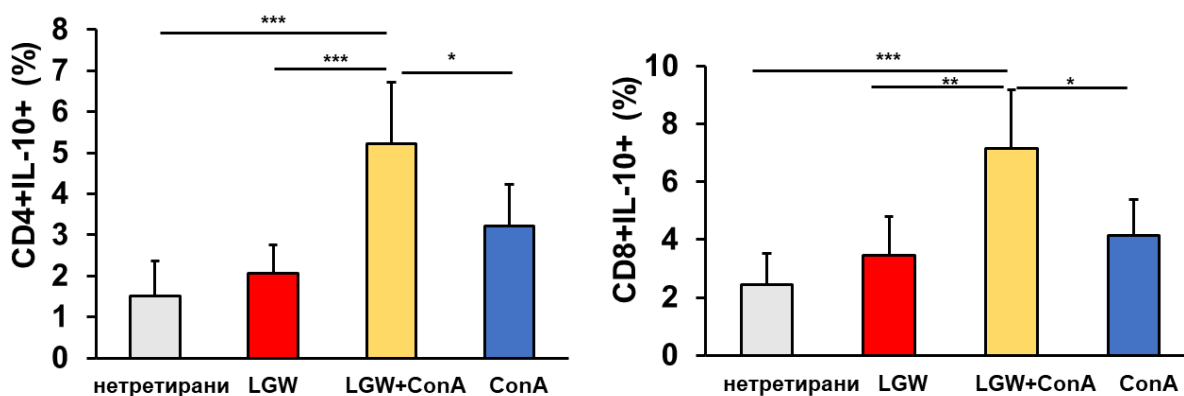
4.4.3. LGW подстиче експанзију регулаторних (IL-10⁺) Т ћелија у јетри током ConA индукованог хепатитиса

Поред супресије ефекторског одговора, испитан је и утицај LGW-а на регулаторни потенцијал моноклеарних ћелија путем анализе заступљености Т ћелија које експримирају IL-10 (Графикон 7). Цитокин IL-10 представља кључни антиинфламацијски медијатор неопходан за ограничавање оштећења ткива и успостављање имунске хомеостазе у јетри.

Резултати проточне цитометрије показују да примена ConA индукује умерен пораст процентуалног удела IL-10⁺ ћелија у поређењу са нетретираним животињама, што представља покушај ендогеног одбрамбеног механизма да ограничи упалу. Међутим, претходна суплементација LGW-ом допринела је значајном додатном повећању ове популације. У групи LGW+ConA, забележен је статистички значајан пораст процента како помагачких (CD4⁺IL-10⁺; $p < 0,001$), тако и цитотоксичких (CD8⁺IL-10⁺; $p < 0,001$) Т ћелија у поређењу са животињама третираним само конканавалином А (Графикон 7).

Посебно је интересантан налаз да суплементација здравих животиња само лиофилизованом козјом сурутком изазива благи пораст базалне експресије IL-10 унутар Т ћелијске популације. Ово сугерише да испитивана сурутка делује као снажан имуномодулатор који превентивно припрема имунски систем кроз фаворизовање антиинфламацијског фенотипа лимфоцита.

Сумирано, способност LGW-а да истовремено супримира ефекторске IFN- γ ⁺ и IL-17⁺ ћелије, уз снажну промоцију регулаторних IL-10⁺ Т ћелија, недвосмислено потврђује његов комплексни хепатопротективни механизам који се заснива на ребалансу имунског одговора у корист заштитних механизма.



Графикон 7. Ефекат LGW-а на процентуални удео IL-10⁺ Т ћелија у јетри C57BL/6 мишева.

Процентуални удео CD4⁺IL-10⁺ и CD8⁺IL-10⁺ лимфоцита укупне популације моноклеарних ћелија изолованих из јетре, 12 h након инјекције ConA, одређен методом проточне цитометрије. Резултати су приказани као средња вредност + SD. Статистичка значајност разлике између група означена је подебљаним симболима: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$) (One-way ANOVA).

4.5. Ефекат LGW-а на активациони статус и регулаторни фенотип лимфоцита јетре

Након што је утврђено да суплементација LGW-ом значајно модулише продукцију проинфламацијских и антиинфламацијских цитокина, било је неопходно јасно дефинисати промене у самом фенотипу и функционалном статусу инфилтришућих Т ћелија. Иmunски посредовано оштећење јетре индуковано применом ConA није само резултат пуког присуства ћелија, већ превасходно зависи од њиховог активационог статуса и способности имунског система да благовремено активира супресивне механизме.

Процес оштећења паренхима отпочиње наглом и масивном активацијом Т лимфоцита, која се огледа кроз појачану експресију раних маркера активације чиме се ћелије оспособљавају за ефекторско деловање и лучење хепатотоксичних медијатора. У том контексту, испитивање динамике експресије активационих молекула омогућава увид у то у којој мери испитивани препарат може да утиче на почетни инфламацијски импулс.

Са друге стране, за потпуну резолуцију упале и преживљавање хепатоцита пресудна је улога регулаторних Т ћелија, које карактерише експресија специфичног транскрипционог фактора FoxP3. Ове ћелије делују као природни кочница имунског одговора, спречавајући прекомерну деструкцију сопственог ткива. Стога је у овом сегменту истраживања посебна пажња посвећена анализи утицаја LGW-а на присуство регулаторних субпопулација, које кроз продукцију супресивног цитокина, IL-10, теже успостављању поновне хомеостазе. Карактеризација ових параметара методом проточне цитометрије омогућила је разумевање начина на који компоненте козје сурутке репрограмирају локални имунски одговор у јетри, трансформишући га из деструктивног у протективни профил.

4.5.1. Модулација експресије раног активационог маркера CD69 на Т лимфоцитима јетре

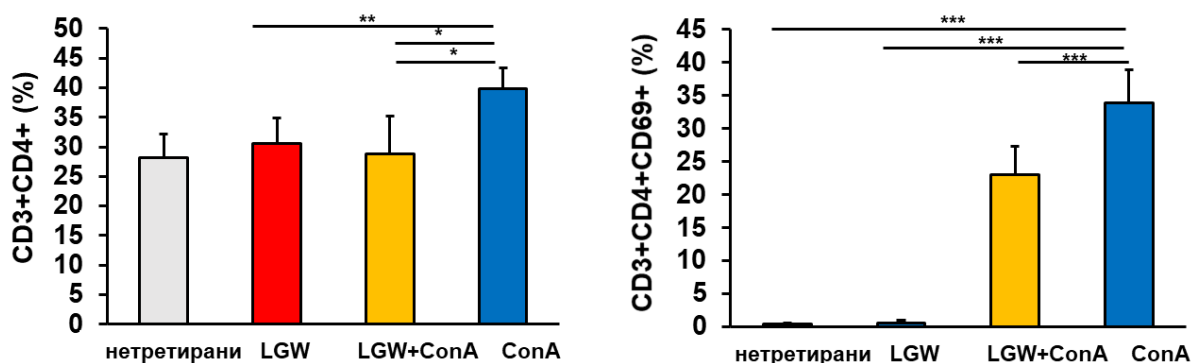
Није уочена разлика у проценту CD3⁺CD4⁺ Т ћелија између група мишева које су примиле само, LGW+ConA и нетретираних мишева, што сугерише да LGW самостално не изазива прилив Т ћелија у јетру (Графикон 8, леви панел).

Први корак у дефинисању функционалног статуса Т ћелија након индукције хепатитиса била је анализа експресије молекула CD69. Овај маркер представља један од најранијих показатеља антиген-специфичне активације лимфоцита, чија појачана експресија корелира са способношћу ћелија да мигрирају у инфламирано ткиво и обаве своју ефекторску функцију.

Резултати проточне цитометрије открили су да примена ConA индукује статистички значајан пораст процентуалног удела CD69⁺ ћелија унутар обе испитиване популације (Графикон 8). Код животиња које су примиле само ConA, проценат активираних помагачких Т ћелија (CD4⁺CD69⁺) порастао је са базалних вредности на готово 35%, што указује на масивну и наглу активацију лимфоцита у паренхиму јетре ($p < 0,001$). Сличан, изражен пораст забележен је и у популацији цитотоксичких Т ћелија (CD8⁺CD69⁺), чиме је потврђено да су обе главне субпопулације Т ћелија снажно захваћене инфламацијским процесом.

Превентивни третман LGW-ом остварио је значајан инхибиторни ефекат на овај почетни талас активације. У групи LGW+ConA, проценат CD4⁺CD69⁺ лимфоцита био је статистички значајно нижи у поређењу са животињама које су примиле само ConA ($p < 0,05$). Ова редукција активационог статуса сугерише да компоненте козје сурутке делују већ у раним фазама имунског одговора, пасивизирајући Т лимфоците и спречавајући

њихово пуно ангажовање у деструкцији хепатоцита. Смањење интензитета активације цитотоксичких Т ћелија под утицајем LGW-а додатно доприноси укупном заштитном ефекту, тако лимитирајући директно оштећење ткива у ком ове ћелије иначе учествују.



Графикон 8. Утицај LGW-а на активацију Т ћелија у јетри.

Процентуални удео (лево) $CD4^+CD69^+$ и (десно) $CD8^+CD69^+$ лимфоцита у популацији моноклеарних ћелија изолованих из јетре C57BL/6 мишева, 12 h након инјекције ConA. Резултати су добијени методом проточне цитометрије и приказани као средња вредност + SD. Статистичка значајност разлике означена је симболима: *** ($p < 0,001$); * ($p < 0,05$) (One-way ANOVA).

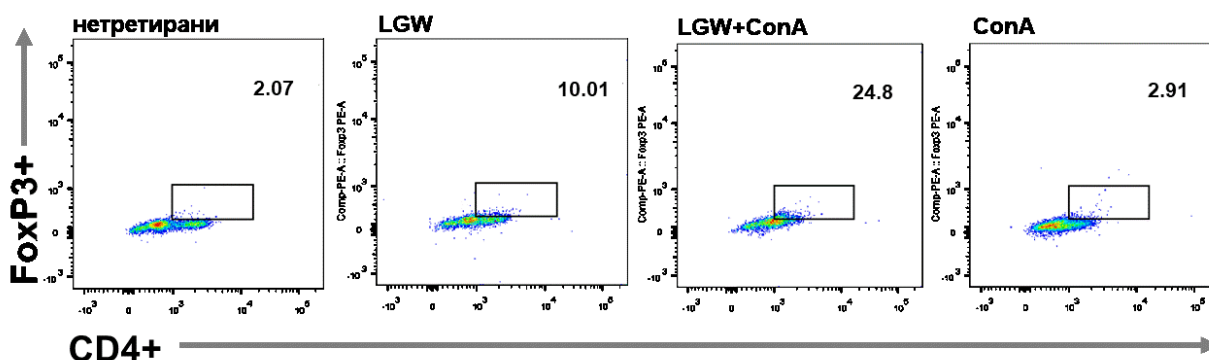
4.5.2. Утицај LGW-а на заступљеност $FoxP3^+$ регулаторних Т ћелија у јетри

Кључни аспект хепатопротективног деловања LGW-а анализиран је кроз испитивање заступљености регулаторних Т ћелија које експримирају специфичан транскрипциони фактор FoxP3. Ове ћелије имају кључну улогу у супресији прекомерног имунског одговора и очувању интегритета паренхима јетре током акутне упале.

Анализа података проточне цитометрије показала је да сама индукција хепатитиса применом ConA код нетретираних животиња не повећава значајно проценат ових регулаторних популација у поређењу са контролном групом, што додатно објашњава тежину оштећења ткива услед изостанка адекватне имунске контроле. Насупрот томе, превентивна суплементација LGW-ом остварила је драматичан ефекат на експанзију регулаторног фенотипа.

Репрезентативни узорци експерименталних група у којима је анализирана популација $CD4^+FoxP3^+$ ћелија приказани су на Слици 3. Ови резултати откривају изузетан имуномодулаторни капацитет лиофилизоване козје сурутке. Док је код контролних животиња и животиња третираних само конканавалином А проценат $CD4^+FoxP3^+$ ћелија релативно низак (2,07% до 2,91%), превентивна суплементација LGW препаратом изазива драматичну експанзију ове популације.

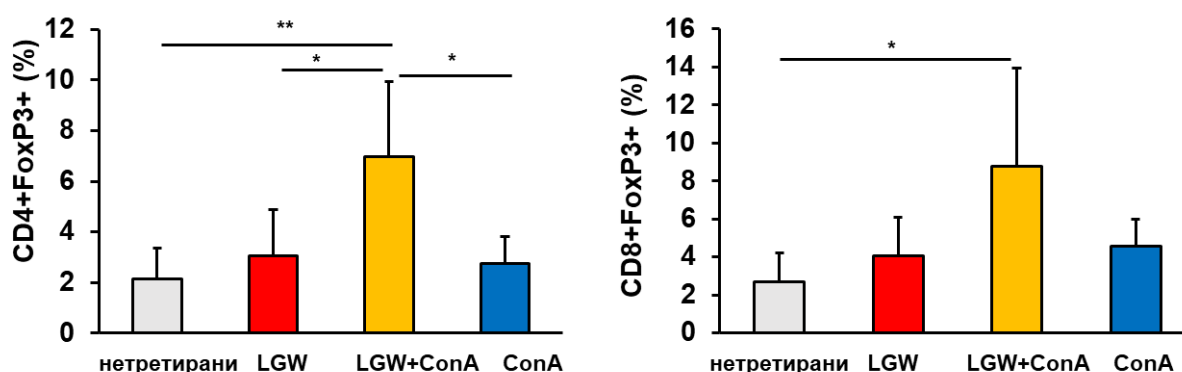
Посебно је значајан налаз у групи LGW+ConA, где проценат регулаторних Т ћелија достиже чак 24,8% (Слика 3). Ово не само да потврђује способност сурутке да модулише стечени имунитет, већ директно корелира са смањењем нивоа трансаминаза и очувањем хистолошке грађе јетре.



Слика 3. Репрезентативни дот-плот прикази процента $CD4^{+}FoxP3^{+}$ регулаторних Т ћелија. Приказана је процентуална заступљеност $CD4^{+}FoxP3^{+}$ ћелија унутар популације мононуклеарних ћелија јетре код: нетретираних контролних мишева; мишева који су третирани LGW-ом (5 дана); мишева који су превентивно примали LGW пре апликације ConA и мишева након апликације ConA. Бројеви изнад означених оквира (*gates*) представљају проценат позитивних ћелија у типичном репрезентативном узорку за сваку групу.

У групи LGW+ConA, забележен је статистички значајан пораст процентуалног удела $CD4^{+}FoxP3^{+}$ лимфоцита у поређењу са животињама које су примиле само ConA ($p < 0,05$), као и у односу на здраве контролне животиње ($p < 0,01$) (Графикон 9). Овај налаз недвосмислено потврђује да лиофилизована козја сурутка фаворизује диференцијацију или регрутовање регулаторних Т ћелија у јетру. Сличан тренд пораста, иако мањег интензитета, примећен је и у популацији $CD8^{+}$ ћелија које експримирају FoxP3⁺ чији је проценат највећи управо у групи која је превентивно добијала испитивани препарат ($p < 0,05$).

Овако изражена промоција FoxP3⁺ ћелија под утицајем LGW-а указује на то да примарни механизам заштите лежи у репрограмирању имунског микроокружења јетре ка толерогеном фенотипу. Способност лиофилизоване козје сурутке да значајно повећа проценат регулаторних ћелија у јетри омогућава ефикасну контролу инфламацијског процеса, чиме се директно ограничава некроза хепатоцита и убрзава опоравак органа.

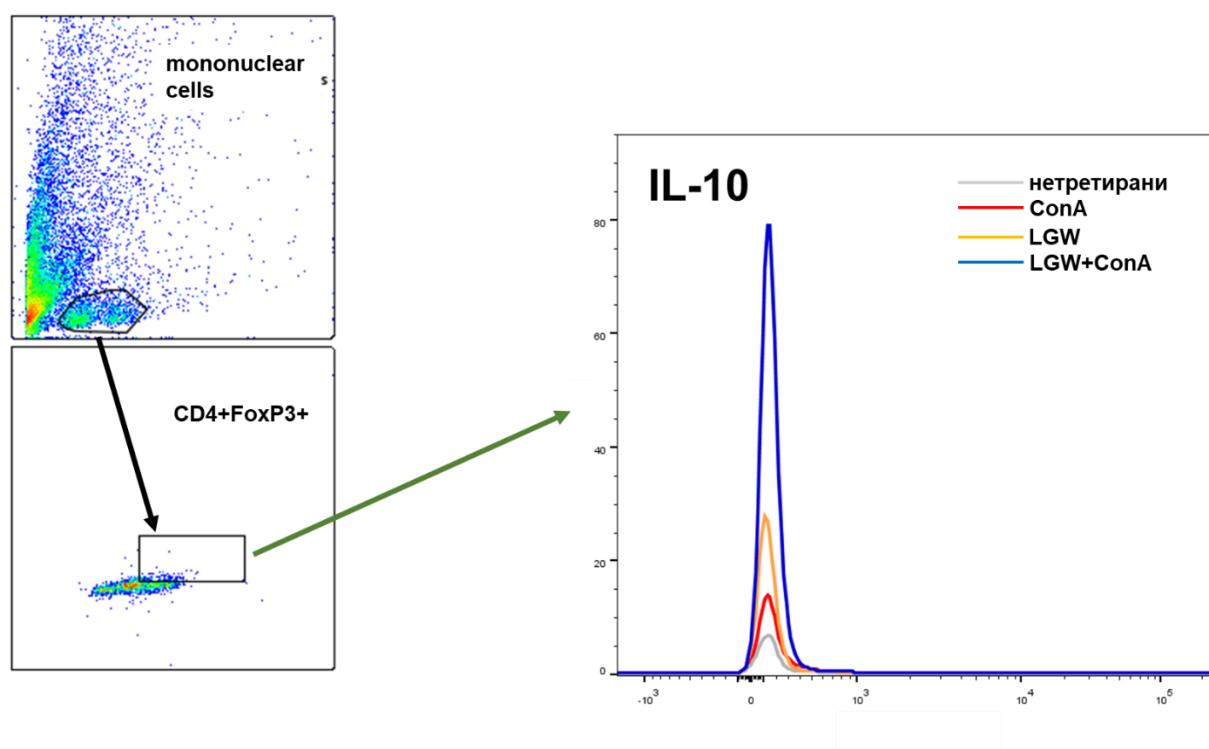


Графикон 9. Ефекат LGW-а на заступљеност FoxP3⁺ регулаторних Т ћелија у јетри.

Процентуални удео (лево) $CD4^{+}FoxP3^{+}$ и (десно) $CD8^{+}FoxP3^{+}$ лимфоцита у популацији мононуклеарних ћелија изолованих из јетре C57BL/6 мишева, 12 h након инјекције ConA. Резултати су приказани као средња вредност + SD. Статистичка значајност разлике означена је симболима: ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$) (One-way ANOVA).

4.5.3. LGW фаворизује експанзију FoxP3⁺IL-10⁺ регулаторних Т ћелија

Да би се потврдио супресивни потенцијал индукованих регулаторних популација, у другој фази фенотипске карактеризације примењена је двострука интрацелуларна детекција FoxP3 транскрипционог фактора и антиинфламацијског цитокина IL-10. На Слици 4 приказана је гејтинг стратегија којом је извршена селекција моноклеарних ћелија у оквиру које је даље издвојена популација CD4⁺FoxP3⁺ ћелија, а у оквиру које је анализирана експресија IL-10, што је и приказано на хистограму. На хистограму се уочава пораст експресије IL-10 у популацији CD4⁺FoxP3⁺ ћелија у групи мишева које је примала LGW у поређењу са нетретираним мишевима и групом која је примила само конканвалин А. Најзначајније, експресија IL-10 је највећа у групи мишева који су претретирани лиофилизованом козјом сурутком пре инјекције ConA.



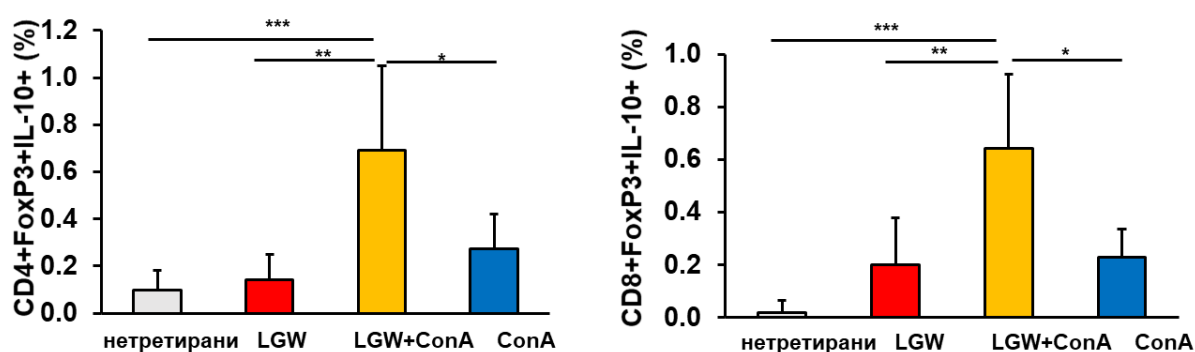
Слика 4. Анализа експресије IL-10 у CD4⁺ Т ћелијама.

Гејтинг стратегија за идентификацију CD4⁺FoxP3⁺ Т ћелија из пула моноклеарних ћелија јетре и репрезентативни хистограмски приказ флуоресценције за IL-10 унутар селектоване популације. Уочава се јасан помак интензитета флуоресценције десно код животиња које су превентивно примале LGW пре апликације ConA (плава линија) у односу на нетретиране (сива линија) и животиње које су примиле само ConA (црвена линија).

Квантитативна анализа додатно потврђује да је превентивна примена LGW-а условила активацију заштитних механизма регулаторних ћелија током хепатитиса (Графикон 10). У групи животиња третираних само конканвалином А, проценат функционалних IL-10⁺ регулаторних Т ћелија остао је на релативно ниском нивоу, што указује на недовољан ендогени капацитет организма да самостално сузбије инфламацију. Насупрот томе, суплементација LGW-ом пре индукције оштећења допринела је енормном порасту заступљености CD4⁺FoxP3⁺IL-10⁺ ћелија у поређењу са нетретираним

контролним животињама ($p < 0,001$), али што је још важније, и у односу на животиње којима је апликован само ConA ($p < 0,05$) (Графикон 10).

Сличан и веома конзистентан ефекат забележен је и у популацији $CD8^+$ ћелија. У групи LGW+ConA забележен је статистички значајно већи проценат $CD8^+FoxP3^+IL-10^+$ ћелија у односу на све остале групе ($p < 0,05$), чиме се потврђује да лиофилизована козја сурутка делује панрегулаторно, обухватајући различите линије Т лимфоцита (Графикон 10).



Графикон 10. Ефекат LGW-а на функционални статус регулаторних Т ћелија.

Процентуални удео (лево) $CD4^+FoxP3^+IL-10^+$ и (десно) $CD8^+FoxP3^+IL-10^+$ лимфоцита у популацији моноклеарних ћелија изолованих из јетре C57BL/6 мишева, 12 h након инјекције ConA. Анализа је извршена методом проточне цитометрије. Резултати су приказани као средња вредност + SD. Статистичка значајност разлике означена је симболима: *** ($p < 0,001$); ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$) (One-way ANOVA).

4.6. Утицај превентивне суплементације LGW-ом на дендритске ћелије јетре

Након детаљне анализе модулације ефекторског и регулаторног одговора Т ћелија, неопходно је било дефинисати узрочно-последичне механизме који претходе овим променама на нивоу урођене имуности. У том контексту, дендритске ћелије представљају централне фигуре имунског надзора, делујући као професионалне антиген-презентујуће ћелије које имају јединствену способност да детерминишу правце диференцијације наивних Т лимфоцита. Судбина инфламацијског процеса у јетри суштински зависи од сигнала које дендритске ћелије преносе лимфоцитима, што је директно условљено њиховим матурационим статусом и цитокинским профилем.

С обзиром на то да је у овом истраживању LGW примењиван као превентивна стратегија, фокус ове секције постављен је на испитивање базалног стања имунског система код здравих животиња. Разумевање начина на који компоненте лиофилизоване козје сурутке модулишу фенотип и функцију дендритских ћелија пре самог инфламацијског стимулуса омогућава нам да сагледамо какав је утицај овог препарата на препрограмирање имунског микроокружења јетре.

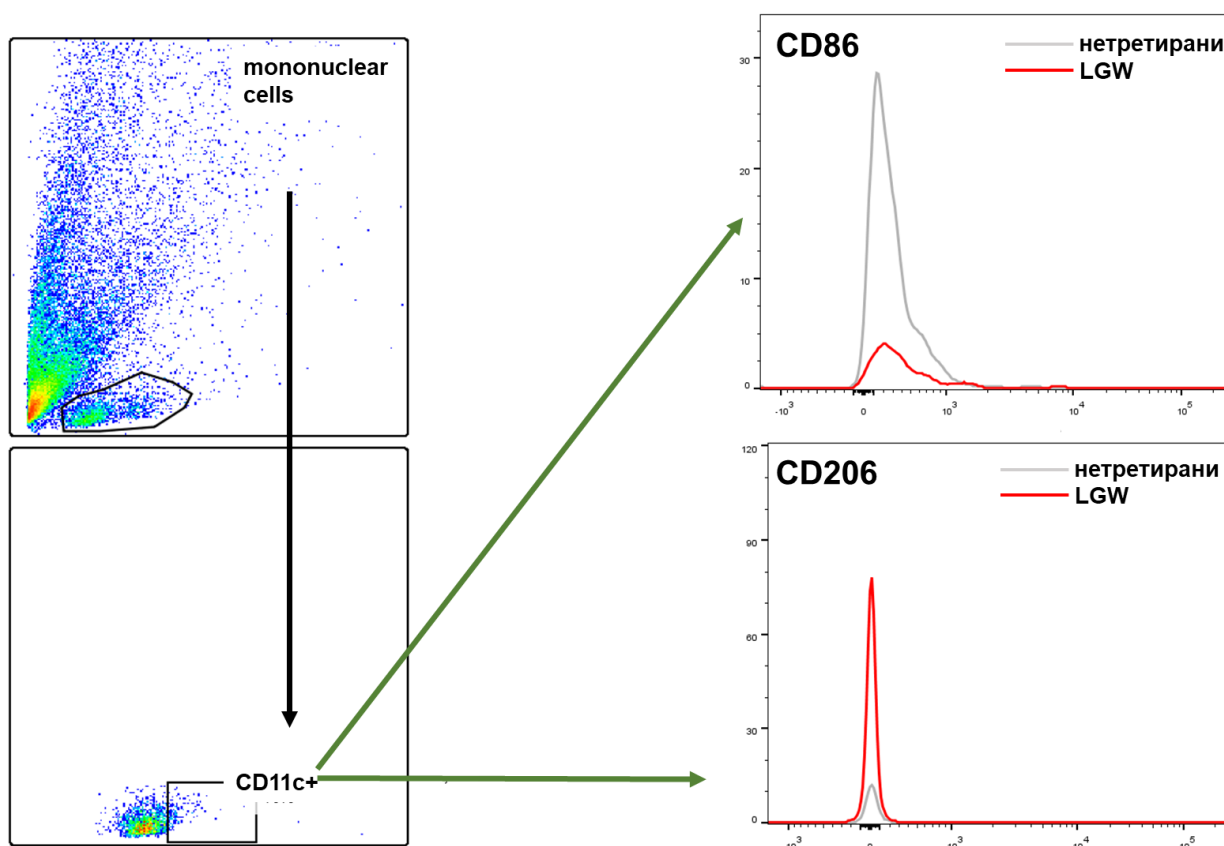
Испитивање је обухватило анализу заступљености $CD11c^+$ ћелија, карактеризацију њихових активационих маркера, као и регулаторног (антиинфламацијског) $IL-10^+$, фенотипа ових ћелија. Оваква анализа пружа одговор на питање да ли хепатопротективни ефекат LGW-а потиче од његове способности да

припреми (енгл. *prime*) дендритиске ћелије за индуковање имунске толеранције, чиме се потенцијално скреће имунски одговор са деструктивног Th1/Th17 профила ка протективним регулаторним механизмима.

4.6.1. Фенотипска карактеризација и матурациони статус дендритских ћелија јетре након суплементације LGW-ом

Како би се прецизно дефинисао механизам којим LGW остварује свој хепатопротективни ефекат, први корак истраживања био је усмерен на анализу дендритских ћелија као кључних регулатора локалног имунског одговора јетре.

На Слици 5 приказани су репрезентативни хистограми на којима се уочава приметно померање интензитета флуоресценције за CD206 у групи животиња које су примале LGW у току пет дана (црвена линија) у односу на контролну групу (сива линија) нетретираних животиња што недвосмислено потврђује прелазак дендритских ћелија у толерогени статус. Експресија маркера активације анализирана је у популацији CD11c⁺ ћелија издвојених из популације мононуклеарних ћелија (Слика 5).



Слика 5. Анализа експресије маркера активације у популацији дендритских ћелија. Репрезентативни прикази проточне цитометрије који илуструју процес издвајања мононуклеарних ћелија на основу морфолошких карактеристика, дефинисање циљне популације CD11c⁺ дендритских ћелија и упоредне хистограмске приказе експресије маркера активације CD86 и CD206 у популацији CD11c⁺ дендритских ћелија. Сива линија представља нетретирану контролну групу, док црвена линија приказује интензитет флуоресценције код животиња које су третиране LGW-ом.

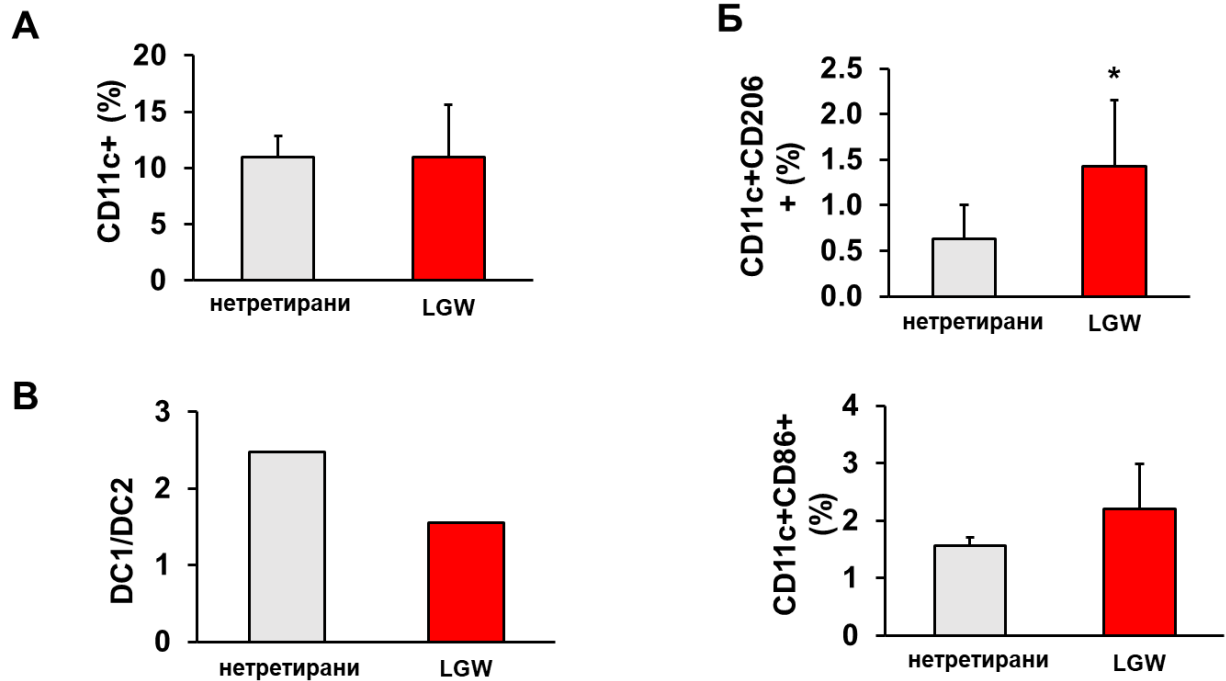
Анализа укупног процента CD11c⁺ ћелија (Графикон 11, панел А) показала је да петодневна превентивна суплементација козјом сурутком код здравих мишева не изазива

статистички значајне промене у заступљености ове популације у јетри у поређењу са нетретираном контролном групом. Овај налаз потврђује да сам препарат не делује проинфламацијски и не изазива неспецифичну регрутацију антиген-презентујућих ћелија у паренхим здраве јетре.

Међутим, примена LGW-а изазвала је значајне квалитативне промена унутар DC популације, што је утврђено анализом специфичних активационих и матурационих маркера (Графикон 11, панел Б). Код животиња које су примале LGW, забележен је статистички значајан пораст процентуалног удела дендритиских ћелија које експримишу CD206 маркер ($p < 0,05$). С обзиром на то да је CD206 карактеристичан за алтернативно активирани, толерогене дендритиске ћелије, овај податак јасно указује на промоцију супресивног имунофенотипа под дејством сурутке. Експресија костимулаторног молекула CD86, који представља маркер класичне матурације неопходан за ефикасну активацију ефекторских Т лимфоцита, показала је тек благи тренд пораста, али без статистички значајне разлике у односу на контролу.

Као директна последица доминантног пораста CD206⁺ субпопулације, уочено је приметно смањење односа класично активираних (DC1) према алтернативно активираним (DC2) дендритиским ћелијама код мишева на LGW режиму исхране (Графикон 11, панел В).

Ови резултати сугеришу да суплементација лиофилизованом козјом сурутком специфично репрограмира дендритиске ћелије јетре, усмеравајући их ка толерогеном профилу. Овакве припремљене ћелије поседују смањен потенцијал за активацију деструктивног Th1/Th17 одговора, док истовремено имају повећан капацитет за индуковање имунске толеранције.

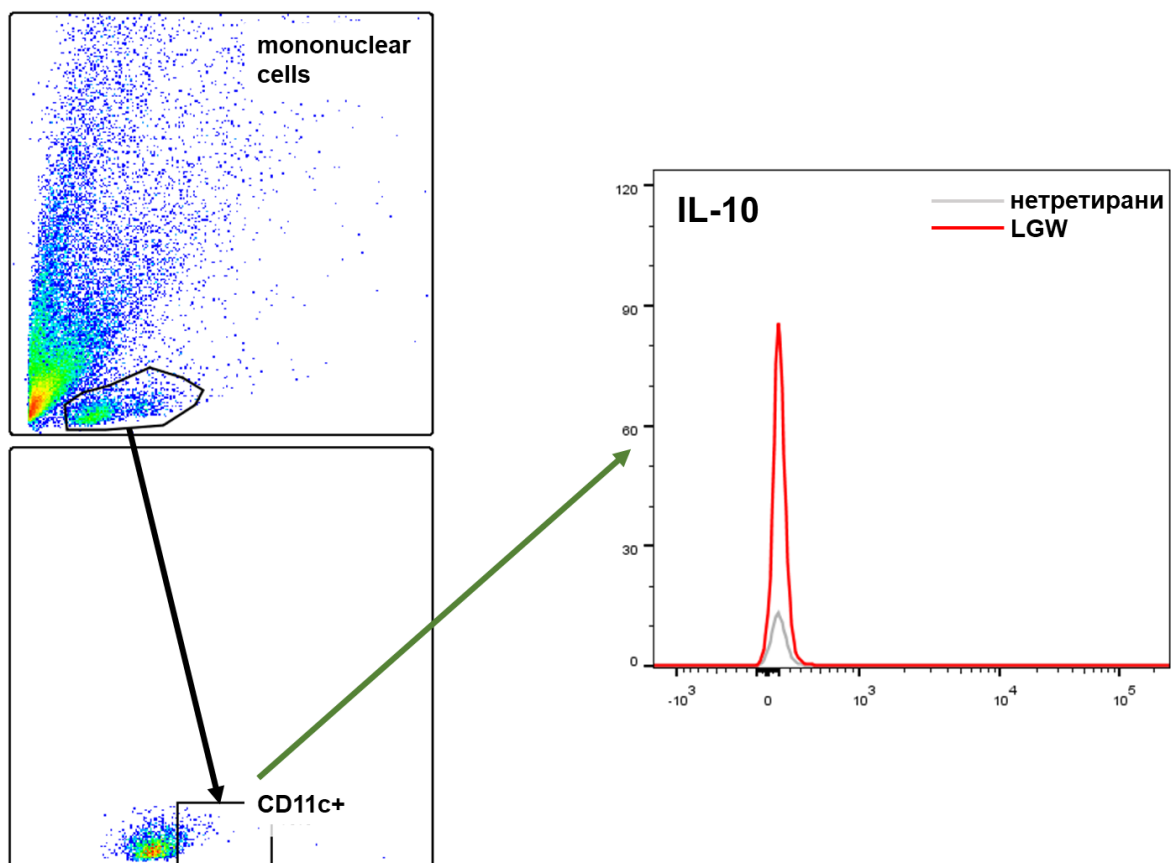


Графикон 11. LGW индукује регулаторни фенотип дендритских ћелија јетре.

(А) Проценат CD11c⁺ ћелија; (Б) учесталост CD11c⁺ ћелија које експримирују маркере класичне (CD86) и алтернативне активације (CD206), као и њихов међусобни однос DC1/DC2 (В). Анализе су извршене проточном цитометријом мононуклеарних ћелија јетре изолованих код нетретираних мишева и 24 h након последње од пет дневних доза LGW-а. Подаци су приказани као средња вредност + SD (n=6; * p < 0,05) (Student's t-test).

4.6.2. LGW повећава проценат регулаторних дендритских ћелија у јетри мишева

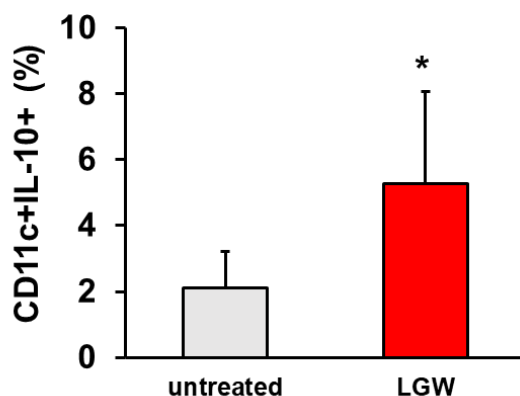
Након анализе матурационог статуса, функционални профил дендритских ћелија додатно је испитан кроз њихову способност за продукцију IL-10, кључног антиинфламацијског цитокина који детерминише правце даље имунске диференцијације. На Слици 6 приказан је репрезентативни хистограм на ком се уочава померање интензитета флуоресценције за IL-10 у групи животиња које су примале LGW (црвена линија) у односу на контролну групу нетретираних животиња (сива линија). Експресија IL-10 анализирана је у популацији CD11c⁺ ћелија издвојених из популације мононуклеарних ћелија (Слика 6).



Слика 6. Анализа експресије антиинфламацијског цитокина IL-10 у популацији дендритских ћелија.

Репрезентативни прикази проточне цитометрије који илуструју процес издвајања мононуклеарних ћелија на основу морфолошких карактеристика, дефинисање циљне популације CD11c⁺ дендритских ћелија и хистограмског приказа експресије IL-10 у популацији CD11c⁺ дендритских ћелија. Сива линија представља нетретирану контролну групу, док црвена линија приказује интензитет флуоресценције код животиња које су третиране LGW-ом.

Резултати показују да петодневна превентивна суплементација LGW-ом здравих животиња у јетри изазива статистички значајан пораст процентуалног удела CD11c⁺IL-10⁺ дендритских ћелија у поређењу са нетретираном контролном групом ($p < 0,05$) (Графикон 12). Индуковани пораст CD11c⁺IL-10⁺ популације представља кључну имунску основу за супресију проинфламацијског Th1/Th17 одговора, што LGW чини моћним природним модулатором урођеног имунског система јетре, пре наступања инфламацијског стимулуса.



Графикон 12. LGW индукује пораст регулаторних, IL-10⁺, дендритских ћелија у јетри.

Процентуални удео CD11c⁺ ћелија које експримирују антиинфламацијски цитокин IL-10 у популацији моноклеарних ћелија изолованих из јетре нетретираних мишева и мишева суплементираних LGW-ом током пет дана. Анализа је извршена методом проточне цитометрије. Подаци су приказани као средња вредност + SD (n=6; * p < 0,05).

Сумирајући добијене резултате, може се закључити да петодневна превентивна суплементација препаратом лиофилизоване козје сурутке свеобухватно репрограмира имунску микросредину јетре. Кључни механизам хепатопротекције LGW-а заснива се на два паралелна процеса:

1. модулација урођене имуности: LGW не мења бројност дендритских ћелија, али значајно мења њихов квалитет фаворизујући толерогени фенотип (CD206⁺) и појачавајући њихов капацитет за продукцију антиинфламацијског IL-10.
2. контрола адаптивне имуности: иако се Т лимфоцити активирају LGW изазива истовремени и снажан пораст IL-10⁺ субпопулација CD4⁺ и CD8⁺ ћелија што је ефикасан противтежни механизам којим се сузбија деструктивни потенцијал IFN- γ -и IL-17- продукујућих ефекторских ћелија.

Ови налази указују на то да LGW делује као снажан *priming* агенс који припрема имунски систем за брзу антиинфламацијску реакцију, чиме се значајно ублажава интензитет акутног оштећења јетре изазваног Т ћелијским митогеном.

5. ДИСКУСИЈА

Акутно оштећење јетре индуковано конканавалином А представља релевантан и широко прихваћен експериментални модел који репликује кључне патофизиолошке механизме имунски посредованог хепатитиса код људи, укључујући обољења аутоимунске и вирусне етиологије (142). За разлику од чисто токсичних модела, ConA иницира комплексну цитокинску каскаду која води ка масивној хепатоцелуларној некрози (142, 228), пружајући идеалан модел за испитивање имуномодулаторног потенцијала лиофилизоване козје сурутке.

Резултати ове студије показују да петодневна орална суплементација лиофилизованом козјом сурутком значајно супримира екстремни пораст серумских трансаминаза (Графикон 1 и Графикон 3), који је директна последица масивне некрозе хепатоцита и губитка интегритета цитоплазматске мембране изазваних применом ConA (91). Поред биохемијских параметара, хистопатолошка анализа је потврдила да LGW значајно редукује површину некротичних поља и степен инфламацијске инфилтрације у перипортним просторима (Графикон 2, Слика 1, Слика 2). Евидентна редукција лезија сугерише да компоненте сурутке активно модулишу рану фазу имунског одговора, потенцијално ометајући интеракцију ConA са специфичним рецепторима на површини синусоидалних ендотелних ћелија и макрофага (160).

Кључни налаз овог истраживања јесте да превентивна примена LGW-а остварује снажан, дозно-зависни хепатопротективни ефекат, при чему се доза од 1 g/kg показала веома добром у очувању функционалног капацитета паренхима. Оваква протективна улога LGW може се приписати примени лиофилизације. Као што сугеришу Tang и сарадници (185), овај технолошки поступак елиминише деструктивно дејство површинског напона и високих температура, чиме је очувана нативна конформација биоактивних молекула. У контексту ове студије, ово је било значајно за спречавање *Maillard*-ове реакције и елиминацију појаве артефаката који би могли додатно да оптерете већ инфламиране хепатоците (230). С обзиром да се лиофилизацијом очува до 98% антиоксидативне активности, највероватније је да уочени заштитни ефекти рефлектују стварни потенцијал сурутке.

Одржавање нижих вредности AST и ALT у групи третираној дозом од 1 g/kg указује на адекватну стимулацију протективних механизма способних да неутралишу цитотоксичке стимулусе активираних конканавалином А. Очување микроархитектуре лобулуса имплицира да суплементација са LGW појачава резистенцију хепатоцита на проапоптотске сигнале посредоване лигандима смрти (231, 232). Ови налази указују на то да LGW превазилази оквире пасивног нутритивног суплемента, делујући као моћан биолошки модулатор који репрограмира имунско микроокружење јетре ка толерогеном статусу. Тиме овај препарат постаје кључни фактор у нутритивној подршци и превенцији тешких инфламацијских обољења јетре.

5.1. Анализа дозно-зависног ефекта лиофилизоване козје сурутке на акутно оштећење јетре

Идентификација дозе са оптималним биолошким ефектом представља кључни корак у транслацијским истраживањима природних суплемената као што је лиофилизована козја сурутка. Компаративна анализа две примењене концентрације LGW (0,25 g/kg и 1 g/kg) показује да овај препарат остварује дозно зависан хепатопротективни ефекат у ConA моделу хепатитиса (Графикон 1). Доза LGW од 1 g/kg остварује статистички значајну хепатопротекцију, што указује на то да је овај ниво суплементације неопходан за адекватну модулацију имунског одговора јетре.

Изразит пораст серумских трансаминаза (AST и ALT) у контролној групи потврдио је успешну индукцију фулминантног хепатитиса, чији је примарни патофизиолошки супстрат масивна некроза хепатоцита уз последични губитак интегритета цитоплазматских мембрана (233). Насупрот томе, петодневни пре-третман дозом LGW-а од 1 g/kg резултовао је скоро потпуним очувањем биохемијског профила јетре (Графикон 3), што је у директној корелацији са хистопатолошким налазима (Графикон 2) који су потврдили одсуство екстензивних некротичних поља и очување лобуларне микроструктуре (Слика 1, Слика 2). Постигнути степен хепатопротекције сугерише да је за сузбијање инфламацијске каскаде индуковане ConA неопходан континуиран унос биоактивних молекула сурутке, који делују као критична цитопротективна подршка паренхиму. Тиме се могуће, превенира оксидативни стрес који претходи некрози (234), позиционирајући дозу од 1g/kg као биолошки супериорну у очувању функционалног и структурног интегритета јетре (235).

Доза од 1 g/kg LGW-а значајно је супримирала инфламацијски фенотип Т лимфоцита и дендритских ћелија у јетри (Графикони 5, 6, 11). Док мање дозе дијетарних протеина често не остварују значајан системски утицај, веће дозе могу директном интеракцијом са рецепторима имунских ћелија дигестивног тракта модулисати портни крвоток и имунски статус јетре (236, 237). Чињеница да је доза од 1 g/kg LGW-а резултовала скоро потпуним очувањем биохемијских и хистопатолошких параметара сугерише да је овом концентрацијом достигнут терапијски плато. Даље повећање дозе вероватно не би дало значајно већи степен заштите, јер је ова доза очигледно довољна да засити рецепторске механизме и антиоксидативне капацитете хепатоцита неопходне за неутрализацију ConA индукованог стреса (238, 239).

У овој студији, најоштрији пад вредности трансаминаза забележен у осмом сату након примене ConA (Графикон 3) и значајно нижи хистолошки скор (Графикон 2) код мишева претретираних са LGW сугеришу да активне компоненте сурутке примарно инхибишу рану каскаду имунске активације (142). Благовременим присуством биоактивних молекула у синусоидима јетре вероватно се спречава иницијална адхезија Т лимфоцита и промћптна секреција проинфламацијских цитокина, чиме се фулминантни ток болести пресеца већ у његовој почетној фази (240). Специфичност козје сурутке, богате аминокиселинама разгранатог ланца (BCAA) и лактоферином, омогућава брзу метаболичку репарацију и директну супресију NF-κB сигнализације (197, 206, 241). Последична редукција продукције проинфламацијских цитокина (TNF-α и IFN-γ) (Графикон 4) формира молекулску заштиту која је у групи са нижом дозом била недовољна за очување структурног интегритета паренхима. Посебно је значајан налаз да петодневна примена LGW-а подиже базални ниво IL-10 (Графикон 10) и удео IL-10⁺ дендритских ћелија (Графикон 12) чак и код здравих животиња, пре самог имунског стимулуса. Ово указује на то да механизам заштите није само реактиван, већ се заснива на специфичном пре-кондиционирању ткива јетре (242). Стварањем овакве антиинфламацијске заштите пре индукције оштећења, LGW практично подиже праг активације имунског система, чиме се објашњава висока ефикасност превентивног протокола. На крају, избор дозе од 1g/kg оправдан је постизањем потпуне заштите без нарушавања метаболичке равнотеже организма. Оваква доза омогућава очување ендогеног регенеративног капацитета јетре, спречавајући развој деструктивне инфламације која би иначе инхибирала природне процесе репарације ткива (243, 244). Резултати ове студије указују на то да примењени режим суплементације представља одговарајући приступ за модулацију имунског одговора јетре, чиме се повећава њена отпорност на акутне имунски посредоване исулте. Оваква запажања пружају добру основу за даља истраживања комплексних интеракција унутар синусоидног микроокружења јетре, док уочена дозна зависност сугерише да би LGW могао имати

потенцијал као помоћно средство у заштити паренхима јетре. Ово отвара могућност за будућа испитивања која би прецизније дефинисала улогу ових биоактивних молекула у оквиру транслаторних протокола за акутна инфламацијска стања.

5.2. Модулација цитокинске мреже и Т ћелијског одговора под дејством LGW-а

Разумевање хепатопротективног ефекта лиофилизоване козје сурутке захтева дефинисање њене способности да интерферира са комплексном каскадом догађаја која је иницирана активацијом Т лимфоцита. У моделу хепатитиса индукованом конканавалином А, Т ћелије представљају примарне ефекторе оштећења, при чему ConA делује као снажан митоген који се везује за Т ћелијски рецептор, изазивајући поликлонску активацију CD4⁺ лимфоцита и њихову масивну инфилтрацију у синусоиде јетре (142).

Наши резултати указују на то да превентивна суплементација LGW-ом значајно модификује овај процес, делујући као системски имунорегулатор. Редукција концентрације проинфламацијских цитокина у ткиву сугерише да LGW лимитира експанзију ефекторских Т ћелија, вероватно кроз модулацију костимулаторне активности антиген презентујућих ћелија (196, (245)). Оваква супресија ране фазе имунског одговора кључна је за превенцију каскаде која води ка масивној некрози паренхима (246).

Кључну улогу у деструкцији паренхима јетре конканавалином А остварује IFN- γ (167), чија је продукција у ткиву јетре у групи третираној LGW-ом била статистички значајно снижена (Графикон 4, 5). IFN- γ , који примарно секретују Th1 лимфоцити и NK ћелије, одговоран је за појачану експресију Fas-лиганда (FasL) на површини Т ћелија, чиме се иницира проапоптотска каскада на хепатоцитима (247, 248). Редукција продукције IFN- γ указује на то да биоактивни пептиди из сурутке вероватно могу директно модулисати активност транскрипционих фактора попут STAT1 и T-bet, који су есенцијални за диференцијацију наивних Т ћелија у Th1 ефекторски фенотип (249, 250).

Сходно литературним подацима, суплементација LGW-ом ефикасно супримира и секрецију TNF- α , цитокина који остварује снажан синергистички ефекат са IFN- γ у провокацији интензивног оксидативног стреса унутар Купферових ћелија (160, 251). Овај патофизиолошки процес иницира акутну дестабилизацију метаболичког и структурног интегритета хепатоцита, што примена LGW-а успешно атенуира, одржавајући виталност ткива јетре (251).

Посебно треба поменути IL-17, ефекторски цитокин Th17 ћелија, чија је проинфламацијска улога у акутним лезијама јетре све више препозната (252, 253). IL-17 делује као потентан хемоатрактант за неутрофилне гранулоците, који екстрацелуларним ослобађањем лизозомалних ензима и реактивних врста кисеоника индукују значајну колатералну деструкцију екстрацелуларног матрикса и паренхима (254, 255). Редукција вредности IL-17 у групи третираној LGW-ом (Графикон 4, 6) имплицира да ова суплементација ефикасно инхибира Th17 диференцијацију, могуће и путем супресије IL-6 сигнализације (256-258). Овакав свеобухватан утицај на профил цитокина указује на значајан имуномодулаторни потенцијал LGW-а, који фаворизује успостављање антиинфламацијске хомеостазе и усмерава имунски одговор ка протективном фенотипу (259).

Насупрот супресији деструктивних ефекторских цитокина, забележени пораст интерлеукина-10 представља кључни репараторни механизам индукован суплементацијом LGW-ом (260). IL-10, као прототип антиинфламацијског цитокина,

поседује способност директне инхибиције продукције TNF- α и IL-12, чиме се ефикасно блокира инфламацијска каскада (261, 262). Повећана концентрација IL-10 у ткиву јетре (Графикон 4) сугерише да LGW фаворизује експанзију регулаторних Т ћелија или стимулише дендритске ћелије на секрецију овог протективног молекула (263-265). Компаративна анализа односа IFN- γ и IL-10 указује да LGW изразито фаворизује протективни профил (266-268).

Чињеница да је хепатопротективни ефекат LGW-а потврђен код два различита соја мишева (BALB/с и C57BL/6), који имају различите генотипове и разликују се по свом примарном имунском одговору (Th2 наспрам Th1 доминације), додатно наглашава конзистентност добијених резултата (269, 270), што представља снажан аргумент за потенцијалну транслацију ових налаза у клиничку праксу у генетски разноликој хуманој популацији.

Молекулска основа овог протективног дејства вероватно почива на специфичном аминокиселинском профилу козје сурутке који омогућава појачану подршку унутарћелијској редокс хомеостазу лимфоцита (271-273). Ово је критично за одржавање њихове функционалне равнотеже и превенцију транзиције у хиперактивно стање (274, 275). Додатно, лактоферин присутан у LGW-у може остварити директну интеракцију са специфичним рецепторима на површини Т ћелија, потенцијално инхибирајући њихову способност адхезије за синусоидални ендотел (276-278).

Оваква спрега између биохемијске модулације и структурног очувања паренхима дефинише суштину терапијског потенцијала лиофилизоване козје сурутке. Препознати ефекти позиционирају LGW изван оквира конвенционалног нутритивног суплемента, дефинишући га као функционални препарат у модулацији Т ћелијски посредованих инфламацијских обољења јетре (279, 280).

5.3. Модулација DC–Treg осовине под дејством LGW-а као механизам активне имунске толеранције

Разумевање механизма којим лиофилизована козја сурутка остварује хепатопротективну улогу захтева разликовање просте инхибиције инфламације од процеса активне имуномодулације. Наши резултати указују на то да LGW не делује само као пасивни цитопротективни агенс, већ као динамички модулатор имунске толеранције, примарно путем модулације DC–Tregs осовине у паренхиму јетре (281, 282).

Дендритске ћелије јетре поседују јединствен функционални капацитет за одржавање толеранције на нутритивне антигене (69). У условима интензивног стреса као што је случај инјекције конканавалина А, дендритске ћелије јетре најчешће подлежу матурацији и диференцијацији у проинфламацијски фенотип (283, 284). Налази наше студије показују да петодневна суплементација LGW-ом припрема јетру тако што фаворизује опстанак толерогених DC (Графикон 11, Слика 5), чиме се практично подиже праг за активацију деструктивних имунских механизма (285). Проточна цитометрија моноклеарних ћелија изолованих из јетре открила је да LGW индукује статистички значајан пораст удела CD206⁺ дендритских ћелија у поређењу са нетретираним животињама. Овај пораст није само квантитативан, већ и функционалан, јер CD206⁺ DC поседују смањен капацитет за активацију Т лимфоцита чак и у присуству проинфламацијских цитокина (286, 287), што их чини идеалним кандидатима за сузбијање ConA индукованог хепатитиса. За разлику од инфламацијских DC које доминантно експримирају CD86 и које подстичу Th1 и Th17 одговоре (288, 289), ове толерогене ћелије имају способност да супримирају диференцијацију наивних Т лимфоцита у инфламацијски помагачки фенотип. Оваква припрема ћелија имунског система јетре омогућава да се након примене ConA избегне масивна секреција

проинфламацијских медијатора која је иначе карактеристична за овај модел и која узрокује масивно оштећење паренхима (160).

Повећање процентуалног удела CD206⁺ дендритских ћелија у паренхиму јетре животиња третираних LGW-ом представља директан доказ имуномодулаторног дејства сурутке. CD206 (манозни рецептор) је функционални молекул укључен у ендоцитозу и антиинфламацијску сигнализацију (290, 291). Висока експресија CD206 на дендритским ћелијама јетре превазилази улогу пасивног маркера толерогености, сугерише функционално јачање 'scavenger' капацитета ткива за брзу елиминацију проинфламацијског дебрија, чиме се активно лимитира пропација некротичног оштећења унутар паренхима (292, 293). Ове алтернативно активирани дендритске ћелије карактеришу се смањеном експресијом костимулаторних молекула, CD86, што их чини неефикасним у покретању деструктивног Th1 и Th17 одговора (294, 295). Насупрот томе, ове ћелије постају примарни извор интерлеукина-10 (IL-10), што је и показано у нашој студији, чиме директно модулишу диференцијацију наивних Т лимфоцита са којима ступају у интеракцију (296).

Директна последица доминације CD206⁺ дендритских ћелија у јетри јесте индукција и експанзија регулаторних Т лимфоцита, такође у ткиву јетре (297). Наши подаци показују да је суплементација сурутком значајно повећала проценат толерогених дендритских ћелија, што је праћено већом учесталосту Treg (Графикон 9, Слика 3) у инфламацијским инфилтратима јетре. Процес индукције Treg *in vivo* вероватно је последица синергије специфичних пептида из сурутке, који делују као лиганди за рецепторе на дендритским ћелијама и високе концентрације аминокиселина које оптимизују метаболизам ових ћелија (298, 299). Могуће је да се хепатопротективни ефекат LGW остварује путем модулације осовине црева-јетра (300, 301). Специфични биоактивни састав козје сурутке може допринети очувању интегритета цревне баријере и промени метаболичког профила микробиоте, што резултује смањеним приливом проинфламацијских сигнала у портну циркулацију (214, 302). Овакав микроамбијент погодује диференцијацији толерогених дендритских ћелија (CD206⁺) и последичној експанзији Treg популације у јетри, чиме се супримира CopA индукована имунска деструкција. Регулаторни Т лимфоцити, дефинисани експресијом транскрипционог фактора Foxp3 (303, 304), играју кључну улогу у заштити јетре од аутоимунског и токсичног стимулуса (51, 305). Путем комплексних механизма, који укључују директну инхибицију ефекторских Т лимфоцита и модулацију локалног цитокиног миљеа, ове ћелије активно сузбијају патолошки имунски одговор и фаворизују успостављање ткивне хомеостазе (306). Резултати ове студије сугеришу да LGW делује као модулатор који усмерава диференцијацију Т лимфоцита ка регулаторном, а не ка деструктивном фенотипу. Ово је посебно важно јер се тежина оштећења јетре у CopA моделу директно мери балансом између ефекторских и регулаторних елемената (307).

Кључни медијатор у овој заштитној каскади је интерлеукин-10 (IL-10), цитокин чије смо повећане вредности јасно детектовали код мишева третираних LGW-ом, а који у дендритским ћелијама генерише аутоамплификациони круг толеранције (281, 308). Резултати ове студије показују да LGW специфично индукује пораст популације IL-10⁺ дендритских ћелија у јетри. Када DC почну да продукују IL-10, индукују снажно антиинфламацијско окружење које директно инхибира секрецију TNF- α и IFN- γ у макрофагима и Т лимфоцитима (135, 261). IL-10⁺ дендритске ћелије делују као својеврсни појачивачи толеранције спречавајући активацију других дендритских ћелија чак и у присуству CopA стимулуса, а IL-10 који продукују додатно подстиче супресорски капацитет присутних Treg, стварајући самоодрживи циклус заштите (136, 309, 310). Овакво померање имунског баланса ка толерогеним механизмима директно доприноси значајном смањењу хистопатолошких оштећења јетре код мишева који су примали LGW.

Даље, хистопатолошка анализа паренхима јетре дала је визуелну потврду описаних имунских догађаја. Код животиња које су примале LGW, уочено је драстично смањење некротичних поља и очување нормалне структуре лобулуса, упркос снажном цитотоксичком стимулусу који изазива ConA. Ово очување ткива је директна последица супресије инфламацијског инфилтрата, посредоване CD206⁺ DC и регулаторним Т ћелијама (305, 311). Без ових регулаторних елемената, јетра мишева брзо улази у стање фулминантне некрозе (305), што је и потврђено у контролној групи. Улога CD206⁺ рецептора овде није само у сигнализацији, већ и у чишћењу остатака ћелијског дебрија, што спречава продужену активацију имунског система и омогућава бржу регенерацију паренхима (292, 312).

Биоактивне компоненте лиофилизоване козје сурутке, првенствено лактоферин и специфични пептиди, делују као кључни покретачи ове толерогене реакције (189). Лактоферин је познат као модулатор функционалног статуса дендритских ћелија, спречавајући њихову превремену матурацију и фаворизујући толерогени фенотип који је и потврђен у овој студији (189, 313). Осим тога, висок садржај аминокиселина разгранатог ланца (BCAA) у сурутци обезбеђује неопходну метаболичку подршку за опстанак Treg у условима оксидативног стреса (314).

Важно је напоменути да компоненте LGW не изазивају пасивну имуносупресију, већ активну имуномодулацију, што значи да системска отпорност организма остаје очувана док се локално у јетри успоставља толеранција (189, 315). Налаз пораста IL-10⁺ DC у јетри иде у прилог овој теорији, што сугерише да сурутка „учи“ имунски систем јетре како да контролише сопствену реакцију (296). Без успостављања осовине толерогена DC, Т регулаторна ћелија, немогуће је постићи овако висок степен заштите у моделу који је толико деструктиван као што је ConA хепатитис.

Биоактивни молекули сурутке, првенствено α-лакталбумини, у литератури се наводе као потенцијални модулатори кључних метаболичких путева, попут mTOR каскаде, што је критично за усмеравање дендритских ћелија ка толерогеном статусу (316). Иако у нашој студији нисмо директно пратили ове сигналне путеве, забележена експанзија CD206⁺ дендритских ћелија сугерише да је примена LGW-а индуковала сличну модулацију имунског одговора. Консеквентно, овакав имунски профил би могао да објасни изразиту редукцију вредности IFN-γ коју смо детектовали, вероватно путем супресије IL-12 сигнализације која је карактеристична за овај тип ћелија. Такође, значајно већа учесталост Treg у паренхиму јетре у LGW групи мишева указује на фаворизовање регулаторног микроокружења, што се често повезује са специфичним изменама у локалном хемокинском профилу (317, 318).

Клиничке импликације ових налаза су далекосежне. Могућност да се нутритивном модулацијом путем LGW-а успешно усмери имунски одговор ка толерогеном, отвара значајну перспективу за његову примену у терапији хроничних инфламацијских болести јетре које карактерише губитак имунске толеранције. Овакав имуномодулаторни потенцијал позиционира лиофилизовану козју сурутку као савремени функционални препарат са прецизно дефинисаним молекулским метама унутар имунског система јетре.

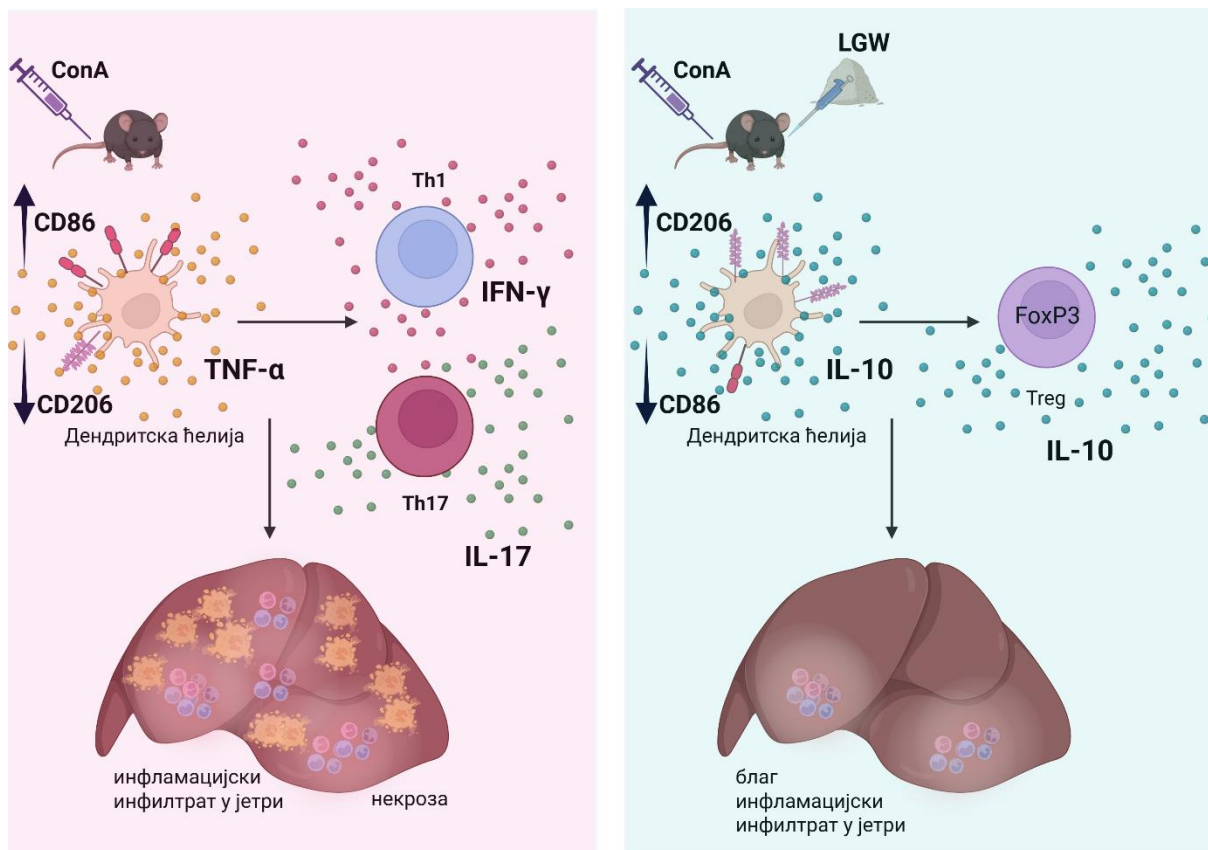


Схема 3. Хепатопротективни ефекат лиофилизоване козје сурутке у моделу ConA хепатитиса (креирано у *BioRender-y*)

6. ЗАКЉУЧАК

Лиофилизована козја сурутка испољава значајан имуномодулаторни потенцијал, делујући као активни чинилац у развоју толерогене микросредине јетре. Ова студија осветљава механизам те заштите, који се заснива на фаворизовању толерогеног фенотипа дендритских ћелија јетре и на експанзији регулаторних Т лимфоцита, чиме се подстиче успостављање специфичне имунске толеранције. Стимулацијом ових толерогених популација LGW успешно превенира имунски посредовано оштећење јетре. Сходно томе, LGW представља перспективно средство за нутритивну превенцију и помоћну терапију инфламацијских обољења јетре.

Закључак проистиче из следећих резултата:

1. Орална суплементација лиофилизованом козјом сурутком испољава јасан дозно-зависни хепатопротективни ефекат, при чему доза од 1 g/kg телесне масе представља оптимални ниво за максималну заштиту паренхима јетре.
2. Превентивна примена LGW-а скоро потпуно супримира екстремни пораст серумских активности трансминаза (AST и ALT) индукован конканавалином А, ефикасно штитећи метаболичку функцију хепатоцита.
3. Суплементација LGW-ом драматично редукује површину некротичних поља и степен инфламацијске инфилтрације, спречавајући деструкцију радијалне архитектуре лобулуса јетре.
4. LGW остварује снажан антиинфламацијски ефекат кроз статистички значајну редукцију концентрација кључних ефекторских цитокина, IFN- γ , TNF- α и IL-17 у ткиву јетре.
5. Третман сурутком значајно повећава концентрацију интерлеукина-10 у ткиву јетре и фаворизује експанзију IL-10⁺ Т лимфоцита, успостављајући супресорско микроокружење.
6. LGW промовише толерогени фенотип дендритских ћелија јетре, што се огледа кроз повишену експресију CD206 маркера и смањен капацитет за матурацију ка проинфламацијском профилу.
7. Толерогене дендритске ћелије индуковане суплементацијом LGW-ом карактерише појачана интрацелуларна експресија IL-10, чиме се поставља основа за супресију ефекторских имунских механизма у јетри.
8. Промене у фенотипу дендритских ћелија праћене су значајном експанзијом регулаторних Т лимфоцита у инфламацијском инфилтрату јетре, чиме се имунски баланс помера са деструктивног ка протективном модусу.
9. Способност LGW-а да модулише базални имунски статус пре апликације имуностимулатора сугерише механизам активног пре-кондиционирања, првенствено кроз стварање антиинфламацијске средине, која подиже праг за активацију имунских механизма одговорних за оштећење јетре.
10. Потврђена ефикасност LGW-а код различитих сојева мишева (BALB/с и C57BL/6) указује на деловање препарата на универзалне имунорегулаторне путеве, независно од генске предиспозиције, ка одређеном типу имунског одговора.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

Скраћеница	Пун назив на енглеском језику
AIH	Autoimmune hepatitis
ALT	Alanine aminotransferase
ANA	Antinuclear antibodies
APC	Antigen-presenting cells
AST	Aspartate aminotransferase
CD3	Cluster of differentiation 3 (T-cell co-receptor)
CD4+	T helper cells
CD8+	Cytotoxic T lymphocytes
CD95	Fas receptor
CD178	Fas-ligand
CD206⁺	Mannose receptor / Tolerogenic marker
ConA	Concanavalin A
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CYP2D6	Cytochrome P450 2D6
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DC	Dendritic cells
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
F-actin	Filamentous actin
FasL	Fas-ligand
Foxp3	Forkhead box P3 (Treg transcription factor)
FTCD	Formiminotransferase cyclodeaminase
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSC	Hepatic Stellate Cells
HCV	Hepatitis C virus
HSV-1	Herpes simplex virus type 1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Immunoglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-17	Interleukin 17
IL-18	Interleukin 18
LC1	Anti-liver cytosol type 1
LGW	Lyophilized Goat Whey
LKM-1	Anti-liver-kidney microsomal type 1
LPS	Lipopolysaccharide
LSEC	Liver Sinusoidal Endothelial Cells
MAMP	Microbe-Associated Molecular Patterns
MCFA	Medium-chain fatty acids
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

SCFA	Short-chain fatty acids
SLA/LP	Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas
SMA	Anti-smooth muscle antibodies
tBid	Truncated Bid (BH3-interacting domain death agonist)
TCR	T-cell receptor
TGF-β	Transforming growth factor beta
Th1	T helper cells type 1
Th17	T helper cells type 17
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
Treg	Regulatory T cells
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Manns MP, Lohse AW, Vergani D. Autoimmune hepatitis--Update 2015. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S100-S111. doi:10.1016/j.jhep.2015.03.005
2. Mieli-Vergani G, Vergani D, Baumann U, et al. Diagnosis and management of pediatric autoimmune liver disease: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66(2):345-360. doi:10.1097/MPG.0000000000001801
3. Liberal R, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25(6):653-664. doi:10.1016/j.bpg.2011.09.009
4. Lohse AW, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2011;55(1):171-182. doi:10.1016/j.jhep.2010.12.012
5. Hahn JW, Yang HR, Moon JS, et al. Global incidence and prevalence of autoimmune hepatitis, 1970-2022: a systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine.* 2023;65:102280. doi:10.1016/j.eclinm.2023.102280
6. Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Regulatory T cells in autoimmune hepatitis: an updated overview. *J Autoimmun.* 2021;119:102619. doi:10.1016/j.jaut.2021.102619
7. Czaja AJ. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis: current status and future directions. *Gut Liver.* 2016;10(2):177-203. doi:10.5009/gnl15352
8. Sebode M, Hartl J, Vergani D, Lohse AW; International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG). Autoimmune hepatitis: From current knowledge and clinical practice to future research agenda. *Liver Int.* 2018;38(1):15-22. doi:10.1111/liv.13458
9. Mieli-Vergani G, Vergani D, Czaja AJ, et al. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4:18017. doi:10.1038/nrdp.2018.17
10. Benjamins D, Sunshine P. Active chronic hepatitis in infancy: possible presence of the disease in siblings. *J Pediatr.* 1969;75(2):294-298. doi:10.1016/s0022-3476(69)80401-4
11. Wheeler C, Scholefield J, Hurrell T, Naidoo J. Autoimmune hepatitis: a review of molecular mechanisms and research gaps in African populations. *Biology (Basel).* 2026;15(5):400. doi:10.3390/biology15050400
12. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis. *Cell Mol Immunol.* 2022;19(2):158-176. doi:10.1038/s41423-021-00768-8
13. Katsumi T, Ueno Y. Epidemiology and surveillance of autoimmune hepatitis in Asia. *Liver Int.* 2022;42(9):2015-2022. doi:10.1111/liv.15155
14. Zachou K, Arvaniti P, Lyberopoulou A, Dalekos GN. Impact of genetic and environmental factors on autoimmune hepatitis. *J Transl Autoimmun.* 2021;4:100125. doi:10.1016/j.jtauto.2021.100125
15. Lammert C, Chalasani SN, Atkinson EJ, McCauley BM, Lazaridis KN. Environmental risk factors are associated with autoimmune hepatitis. *Liver Int.* 2021;41(10):2396-2403. doi:10.1111/liv.14944
16. Michel M, Spinelli F, Grambihler A, et al. Health-related quality of life in patients with autoimmune hepatitis. *Qual Life Res.* 2021;30(10):2853-2861. doi:10.1007/s11136-021-02857-4
17. Lee DU, Schuster K, Bahadur A, et al. Trends of costs and admission rates among patients admitted with autoimmune hepatitis: analysis of US hospitals using the NIS database. *J Clin Exp Hepatol.* 2024;14(1):101279. doi:10.1016/j.jceh.2023.08.015

18. Martín Barraza JI, Bars-Cortina D. Dietary pattern's role in hepatic epigenetic and dietary recommendations for the prevention of NAFLD. *Nutrients*. 2024;16(17):2956. doi:10.3390/nu16172956
19. Schramm C, Weiler-Normann C, Wiegand C, et al. Treatment response in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2010;52(6):2247-2248. doi:10.1002/hep.23840
20. Ngu JH, Bechly K, Chapman BA, et al. Population-based epidemiology study of autoimmune hepatitis: a disease of older women?. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(10):1681-1686. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06384.x
21. Al-Chalabi T, Portmann BC, Bernal W, McFarlane IG, Heneghan MA. Autoimmune hepatitis overlap syndromes: an evaluation of treatment response, long-term outcome and survival. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(2):209-220. doi:10.1111/j.1365-2036.2008.03722.x
22. Grønbaek L, Otete H, Ban L, et al. Incidence, prevalence and mortality of autoimmune hepatitis in England 1997-2015: a population-based cohort study. *Liver Int*. 2020;40(7):1634-1644. doi:10.1111/liv.14480
23. Newton JL, Burt AD, Park JB, Mathew J, Bassendine MF, James OF. Autoimmune hepatitis in older patients. *Age Ageing*. 1997;26(6):441-444. doi:10.1093/ageing/26.6.441
24. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2015;63(4):971-1004. doi:10.1016/j.jhep.2015.06.030
25. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*. 2007;120(4):435-446. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02555.x
26. Mercado LA, Gil-Lopez F, Chirila RM, Harnois DM. Autoimmune hepatitis: a diagnostic and therapeutic overview. *Diagnostics (Basel)*. 2024;14(4):382. doi:10.3390/diagnostics14040382
27. Costaguta A, Costaguta G, Álvarez F. Autoimmune hepatitis: towards a personalized treatment. *World J Hepatol*. 2024;16(11):1225-1242. doi:10.4254/wjh.v16.i11.1225
28. Ayata G, Gordon FD, Lewis WD, et al. Liver transplantation for autoimmune hepatitis: a long-term pathologic study. *Hepatology*. 2000;32(2):185-192. doi:10.1053/jhep.2000.9077
29. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med*. 2006;354(1):54-66. doi:10.1056/NEJMra050408
30. de Boer YS, van Gerven NM, Zwiers A, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1. *Gastroenterology*. 2014;147(2):443-452.e5. doi:10.1053/j.gastro.2014.04.022
31. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(6):320-329. doi:10.1038/nrgastro.2011.69
32. Tunio NA, Mansoor E, Sheriff MZ, Cooper GS, Sclair SN, Cohen SM. Epidemiology of autoimmune hepatitis (AIH) in the United States between 2014 and 2019: a population-based national study. *J Clin Gastroenterol*. 2021;55(10):903-910. doi:10.1097/MCG.0000000000001460
33. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1999;31(5):929-938. doi:10.1016/s0168-8278(99)80297-9
34. Vitozzi S, Djilali-Saiah I, Lapierre P, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Autoimmunity*. 2002;35(8):485-492. doi:10.1080/0891693021000056712

35. Liu H, Wang Y, Wang P, et al. Clinical significance of serum antinuclear antibodies in patients with autoimmune hepatitis and comorbidity. *Clin Exp Med*. 2023;23(7):3453-3463. doi:10.1007/s10238-023-01094-1
36. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Bianchi FB. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 1996;24(5):1068-1073. doi:10.1002/hep.510240515
37. Heneghan MA, Lohse AW. Update in clinical science: autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2025;82(5):926-937. doi:10.1016/j.jhep.2024.12.041
38. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008;48(1):169-176. doi:10.1002/hep.22322
39. Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, et al. Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology*. 1972;63(5):820-833.
40. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1993;105(5):1502-1507. doi:10.1016/0016-5085(93)90157-8
41. Maggiore G, Bernard O, Mosca A, Ballot E, Johanet C, Jacquemin E. Long-term outcomes of patients with type 1 or 2 autoimmune hepatitis presenting in childhood. *J Hepatol*. 2023;78(5):979-988. doi:10.1016/j.jhep.2023.01.013
42. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology*. 1988;8(6):1662-1666. doi:10.1002/hep.1840080632
43. Manns MP, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1. *J Clin Invest*. 1989;83(3):1066-1072. doi:10.1172/JCI113949
44. Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1999;116(3):643-649. doi:10.1016/s0016-5085(99)70186-1
45. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis in children. *Clin Liver Dis*. 2002;6(3):623-634. doi:10.1016/s1089-3261(02)00020-x
46. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology*. 1997;25(3):541-547. doi:10.1002/hep.510250308
47. Chascsa DM, Ferré EMN, Hadjiyannis Y, et al. APECED-associated hepatitis: clinical, biochemical, histological and treatment data from a large, predominantly American cohort. *Hepatology*. 2021;73(3):1088-1104. doi:10.1002/hep.31421
48. Djilali-Saiah I, Fakhfakh A, Louafi H, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. HLA class II influences humoral autoimmunity in patients with type 2 autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 2006;45(6):844-850. doi:10.1016/j.jhep.2006.07.034
49. Saadah OI, Smith AL, Hardikar W. Long-term outcome of autoimmune hepatitis in children. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16(11):1297-1302. doi:10.1046/j.1440-1746.2001.02615.x
50. Jeffery HC, Jeffery LE, Lutz P, et al. Low-dose interleukin-2 promotes STAT-5 phosphorylation, Treg survival and CTLA-4-dependent function in autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol*. 2017;188(3):394-411. doi:10.1111/cei.12940
51. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol*. 2004;41(1):31-37. doi:10.1016/j.jhep.2004.03.008

52. Sirbe C, Simu G, Szabo I, Grama A, Pop TL. Pathogenesis of autoimmune hepatitis—cellular and molecular mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13578. doi:10.3390/ijms222413578
53. Bogdanos DP, Choudhuri K, Vergani D. Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences. *Liver.* 2001;21(4):225-232. doi:10.1034/j.1600-0676.2001.021004225.x
54. Doherty DG, Donaldson PT, Underhill JA, et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 1994;19(3):609-615. doi:10.1002/hep.1840190311
55. Baharlou R, Faghihi-Kashani A, Faraji F, et al. HLA-DRB1 alleles of susceptibility and protection in Iranians with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol.* 2016;77(4):330-335. doi:10.1016/j.humimm.2016.01.007
56. Strettell MD, Donaldson PT, Thomson LJ, et al. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 1997;112(6):2028-2035. doi:10.1053/gast.1997.v112.pm9178696
57. Lim YS, Oh HB, Choi SE, et al. Susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis is associated with shared amino acid sequences at positions 70-74 of the HLA-DRB1 molecule. *J Hepatol.* 2008;48(1):133-139. doi:10.1016/j.jhep.2007.08.019
58. van Gerven NM, de Boer YS, Zwiers A, et al. HLA-DRB1*03:01 and HLA-DRB1*04:01 modify the presentation and outcome in autoimmune hepatitis type-1. *Genes Immun.* 2015;16(4):247-252. doi:10.1038/gene.2014.82
59. Elfaramawy AA, Elhossiny RM, Abbas AA, Aziz HM. HLA-DRB1 as a risk factor in children with autoimmune hepatitis and its relation to hepatitis A infection. *Ital J Pediatr.* 2010;36:73. doi:10.1186/1824-7288-36-73
60. Czaja AJ. Incorporating the molecular mimicry of environmental antigens into the causality of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2023;68(7):2824-2842. doi:10.1007/s10620-023-07967-5
61. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest.* 1991;88(4):1370-1378. doi:10.1172/JCI115443
62. Marceau G, Lapierre P, Béland K, Soudeyns H, Alvarez F. LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry?. *Hepatology.* 2005;42(3):675-682. doi:10.1002/hep.20816
63. Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, et al. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol.* 2003;170(3):1481-1489. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1481
64. Peiseler M, Sebode M, Franke B, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol.* 2012;57(1):125-132. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.029
65. Abe M, Hiasa Y, Onji M. T helper 17 cells in autoimmune liver diseases. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:607073. doi:10.1155/2013/607073
66. Liu Y, Yan W, Yuan W, et al. Treg/Th17 imbalance is associated with poor autoimmune hepatitis prognosis. *Clin Immunol.* 2019;198:79-88. doi:10.1016/j.clim.2018.11.003
67. Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology.* 2012;143(3):765-776.e3. doi:10.1053/j.gastro.2012.05.049
68. Fabre T, Kared H, Friedman SL, Shoukry NH. IL-17A enhances the expression of profibrotic genes through upregulation of the TGF- β receptor on hepatic stellate cells in

- a JNK-dependent manner. *J Immunol.* 2014;193(8):3925-3933. doi:10.4049/jimmunol.1400861
69. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:147-163. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132629
 70. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev.* 2000;174:21-34. doi:10.1034/j.1600-0528.2002.017408.x
 71. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(2):88-110. doi:10.1038/nrgastro.2015.200
 72. Limmer A, Ohl J, Kurts C, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med.* 2000;6(12):1348-1354. doi:10.1038/82161
 73. Doherty DG. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: a comprehensive review. *J Autoimmun.* 2016;66:60-75. doi:10.1016/j.jaut.2015.08.020
 74. Fleming M, Sanchez-Fueyo A, Safinia N. Regulatory T cell therapy in autoimmune liver disease and transplantation. *JHEP Rep.* 2025;7(8):101394. doi:10.1016/j.jhepr.2025.101394
 75. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol.* 1995;19(12):1409-1417. doi:10.1097/00000478-199512000-00007
 76. Covelli C, Sacchi D, Sarcognato S, et al. Pathology of autoimmune hepatitis. *Pathologica.* 2021;113(3):185-193. doi:10.32074/1591-951X-241
 77. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol.* 2003;38(suppl 1):S38-S53. doi:10.1016/s0168-8278(02)00429-4
 78. Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, et al. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology.* 2006;44(5):1182-1190. doi:10.1002/hep.21378
 79. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol.* 2002;1(1):1. doi:10.1186/1476-5926-1-1
 80. Knolle PA, Gerken G, Loser E, et al. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology.* 1996;24(4):824-829. doi:10.1002/hep.510240413
 81. Knolle PA, Schmitt E, Jin S, et al. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology.* 1999;116(6):1428-1440. doi:10.1016/s0016-5085(99)70511-1
 82. Bonder CS, Norman MU, Swain MG, et al. Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity.* 2005;23(2):153-163. doi:10.1016/j.immuni.2005.06.007
 83. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, et al. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:375-396. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.375
 84. Eksteen B, Afford SC, Wigmore SJ, Holt AP, Adams DH. Immune-mediated liver injury. *Semin Liver Dis.* 2007;27(4):351-366. doi:10.1055/s-2007-991512
 85. Lohse AW. Experimental models of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis.* 1991;11(3):241-247. doi:10.1055/s-2008-1040442
 86. Bovensiepen CS, Schakat M, Sebode M, et al. TNF-producing Th1 cells are selectively expanded in liver infiltrates of patients with autoimmune hepatitis. *J Immunol.* 2019;203(12):3148-3156. doi:10.4049/jimmunol.1900124
 87. Zhao L, Tang Y, You Z, et al. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One.* 2011;6(4):e18909. doi:10.1371/journal.pone.0018909

88. Wang H, Feng X, Yan W, Tian D. Regulatory T cells in autoimmune hepatitis: unveiling their roles in mouse models and patients. *Front Immunol.* 2020;11:575572. doi:10.3389/fimmu.2020.575572
89. Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science.* 1996;272(5270):1947-1950. doi:10.1126/science.272.5270.1947
90. Robinson D, Shibuya K, Mui A, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity.* 1997;7(4):571-581. doi:10.1016/s1074-7613(00)80378-7
91. Li L, Li X, Zhang F. The pivotal role of cytokines in liver disease pathogenesis and therapeutic potential. *Front Immunol.* 2025;16:1694582. doi:10.3389/fimmu.2025.1694582
92. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med.* 1995;182(5):1223-1230. doi:10.1084/jem.182.5.1223
93. Mundt B, Kühnel F, Zender L, et al. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J.* 2003;17(1):94-96. doi:10.1096/fj.02-0537fje
94. Guy CS, Wang J, Michalak TI. Hepatocytes as cytotoxic effector cells can induce cell death by CD95 ligand-mediated pathway. *Hepatology.* 2006;43(6):1231-1240. doi:10.1002/hep.21201
95. Ni X, Hazarika P, Zhang C, Talpur R, Duvic M. Fas ligand expression by neoplastic T lymphocytes mediates elimination of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in mycosis fungoides: a potential mechanism of tumor immune escape?. *Clin Cancer Res.* 2001;7(9):2682-2692.
96. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995;14(22):5579-5588. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x
97. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17(6):1675-1687. doi:10.1093/emboj/17.6.1675
98. Yin XM, Wang K, Gross A, et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature.* 1999;400(6747):886-891. doi:10.1038/23730
99. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-730. doi:10.1126/science.1059108
100. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(5):405-413. doi:10.1038/nrm2153
101. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-489. doi:10.1016/s0092-8674(00)80434-1
102. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7320-7326. doi:10.1074/jbc.M008363200
103. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391(6662):43-50. doi:10.1038/34112
104. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol.* 1971;105(1):13-20. doi:10.1002/path.1711050103

105. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(4):279-289. doi:10.1038/nri2215
106. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418(6894):191-195. doi:10.1038/nature00858
107. Kamijo A, Yoshizawa K, Joshita S, et al. Cytokine profiles affecting the pathogenesis of autoimmune hepatitis in Japanese patients. *Hepatol Res.* 2011;41(4):350-357. doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00773.x
108. Herkel J, Jagemann B, Wiegand C, et al. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology.* 2003;37(5):1079-1085. doi:10.1053/jhep.2003.50191
109. Sugimura T, Obermayer-Straub P, Kayser A, et al. A major CYP2D6 autoepitope in autoimmune hepatitis type 2 and chronic hepatitis C is a three-dimensional structure homologous to other cytochrome P450 autoantigens. *Autoimmunity.* 2002;35(8):501-513. doi:10.1080/0891693021000056721
110. Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Adaptive immunity in autoimmune hepatitis. *Dig Dis.* 2010;28(1):63-69. doi:10.1159/000282066
111. Sauty A, Dziejman M, Taha RA, et al. The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 1999;162(6):3549-3558.
112. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2008;48(5):1440-1450. doi:10.1002/hep.22500
113. Oudar O, Moreau A, Feldmann G, Scoazec JY. Expression and regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in organotypic cultures of rat liver tissue. *J Hepatol.* 1998;29(6):901-909. doi:10.1016/s0168-8278(98)80117-7
114. Slifka MK, Whitton JL. Antigen-specific regulation of T cell-mediated cytokine production. *Immunity.* 2000;12(5):451-457. doi:10.1016/s1074-7613(00)80197-1
115. Vachliotis ID, Polyzos SA. The role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Obes Rep.* 2023;12(3):191-206. doi:10.1007/s13679-023-00519-y
116. Li S, Huang X, Zhong H, et al. Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) genetic polymorphisms and the risk of autoimmune liver disease: a meta-analysis. *J Genet.* 2013;92(3):617-628. doi:10.1007/s12041-013-0282-5
117. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med.* 2004;8(4):445-454. doi:10.1111/j.1582-4934.2004.tb00469.x
118. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003;114(2):181-190. doi:10.1016/s0092-8674(03)00521-x
119. Tilg H. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis.* 2010;28(1):179-185. doi:10.1159/000282083
120. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, et al. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions: evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem.* 1992;267(8):5317-5323.
121. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2000;21(3):49-98. doi:10.1016/s0098-2997(00)00004-2

122. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1641-1654. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.002
123. Shuh M, Bohorquez H, Loss GE Jr, Cohen AJ. Tumor necrosis factor- α : life and death of hepatocytes during liver ischemia/reperfusion injury. *Ochsner J*. 2013;13(1):119-130.
124. Steinhoff G, Behrend M, Wonigeit K. Expression of adhesion molecules on lymphocytes/monocytes and hepatocytes in human liver grafts. *Hum Immunol*. 1990;28(2):123-127. doi:10.1016/0198-8859(90)90008-d
125. Roberts RA, Ganey PE, Ju C, et al. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 2007;96(1):2-15. doi:10.1093/toxsci/kfl173
126. Dragon S, Rahman MS, Yang J, et al. IL-17 enhances IL-1 β -mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(4):L1023-L1029. doi:10.1152/ajplung.00306.2006
127. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, et al. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*. 2009;32(1):43-51. doi:10.1016/j.jaut.2008.11.001
128. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*. 2008;181(6):4089-4097. doi:10.4049/jimmunol.181.6.4089
129. Fabre T, Molina MF, Soucy G, et al. Type 3 cytokines IL-17A and IL-22 drive TGF- β -dependent liver fibrosis. *Sci Immunol*. 2018;3(28):eaar7754. doi:10.1126/sciimmunol.aar7754
130. Griffin GK, Newton G, Tarrio ML, et al. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol*. 2012;188(12):6287-6299. doi:10.4049/jimmunol.1200385
131. Yan S, Wang L, Liu N, et al. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunol Cell Biol*. 2012;90(4):421-428. doi:10.1038/icb.2011.59
132. Taubert R, Hardtke-Wolenski M, Noyan F, et al. Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. *J Hepatol*. 2014;61(5):1106-1114. doi:10.1016/j.jhep.2014.05.034
133. Jiang Y, Wang X, Dong C. Molecular mechanisms of T helper 17 cell differentiation: emerging roles for transcription cofactors. *Adv Immunol*. 2019;144:121-153. doi:10.1016/bs.ai.2019.09.003
134. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009;10(9):1000-1007. doi:10.1038/ni.1774
135. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
136. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*. 2007;8(9):931-941. doi:10.1038/ni1504
137. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787-795. doi:10.1172/JCI59643
138. Mittal SK, Roche PA. Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr Opin Immunol*. 2015;34:22-27. doi:10.1016/j.coi.2014.12.009
139. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Huppé G, et al. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur J Immunol*. 2008;38(5):1225-1230. doi:10.1002/eji.200737902

140. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(1):23-63. doi:10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30
141. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1191-1197. doi:10.1038/ni1276
142. 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. doi:10.1172/JCI115836
143. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Tacke F. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim.* 2015;49(1 suppl):12-20. doi:10.1177/0023677215572841
144. Tiegs G. Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury. *Z Gastroenterol.* 2007;45(1):63-70. doi:10.1055/s-2006-927397
145. Hao J, Sun W, Xu H. Pathogenesis of concanavalin A induced autoimmune hepatitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2022;102:108411. doi:10.1016/j.intimp.2021.108411
146. Sumner JB, Howell SF. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. *J Bacteriol.* 1936;32(2):227-237. doi:10.1128/jb.32.2.227-237.1936
147. Hardman KD, Ainsworth CF. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry.* 1972;11(26):4910-4919. doi:10.1021/bi00776a006
148. Goldstein IJ. Studies on the combining sites of concanavalin A. *Adv Exp Med Biol.* 1975;55:35-53. doi:10.1007/978-1-4684-0949-9_3
149. Palacios R. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol.* 1982;128(1):337-342.
150. Chilson OP, Kelly-Chilson AE. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1989;19(2):389-396. doi:10.1002/eji.1830190225
151. Weiss A, Imboden J, Hardy K, et al. The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annu Rev Immunol.* 1986;4:593-619. doi:10.1146/annurev.iy.04.040186.003113
152. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003;17(18):2205-2232. doi:10.1101/gad.1102703
153. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008;132(3):344-362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020
154. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science.* 1988;240(4856):1169-1176. doi:10.1126/science.3131876
155. Kato M, Ikeda N, Matsushita E, Kaneko S, Kobayashi K. Involvement of IL-10, an anti-inflammatory cytokine in murine liver injury induced by concanavalin A. *Hepatol Res.* 2001;20(2):232-243. doi:10.1016/s1386-6346(00)00137-6
156. Lurje I, Hammerich L, Tacke F. Dendritic cell and T cell crosstalk in liver fibrogenesis and hepatocarcinogenesis: implications for prevention and therapy of liver cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7378. doi:10.3390/ijms21197378
157. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):45-65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189
158. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(suppl 1):173-179. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06592.x

159. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11. doi:10.1038/cdd.2008.150
160. 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. doi:10.1002/hep.1840210131
161. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, et al. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity.* 2007;27(4):647-659. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.023
162. Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:345803. doi:10.1155/2011/345803
163. Riva F, Carotti D, Barra D, et al. Different reactivity of mitochondrial and cytoplasmic aspartate aminotransferases toward an affinity labeling reagent analog of the coenzyme. *J Biol Chem.* 1980;255(19):9230-9235.
164. Lin X, Shi S, Chen L, et al. Editorial: acute liver injury and repair: cellular and molecular mechanisms. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1439921. doi:10.3389/fcell.2024.1439921
165. Luster AD, Greenberg SM, Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med.* 1995;182(1):219-231. doi:10.1084/jem.182.1.219
166. 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. doi:10.3748/wjg.v18.i2.119
167. Nishikage T, Seki S, Toyabe S, et al. Inhibition of concanavalin A-induced hepatic injury of mice by bacterial lipopolysaccharide via the induction of IL-6 and the subsequent reduction of IL-4: the cytokine milieu of concanavalin A hepatitis. *J Hepatol.* 1999;31(1):18-26. doi:10.1016/s0168-8278(99)80159-7
168. Benseler V, Warren A, Vo M, et al. Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(40):16735-16740. doi:10.1073/pnas.1112251108
169. Al-Salihi M, Bornikoel A, Zhuang Y, et al. The role of ADAM17 during liver damage. *Biol Chem.* 2021;402(9):1115-1128. doi:10.1515/hsz-2021-0149
170. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, et al. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med.* 1997;3(4):409-413. doi:10.1038/nm0497-409
171. Vasuri F, Malvi D, Gruppioni E, et al. Histopathological evaluation of recurrent hepatitis C after liver transplantation: a review. *World J Gastroenterol.* 2014;20(11):2810-2824. doi:10.3748/wjg.v20.i11.2810
172. Yan M, Huo Y, Yin S, Hu H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biol.* 2018;17:274-283. doi:10.1016/j.redox.2018.04.019
173. Ramachandran A, Jaeschke H. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *J Clin Transl Res.* 2017;3(suppl 1):157-169. doi:10.18053/jctres.03.2017S1.002
174. Brown AT, Ou X, James LP, et al. Correlation of MRI findings to histology of acetaminophen toxicity in the mouse. *Magn Reson Imaging.* 2012;30(2):283-289. doi:10.1016/j.mri.2011.09.023
175. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). *J Nutr Biochem.* 2003;14(5):251-258. doi:10.1016/s0955-2863(03)00030-5

176. Han B, Zhang L, Zhou P. Comparative proteomics of whey proteins: new insights into quantitative differences between bovine, goat and camel species. *Int J Biol Macromol*. 2023;227:10-16. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.12.103
177. Garrido BC, Souza GHMF, Lourenço DC, Fasciotti M. Proteomics in quality control: whey protein-based supplements. *J Proteomics*. 2016;147:48-55. doi:10.1016/j.jprot.2016.03.044
178. Farrell HM Jr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci*. 2004;87(6):1641-1674. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6
179. Chianese L, Calabrese MG, Ferranti P, et al. Proteomic characterization of donkey milk "caseome". *J Chromatogr A*. 2010;1217(29):4834-4840. doi:10.1016/j.chroma.2010.05.017
180. Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res*. 2007;68(1-2):88-113. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.013
181. Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39(4):354-360. doi:10.1097/00005176-200410000-00010
182. Barrionuevo M, Alferez MJ, Lopez AI, Sanz SM, Campos MS. Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J Dairy Sci*. 2002;85(3):657-664. doi:10.3168/jds.s0022-0302(02)74120-9
183. Barrionuevo M, López Aliaga I, Alferez MJ, et al. Beneficial effect of goat milk on bioavailability of copper, zinc and selenium in rats. *J Physiol Biochem*. 2003;59(2):111-118. doi:10.1007/BF03179876
184. Wang Y, Xiao R, Liu S, et al. The impact of thermal treatment intensity on proteins, fatty acids, macro/micro-nutrients, flavor, and heating markers of milk—a comprehensive review. *Int J Mol Sci*. 2024;25(16):8670. doi:10.3390/ijms25168670
185. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharm Res*. 2004;21(2):191-200. doi:10.1023/b:pham.0000016234.73023.75
186. Mutukuri TT, Wilson NE, Taylor LS, Topp EM, Zhou QT. Effects of drying method and excipient on the structure and physical stability of protein solids: freeze drying vs. spray freeze drying. *Int J Pharm*. 2021;594:120169. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120169
187. Livney YD. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2010;15(1-2):73-83. doi:10.1016/j.cocis.2009.11.002
188. Cross ML, Gill HS. Immunomodulatory properties of milk. *Br J Nutr*. 2000;84(suppl 1):S81-S89. doi:10.1017/s0007114500002294
189. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(22):2549-2559. doi:10.1007/s00018-005-5370-2
190. Edwards PJB, Jameson GB. Structure and stability of whey proteins. In: Singh H, Boland M, Thompson A, eds. *Milk Proteins: From Expression to Food*. 2nd ed. Academic Press; 2014:139-175.
191. Mediawaththe ATM, Chandrapala J, Huppertz T, Vasiljevic T. Heat-induced changes of milk protein concentrate suspensions as affected by addition of calcium sequestering salts and shearing. *Int Dairy J*. 2024;149:105825. doi:10.1016/j.idairyj.2023.105825

192. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci.* 2004;87(4):785-796. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1
193. Tai CS, Chen YY, Chen WL. β -lactoglobulin influences human immunity and promotes cell proliferation. *Biomed Res Int.* 2016;2016:7123587. doi:10.1155/2016/7123587
194. Layman DK. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr.* 2003;133(1):261S-267S. doi:10.1093/jn/133.1.261S
195. Bounous G, Gold P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med.* 1991;14(4):296-309.
196. Wong CW, Watson DL. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J Dairy Res.* 1995;62(2):359-368. doi:10.1017/s0022029900031058
197. Håversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cell Immunol.* 2002;220(2):83-95. doi:10.1016/s0008-8749(03)00006-6
198. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, et al. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(12):1291-1298. doi:10.1046/j.1440-1746.2002.02868.x
199. Rascón-Cruz Q, Siqueiros-Cendón TS, Siañez-Estrada LI, et al. Antioxidant Potential of Lactoferrin and Its Protective Effect on Health: An Overview. *Int J Mol Sci.* 2024;26(1):125. doi:10.3390/ijms26010125
200. Abdel-Wahhab KG, Ashry M, Hassan LK, et al. Hepatic and immune modulatory effectiveness of lactoferrin loaded selenium nanoparticles on bleomycin induced hepatic injury. *Sci Rep.* 2024;14(1):21066. doi:10.1038/s41598-024-72124-x
201. Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients.* 2011;3(4):442-474. doi:10.3390/nu3040442
202. Thakur R, Biswal P, Sari TP, et al. Therapeutic effect of goat milk and its value-addition: current status and way forward. *J Food Sci Technol.* 2024;61(9):1621-1631. doi:10.1007/s13197-023-06482-1
203. Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, et al. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J Food Compos Anal.* 2009;22(4):322-329. doi:10.1016/j.jfca.2008.10.020
204. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-632. doi:10.1038/nrm2952
205. Stobiecka M, Król J, Brodziak A. Antioxidant activity of milk and dairy products. *Animals (Basel).* 2022;12(3):245. doi:10.3390/ani12030245
206. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr Metab (Lond).* 2018;15:33. doi:10.1186/s12986-018-0271-1
207. Jeong SY. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling in skeletal muscle hypertrophy: a literature review with implications for health and disease. *Cureus.* 2025;17(11):e96018. doi:10.7759/cureus.96018
208. Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr.* 2006;136(1 suppl):227S-231S. doi:10.1093/jn/136.1.227S

209. Dalaka E, Stefos GC, Politis I, Theodorou G. Immunomodulatory properties of sweet whey-derived peptides in THP-1 macrophages. *Molecules*. 2025;30(6):1261. doi:10.3390/molecules30061261
210. Xie Z, Guo Z, Liu J. Whey acidic protein/four-disulfide core domain 21 regulate sepsis pathogenesis in a mouse model and a macrophage cell line via the Stat3/Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway. *Med Sci Monit*. 2018;24:4054-4063. doi:10.12659/MSM.908077
211. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007;447(7148):1116-1120. doi:10.1038/nature05894
212. Jenness R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. *J Dairy Sci*. 1980;63(10):1605-1630. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)83125-0
213. van der Toorn MV, Chatziioannou AC, Pellis L, et al. Biological relevance of goat milk oligosaccharides to infant health. *J Agric Food Chem*. 2023;71(38):13935-13949. doi:10.1021/acs.jafc.3c02194
214. Daddaoua A, Puerta V, Requena P, et al. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr*. 2006;136(3):672-676. doi:10.1093/jn/136.3.672
215. Qin X, Chen M, He B, et al. Role of short-chain fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease and potential therapeutic targets. *Front Microbiol*. 2025;16:1539972. doi:10.3389/fmicb.2025.1539972
216. López Aliaga I, Alférez MJ, Barrionuevo M, et al. Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron. *J Physiol Biochem*. 2000;56(3):201-208. doi:10.1007/BF03179787
217. Stergiadis S, Nørskov NP, Purup S, et al. Comparative nutrient profiling of retail goat and cow milk. *Nutrients*. 2019;11(10):2282. doi:10.3390/nu11102282
218. Mansor M, Al-Obaidi JR, Ismail IH, et al. Cross-reactivity analysis of milk proteins from different goat breeds with cow's milk allergens using a proteomic approach. *Mol Immunol*. 2023;155:44-57. doi:10.1016/j.molimm.2022.12.016
219. Haenlein GF. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Res*. 2004;51(2):155-163. doi:10.1016/j.smallrumres.2003.08.010
220. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998;45(3):221-229. doi:10.1016/s0939-6411(98)00004-6
221. Cheng Y, Duong HTT, Hu Q, et al. Practical advice in the development of a lyophilized protein drug product. *Antib Ther*. 2024;8(1):13-25. doi:10.1093/abt/tbae030
222. Arsiccio A, Giorsello P, Marengo L, Pisano R. Considerations on protein stability during freezing and its impact on the freeze-drying cycle: a design space approach. *J Pharm Sci*. 2020;109(1):464-475. doi:10.1016/j.xphs.2019.10.022
223. Haas J, Kim BJ, Atamer Z, et al. Effects of spray drying and freeze drying on the protein profile of whey protein concentrate. *J Food Sci*. 2024;89(11):7477-7493. doi:10.1111/1750-3841.17349
224. Silva GVD, Machado BAS, Oliveira WP, et al. Effect of drying methods on bioactive compounds and antioxidant capacity in grape skin residues from the new hybrid variety "BRS Magna". *Molecules*. 2020;25(16):3701. doi:10.3390/molecules25163701
225. Zhao X, Guo Y, Zhang Y, et al. Effects of different heat treatments on Maillard reaction products and volatile substances of camel milk. *Front Nutr*. 2023;10:1072261. doi:10.3389/fnut.2023.1072261

226. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(6):911-916. doi:10.1016/j.jada.2010.03.018
227. Manninen AH. Hyperinsulinaemia, hyperaminoacidaemia and post-exercise muscle anabolism: the search for the optimal recovery drink. *Br J Sports Med.* 2006;40(11):900-905. doi:10.1136/bjsm.2006.030031
228. Nabekura T, Matsuo S, Shibuya A. Concanavalin A-induced acute liver injury in mice. *Curr Protoc.* 2024;4(8):e11117. doi:10.1002/cpz1.1117
229. Volarevic V, Milovanovic M, Ljubic B, et al. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2012;55(6):1954-1964. doi:10.1002/hep.25542
230. van Boekel MAJS. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.* 1998;62(4):403-414. doi:10.1016/S0308-8146(98)00075-2
231. Akazawa Y, Nakao K. To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2018;53(8):893-906. doi:10.1007/s00535-018-1451-5
232. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol.* 2013;59(3):583-594. doi:10.1016/j.jhep.2013.03.033
233. Bonder CS, Ajuebor MN, Zbytnuik LD, et al. Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol.* 2004;172(1):45-53. doi:10.4049/jimmunol.172.1.45
234. Layman AJ, Alsbrook SM, Koturbash IK, McGill MR. Natural products that protect against acetaminophen hepatotoxicity: a call for increased rigor in preclinical studies of dietary supplements. *J Diet Suppl.* 2025;22(1):105-122. doi:10.1080/19390211.2024.2335445
235. Hamad EM, Taha SH, Abou Dawood AG, et al. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids Health Dis.* 2011;10:57. doi:10.1186/1476-511X-10-57
236. Noh KW, Park S. Effects of amino acid supplementation on muscle protein metabolism and adaptation: a narrative review of effects on muscle mass, strength, and sex differences. *Phys Act Nutr.* 2025;29(3):53-63. doi:10.20463/pan.2025.0026
237. Beaufrère B, Dangin M, Boirie Y. The 'fast' and 'slow' protein concept. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme.* 2000;3:121-133.
238. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol In Vitro.* 2003;17(1):27-33. doi:10.1016/s0887-2333(02)00119-4
239. Tajiri K, Shimizu Y. Branched-chain amino acids in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2013;19(43):7620-7629. doi:10.3748/wjg.v19.i43.7620
240. 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. doi:10.1016/s0016-5085(98)70324-5
241. Mulder AM, Connellan PA, Oliver CJ, et al. Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. *Nutr Res.* 2008;28(9):583-589. doi:10.1016/j.nutres.2008.05.007
242. Manukyan MN, Yavuz Y, Erbarut I, et al. The effect of glutathione preconditioning on heme oxygenase-1 system established by whey protein feeding on hepatocellular injury in a rat hepatic normothermic i/r injury model. *Turk J Surg.* 2008;24(3):137-144.

243. Michalopoulos GK, Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(1):40-55. doi:10.1038/s41575-020-0342-4
244. Zhang C, Sun C, Zhao Y, et al. Signaling pathways of liver regeneration: biological mechanisms and implications. *iScience*. 2023;27(1):108683. doi:10.1016/j.isci.2023.108683
245. Matar C, Valdez JC, Medina M, et al. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J Dairy Res*. 2001;68(4):601-609. doi:10.1017/s0022029901005118
246. Küsters 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. doi:10.1053/gast.1996.v111.pm8690213
247. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. 1993;364(6440):806-809. doi:10.1038/364806a0
248. Ksontini R, Colagiovanni DB, Josephs MD, et al. Disparate roles for TNF-alpha and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol*. 1998;160(8):4082-4089.
249. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000;100(6):655-669. doi:10.1016/s0092-8674(00)80702-3
250. Oestreich KJ, Weinmann AS. Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):191-195. doi:10.1016/j.coi.2011.12.004
251. Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med*. 2003;3(6):483-490. doi:10.2174/1566524033479528
252. Kartasheva-Ebertz DM, Pol S, Lagaye S. Retinoic acid: a new old friend of IL-17A in the immune pathogeny of liver fibrosis. *Front Immunol*. 2021;12:691073. doi:10.3389/fimmu.2021.691073
253. Luan J, Zhang X, Wang S, et al. NOD-like receptor protein 3 inflammasome-dependent IL-1 β accelerated ConA-induced hepatitis. *Front Immunol*. 2018;9:758. doi:10.3389/fimmu.2018.00758
254. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, et al. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity*. 2008;29(6):947-957. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.003
255. Li J, Lau GK, Chen L, et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-kB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *PLoS One*. 2011;6(7):e21816. doi:10.1371/journal.pone.0021816
256. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-238. doi:10.1038/nature04753
257. Jamshidi S, Mohsenpour MA, Masoumi SJ, et al. Effect of whey protein consumption on IL-6 and TNF- α : a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Metab Syndr*. 2022;16(1):102372. doi:10.1016/j.dsx.2021.102372
258. Cai C, Zhao Y, Ma M, et al. Anti-inflammatory and gut modulating effects of donkey whey protein in dextran sodium sulfate-induced colitis mice: insights from the various processing methods. *J Dairy Sci*. 2025;108(11):12076-12095. doi:10.3168/jds.2024-25381
259. Calder PC. Feeding the immune system. *Proc Nutr Soc*. 2013;72(3):299-309. doi:10.1017/S0029665113001286

260. Ali AK, Komal AK, Almutairi SM, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection. *Front Immunol.* 2019;10:2688. doi:10.3389/fimmu.2019.02688
261. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991;147(11):3815-3822.
262. Raychaudhuri B, Fisher CJ, Farver CF, et al. Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Cytokine.* 2000;12(9):1348-1355. doi:10.1006/cyto.2000.0721
263. Wakkach A, Fournier N, Brun V, et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003;18(5):605-617. doi:10.1016/s1074-7613(03)00113-4
264. Xu Y, Tang X, Yang M, et al. Interleukin 10 gene-modified bone marrow-derived dendritic cells attenuate liver fibrosis in mice by inducing regulatory T cells and inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:4652596. doi:10.1155/2019/4652596
265. Jovicic N, Jetic I, Jovanovic I, et al. Differential immunometabolic phenotype in Th1 and Th2 dominant mouse strains in response to high-fat feeding. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134089. doi:10.1371/journal.pone.0134089
266. Ha DJ, Kim J, Kim S, Go GW, Whang KY. Dietary whey protein supplementation increases immunoglobulin G production by affecting helper T cell populations after antigen exposure. *Foods.* 2021;10(1):194. doi:10.3390/foods10010194
267. Adler S, Olsen W, Rackerby B, Spencer R, Dallas DC. Effects of whey protein supplementation on inflammatory marker concentrations in older adults. *Nutrients.* 2023;15(18):4081. doi:10.3390/nu15184081
268. Goh A, Muhandi L, Ali A, et al. Differences between peptide profiles of extensive hydrolysates and their influence on functionality for the management of cow's milk allergy: a short review. *Front Allergy.* 2022;3:950609. doi:10.3389/falgy.2022.950609
269. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
270. Schulte S, Sukhova GK, Libby P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *Am J Pathol.* 2008;172(6):1500-1508. doi:10.2353/ajpath.2008.070776
271. Bounous G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* 2000;20(6C):4785-4792.
272. Calder PC. Branched-chain amino acids and immunity. *J Nutr.* 2006;136(1 suppl):288S-293S. doi:10.1093/jn/136.1.288S
273. Sahsi B, Gunaydin G. Immunometabolism - the role of branched-chain amino acids. *Front Immunol.* 2022;13:886822. doi:10.3389/fimmu.2022.886822
274. Maciver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, et al. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):949-957. doi:10.1189/jlb.0108024
275. Palmer CS, Ostrowski M, Balderson B, Christian N, Crowe SM. Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front Immunol.* 2015;6:1. doi:10.3389/fimmu.2015.00001
276. Actor JK, Hwang SA, Kruzel ML. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des.* 2009;15(17):1956-1973. doi:10.2174/138161209788453202

277. Ellass E, Masson M, Mazurier J, Legrand D. Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8 in human endothelial cells. *Infect Immun.* 2002;70(4):1860-1866. doi:10.1128/IAI.70.4.1860-1866.2002
278. Mattsby-Baltzer I, Roseanu A, Motas C, et al. Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr Res.* 1996;40(2):257-262. doi:10.1203/00006450-199608000-00041
279. Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, et al. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br J Nutr.* 1999;81(suppl 1):S1-S27.
280. Del Ben M, Polimeni L, Baratta F, Pastori D, Angelico F. The role of nutraceuticals for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83(1):88-95. doi:10.1111/bcp.12899
281. Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology.* 2014;60(6):2109-2117. doi:10.1002/hep.27254
282. Zheng M, Tian Z. Liver-mediated adaptive immune tolerance. *Front Immunol.* 2019;10:2525. doi:10.3389/fimmu.2019.02525
283. Bozward AG, Davies SP, Morris SM, Kayani K, Oo YH. Cellular interactions in self-directed immune-mediated liver diseases. *J Hepatol.* 2025;82(6):1110-1124. doi:10.1016/j.jhep.2025.01.002
284. Du X, Li M, Huan C, Lv G. Dendritic cells in liver transplantation immune response. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1277743. doi:10.3389/fcell.2023.1277743
285. Yoo S, Ha SJ. Generation of tolerogenic dendritic cells and their therapeutic applications. *Immune Netw.* 2016;16(1):52-60. doi:10.4110/in.2016.16.1.52
286. van Lummel M, van Veelen PA, de Ru AH, et al. Dendritic cells guide islet autoimmunity through a restricted and uniquely processed peptidome presented by high-risk HLA-DR. *J Immunol.* 2016;196(8):3253-3263. doi:10.4049/jimmunol.1501282
287. Burgdorf S, Kautz A, Böhnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science.* 2007;316(5824):612-616. doi:10.1126/science.1137971
288. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-252. doi:10.1038/32588
289. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:621-667. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828
290. Wollenberg A, Mommaas M, Oppel T, et al. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol.* 2002;118(2):327-334. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x
291. Garcia-Aguilar T, Espinosa-Cueto P, Magallanes-Puebla A, Mancilla R. The mannose receptor is involved in the phagocytosis of mycobacteria-induced apoptotic cells. *J Immunol Res.* 2016;2016:3845247. doi:10.1155/2016/3845247
292. Lee SJ, Evers S, Roeder D, et al. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science.* 2002;295(5561):1898-1901. doi:10.1126/science.1069540
293. Ramirez-Ortiz ZG, Pendergraft WF 3rd, Prasad A, et al. The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity. *Nat Immunol.* 2013;14(9):917-926. doi:10.1038/ni.2670

294. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002;23(9):445-449. doi:10.1016/s1471-4906(02)02281-0
295. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev.* 2011;241(1):206-227. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01015.x
296. Ludewig B, Odermatt B, Ochsenbein AF, Zinkernagel RM, Hengartner H. Role of dendritic cells in the induction and maintenance of autoimmune diseases. *Immunol Rev.* 1999;169:45-54. doi:10.1111/j.1600-065x.1999.tb01305.x
297. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9:642. doi:10.3389/fphar.2018.00642
298. Balbis E, Patriarca S, Furfaro AL, et al. Whey proteins influence hepatic glutathione after CCl4 intoxication. *Toxicol Ind Health.* 2009;25(4-5):325-328. doi:10.1177/0748233709104870
299. Saint-Sauveur D, Gauthier SF, Boutin Y, Montoni A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Int Dairy J.* 2008;18(3):260-270. doi:10.1016/j.idairyj.2007.07.011
300. Suzuki R, Arai S, Kurimoto M, Yuda N, Tanaka M. Antioxidant properties of whey protein-derived peptides: radical scavenging and cytoprotective effects. *Food Sci Nutr.* 2025;13(10):e71092. doi:10.1002/fsn3.71092
301. Rackerby B, Kim E, Bobe G, Dallas DC, Park SH. Effects of whey protein isolate on the human gut microbiota and intestinal function in older adults. *J Dairy Sci.* 2026;109(2):1065-1081. doi:10.3168/jds.2025-27204
302. Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A, et al. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr.* 2006;25(3):477-488. doi:10.1016/j.clnu.2005.11.004
303. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-1061. doi:10.1126/science.1079490
304. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-336. doi:10.1038/ni904
305. 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. doi:10.1002/hep.21498
306. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-532. doi:10.1038/nri2343
307. Bonkovsky HL, Barnhart HX, Foureau DM, et al. Cytokine profiles in acute liver injury—results from the US Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) and the Acute Liver Failure Study Group. *PLoS One.* 2018;13(10):e0206389. doi:10.1371/journal.pone.0206389
308. Venken K, Decruy T, Sparwasser T, Elewaut D. Tregs protect against invariant NKT cell-mediated autoimmune colitis and hepatitis. *Immunology.* 2024;171(2):277-285. doi:10.1111/imm.13718
309. Kendal AR, Waldmann H. Infectious tolerance: therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(5):560-565. doi:10.1016/j.coi.2010.08.002
310. Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev.* 2008;226:219-233. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00711.x

311. Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology*. 2015;62(1):279-291. doi:10.1002/hep.27793
312. Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*. 2009;214(7):554-561. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.004
313. Hwang SA, Kruzel ML, Actor JK. Recombinant human lactoferrin modulates human PBMC derived macrophage responses to BCG and LPS. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;101S:S53-S62. doi:10.1016/j.tube.2016.09.011
314. Kawaguchi T, Shiraishi K, Ito T, et al. Branched-chain amino acids prevent hepatocarcinogenesis and prolong survival of patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(6):1012-1018. doi:10.1016/j.cgh.2013.08.050
315. Shertzer HG, Woods SE, Krishan M, et al. Dietary whey protein lowers the risk for metabolic disease in mice fed a high-fat diet. *J Nutr*. 2011;141(4):582-587. doi:10.3945/jn.110.133736
316. Kim E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr Res Pract*. 2009;3(1):64-71. doi:10.4162/nrp.2009.3.1.64
317. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-181. doi:10.1038/nri2711
318. Oo YH, Shetty S, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig Dis*. 2010;28(1):31-44. doi:10.1159/000282062

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Др Наталиа Соловјова рођена је 07.07.1963. године у Кемерову, СССР. Медицински факултет на Медицинском институту у Кемерову уписала је 1980/1981. године и успешно завршила 1985/1986. године. Специјалистичке студије на Медицинском факултету Универзитета у Београду завршила је 2013. године и стекла звање специјалиста физикалне медицине и рехабилитације. Школске 2018. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Положила је све испите на докторским студијама.

Од 2004. године запослена на Вишој медицинској школи у Београду, која од 2020. године реорганизована у Академију струковних студија Београд, одсек Висока Здравствена школа

Члан је Српског друштва за имунологију, молекулску имунологију и регенеративну медицину и члан СЛД, секција физикалне медицине и рехабилитације. Учесница је бројних међународних и националних научних скупова, аутор и коаутор више радова.

1. Dimitrijević JD[†], **Solovjova N[†]**, Bukonjić AM, Tomović DL, Milinković M, Čaković A, Bogojeski J, Ratković ZR, Janjić GV, Rakić AA, Arsenijević NN, Milovanović MZ, Milovanović JZ, Radić GP, Jevtić VV. Docking Studies, Cytotoxicity Evaluation and Interactions of Binuclear Copper(II) Complexes with S-Isoalkyl Derivatives of Thiosalicylic Acid with Some Relevant Biomolecules. *Int J Mol Sci.* 2023;24(15):12504.
2. Grujčić M, Milovanović M, Nedeljković J, Jovanović D, Arsenijević D, **Solovjova N**, Stanković V, Tanasković I, Arsenijević A, Milovanović J. The Possible Effects of Galectin-3 on Mechanisms of Renal and Hepatocellular Injury Induced by Intravascular Hemolysis. *Int J Mol Sci.* 2024;25(15):8129.
3. Nedeljković J, Milovanović J, Marković V, **Solovjova N**, Mijailović S, Zdravković N, Nedeljković N, Milovanović M. The IL-33/ST2 Axis Protects the Hippocampus from LPS-Induced Inflammation and Damage by Modulating Microglial Phenotype. *Biomedicines.* 2026;14(2):459.
4. **Solovjova N**, Milovanović M, Arsenijević A, Volarević V, Petrović I, Grujčić M, Nedeljković J, Arsenijević D, Rosić V, Jovićić N, Milovanović J. Anti-Inflammatory Effects of Goat Whey Protein in Concanavalin-A Induced Hepatitis. *Nutrients.* 2026;18(5):766.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

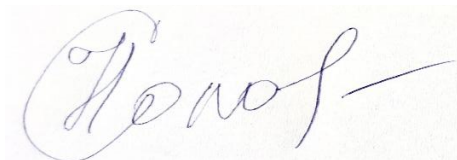
“Антиинфламацијски и хепатопротективни ефекат лиофилизоване козје сурутке у
експерименталном моделу акутног хепатитиса“

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,

У Крагујевцу, 14.04.2026. године,



потпис аутора

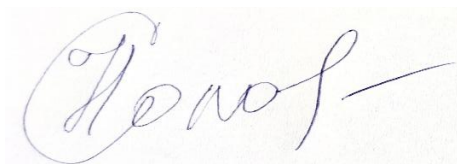
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

“Антиинфламацијски и хепатопротективни ефекат лиофилизоване козје сурутке у
експерименталном моделу акутног хепатитиса“

истоветне.

У Крагујевцу, 14.04.2026. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Наталиа Соловјова,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

“Антиинфламацијски и хепатопротективни ефекат лиофилизоване козје сурутке у експерименталном моделу акутног хепатитиса“

и то у целини, као и да по један примерак тако умноженог 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 наведеног докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

припадницима јавности да тако доступна докторска дисертација користи под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

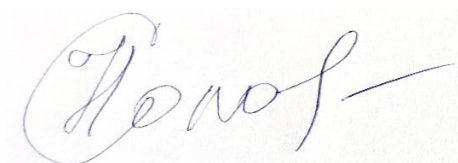
1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

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.

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

У Крагујевцу, 14.04.2026. 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/>