

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА-СКОПЈЕ



**ПАТОХИСТОЛОШКА И
ИМУНОХИСТОХЕМИСКА АНАЛИЗА НА
АНТИТЕЛАТА ВО КОЛОН КАЈ СТАОРЦИ СО
ПРЕДИЗВИКАН КОЛИТИС И ТРЕТИРАНИ СО
МИКРОИНКАПСУЛИРАН СИНБИОТИК**

Докторски Труд

Ивица Ѓуровски

Скопје, 2018 година

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА-СКОПЈЕ



**ПАТОХИСТОЛОШКА И
ИМУНОХИСТОХЕМИСКА АНАЛИЗА НА
АНТИТЕЛАТА ВО КОЛОН КАЈ СТАОРЦИ СО
ПРЕДИЗВИКАН КОЛИТИС И ТРЕТИРАНИ СО
МИКРОИНКАПСУЛИРАН СИНБИОТИК**

Докторски Труд

Ивица Ѓуровски

Скопје, 2018 година

Ментор:

Проф. д-р. Дине Митров

Членови на комисија:

Проф. д-р Игор Улчар

Проф. д-р Велимир Стојковски

Проф. д-р Флорина Поповска-Перчиниќ

Проф. д-р Кристина Младеновска

Проф. д-р Марко Хохштетер

Благодарност

Најголема благодарност изразувам кон доц. д-р Трпе Ристоски за големата поддршка, стручната помош и советите во изработката на овој докторски труд, од неговата иницијација, до неговата целосна реализација.

Голема благодарност изразувам кон менторот, проф. д-р Дине Митров за поддршката и помошта при работата.

Огромна благодарност изразувам кон проф. д-р Кристина Младеновска и доц. д-р Тања Петреска Ивановска од Фармацевтскиот факултет, за соработката во експерименталната работа.

Голема благодарност изразувам кон доц. д-р Славица Костадинова-Куновска и Јанка Петровска од Катедрата за Патолошка морфологија при Медицинскиот факултет – Скопје, за исклучителната помош во имунохистохемиското истражување.

Благодарност изразувам кон Мартин Николовски за сугестиите при финализацијата на докторскиот труд.

Благодарам на моите соработници од Институтот за ветеринарна медицина, како и на колегите од Ветеринарниот факултет во Скопје.

Голема благодарност кон моето семејство за разбирањето и поддршката.

Резиме

Инфламаторните цревни заболувања со своите две форми (улцерозен колитис и Кронова болест) претставува светски распространет здравствен проблем кај хуманата и анималната популација. Нарушената благосостојба на заболените, како и скапите третмани за лекување на болеста ја наметнуваат потребата од наоѓање алтернативни превентивни мерки. Поради тоа сè поголем акцент во светски рамки се става на употребата на функционални прехранбени производи со пробиотици, пребиотици и синбиотици за превенција на ова, како и на други заболувања.

Недоволното познавање на етиологијата и патогенезата на болеста, како и неможноста за поистоветување на својствата на различните пробиотици и нивното влијание врз имунолошкиот систем, беа причина за изведување на оваа докторска дисертација.

Во овој труд се прикажани резултатите од истражувањето на структурните, хистохемиските и имунохистохемиските промени во колонот при третман со нов функционален производ кај експериментален животински модел на колитис предизвикан со тринитробензен сулфонска киселина (ТНБС). Истражувањето е извршено на женски Wistar стаорци со телесна маса од 180 до 250 g и старост од 10 до 14 недели, поделени во пет групи. Материјалите (колони) се фиксирани во неутрален формалин, вклопени во парафин и пресечени со микротом на пресеци со дебелина од 3 до 5 μm . За бојење на препаратите е користена хематоксилин и еозин (ХЕ) и Periodic Acid Schiff (PAS) методата, додека за имунохистохемиското бојење е користен En Vision Kit (Dako ChemMate, Denmark), со употреба на следните примарните антитела: моноклонални антихумани (анг. monoclonalrabbit-anti-human) CD3-антитела од зајак за Т-лимфоцити (ДАКО), моноклонални антихумани (анг. monoclonalmouse-anti-human) CD79 α -антитела и CD20 α -антитела од глушец за В-лимфоцити (ДАКО), моноклонални антихумани (анг. monoclonalmouse-anti-human) CD68 и (анг. monoclonalmouse-anti-human) MAC387 (ДАКО) антитела од глушец за макрофаги.

За целите на истражувањето, стаорците беа третирани со ајран со микроинкапсулиран синбиотик (еднаш и два пати дневно) и ајран со микрочестички без синбиотик. Микрочестичките беа подготвени од цитозан и алгинат, додека синбиотикот се состоеше од пробиотик *Lactobacillus casei* 01 и пребиотик инулин збогатен со олигофруктоза, смеса од олигофруктоза со степен на полимеризација 2-8 и долго-верижна фракција на инулин (DP 10-60), Synergy 1. Апликацијата на TNBS (30 mg/kg) предизвика промени во колонот соодветни за симулирање на Кроновата болест. Од патоморфолошки аспект, промените во колонот се во форма на хиперемични подрачја, улцерации, намалување на бројот на гоблет клетки и на количината на муцин како и инфилтрација со макрофаги, лимфоцити и леукоцити. Со помош на

имунохистохемискиот метод утврдено е дека концентрацијата на CD3+ Т-лимфоцитите е значително повисока кај позитивната контрола распоредени во сите слоеви на колонот -мукозата (каде што беше присутна), субмукозата, мускуларисот и во некои случаи дури и серозата, како и периферната обвивка на лимфоидните агрегати. Кај стаорците од позитивната контролна група, CD20 и CD79 α -позитивните клетки покажаа повисока концентрација во споредба со негативната контрола распоредени во целата структура на колонот: мукозата (каде што беше присутна), субмукозата, мускуларисот и во некои случаи дури и серозата како и централната област на лимфоидните агрегати, со тоа што бројот на CD79 α -позитивни плазма клетки беше значително поголем во споредба со CD20-позитивните В-клетки. Бројот на CD68 и MAC387-позитивни макрофаги кај колитичните групи беше значително зголемен и тоа во длабоката ламина проприја, помеѓу криптите и во близина на криптите.

Добиените резултати во нашето истражување покажаа дека ајранот со микроинкапсулиран синбиотик (без разлика меѓу еднократната и двократната апликација) има голем терапевтски потенцијал. Со примена на моноклонските антители за клетките од имунолошкиот систем докажано е дека антиинфламаторното дејство на ајранот со микроинкапсулиран синбиотик се должи на подобрување на епителната бариера и намалување на воспалителниот инфилтрат составен од Т и В-лимфоцити, плазма-клетки и ткивни макрофаги. Имунохистохемискиот метод овозможува истовремено следење на промените во ткивото и дистрибуцијата на имунолошките клетки во истото.

Клучни зборови: инфламаторни цревни заболувања, микроинкапсулиран синбиотик, имунолошки одговор.

Abstract

Inflammatory bowel disease with its' two forms (ulcerative colitis and Crohn's disease) presents a worldwide health problem in the human and animal population. The disrupted wellbeing and the expensive treatment for the disease, imposes the need for finding an alternative preventive measures. That's why the worldwide attention is focused on the use of functional food with probiotics, prebiotics and synbiotics for prevention to this as well as other diseases.

The poor understanding of the etiology and the pathogenesis of the disease as well as the need for studying the properties of different probiotics and their influence on the immunological system were the goals of this doctoral dissertation.

This work presents the results from the investigation of the structural, histochemical and immunohistochemical changes in the colon, treated with new functional product in experimental model of colitis induced with threinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). The investigation was performed on female Wistar rats with body weight of 180-250 g and age of 10 – 14 weeks, divided in five groups. The materials (colon) are fixated in neutral formalin, embaded in parafin and cut by mictotom on 3-5 μm thick slides. The hematoxilin and eosin (H.E.) and Periodic Acid Schiff (PAS) methods are used for staining of the slides, and for the immunohistochemical method En Vision Kit (Dako ChemMate, Denmark) is used with the following primary antibodies: monoclonal rabbit-anti-human CD3 for T-lymphocytes (DAKO), monoclonal mouse-anti-human CD79 α cy and CD20cy for B-lymphocytes (DAKO), monoclonal mouse-anti-human CD68 and monoclonal mouse-anti-human MAC387 (DAKO) for macrophages.

For the purpose of the investigation, the rats were treated with ayran (Zdravje Radovo, Makedonija) containing microencapsulated synbiotic (once and twice per day) and ayran with blank microparticles. The microparticles were prepared of alginate and chitosan, while the symbiotic was composed of probiotic *Lactobacillus casei* 01 and the prebiotic inulin enriched with oligofructose, mixture of oligofructose with polymerization degree 2-8 and long-chain inulin fraction (DP 10-60), Synergy 1. The application of TNBS (30 mg/kg) caused changes to the colon, adequate for simulation of the Crohn's disease. From patomorphologic aspect, the changes of the colon are in the form of hyperemic areas, ulcerations, decrease in the number of goblet cells and the amount of mucin, as well as infiltration with macrophages, lymphocytes and leukocytes. The immunohistochemical method shows that the concentration of the CD3+ T- lymphocytes is significantly higher in the positive control, distributed in all the layers of the colon: the mucosa (if present), the submucosa, muscularis and in some cases, the serosa as well as the peripheral layer of the lymphoid aggregates. The rats in the positive

control group had higher concentration of CD20 и CD79 α -positive cells compared to the negative control group, distributed trough the whole structure of the colon: the mucosa (if present), the submucosa, muscularis and in some cases, even the serosa as well as the celtral area of the lymphoid aggregates. The number of the CD79 α -positive cells was significantly higher compared to the CD20-positive B-cells. The number of CD68 и MAC387-positive macrophages in the colitic group was significantly increased in the deep lamina propria, between the crypts and near the crypts.

The results from this examination showed that the ayran containing microencapsulated synbiotic (without diference between the groups treated once and twice per day) has a great therapeutic potential. The use of monoclonal antybodies for the cell of the immunological system pruve that the anti-inflammatory property of the ayran with microencapsulated synbiotic is due to improvement of the epithelial barrier and the decrease of the inflammatory infiltrate composed of T and B-lymphocies, plasma cells and tissue macrophages. The immunohistochemical method allows for simulataneus observation of the tissue changes and the distribution of immunological cells in it.

Key words: inflammatory bowel diseases, microencapsulated symbiotic, immune response

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД.....	1
2. ПРЕГЛЕД НА ДОСТИГНУВАЊАТА НА НАУЧНАТА ДИСЦИПЛИНА ПОВРЗАНИ СО ПРЕДМЕТОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕ	4
2.1. Структура, функција и хистолошка градба на лимфоидното ткиво во цревата (анг. Gut Associated Lymphoid Tissues –GALT)	4
2.2. Карактеристики на колитис при инфламаторни цревни заболувања.....	9
2.3. Имунолошкиот одговор при ИЦЗ.....	11
2.4. Инфламаторни цревни заболувања (ИЦЗ) и имунолошкиот одговор при колитис кај домашните животни.....	18
2.5. Анимални модели на инфламаторни цревни заболувања (ИЦЗ).....	21
2.6. Карактеристики на колитис предизвикан со ТНБС (<i>три-нитробензен сулфонска киселина</i>).....	23
2.7. Улогата на цревната микрофлора во ИЦЗ.....	25
2.8. Влијанието на различни компоненти од исхраната врз текот на болеста.....	26
2.8.1. Функционална храна.....	28
2.8.2. Влијание на пробиотици врз различните компоненти од имунолошкиот систем.....	31
2.9. Имунохистохемискиот метод во проучувањето на ИЦЗ.....	36
3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	40
4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ.....	41
4.1. Материјали.	41
4.2. Експериментален дизајн.....	42
4.3. Методи	45
4.3.1. Хистохемиска метода	45
4.3.2. Имунохистохемиски метод	45

4. 3. 3. Определување на степенот на ткивно оштетување и инфилтрација со воспалителни клетки.....	46
5. РЕЗУЛТАТИ	48
5. 1. Макроскопски и микроскопски промени и дистрибуција на Т- лимфоцитите, В-лимфоцитите и макрофагите во колонот кај стаорците од – негативната контролна група (Група I).....	48
5. 1. 1. Макроскопски промени.....	48
5. 1. 2. Микроскопски промени	48
5. 1. 3. PAS (Periodic acid Schiff) бојење.....	49
5. 1. 4. Дистрибуција на CD3 Т-лимфоцитите.....	49
5. 1. 5. Дистрибуција на CD20 В-лимфоцитите.....	50
5. 1. 6. Дистрибуција на CD79 В-лимфоцитите.....	50
5. 1. 7. Дистрибуција на CD68-позитивните клетки.....	51
5. 1. 8. Дистрибуција на MAC387- позитивните клетки.....	51
5. 2. Макроскопски и микроскопски промени и дистрибуција на Т- лимфоцитите, В-лимфоцитите и макрофагите во колонот кај стаорците од – позитивната контролна група (Група II).....	52
5. 2. 1. Макроскопски промени.....	52
5. 2. 2. Микроскопски промени	52
5. 2. 3. PAS (Periodic acid Schiff) бојење.....	53
5. 2. 4. Дистрибуција на CD3 Т -лимфоцитите.....	54
5. 2. 5. Дистрибуција на CD20 В- лимфоцитите.....	55
5. 2. 6. Дистрибуција на CD79 В -лимфоцитите.....	56
5. 2. 7. Дистрибуција на CD68 -позитивните клетки.....	56
5. 2. 8. Дистрибуција на MAC387- позитивните клетки.....	57
5. 3. Макроскопски и микроскопски промени и дистрибуција на Т- лимфоцитите, В-лимфоцитите и макрофагите во колонот кај стаорците од –	58

групите третирани со инкапсулиран синбиотик еднаш и два пати на ден (Група III, IV)	
5. 3. 1. Макроскопски промени.....	58
5. 3. 2. Микроскопски промени	58
5. 3. 3. PAS (Periodic acid Schiff) бојење.....	60
5. 3. 4. Дистрибуција на CD3 Т -лимфоцитите.....	60
5. 3. 5. Дистрибуција на CD20 В- лимфоцитите.....	61
5. 3. 6. Дистрибуција на CD79 В -лимфоцитите.....	62
5. 3. 7. Дистрибуција на CD68 -позитивните клетки.....	62
5. 3. 8. Дистрибуција на MAC387- позитивните клетки.....	63
5. 4. Макроскопски и микроскопски промени и дистрибуција на Т-лимфоцитите, В-лимфоцитите и макрофагите во колонот кај стаорците од – групата третирана со празни микрочестички (Група V)	64
5. 4. 1. Макроскопски промени.....	64
5. 4. 2. Микроскопски промени	64
5. 4. 3. PAS (Periodic acid Schiff) бојење.....	65
5. 4. 4. Дистрибуција на CD3 Т- лимфоцитите.....	65
5. 4. 5. Дистрибуција на CD20 В- лимфоцитите.....	66
5. 4. 6. Дистрибуција на CD79 В -лимфоцитите.....	66
5. 4. 7. Дистрибуција на CD68 -позитивните клетки.....	67
5. 4. 8. Дистрибуција на MAC387- позитивните клетки.....	68
6. ДИСКУСИЈА.....	70
7. ЗАКЛУЧОК.....	80
8. ЛИСТА НА КРАТЕНКИ.....	83
9. ЛИТЕРАТУРА.....	85

1. ВОВЕД

Инфламаторните цревни заболувања (ИЦЗ) се јавуваат кај сè поголем процент од хуманата и анималната популација. Не се целосно познати, ниту етиологијата, ниту патогенезата на овие заболувања, поради што сè повеќе внимание се посветува, во светски рамки, на изнаоѓање на соодветни решенија во поглед на одредување соодветна терапија и, што е уште поважно, соодветна превенција.

Заболувањата се јавуваат во две форми и тоа: улцерозен колитис (УК) и Кронава болест (КБ). Разликата меѓу овие две болести е во локализацијата и карактерот на воспалението. УК се јавува на колонот и претставува дифузна мукозна инфламација со присуство на неутрофили во ламина проприја додека КБ се јавува на попроксималните делови од дигестивниот тракт и колонот и тоа во форма на фокално трансмурално воспаление со зголемено присуство на макрофаги.

Се претпоставува дека во основа на заболувањата лежи нарушување на односот меѓу цревната микрофлора и имунолошкиот систем во цевата. Некои истражувања укажуваат на одредени патогени соеви, како што е на пр. еден атхезивен слој на *Escherichia coli*, кој што во повеќе случаи е изолиран од колонот на лица заболени од ИЦЗ. Други истражувања укажуваат дека колитис се јавува и при нормална микрофлора, што пак би значело дека во тој случај проблемот е со цревната бариера. Улогата на имунолошкиот систем во појавата и патогенезата на ИЦЗ сèуште не е целосно позната. Се знае само дека претставува кулминација на ефектот од останатите етиолошки фактори. Досегашните истражувања покажале дека CD4+ лимфоцитите со тип 1 хелпер Т-клетки (Th1) фенотип се доминантни кај пациентите со КБ, додека кај пациентите со УК се доминантни CD4+ лимфоцитите од Th2-фенотип. Според поновите истражувања, дефекти во вродениот интестинален имунитет, а не прекумерната реакција на стекнатиот имунитет, доведуваат до појава на ИЦЗ. Во поново време во литературата се среќаваат сè повеќе податоци за ИЦЗ кај животните, меѓу кои особено важни се оние што се среќаваат кај кучињата и мачките како најчести домашни миленици. Истражувањата се насочени кон утврдување на патогенезата на болестите и воочување на сличностите и разликите со хуманите ИЦЗ, при што е утврден зголемен број на CD3+ Т-лимфоцити и CD79α В-лимфоцити кај болните во споредба со здравите животни. Клиничките манифестации на болеста кај животните зависат пред сè од локализацијата на воспалителниот процес, додека хистолошки,

зголеменото присуство на макрофаги или неутрофили во цревата претставува можност за постоење на инфекција. Класификацијата на болеста зависи од тоа кој клеточен инфилтрат доминира во ламина проприја.

За подобро разјаснување на патологијата на оваа болест, како и за влијанието на различни лековии третмани за истата, сè повеќе актуелни се истражувањата врз животински модели. Се користат различни животински модели, а како најчесто се користени моделите со хемиски индуциран колитис. Во ова истражување користен е модел на колитис предизвикан со ТНБС (тринитробензен сулфонска киселина) која во вид на 50% раствор во етанол се аплицира интаректално за предизвикување на колитис со слични својства како КБ. Токсичното дејство на ТНБС, проследено со акутно оштетување на колонот, главно, се должи на формирање на кислородни радикали со голема реактивност, како што се супероксидниот анјон и водород пероксид кои вршат неспецифично оштетување на интестиналниот сид (Morris и сор., 1989). Подоцна, се активира и задоцнетиот тип на хиперсензитивност преку Th1-одговорот кон хаптенот ТНБС, што понатаму резултира со хронично оштетување на колонот со слични карактеристики со КБ кај луѓето (Morris и сор., 1989). „Класичниот“ модел кој е користен во ова истражување се состои од единечна апликација на ТНБС која предизвикува акутен самоограничувачки колитис сличен на КБ, кој се карактеризира со трансмурална гранулоцитна и лимфоцитна инфилтрација и Т клеточен одговор (Neurath и сор.,1995) и кој најчесто се користи за испитување на епителната реституција и пролиферација како и за механизмите на Т-клеточна посредувана автоимуна цревна инфламација во различни стадиуми од еволуцијата на болеста.

Поради одредениот успех во третманите со антибиотици кај пациентите со ИЦЗ, сè повеќе се истражуваат функционалните прехранбени производи со пробиотици, пребиотици и синбиотици во превенција на ова заболување. Не се целосно разјаснети механизмите со кои пробиотиците го остваруваат антиинфламаторното дејство. Исто така, докажано е дека различни пробиотици, антиинфламаторното дејство го остваруваат на различни начини преку активација или супресија на различни клеточни субпопулации. Дел од пробиотиците, антиинфламаторното дејство го изразуваат доколку бидат аплицирани пред апликацијата на патогенот -превентивно. Тоа настанува делумно поради мукоатхерентниот потенцијал на самите пробиотици, преку компетитивна инхибиција на адхезијата на различни патогени. Според

литературните податоци, антиинфламаторното дејство се одвива преку различни механизми и тоа: преку индукција на протективните цитокини како што се IL-10 или трансформирачкиот фактор на раст бета или инхибиција на проинфламаторните цитокини, намалување на активацијата на миелопероксидазата и експресијата на TNF α , стимулација на продукцијата на масни киселини со кратки низи, инхибиција на инфилтрација на воспалителните клетки, како и намалување на мукозната пермеабилност.

Останува отворено прашањето во однос на генезата на структурните промени во слузницата на цревата, поради што се прават напори да се дефинира улогата на имунолошкиот систем во гастроинтестиналниот тракт во текот на болеста, како и при апликацијата на различни функционални прехранбени производи. Цревата претставуваат важен лимфатичен орган кој квантитативно претставува главна компонента на целокупниот имунолошки систем во организмот, што е од посебна важност за хомеостазата на интестиналниот тракт и имунолошките процеси во мукозните структури и кај другите органски системи. Иако најголем број патогени агенси влегуваат во организмот преку дигестивниот систем, слузницата на цревата во текот на еволуцијата развила локални механизми за одбрана од инфективните агенси. Еден дел од овој апарат се неспецифични механизми кои вклучуваат слуз, епител од ламина епителијалис, лизоцим од Панетовите клетки, маст-клетки, гама-интерферон и комплемент. Во последните дваесетина години, благодарение на примената на моноклонски антитела, дополнително се проширени знаењата за клеточните субпопулации на имунолошкиот систем.

Влијанието на функционалните прехранбени производи врз мукозниот блок на дебелите црева кај моделите на хемиски индуциран колитис не е целосно разјаснето, што е една од причините за спроведување на истражувањата во рамките на оваа докторска дисертација.

2. ПРЕГЛЕД НА ДОСТИГНУВАЊАТА НА НАУЧНАТА ДИСЦИПЛИНА ПОВРЗАНИ СО ПРЕДМЕТОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕ

2.1. Структура, функција и хистолошка градба на лимфоидното ткиво во цревата (анг. Gut Associated Lymphoid Tissues -GALT)

Цревната слузокожа опфаќа најголем процент од целокупната телесна површина и е во постојан контакт со факторите на надворешната средина, како што се храната, ендогените микроорганизми и патогени кои се одделени од имунолошките клетки со само еден слој од епителни клетки. За ефективна одбрана од повреди или од инфекции, имунолошкиот систем на мукозата мора да биде добро организиран и усогласен. Поради тоа, цревата се развиле во најголем имунолошки орган во телотона цицачите со воспоставени механизми, преку кои имунолошкиот систем ги штити цревата од патогени, а во истовреме им овозможува непречен развој на ендогените бактерии и апсорпција на хранливите материи. Интересно е тоа што ендогените бактерии не само што не поттикнуваат инфламаторен одговор, туку го поттикнуваат циркуирањето на сигналот, што позитивно влијае врз одржувањето на хомеостазата и заштита на ткивото (Melanie, 2015).

Вршењето на овие сложени процеси е задача на мезентеријалните лимфни чворови (МЛЧ), Паеровите плочи (ПП) и самостојните интестинални ткива претставени со криптоплочи (КП) и со изолираните лимфни фоликули (ИЛФ). Сите овие ткива се добро организирани, иако постојат разлики во нивната функција и развој. МЛЧ и ПП се формираат за време на неонаталниот развој и се дел од секундарните лимфни органи (СЛО), додека формирањето на солитарните интестинални лимфоидни ткива (СИЛТ) (пр. криптоплочите и ИЛФ) започнува по раѓањето (Melanie, 2015).

Во состав на градбата на пренаталните МЛЧ и ПП влегуваат високо организирани В-клеточни зони со повеќе герминативни центри и Т-клеточни зони изградени од Т-клетки и дендритични клетки. Непосредно над ПП се наоѓаат високо специјализирани М-клетки (М=микрофолд). Овие клетки, со нивната локализација помеѓу епителните клетки, се во директен контакт со цревните антигени. Нивната функција се состои во пренесување на антигените сигнали од луменот на цревата до ПП преку процесот на трансцитоза. МЛЧ контактираат со антигените од ламина

проприја на тенките црева преку аферентни лимфни садови. Антигените влегуваат во супкапуларниот синус меѓу капсулата на ЛЧ и клеточниот паренхим.

Криптоплочите, како наједноставни лимфоидни органи во ламина проприја се составени од индуцирачки клетки на лимфоидното ткиво (анг. lymphoid tissue inducer (LTi) cells) и стромални клетки опкружени со монофагоцитни клетки. КП подоцна се диференцираат во ИЛФ кои се градени од В-клетки, опкружени со Lt_i-клетки и монофагоцитни клетки (Melanie, 2015).

Најраните случувања во лимфното ткиво кај глвците се во 9,5 ден (E9.5) од ембрионалниот развој. Тогаш, ендотелните клетки во сидот на венските крвни садови започнуваат со формирање на протуберанција, која најнапред формира лимфни ќеси, а потоа до E15.5 се разгранува за да ја креира лимфатичната мрежа (Wigle and Oliver, 1999; Sabin, 1902, 1904). Најраниот анлаген на лимфните јазли се формира преку населување на сврзно ткиво во лимфните ќеси во развој, кон кои подоцна се привлекуваат и Lt_i-клетките (van de Pavert и соp., 2009). Развојот на ПП започнува околу E16-17 и тоа во проксималниот дел на цревата и потоа се продолжува кон дисталниот дел до раѓањето. Овој процес започнува со групирање на Lt_i-клетките кои претходно се распространети долж сидот на тенките црева (Adachi и соp., 1997, 1998; Veiga-Fernandes и соp., 2007; Yoshida и соp., 1999).

Lt_i-клетките се сметаат за едни од клучните клетки кои се неопходни за развој на организираниите лимфоидни структури. Тие се први кои влегуваат во анлагенот на лимфните фоликули за време на феталниот развој (Mebius и соp., 1996, 1997; Kelly и Scollay, 1992). Lt_i-клетките се развиваат од прекурсорите на феталниот црн дроб и се доминантна вродена ИЛС (анг. innate lymphoid cells) популација пред породувањето. На нивната површина не експресираат рекомбинантни антиген-специфични рецептори (Spits и соp., 2012).

Во формирањето на ПП учествуваат уште два типа на клетки. Едните се организирачки клетки на лимфоидното ткиво (анг. lymphoid tissue organizer (LTo) cells), кои влегуваат во интеракција со надојдените LT_i во анлагенот на лимфоидниот орган, притоа, градејќи тесно клеточно групирање. Третиот тип на клетки кои влегуваат во формирањето на ПП се тн. иницијаторни клетки на лимфоидното ткиво (анг. lymphoid tissue initiator (LT_in) cells) (Veiga-Fernandes и соp., 2007).

Кај стаорцити во тенкото црево, ПП се локализирани на антимезентеријалната страна на цревата. Тие се главно поголеми и побројни во дисталниот отколку во проксималниот дел на тенките црева. Во просек по 8 ПП се изброени кај Sprague-Dawley стаорците. Покрај Паеровите плочи, постојат и изолирани лимфни фоликули, помали од 1 mm во дијаметар. Бројот на фоликули во ПП, најчесто варира од 2 до 6, со понекогаш и повеќе од 12 во најголемите плочи. Тие варираат од 5 до 10 mm во должина и од 2 до 7 mm во ширина.

Во дебелото црево, лимфоидните агрегати се нееднакво распоредени во 4 региони: проксималниот пол на кекумот; проксималниот колон, на нивото на мускуларните набори со форма на рибина коска (17 до 19 cm од анусот); дисталниот колон, 3 до 4 cm од аналната маргина. Интермедијална локализација (10 до 12 cm од анусот) е најдена само со микроскопски преглед. Големината на лимфоидните формации во колонот е околу 5 mm, освен во дисталниот колон каде што големината им достигнува 10 mm. Овие плочи, главно, се формирани од 5 до 8 фоликули во мукозата и субмукозата, поминувајќи низ дисконтинуирианиот мускуларис мукоза.

Во некои од лимфоидните формации се вклучени жлездени цевчиња, блиску поврзани со околот лимфоидно ткиво. Тие се лоцирани под фоликулите, близу мускуларисот, како и во перифоликуларните области, со циркуларна дистрибуција околу фоликулите. Некои од интерфоликуларните жлезди изгледа дека се продолжетоци од парафоликуларните крипти. Овие жлезди се најдени во 10/45 ПП и во 3/34 колонски лимфоидни плочи кај нормални стаорци. Овие епителни жлезди поврзани со лимфоидното ткиво најчесто се атипични во споредба со цревните жлезди лоцирани надвор од лимфоидните плочи. Нивниот лумен најчесто е зголемен, полн со мукус и опкружен со епител, со или без присуство на гоблет клетки. Други жлезди се покриени со неколку слоеви на базофилен епител.

Солитарните цревни лимфоидни ткива (СИЛТ) претставени со КП и ИЛФ се детектираат најрано во втората недела по раѓањето и за разлика од ПП и ЛН, КП можат да се формираат и кај возрасни глупци (Bouskra и соp., 2008; Kanamori и соp., 1996; Taylor и соp., 2004). КП првично се опишани како мали кластери од Kit⁺ IL-7R α ⁺ Thy-1⁺ клетки лоцирани близу криптите на цревниот епител (Kanamori и соp., 1996).

Криптоплочите се мали насобири од Т-клетки и дендрични клетки со просечен дијаметар од 80 μ m (Eberl and Littman, 2004; Mowat and Viney, 1997; Pabst и соp.,

2005). Овие лимфоидните агрегати најдени во меѓу кристалната ламина проприја на тенките црева се формираат после доењето и се многу побројни од изолираните лимфни фоликули и ПП, околу 1700 кај возрасен глушец (Eberl and Littman, 2004). Постои теорија дека криптоплочите се лимфоидни ткива во кои се јавува екстратимусно насобирање на интраепителни лимфоцити (Eberl and Littman, 2004).

КП прво се развиваат во незрели ИЛФ, а подоцна во зрели ИЛФ. Овој процес е контролиран од факторите на околината, како што се цревната микрофлора и факторите за вдување на В лимфоцитите преку регрутирање на плазма клетките (Hamada и сор., 2002; Lorenz и сор., 2003; Pabst и сор., 2006; Taylor и сор., 2004; Eberl и Littman, 2004). КП се најчесто застапени во проксималниот дуоденум, а нивниот број опаѓа движејќи се кон дисталниот колон. ИЛФ пак се помалку застапени во проксималниот дел на цревата, а нивниот број се зголемува движејќи се кон дисталниот дел на цревата, како и со зголемувањето на количеството на бактерии (Pabst и сор., 2006; Taylor и сор., 2004; Kanamori и сор., 1996; Bouskra и сор., 2008). Криптоплочите се присутни кај germ free глвците, но за развојот на незрели и зрели ИЛФ потребни се сигнали од цревната микрофлора (Hamada и сор., 2002; Pabst и сор., 2006; Taylor и сор., 2004; Kanamori и сор., 1996). Бројот и големината ИЛФ се во тесна корелација со бројот на цревни бактерии.

Сите овие лимфатични ткива заедно го градат лимфоидното ткиво на цревата (анг. Gut Associated Lymphoid Tissues (GALT)), кое пак заедно со лимфоидното ткиво на назофаринксот (анг. Nasopharynx Associated Lymphoid Tissue (NALT) и бронхијалното лимфоидно ткиво (анг. Bronchus Associated Lymphoid Tissue (BALT)), го градат комплексот на мукозното лимфоидно ткиво (анг. Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT)), чија основна улога е продукција на IgA низ мукозните површини како дел од антиген специфичните, Th2- зависни реакции, иако реакциите посредувани од Th1 и цитотоксичните Т-клетки, исто така, може да се појават, кои пак резултираат со имунотолеранција (Gormley и сор., 1998; Kiyono и Fukuyama, 2004).

MALT се означува уште и како „заеднички мукозен имун систем“, затоа што различни негови делови, иако се анатомски разделени, сепак, се функционално поврзани, делувајќи заедно или независно од системскиот имун систем. Поради тоа, презентацијата на антиген и активацијата на В-клетките на едно место може да резултира со секреција на IgA во мукозата на различни органи. MALT ги опфаќа В-

клетките, CD4+ и CD8+ Т-клетките, антиген презентирачките дендритични клетки, макрофагите и понекогаш, маст-клетките и еозинофилите во интерфоликуларниот регион, клетки кои се доволни за започнување на имунолошкиот одговор. Т-клеточната активација, која резултира со промена на IgA класата, и клоналната експресија на В клетките се одвива во секундарните лимфоидни ткива кои ги содржи MALT. Помеѓу епителните клетки и ламина проприја во сите мукозни ткива се наоѓаат дифузно дисеминирани Т- лимфоцити кои се претежно CD8+ во епителниот слој и претежно CD4+ во ламина проприја. Во гастроинтестиналниот тракт тие го претставуваат најголемиот збир од единечни Т-лимфоцити во однос на целото тело. Тие се т.н. интраепителни лимфоцити (ИЕЛ) и претставуваат дел од MALT. Доста се застапени помеѓу епителните клетки и тоа 1 лимфоцит на 4-6 епителни клетки (Kelsall и Strober, 1999; Kuper и соp., 2002; MacDonald, 2003; Pabst и соp., 2005).

Во епителот кој што налегнува на лимфоидните фоликули се наоѓаат т.н. М-клетки. Тоа се епителни клетки чија улога е во транспорт на микроорганизми и други микро- и солубилни молекули од цревниот лумен до лимфоидното ткиво. На овој начин лимфоидното ткиво добива присап до луминалните антигени (Gebert и Pabst, 1999; Kelsall и Strober, 1999). Неколку лимфоцити и макрофаги се сместени во базалната мембрана на М-клетките, во вдлабнатина во вид на џеб (Gebert и Pabst, 1999; Pabst, 1987). Лимфогландуларниот комплекс во колонот е претставен со ПП и со крипти кои се протегаат во колонската субмукоза. Во однос на останатиот дел од дигестивниот систем, ПП во колонот се помали и имаат помалку фоликули со помали герминативни центри. Субмукозните крипти се поредени покрај фоликуларно поврзаниот епител и опкружени со лимфоидно ткиво (Owen и соp., 1991). Лимфогландуларните комплекси во проксималниот колон кај глувците и низ целиот колон кај стаорците се насочени кон антимезентеријалната граница (Deasy и соp., 1983; Morfitt и Pohlenz, 1989; Perry и Sharp, 1988), додека во дисталниот колон се неправилно распоредени со просек од околу 1,4 плочи на сантиметар колон (Owen и соp., 1991). Цекалните плочи, коишто претставуваат големи агрегати од лимфоидни фоликули во проксималниот цекум наспроти илеоцекалната валвула, исто така, имаат постојана локација (Owen и соp., 1991). Во ПП, областите со В-клетки се поголеми отколку областите со Т-клетки и тоа во однос на Т-клетки: В-клетки еднаков на 0,2 (Sminia и Kraal, 1999). Големината, бројот, дистрибуцијата и составот на ПП може да варира кај

различни видови или раси животни. Односот на CD4+ спрема CD8+ Т -клетките во ПП е 5,0 (Sminia и Kraal, 1999).

Изолираните лимфни фоликули се идентификувани кај стаорците, глувците, зајациите и гвинејските прасиња (Hamada и сop., 2002; Lorenz и Newberry, 2004; Pabst и сop., 2005). Помали се, но слични со ПП и имаат 1-2 В-клеточни фоликули кои може да содржат герминативни центри и мала популација на CD4+ Т-клетки, над кои лежи фоликуларно поврзан епител со М-клетки и распространети дендритични клетки со неколку макрофаги (Lorenz и Newberry, 2004; Pabst и сop., 2005). Изолираните лимфоидни фоликули не се присутни кај новородените глувци, станувајќи постојано забележливи со светлосен микроскоп во дуоденумот и проксималниот јејунум на возраст од 7 дена кај BALB/cA/JcI и на 25 дена кај C57BL/6J/JcI., а кај возрасни глувци нивниот број достигнува и до 200 (Hamada и сop., 2002).

2.2. Карактеристики на колитис при инфламаторни цревни заболувања

Инфламаторните цревни заболувања (ИЦЗ) се хронични инфламаторни болести на гастроинтестиналниот тракт кај луѓето и животните. Кај луѓето се втора најчеста инфламаторна болест, која се јавува меѓу 15 и 30-годишна возраст (Loftus и Sandborn, 2002). Се јавува во форма на Кронова болест (КБ) и улцерозенколитис (УК), кои меѓу себе се разликуваат во патогенезата и клиничките карактеристики. Досегашните истражувања укажуваат на различни компоненти во патогенезата на ИЦЗ, како што се генетската предизпозиција, микробиолошки фактори од околната средина, епителната бариера на цревата, како и вродениот и стекнатиот имунитет. Иако етиологијата и патогенезата на болестите се целосно познати, општо е прифатено дека ИЦЗ резултат на нарушен мукозен имун одговор кон факторите од околината кај генетски приемливи домаќини. За проучување на патогенезата на болестите, како и за развивање на лековити третмани за нивнолекување, развиени се анимални модели на ИЦЗ. КБ најчесто ги погодува илеумот и колонот и тоа во вид на фокална трансмурална инфламација, проследена со грануломи, стриктури и фистули, додека УК го зафаќа ректумот и повремено колонот и тоа со дифузна инфламација претежно на мукозата (Abraham и Cho, 2009). Со помош на Genome-wide association studies (GWAS), досега се идентификувани околу 163 генетски локации поврзани со ИЦЗ. 110 од нив се поврзани со двете болести, 30 се специфични за КБ, а 23 за УК (Jostins и сop., 2012). Генетските варијации поврзани со зголемена приемливост за КБ се воглавно поврзани со

вродениот имунитет, автофагија и фагоцитоза (Xavier и Podolsky, 2007), додека кај УК, генетските варијации се главно поврзани со бариерната функција. Како најчеста генетска алтерација поврзана со КБ е идентификуван полиморфизам на NOD2-генот (Barrett и сop., 2008; Strober и Watanabe, 2011), кој пак е поврзан со МНС-кроспрезентацијата, индукцијата на аптофагија и отпорноста на интрацелуларни бактериски инфекции (Wagner и Cresswell, 2012; Cooney и сop., 2010; Homer и сop., 2010). Исто така е откриена и поврзаност помеѓу ИЦЗ и IL23R-генот, кој ја кодира субединицата на рецепторот за IL-23, проинфламаторен цитокин вклучен во генерирањето на Th17 клетките. GWAS при УК посочува на алтерации во регионот на комплексот на ткивно совпаѓање класа II во близина на HLA-DRA (α -синцирот) (Silverberg и сop., 2009; Stokkers и сop., 1999).

Проучувањата на болеста покажале дека широка лепеза од фактори на околината влијаат врз појавување на болеста. Меѓу нив, како најзначани се вбројуваат: исхраната, пушењето, лековите, стресот и микробиолошките фактори (Danese и сop., 2004). Неправилната исхрана, нестероидните анти-инфламаторни агенси (НСАИЛ), состојби со расположението, како што е депресијата, се само дел од примерите (Silverstein и сop., 1989; Amre и сop., 2007; Kaufmann и Taubin., 1987).

Најголемиот дел од спроведените истражувања во врска со болеста укажуваат на неоспорената улога на интеракцијата меѓу микрофлората и имунолошкиот систем како клучен етиолошки и патогенетски фактор (Macdonald иMonteleone, 2005). Важноста на улогата на бактериите во патогенезата се гледа и по успешноста на антибиотските терапии (Danis, 1991) во справувањето со болеста, како и примената на пробиотици во превенцијата и ублажувањето на болеста (Corridoni и сop., 2012; Gionchetti и сop., 2003). Епителот на цревата претставува граница меѓу антигените од луменот на цревата и имунолошкиот систем на цревата. Одамна постои претпоставката за абнормалната цревна епителна бариера како причина за ИЦЗ. Според оваа теорија, нарушената функција на интестиналната епителна бариера дозволува зголемен влез на антигени преку цревната мукоза, што доведува до засилен имунолошки одговор (Shorter и сop., 1972). Кај пациентите со ИЦЗ, забележана е зголемена пропустливост на интестиналниот епител од нормалната. Сепак, зголемената пермеабилност сама за себе не е доволна за да предизвика ИЦЗ, но игра важна улога во нејзината етиологија и патогенеза.

2.3. Имунолошкиот одговор при ИЦЗ

Идентификацијата на различни клетки од имунолошкиот систем е неопходна за изучување на патогенезата на инфламаторните заболувања кај различни животни и кај човекот. Поради тоа, имунохистохемскиот метод станува сè поважна во истражувањата. Најчесто користен е методот која се базира на директна имунофлуоресценција на смрзнати пресеци од соодветните органи, но нејзин основен недостаток е неможноста за воочување на хистолошката структура, што може да влијае врз поставувањето на правилна дијагноза. За разлика од оваа метода, имунохистохемскиот метод овозможува истовремено откривање на антигените и на морфолошките промени, а се изведува на ткивни примероци фиксирани во формалин и вклопени во парафин.

Изучувањето на CD-антигените на клетките од периферните лимфатични органи до скоро беше доста отежнато со оглед на конвенционалното фиксирање и калапење на ткивата, што доведува до деструкција на антигените. Различни методи на откривање на епитопите на клетките од лимфатичните ткива кај говедата, глувците, стаорците даваат одредени резултати. Употребата на криостатските ткивни пресеци и алтернативни фиксативи, покрај вообичаената практика за вклопување во парафин, довела до одредени подобрувања, што не било доволно за зачувување на хистолошките детали, како при фиксацијата во формалин, којашто се користи за патолошка дијагностика во лабораториите ширум светот.

Имајќи го предвид фактот дека најголем број патогени агенси влегуваат во организмот преку дигестивниот тракт, слузницата на цревата во текот на еволуцијата развила локални механизми за одбрана против штетните агенси. Еден дел од овој апарат се неспецифичните механизми кои вклучуваат слуз, епителот од ламина епителијалис, лизоцим од Панетовите клетки, мастоцити, гама-интерферон и комплемент. Површината на цревата, како и останатите делови од гастроинтестиналниот тракт (ГИТ), е обложена со мукус кој го лачат гоблет-клетките и кој претставува неспецифична одбранбена бариера преку своите особини (атхезивност, вискозност, способност за атсорпција и неутрализација на киселите производи). Значаен фактор за одбранбената функција на епителот се и антимикробните пептиди, како што е α -дефензин кој го лачат Панетовите клетки. Дел од неспецифичната одбрана претставуваат микровилите од епителните клетки и

гликокаликсот. Брзата замена на епителните клетки од слузницата на цревата е уште еден дополнителен механизам на одбрана од инвазија на микроорганизми и паразити (Soos и соp., 2000; Pabst и Rothkotter, 1999; Narita и соp., 1996). Кај ИЦЗ се јавува оштетување на епителниот слој во вид на ерозии, улцерации и намалување во продукцијата на дефензинот, што како последица се појавува зголемување на влезот на интестиналната микробиота и зголемување на инфламаторниот одговор (Taupin и Podolsky, 2003; McVay и соp., 2006; Wehkamp и соp., 2005; Simms и соp., 2008).

Епителниот слој во цревата претставува физичка граница помеѓу микробиомот и антигените од цревниот лумен од една страна, и лимфното ткиво во цревата, од друга страна. Притоа ефикасноста на оваа бариера зависи од цврстината на меѓуклеточните врски што ја градат, како и од големината на меѓуклеточниот простор. Зголемената пропустливост на парацелуларниот простор која се јавува при ИЦЗ можеби настанува како примарен дефект во функцијата на бариерата или може да е резултат на самото воспаление (Turner, 2006). Епителот на цревата заедно со лимфоцитите и макрофагите во мукозата и субмукозата претставува развиен комплексен систем за блокирање, толеранција, неутрализација и елиминација на антигените. Стабилноста и самообновувањето на интестиналниот епител во најголема мера е регулирано од страна на сапрофитската цревна флора. Групата непатогени бактерии која се наоѓа во цревата даваат важни инструкции во врска со програмирањето на епителната дегенерација. Бројноста и регионалниот распоред се важни за стабилноста на цревната флора, а со тоа и за хомеостазата на цревниот епител. Лимфатичното ткиво на интестиналниот тракт кое всушност претставува повеќе од 70% од сите имуни клетки (коскена срцевина, тимус, слезена и лимфните чворови), е од голема важност за хомеостазата на интестиналниот тракт, како и за имунолошките реакции во мукозните структури и кај другите органски системи (Gordon и соp., 1997). Ламина епителијалис кај цревата е составена од еднослоен високопризматичен епител и пехарести клетки. Бројот на овие клетки е особено поголем во слузницата на дебелото црево.

При нормална состојба, гоблет-клетките лачат слој од мукус кој го ограничува контактот помеѓу епителните клетки и бактериите, додека Панетовите клетки преку продукција на антимикуробни пептиди (пр. α -дефензини) дава дополнителна заштита од луминалните микроорганизми. Тука важна улога има и продукцијата на IgA. Вродениот осет за микроби од страна на епителните, дендритичните клетки и макрофагите е посредуван преку рецептори за препознавање на шеми како што се

“tool-like”-рецепторите и протеините за нуклеотидно олигомериозациски домен (NOD). Дендритичните клетки ги презентираат антигените на наивните CD4+ Т-клетки во секундарните лимфоидни органи (ПП и МЛЧ), каде што факторите како што се фенотипот на антиген- презентирачките клетки и цитокините (анг. transforming growth factor β [TGF- β] и IL-10) го модулираат диференцирањето на карактеристични профили на цитокини на субгрупите од CD4+ Т-клетките со регулаторни Т-клетки [пр. Трег] и помошнички Т клетки [пр. Th1, Th2 и Th17], а и ентеротропните молекули (пр. $\alpha 4\beta 7$) се индуцирани, што овозможуваат лимфоцитите од системската циркулација да се вдомат во цревата. Овие активирани CD4+ Т-клетки потоа циркулираат во цревната ламина проприја, каде што вршат ефекторска функција.

Различни фенотипови на лимфоцити се наоѓаат во ламина епителијалис. Лимфоретикуларната компонента на ГИТ ја сочинуваат лимфоцити организирани во солитарни лимфни фоликули или ПП. Во организираниот имунолошки систем на цревата влегуваат и интраепителните лимфоцити, плазмозити, макрофаги и мастоцити од ламина проприја. GALT како високоорганизиран дел од имунолошкиот систем на организмот се карактеризира со строго одредена дистрибуција на поединечни субтипови Т и В-лимфоцити.

Лимфното ткиво на цревата се состои од лимфоцити кои може да бидат поединечни и дифузно распространети во епителот и ламина проприја или се групирани во вид на чворови т.е. мукозни фоликули (анг. Noduli lymphatici solitarii) или како лимфатични агрегати кои ги образуваат ПП сместени во мукозата и субмукозата на цревата. Интраепителните лимфоцити (ИЕЛ) претставуваат единствена популација од мали и големим лимфоцити сместени во базалната мембрана помеѓу епителните клетки. Ламина проприја на цревните ресички содржи голем број В-клетки, плазма-клетки, макрофаги, дендритични клетки и Т-клетки со CD4+ и CD8+ фенотип. Оваа популација лимфоцити се означува како лимфоцити од ламина проприја и на својата површина експримираат маркери слични со лимфоцитите од периферните ткива. Во последните дваесетина години, примената на моноклонски антители против различни CD (анг. cluster of differentiation) антигени на леукоцитите помогнала за подобра класификација и дефиниција на функцијата на имуноцитите од ГИТ.

Болестите на цревата претставуваат еден од најчестите причини за појава на болест и смрт кај луѓето и животните. Овој податок претставува предизвик за

научниците во изнаоѓање на нови стратегии со цел зголемување на ефикасноста на мукозниот имунитет. Како резултат на ова се настојува да се изврши индукција на имунолошкиот одговор во цревата, како и последична дисеминација на ефекторските клетки и молекули до интестиналните и екстраинтестиналните региони. Ефективната индукција на IgA е зависна од Т-клетките и бара поврзаност меѓу Т и В-клетките во рамките на GALT. Ослободувањето на IgA-антителата на мукозните површини, исто така, зависи од Т-клетките, но антигените иницираат одржување на имунолошкиот процес. Антигените влегуваат преку епителната бариера на ГАЛТ и ги стимулираат ефекторските клетки на цревата, иако антигените презентирани на овој начин, преку епителот на цревните ресички, можат да предизвикаат супресивен одговор.

Процесот на имуноактивација започнува со пенетрирањето на патогенот преку површинскиот епител. Транспортирањето на патогенот низ интестиналниот епител се врши со М-клетките кои го презентираат на субепителните лимфоцити во ПП, како и ентероцитите. Во исто време, ИЕЛ се активирани и секретираат интерферон кој ја зголемува способноста на ентероцитите да го презентираат антигенот. ИЕЛ може да предизвикаат цитолиза на патогенот. Во ПП, Т-лимфоцитите од парафоликуларните региони реагираат со антиген презентирачките клетки (АПЦ) и антигените пептиди и се активираат. В-лимфоцитите во фоликуларните области на (ПП) се примарно активирани во интеракција со антигенот и нивните површински имуноглобулини. Активацијата на В-лимфоцитите е засилена преку помошничките Th-лимфоцити, така што В-лимфоцитите пролиферираат во герминативните центри на фоликулите во ПП. Повеќето В-лимфоцити во оваа фаза се IgA-позитивни. Сите лимфоцити ги напуштаат ПП преку крвните садови до мезентеријалните лимфни чворови и слезината, каде што се продолжува понатамошната клеточна активација. Активираниите лимфоцити, потоа, се враќаат до цревата, било директно или преку периферната циркулација. Оние кои директно доаѓаат до цревата се диференцираат во ефекторски клетки и влегуваат во ламина проприја. Во ламина проприја плазма-клетките и цитотоксичните лимфоцити го уништуваат патогенот. Активираниите Th-лимфоцити во ламина проприја веројатно ја помагаат локалната активација на неколку преостанати В-лимфоцити. Т-супресорските лимфоцити влегуваат во епителот за да станат ИЕЛ и го регулираат одговорот преку супресорските и контрасупресорските активности. ИЕЛ се исто така цитотоксични за луминалните антигени. Активираниите лимфоцити кои не се враќаат во цревата, директно влегуваат во торакалниот дуктус и потоа во венската циркулација.

Вака се прави префрлање на локалниот во системски имунолошки одговор и лимфоцитите кои памтат се распространуваат низ целото тело.

Во ламина проприја при ИЦЗ се одвива засилена инфилтрација со вродени имунолошки клетки (неутрофили, макрофаги, дендритични клетки и НК Т-клетки) и стекнати имунолошки клетки (В-клетки и Т-клетки). Ова доведува до зголемување на локалното ниво на $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $INF-\gamma$ и цитокини од односот $IL23-Th17$ (Clara и Judy, 2009).

ПП содржат ефекторски Т и В-лимфоцити како и регулаторски Т-лимфоцити како што се: помошничките Т-лимфоцити, регулаторните лимфоцити специфични за IgA и антисупресорски клетки. Имунизација на еден дел од мукозата, често доведува до создавање антитела со иста специфичност во други подрачја од организмот. Од ова може да се заклучи дека клетките активирани во пределот на мукозата ќе се распределат по другите мукозни ткива, каде што, ако наидат на истиот антиген, ќе пролиферираат и ќе ја прошират општата заштита на мукозата. Поради тоа и поради големата количина на лимфатично ткиво во цревата, оралната имунизација би бил најдобар начин за постигнување на целосна имуност на мукозата (Green и сор., 1997).

Епителот кој ги обложува мукозните ткива не претставува целосна механичка препрека за макромолекулите и партикуларните антигени, кои можат да продрат или помеѓу епителните клетки, односно низ специјализираните клетки на лимфоепителот, познати како М-клетки. При патолошки процеси во слузницата, пропусливоста може да се промени, што секако доведува до засилена локална реактивност на зголемената количина на антиген.

Антигените кои влегуваат во цревата го стимулираат развојот на локалниот и системскиот имунолошки одговор преку механизми кои не се целосно познати. Влезот на антигени преку епителната бариера во подлабоките структури на мукозата најверојатно се одвива преку М-клетките кои се дефинирани како специјализирани епителни клетки кои се појавуваат само во епителот на лимфните фоликули.

ИЕЛ на цревата претставуваат многу голема популација од клетки кои се лоцирани на местата на влез на антигените во цревата. Посебно добро се проучени кај глувците и стаорците. Имаат цитотоксично дејство, создаваат различни цитокини и поседуваат супресорски способности. Кај глувците се дефинирани како тимус-зависни

и тимус-независни Т-лимфоцити. Поседуваат различни фенотипски и функционални способности во зависност од тоа дали се сместени во тенките или во дебелите црева. Бројот на ИЕЛ се зголемува со староста. Ова зголемување е многу помало кај germ-free глумците во однос на глумците кои се чуваат во нормални услови.

Лamina проприја во цревата содржи бројни лимфоцити кои се ефекторски клетки, како и мемори-клетки на цревниот имунолошки систем. Постојат податоци по кои лamina проприја е густо населена со антиген презентирачки клетки, вклучувајќи макрофаги и дендритични клетки. Бројот и фенотипските карактеристики на лимфоцитите од лamina проприја директно зависи од староста на стаорците и од цревната бактериска флора.

Од имуноглобулините во мукозниот имунитет најголема важност имаат IgA и тоа поради нивната брза синтеза и способноста за транспорт низ мукозниот епител. IgA кои се наоѓаат во крвната плазма се со мономерен облик, додека секреторниот IgA е димер или пентамер. Примарната улога на секреторните IgA е заштита на слuzницата. Фиксиран на површината на слuzницата, sIgA претставува имуноспецифична бариера (тн. антисептична маст), која ја штити слuzницата од бројните микроорганизми кои постојано се внесуваат од надворешната средина во дигестивниот тракт. На овој начин, sIgA спречува припојување на микроорганизмите за епителот на слuzницата и го спречува нивното продирање во организмот. Од друга страна, sIgA има способност да создава нерастворливи комплекси со антигените кои доаѓаат во контакт со слuzницата и на тој начин спречува нивна ресорпција.

IgA е од голема важност за одржување на цревната хомеостаза и во форма на секреторен IgA (SIgA) претставува главен изотип на антитела во гастроинтестиналниот тракт. Неговата улога е како прва одбранбена линија против разни микроби и антигени. Него го продуцираат плазма клетките преку Т-клеточно-зависен и Т-клеточно-независен пат, при што постојат разлики во експресијата и антигената специфичност. Така, SIgA произведен со Т-клеточно-зависниот начин тежнее кон продукција на антитела со афинитет спрема одредени микроби и токсини. За разлика од него, Т-клеточно-независниот SIgA произведува антитела кои се претежно со низок афинитет и специфичност (Jason, 2015).

Според некои истражувачи, за патогенезата на ИЦЗ од голема важност е сепенот на покриеност на бактериите со IgA. Забележано е и зголемено присуство на

IgA+ бактерии во фецесот кај заболените со ИЦЗ и кај експериментални модели на колитис. Кај здравите индивидуи биле пронајдени бактериски соеви како кај ИЦЗ пациентите, но не биле покриени со IgA. Направено е и истражување во кое од столица на пациенти со ИЦЗ се создадени IgA+ и IgA- бактериски популации, кои подоцна биле аплицирани кај СПФ-гљувци и не предизвикале клинички промени. Но кога истите биле дадени на гљувци со ДСС (декстран содиум сулфат)-индуциран колитис, кај IgA+ групата бил предизвикан многу посилен колитис во споредба со IgA- групата (Jason, 2015).

Населувањето на цревата со микроорганизми во постнаталниот живот има големо значење за развојот на ГИТ. Тоа влијае врз здравјето, па дури и врз преживувањето на младенчињата, имајќи го предвид директното влијание на цревната флора врз имунолошките механизми и синтезата на антитела за време на неонаталниот период, со цел адекватна замена на пасивните антитела добиени преку млекото. Микроорганизмите кои влегуваат во состав на цревниот микробиом се стекнати уште при раѓањето, но значително се менуваат во текот на животот под дејство на различни фактори на околината. Микроорганизмите, покрај обезбедувањето на важни хранливи материи и моделирањето на енергетскиот метаболизам, влијаат и врз развојот на имунолошкиот систем на цревата (Backhed, 2005). Развојот на цревната микрофлора индуцира лимфоцитна инфилтрација во ламина проприја на цревата, со доминација на имуноцитите кои секретираат IgM и IgA. Двата имуноглобулина се транспортираат низ епителот преку везикули со потекло од мембраната на епителните клетки.

Улогата на имунолошкиот систем во појавата и патогенезата на ИЦЗ сè уште не е целосно позната. Се знае само дека претставува кулминација на ефектот од останатите етиолошки фактори. Досегашните истражувања покажале дека CD4+ лимфоцитите со тип 1 хелпер Т-клетки (Th1) фенотип се доминантни кај пациентите со КБ, додека кај пациентите со УК се доминантни CD4+ лимфоцитите од Th2-фенотип. Уште еден тип CD4+-фенотип, Th17-клетките се поврзуваат со ИЦЗ, меѓутоа, нивната улога е сèуште дискутабилна (Fujino и сор., 2003; Fuss и сор., 2004). Одредени истражувања упатуваат на улогата на Treg во одржувањето на цревната хомеостаза. Во отсуство на инфламаторни медијатори, TGF- β го поттикнува развојот на овие клетки, кои пак вршат супресија на воспалителните процеси, но во присуство на про-инфламаторни цитокини, како што се IL-6, TGF- β , предизвикува диференцијација на Th17-клетките, со што се нарушува хомеостазата на цревата (Bettelli и сор., 2007).

Според поновите истражувања, дефекти во вродениот интестинален имунитет, а не прекумерната реакција на стекнатиот имунитет, доведуваат до појава на ИЦЗ. Дури и мали девијации кај одредни вродени цитокини можат да предизвикаат имунолошки нарушувања, што може да резултира со хронично цревно воспаление. Ова се однесува на вродените цитокини: TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-33 и TL1A (цитокин сличен со тумор некторичниот фактор алфа), како и на сигналните молекули: NF- κ B (нуклеарен фактор κ B), MAPK (митогенетски активирана протеин киназа) и MyD88 (миелоид диференцирачки ген за примарен одговор 88) (Vamias и сор., 2012). Овие молекули во акутната фаза од инфламацијата ја одржуваат цревната хомеостаза преку зачувување на интегритетот на епителната бариера, додека при доцните фази на хронична интестинална инфламација, настанува нарушување во функцијата на еден или повеќе од хомеостатските механизми што резултира со преголема или премала продукција на цитокини. TNF- α првично се сметал за проинфламаторен вроден цитокин, но подоцна било докажано дека TNF- α може да покажува и антиинфламаторни одлики (Corridoni и сор., 2012; Noti и сор., 2010).

Најчесто користен животински модел за ИЦЗ се глувците и стаорците. Постојат 4 поголеми групи на животински модели за ИЦЗ и тоа: хемиски предизвикан колитис (најчест модел), адаптивен трансфер на имунолошки клетки, генетски инжинирани и со спонтан колитис. Најчесто користени хемикалии за предизвикување на колитис се: ТНБС (тринитробензен сулфонска киселина) во 50% раствор на етанол, интраректална администрација на оксалазон растворен во етанол или администрација на декстран сулфат содиум (ДСС) во водата за пиење.

2.4. Инфламаторните цревни заболувања (ИЦЗ) и имунолошкиот одговор при колитис кај домашните животни

Во поново време во литературата се среќаваат се повеќе податоци за ИЦЗ кај животните, меѓу кои особено важни се оние што се среќаваат кај кучињата и мачките како најчести домашни миленици. Истражувањата се насочени кон утврдување на патогенезата на болеста и воочување на сличностите и разликите со хуманите ИЦЗ. Така на пример, за ИЦЗ кај кучињата се сметаат цревните воспаленија кои траат подолго од три недели и притоа постои хистолошка потврда за мукозно воспаление, додека сите други можни причини за ентеритис се исклучени (Washabau и Holt, 2005; Kleinschmidt и сор., 2007; Schreiner и сор., 2008). Во зависност од типот на клеточен

инфилтрат што доминира при воспаление на тенките црева, се разликуваат следните форми на ИЦЗ кај кучињата: лимфоцитно-плазмоцитен ентеритис (LPE), еозинофилен ентеритис и еозинофилен гастроентеритис (EGE); додека кај дебелиите црева се разликуваат следните форми: лимфоцитно-плазмоцитен колитис, еозинофилен колитис, хистиоцитен-улцеративен колитис (HUC) (со PAS-позитивни макрофаги) и регионален грануломатозен колитис (со PAS-негативни макрофаги) (German и сор., 2001). Диференцијално дијагностички важна болест кај кучињата е дијареа како резултат на храна (анг. Food responsive diarrhea – FRD), која всушност претставува хроничен ентеритис со непозната етиологија. Постојат хипотези дека настанува како резултат на алергиски фактори (Cave, 2003).

ИЦЗ се јавува како една од најчестите состојби на хроничен ентеритис кај мачките. Најчесто форма е лимфоцитоплазматичен ентеритис, а постојат и еозинофилен, грануломатозен и супуративен ентеритис (German и сор., 2001; Jergens, 1999; German и сор., 2000). Клинички знаци на болеста се повраќање, дијареа, губење на телесната тежина. Се смета дека ИЦЗ се јавува во еднаков процент кај машките и женските животни претежно на средовечна возраст. Во однос на расната предиспозиција, забележана е зголемена инциденца на имунопролиферативна ентеропатија кај Basenjis, ентеропатија со загуба на протеини поврзана со нефропатија со загуба на протеини кај Soft-Coated Wheaten Terriers и HUC кај боксерите (German и сор., 2000).

Како за луѓето, така и за кучињата се смета дека болеста е резултат на неправилен имунолошки одговор на цревата кон цревната микрофлора кај генетски предиспониран домаќин (Burgener и сор., 2008). Ова е поддржано и со податокот дека бактериите од тенките црева кај кучињата со ИЦЗ се разликуваат од бактериите кај здравите кучиња (Xenoulis и сор., 2008). Кај мачки со ИЦЗ е забележана тесна корелација помеѓу количеството на мукозно-поврзаните *Enterobacteriaceae* и хистолошките промени на дуоденумот како и клиничките знаци на болеста (Janeczko и сор., 2008). Нов тип на *E. coli*, таканаречен атхерентен и инвазивен тип на *E. coli* е изолиран од мукозата на колонот и илеумот од хумани пациенти со КБ и кучиња со грануломатозен колитис (Simpson и сор., 2006), чии фенотипски сличности се детално истражеин и потврдени за расата боксер. Доказ за важноста на луминалните бактерии дава и податокот дека третманот со метронидазол и тилозин ја елиминира болеста кај мачки и кучиња, соодветно (Grove и сор., 1977). Кај мачките и кучињата со ИЦЗ е

забележано зголемено присуство на IgG+ плазма-клетки како и на CD3+, CD4+ и CD8+ T-клетките во ламина проприја. Зголемен е и бројот на неутрофили и на макрофаги, додека намален е бројот на маст клетките (Westermarck и сор., 2005; Jergens и сор., 1999;). И кај кучињата и кај мачките со ИЦЗ е забележана мешовита Th1/Th2-цитокина активација (Janeczko и сор., 2008; Peters и сор., 2005). Во истражувањата кај кучиња со ИЦЗ е утврдено дека В-лимфоцитите учествуваат со помалку од 1% од изолираните интраепителни леукоцити, додека мнозинството припаѓало на Т-клеточната популација, од кои CD8+ биле доминантни во однос на CD4+-лимфоцитите (German и сор., 2001). Патогенезата на болеста кај домашните животни во голема мера соодветствува со онаа кај луѓето, што може да се согледа според податокот дека мешаниот Th1/Th2-цитокин одговор кај кучињата со ИЦЗ не се разликува од Th2 одговорот кај УК, додека пак постојат многу сличности помеѓу грануломатозниот колитис кај кучињата од расата боксер и КБ кај луѓето (German и сор., 2000; Simpson и сор., 2006).

Направена е споредба во концентрацијата на CD3+ Т-лимфоцитите и CD79 α В-лимфоцитите во колонот кај здрави и кај кучиња со лимфоцитно-плазмоцитен колитис. Притоа е утврдена значително поголема застапеност на CD3+ Т-лимфоцитите и CD79 α В-лимфоцитите кај болните во споредба со здравите кучиња (Stonehewer и Simpson, 1998). Во друго истражување е направена споредба на бројот на CD3+ Т-клетки и плазма-клетките кај здрави кучиња и кај кучиња со ИЦЗ, при што е утврдено дека кај болните кучиња дошло до зголемување на бројот на CD3+ Т-клетките, IgG+-плазма клетките, макрофагите и неутрофилите во ламина проприја кај тенките црева со истовремено намалување на бројот на маст клетките. Бројот на интраепителните CD3+-леукоцити бил, зголемен кај болните животни (German и сор., 2001).

Клиничките манифестации на болеста кај животните зависат, пред се, од локализацијата на воспалителниот процес. Така, воспалението на желуднкот и на дуоденумот се манифестира со повраќање и дијареа од тенките црева. Воспалението пак на колонот пројавува дијареа од дебелото црево со крв и мукус. Кај некои мачки, воспалението може да ги зафати и црниот дроб или панкреасот. При силен ентеритис може да се јави асцитис, како резултат на губење на цревните плазмени протеини (пр. панхипопротеинемија) (Albert и Kenneth, 2012).

Хистолошки, зголеменото присуството на макрофаги или неутрофили во цревата претставува можност за постоење на инфекција, додека класификацијата на болеста зависи од тоа кој клеточен инфилтрат доминира во ламина проприја. Зголеменото присуство на еозинофили посочува на можна паразитна инвазија или нетолеранција кон одредена храна. Најчеста форма на ИЦЗ претставува „лимфоплазмоцитниот ентеритис“, кој се одликува со зголемено присуство на лимфоцити и плазма-клетки и по сè изгледа дека постои расна predisпозиција за Basenji, Lunde hund и кинескиот шарпеј (Albert и Kenneth, 2012).

Кај коњите, исто така, постои група на хронични болести на цревата кои се вбројуваат во ИЦЗ, а кои главно се одликуваат со малапсорпција и малдигестија на тенките, а поретко и на дебелиите црева. Малапсорпцијата претставува нарушување во апсорпцијата на протеини, витамини, минерали и други хранливи материи во цревната мукоза, додека малдигестија, неправилно разградување на микронутриентите. Како и кај човекот, и кај коњите поделбата на ИЦЗ се прави врз основа на клеточниот инфилтрат што доминира во мукозата и субмукозата на цревата (Divers и сор., 2006). Така, кај коњите познати се следните форми на ИЦЗ: идиопатски еозинофилен ентероколитис (анг. Idiopathic eosinophilic enterocolitis-EC), мултисистемска еозинофилна епителотропна болест (анг. Multisystemic eosinophilic epitheliotropic disease-MEED), грануломатозен ентеритис (анг. Granulomatous enteritis-GE) и лимфоцитно-плазмоцитен ентероколитис (анг. Lymphocytic-plasmacytic enterocolitis - LPE) (Schumacher и сор., 2000).

2.5. Анимални модели на инфламаторни цревни заболувања (ИЦЗ)

Нашето разбирање за болеста во поглед на етиологијата, патогенезата и третманот за различни болести, меѓу кои и ИЦЗ, во последните години е доста проширено благодарение на истражувањата на различни живтински модели. Глувците и стаорците, покрај разликите што постојат, претставуваат важен дел од имунолошкиот и патолошкиот аспект на хуманите ИЦЗ, поради што претставуваат важна алатка во истражувањето на патолошките механизми и имунолошките процеси кои се основа на хроничната мукозна инфламација, вклучувајќи ги ДСС (со одлики на УК) и ТНБС (со одлики на КБ) моделите на колитис во ИЦЗ (Strober и сор., 2002). Неколку фактори ги прават моделите на глувци и стаорци со хемиски индуцирана интестинална инфламација особено погодни за проучување на болеста. Пред сè, тоа што (а)

почетокот и траењето на инфламацијата се непосредни и се под контрола, (б) не постојат вештачки генетски делеции или манипулации кои вообичаено не се наоѓаат во хуманото ИЦЗ (Strober и сop., 2002; Wirtz и сop., 2007), а постојат и податоци дека хемиските модели на глувци и стаорци се слични со хуманата ИЦЗ во многу аспекти, вклучувајќи ја и цитокината дисрегулација (Mizoguchi и Mizoguchi, 2008), поради што се особено погодни за проучување на вродениот и стекнатиот имунитет во цревниот имунолошки одговор (Strober и сop., 2002; Wirtz и сop., 2007).

Во текот на изминатите години, развиен е голем број експериментални животински модели на интестинална инфламација кои обезбедија важни податоци за механизмите кои ја одржуваат мукозалната хомеостаза или ја спроведуваат цревната инфламација. Нивното проучување ја овозможи идентификацијата на различни цели за третман и за истражување на нови лекови, главно, биолошки лекови. Безбедноста и терапевскиот ефект на овие агенци е проценет во голем број клинички студии, но само мал дел од нив стигнале до клиничка пракса. Како поважни експериментални модели се истакнуваат: експериментални модели на колитис со дефекти во епителната бариера; експериментални модели на колитис со дефекти во вродениот имунитет; експериментални модели на колитис со нарушување во стекнатиот Т-клеточен одговор и експериментални модели на колитис со прекумерен ефекторски клеточен одговор.

Нарушувањето во функцијата на епителната бариера во патогенезата на ИЦЗ е докажано преку анималните модели на колитис, кај кои хемиски нарушувања или генетски дефекти во епителната бариера резултираат со интестинална инфламација. Апликацијата на ДСС во водата за пиење кај глувците предизвикува акутна колонска инфламација, која се манифестира со губење на тежината, дијареа и ректално крварење (Okayasu и сop., 1990). ДСС доведува до развој на цревна инфламација поради зголемена епителна пермеабилност како резултат на губење на зонула оклуденс, предизвикано со врзување на двовалентните катјони (пр. Ca^{++} , Mg^{++}) (Poritz и сop., 2007). Според повеќето карактеристики, ДСС-колитисот е доста сличен со УК.

N-кадхерин претставува трансмембрански протеин кој има важна функција во клеточната адхезија преку формирање на адхерентни врски на начин кој е зависен од калциумот (Radice, 2013). Кај глувците со доминантен негативен N-кадхерин мутиран протеин под контрола на I-FABP-промотер активен во епителните клетки на тенкото црево се развива воспаление на тенкото црево со сегментална дистрибуција слично како кај КБ (Hermiston и Gordon, 1995). Мукозниот слој од цревата претставува површински заштитен слој со протеински состав кој го лачат гоблет-клетките. Содржи

голема количина на антимицробни пептиди, со што го оневозможува продирањето на патогени. Глувците $Muc2^{-/-}$ кои имаат дефекти во производството на муцин развиваат колитис кој е феностипски сличен со УК (Van der Sluis и сop., 2006). Глувчешкиот ген одговорен за резистентност на повеќе лекови (анг. multiple drug resistance) 1a ($mdr1a$) учествува во регулацијата на епителната трансцелуларна пропустливост. Кај глувците $Mdr1a^{-/-}$ се јавува зголемена епителна пропустливост, поради што спонтано развиваат инфламација слична на УК (Panwala и сop., 1998). Развојот на колитис кај глувци кај кои постои недостаток од В и Т-клетки е доказ дека стекнатиот имунитет не е апсолутно неопходен за да настане воспаление на цревата. Од друга страна, присуството само на дефекти во вродениот имунитет се доволни за сами да ја нарушат цревната хомеостаза. Такви „вродени“ модели на експериментален колитис може да бидат создадени со користење на имунодефициентни глувци (анг. Severe combined immunodeficiency-SCID или Recombination-activation gene-RAG-дефициентни глувци), со нивна колонизација со *Helicobacter* видови или преку применана агонистички анти-CD40-антитела (Uhlir и сop., 2006). Со тие модели е докажан важниот придонес на IL-23 во вродените механизми на патогенезата на ИЦЗ (Uhlir и сop., 2006).

Мукозните Т-клетки носат фенотип на активирани ефекторски клетки. Доминантните ефекторски Т-клеточни одговори во цревната мукоза се задолжени за одржување на цревната хомеостаза меѓу нормалната микрофлора, патогените и имунолошкиот систем на цревата. Тоа го прават преку насочување на неутрофилната инфламација и одржување на епителната бариера преку строго контролирани клеточни одговори. Сите пречки во спроведувањето на оваа контрола преку зајакнат одговор на ефекторските клетки или преку дефективни регулаторни одговори може да предизвикаат цревно воспаление.

2.6. Карактеристики на колитис предизвикан со ТНБС (тринитробензен сулфонска киселина)

За предизвикување на колитис со слични својства како КБ се применува 50% раствор на ТНБС во етанол интра ректално. Интраколонската апликација на етанолен раствор на ТНБС кај стаорците најпрво предизвикува нарушување на интестиналната епителна бариера како резултат на дејството на етанолот. Овој ефект овозможува олеснета пенетрација на хаптенот ТНБС кој со тринитрофенолниот дел од молекулата се врзува за ендогените протеини. Токсичното дејство на ТНБС придружено со акутно

оштетување на колонот, главно се должи на формирање на кислородни радикали со голема реактивност, како што се супероксидниот анјон и водород пероксид, кои вршат неспецифично оштетување на интестиналниот сид (Morris и сор., 1989). Подоцна, се активира и задоцнетиот тип на хиперсензитивност преку Th1-одговорот кон хаптенот ТНБС што пак, понатаму резултира со хронично оштетување на колонот со слични карактеристики со КБ кај луѓето (Morris и сор., 1989). Јачината на колитисот зависи од концентрацијата на ТНБС и од административниот протокол. „Класичниот“ модел со единечна апликација на ТНБС предизвикува акутен самоограничувачки колитис сличен на КБ кој се карактеризира со трансмурална гранулоцитна и лимфоцитна инфилтрација и Т-клеточен одговор (Neurath и сор., 1995) и кој најчесто се користи за испитување на епителната реституција и пролиферација, како и за механизмите на Т-клеточна посредувана автоимуна цревна инфламација во различни стадиуми од еволуцијата на болеста.

Слично како ТНБС, и оксазолонот е хаптенизирачки агенс чиј раствор со етанол се аплицира интраректално. За разлика од ТНБС, оксазолонот предизвикува колитис сличен на УК, кој се одликува со оштетување на епителниот слој во вид на улцерации на мукозата и силна инфилтрација со лимфоцити и гранулоцити како и деплеција на гоблет-клетките и недостаток на трансмурална инфламација (Hoving и сор., 2012). Morris и сор. први ја опишале употребата на ТНБС за предизвикување колитис кај стаорци. Оттогаш, ТНБС се користи за создавање на модели на колитис, со цел проучување на патогенезата на цревните заболувања, како и за испитување на нови лекови, како на пример, стероиди, антитумор некротичен фактор (TNF), 5-аминосалицилна к-на (Pohlmann и сор., 2009; Kim и сор., 2009; Shen и сор., 2007) и терапевтски практики во лекување на истите.

За предизвикување на колитис, ТНБС се аплицира ректално и тоа растворен во етанол кој ја нарушува мукозната бариера (Neurath и сор., 2000). Поради непостоењето на стандарден протокол, различни студии користат различна администрација и дозирање на ТНБС. Направени се повеќе испитувања, со цел утврдување на соодветно дозирање на ТНБС за добивање на што поблиски ефекти со хуманите ИЦЗ. Така на пример, во едно истражување е утврдено дека апликацијата на 0,7 mL од ТНБС (30 mg/mL) предизвика умерен колитис кој трае 12 дена со намалување помеѓу T7 и T12. Меѓутоа, поради истекувањето на мала фракција ТНБС од ректумот непосредно по аплицирањето тоталниот волумен бил редуциран на 0,6 mL за следното истражување

(Brenna и сор., 2013). Со помош на овој модел е докажана функцијата на маст-клетките во ИЦЗ кои со своите продукти доведуваат до оштетување на епителната функција при што е намалена апсорпцијата на вода во воспалената мукоза што пак придонесува за појава на дијареа (Stein и сор., 1998). Овој модел е искористен и за да се докаже дека оралната администрација на протеини екстрахирани при колитис, предизвикува имуна толеранција, го намалува инфламаторниот имунолошки одговор и го ублажува колитисот. Сево ова укажува дека неизбалансираноста меѓу проинфламаторните и антиинфламаторните медијатори може да се смета како причина за ИЦЗ (Pan и сор., 2000).

2.7. Улогата на цревната микрофлора во ИЦЗ

Како што беше претходно изнесено, важноста на микрофлората, поточно, интеракцијата меѓу микрофлората и имунолошкиот систем на цревата, како иницијален фактор за етиологијата и патогенезата на болеста, е докажана во многу истражувања и е општо прифатена во научната заедница. Токму оштетувањето на интеракцијата меѓу микрофлората и имунолошкиот систем претставува основа за барање начин за лекување на болеста преку модулирање на цревната микрофлора со пробиотици, пребиотици, синбиотици и антибиотици. Иако досега ниеден патоген не е докажан како директна причина за настанувањето на болестите, сепак, многу автохтони микроорганизми, доколку се најдат во специфични услови на исхрана кај предиспониран домаќин, можат да предизвикаат инфламација поради што се нарекуваат „патобиони“ (Chow и сор., 2011). Коменсалните бактерии го супримираат растот на патогените преку директно натпреварување со нив за колонизација на цревата и зафаќање на врзувачките места, како и преку намалување на експресијата на гени поврзани со факторите за вируленција (Kamada и сор., 2012). За разлика од здравите индивидуи, кај пациентите со ИЦЗ е забележана зголемена нестабилност на бактериите, како и намалување на нивниот диверзитет (Sartor, 2008). Слична е состојбата и со количеството и составот на габите (Ott и сор., 2008). Овие промени доведуваат до нарушување во одредени метаболички функции на микрофлората. Настанува намалување на метаболизмот на масните киселини со краток ланец (анг. short-chain fatty acids -SCFAs), главно, ацетат, пропионат и бутират, кои имаат антиинфламаторна и имунорегулаторна активност. Исто така, настанува намалување на синтезата на аминокиселини, а зголемување на оксидативниот стрес и секрецијата на токсини (Kostic и сор., 2014). Сево ова доведува до полесна колонизација со

патогени како и стимулација на растот на патобионите (Kamada и сор., 2013). Така, кај пациентите со УК е забележано зголемено присуство на *Fusobacterium genus* (*Fusobacteria phylum*), поточно *Fusobacterium varium* (Ohkusa и сор., 2002; Andoh и сор., 2007), додека кај пациенти со КБ е забележано зголемено присуство на атхерентните-инвазивните соеви на *Escherichia coli* (*E. coli*) (*Proteobacteria phylum*).

Улогата на бактериите во патогенезата на болеста е потврдена со податокот дека одредени антибиотици се ефикасни кај дел од пациентите со ИЦЗ. Особено важни се бактериите кои можат да атхерираат и да ја инвадираат цревната мукоза, како што е *Escherichia coli*. Досегашните истражувања покажуваат дека микробијалните антигени кои се нормално присутни во интестиналниот лумен, а не специфични патогени, се одговорни за воспалението во цревата. Пациентите со КБ и УК имаат деплеција на mucosa-associated phyla Firmicutes и Bacteroidetes, но сèуште не се знае дали овие оштетувања довеле до појава на болеста или претставуваат секундарни промени предизвикани од инфламацијата (Clara и Judy, 2009).

Цревната микрофлора е неопходна за нормално развивање на имунолошкиот систем. Така кај germ-free животните доаѓа до намалување на ПП, изолираните лимфоидни фоликули, Панетовите и Т-клетките во ламина проприја, како и нарушување на цревната бариера (Gordon и сор., 1966; Durkin и сор., 1981; Hamada и сор., 2002; Ukena и сор., 2007; Vourska и сор., 2008;). Кај пациентите со ИЦЗ е забележано губење на имунолошката толеранција кон цревната микрофлора, пропратено со експанзија на CD8+ Т-лимфоцитите (Duchmann и сор., 1995). Се претпоставува дека ИЦЗ се јавува кај индивидуи со генетска предиспозиција за имуна дисрегулација при експозиција на специфични фактори на околината.

2. 8. Влијанието на различни компоненти од исхраната врз текот на болеста

Помеѓу факторите поврзани со ИЦЗ, исхраната и интестиналната микрофлора се чини дека се најпроменливи, што ги прави цел за превенција и третман на ИЦЗ. Исхраната може да ја менува композицијата на цревната микрофлора и продукцијата на апсорптивни метаболити, така што проучувањето на ефектите од овие фактори врз патогенезата на ИЦЗ е комплицирано. Многу од прехранбените продукти, како што се витамините, аминокиселините и масните киселини со краток ланец, помагаат во регулацијата на имуните функции, иако дел од нив се под влијание на цревната микрофлора. Од друга страна, исхраната богата со масти ја засилува јачината на

колитисот кој се развива кај глувците (van der Logt и сор., 2013; Gruber и сор., 2013). Големо внимание е посветено на изучувањето на есенцијалните масни киселини со животински модели на ИЦЗ. На пример, додавањето на полинезаситени масни киселини во исхраната на глувците има варијабилен ефект во превентивата и третманот на колитисот (Bosco и сор., 2013; Matsunaga и сор., 2008; Mbodji и сор., 2013). Растителните полисахариди и тешко сварливите влакнести компоненти од растенијата, главно, е покажано дека ги редуцираат карактеристиките на колитис кај глувците, веројатно поради засилената продукција на масни киселини со краток ланец, што можеби ја подобрува бариерната функција служејќи како извор на енергија за колоноцитите (Roediger и Raе, 1982) и поттикнување на развојот на Т-регулаторни клетки. Антиколитичниот ефект на растително-базираните компоненти, исто така, се проучени кај куркуминот (Ung и сор., 2010), зелениот чај (Bruckner и сор., 2012) и други. Постојат податоци за влијанието на одредени витамини и минерали врз патогенезата на ИЦЗ. Кај HLA-B27 трансгенетските стаорци, исхраната со високо ниво на калциум довела до инхибиција на дијарејата и цревната пропустливост (Schepens и сор., 2009). Кај глувци со ДСС индуциран колитис, давањето на активната форма на витамин Д довела до стврднување на столицата, помала загуба на крв и повраток на тежината преку поттикнување на отпорноста на епителните клетки кон повреди и супресија на инфламаторниот одговор кон луминалните антигени (Zhao и сор., 2012). Кај пациенти со ИЦЗ кои имале документирана регулација на дефицит на витамин Д било помалку веројатно да имаат потреба од оперативен зафат во споредба со оние кои останале дефицитарни со витамин Д (Ananthkrishnan и сор., 2013).

Постојат доста податоци за позитивното влијание на исхраната како терапија при ИЦЗ кај домашните животни (Allenspach и сор., 2007; Luckschander и сор., 2006). Како посебно повољно е докажано дејството на чисти протеини од дивеч и патка, хидролизирани протеини, храна со ниска концентрација на глутен, лактоза и на масти (Guilford и сор., 2001; Jergens, 1999), чии комбинации се веќе присутни во комерцијално достапната храна за кучиња и мачки.

При третман на кучињата со идиопатска хронична ентеропатија, секогаш се започнува со примена на елиминациска исхрана или во случај да има клинички значителна ентеропатија со загуба на протеини (анг. protein-losing enteropathy [PLE]), се применува диета со ниска количина на масти. Доколку во овие случаи животното добро реагира, не е потребен понатамошен третман со лекови. Во спротивно се

продолжува со антибиотици или со стероидна терапија (Hall и German, 2005; Jergens и сор., 1992).

2. 8. 1 Функционална храна

Функционалната храна подразбира: прехранбен производ кој не е модифициран; храна во која својствата на определена компонента се подобри со растење и одгледување во специфични услови или по биотехнолошки пат; прехранбен производ во кој е додадена некоја компонента со цел продукција на поволни ефекти; храна од која определена компонента е отстранета со технолошки или биотехнолошки постапки за да се постигнат позитивни ефекти врз здравјето, доколку целта не може да се постигне на поинаков начин; прехранбен производ во кој определена компонента е заменета со друга компонента со полезни карактеристики; прехранбен производ во кој дадена компонента е модифицирана со помош на ензими, на хемиски или технолошки начин, со цел обезбедување на позитивни ефекти врз здравјето; прехранбен производ во кој е модифицирана биорасположивоста на дадена компонента или пак прехранбен производ во кој се извршени комбинирани модификации од оние што се погоре наведени (Ashwell, 2002; Howlett, 2008). Во 2001 година, од Организацијата за храна и земјоделие (FAO) и Светската здравствена организација (WHO), пробиотиците се дефинирани како живи микроорганизми кои кога се додаваат во соодветна кличина предизвикуваат здравствени придобивки за домаќинот. Пребиотиците претставуваат не-дигестибилни, селективно ферментирани состојки кои предизвикуваат специфични промени во активноста и композицијата на цревната микрофлора дејствувајќи позитивно на здравјето и благосостојбата на домаќинот (Gibson и сор., 2004; Macfarlane и сор., 2006). Синбиотиците пак претставуваат комбинација од пробиотици и пребиотици. За да биде одреден микроорганизам користен како пробиотик, според најновите препораки на FAO/WHO, треба да ги исполнува следниве фактори: да може безбедно да ја премине желудечната содржина, да има антимикуробни особини, да поседува способност за адхеренција на мукусот и на епителните клетки и да го преживее производствениот процес (FAO/WHO, 2002). Различни микроорганизми, па дури и одделни соеви од ист вид, имаат различни пробиотски особини, поради што е неопходно нивно посебно испитување (Kailasapathy и Chin, 2000).

Досега се пријавени различни позитивни ефекти на одредени пробиотици врз здравјето на луѓето и животните, но сепак постојат малку податоци за механизмите на нивното делување (Veegarap и сор., 2012). Пробиотиците можат да го зафатат

физичкиот простор и да влезат во интеракција со цревното ткиво или да ослободат биоактивни продукти/метаболити, резултирајќи со блокирање на патогените бактерии, подобрување на бариерната функција и подобрување на мукозниот имун систем (Veerappan и сор., 2012). Пробиотиците можат да предизвикаат анти-инфламаторна реакција преку редуцирање на продукцијата на проинфламаторните цитокини (Veerappan и сор., 2012). Цревната невопластичност, поттикната од инфламација, како што е во случајот со ИЦЗ, може да е предизвикана со проинфламаторните цитокини од активираните имунолошки клетки (Giaroni, 1999; Lomax, 2005; Veerappan и сор., 2012). Во таа смисла, пробиотикот *Streptococcus faecalis* 129 ВЮ 3В (SF3В) може да го превенира колитично-поврзаното попречување на цревните неврони со парцијално блокирање на активацијата на инфламаторниот одговор. Пробиотиците се тестираат како поединечни соеви или како комбинација од повеќе соеви. *E. coli* Nissle 1917 покажал безбедност и ефикасност во спречување на повторувањето на УК, слично како и лекот месалазин (Kruis и сор., 1997; Rembacken и сор., 1999; Kruis и сор., 2004; Henker и сор., 2008). Пробиотикот *Lactobacillus rhamnosus* GG (*L. rhamnosus* GG) покажал дури подобри резултати за истата намена (Zocco и сор., 2006). VSL#3 претставува пробиотска комбинација која се состои од четири соја од *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. Acidophilus* и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), три соја од *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve* и *B. infantis*) и еден сој *Streptococcus* (*S. salivarius* subsp. *thermophilus*), која е широко проучена во третманот на УК. Оваа комбинација се покажала како успешна во справувањето со активната болест, како и во спречување на повторувањето на болеста (Venturi и сор., 1999). Постојат податоци и за позитивните ефекти на синбиотици во третманот на УК и тоа: *B. longum* и Sinergy 1 (a inulinoligofructose) (Furrie и сор., 2005), *B. longum* и *B. psyllium* (Fujimori и сор., 2009), инулин во комбинација со неколку корисни бактериски соеви (*Bifidobacterium infantis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *Lactobacillus gasseri*, *L. plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sporogenes* и *Streptococcus thermophilus*) (Guslandi, 2011).

Постојат помалку податоци за употребата на пробиотици во третманот на КБ. Во една студија е пријавено дека кај лица со активна болест, додавањето на *E. coli* Nissle 1917 на терапијата со преднизолон довела до намалување на степенот на ремисија на болеста (Malchow, 1997). Кај лица со неактивна болест, додавањето на *S. boulardii* при лекување со месалазин довело до намалена ремисија на болеста, во споредба со пациентите што примале само месалазин (Guslandi и сор., 2000). Се

претпоставува дека *S. boulardii* доведува до засилено ослободување на секреторни IgA, како и до регулирање на цревната пропустливост.

Во литературата постојат податоци и за употребата на пробиотиците, пребиотиците и синбиотиците кај домашните животни. Така, за пребиотиците постои податок дека додавањето на ФОС во 0,75% сува материја предизвикува промени во фекалната флора кај здрави мачки (Sparkes и сор., 1998), при што предизвикува позитивна промена во бројот на лактобацили и *Bacteroides* spp. во однос на *E. coli* споредено со нормална исхрана.

Со досегашните истражувања е докажана важноста од одржување на микробијална рамнотежа во превенцијата и третманот на ИЦЗ. Податоците за употребата на пробиотици во лекувањето на болеста кај кучиња и мачки се во почетна фаза. Постојат само неколку истражувања за дејството на конкретни пробиотици. Така на пример, во едно *in vitro* истражување е докажано дека апликацијата на пробиотски коктел од различни *Lactobacillus* spp. ја подобрило експресијата на регулаторните во однос на про-инфламаторните цитокини (Sauter и сор., 2005). Друг пробиотик кој содржи *B. Animalis* се покажал како успешен во третманот на акутна дијареја кај кучињата (Kelley и сор., 2009).

Allenspach и сор. (2006) утврдиле дека употребата на циклоспорин А (суА) кај кучињата доведува до значително намалување на бројот на Т-клетките во биопсии од дуоденум боени со имунохистохемиски метод со примена на CD3-антителото. Употребата на антибиотици како што е метронидазолот се користи во лекување на ИЦЗ кај луѓето (Sutherland и сор., 1991) и кај кучињата (Jergens и сор., 2010). Rossi и сор. (2014) во своето истражување направиле споредба на пробиотската комбинација VSL#3 и комбинација од преднизон и метронидазол кај кучиња со ИЦЗ. Притоа, хистолошкиот наод и мукозната инфилтрација со CD3+ Т-клетки значително се намалиле кај двете групи, без значајна разлика помеѓу групите.

VSL#3, исто така, покажал позитивен ефект кај мали кутриња со ентеритис предизвикан од парвовируса, кај кои го подобрил процентот на преживување од 70% кај нетретираните на 90% кај третираните (Arslan и сор., 2012). Друг пробиотски коктел ја забрзал нормализацијата на столицата кај кучиња со акутен гастроентеритис (Herstad и сор., 2010). *B. animalis* АНС7 од кучешко потекло довел до скратување на времето за закрепнување од 6,6 на 3,9 дена (Kelley и сор., 2009). *E. faecium* SF 68 ја

намалил појавата на дијареа кај мачки во азил (анг. shelter cats), но не и кај кучиња (Bybee и сор., 2011). Друг синбиотик довел до намалување на дијареата кај мачки за 21 ден (Hart и сор., 2012). Постојат, исто така, податоци за позитивниот ефект на *L. acidophilus* (Marshall-Jones и сор., 2006) и комбинацијата од *Lactobacillus* група II и *E. faecium* (Коерпал и сор., 2006) врз здравјето на мачките.

Кај коњи, *Saccharomyces boulardii* покажал позитивен ефект во намалување на дијарејата (Desrochers и сор., 2005).

Кај телиња што цицаат, зголемената количина на *Lactobacillus* довела до намалување на инциденцата на дијареја (Ellinger и сор., 1980). Пријавен е зголемен раст и прехранбена ефикасност кај телиња третирани со пробиотици (Abe и сор., 1995). Позитивен ефект од употребата на пробиотици има и кај нововнесените (Ahasan и сор., 2015), како и кај товните говеда (Swinney-Floyd и сор., 1999).

2.8.2 Влијанието на пробиотиците врз различните компоненти од имунолошкото систем

Употребата на пробиотици станува сè по популарна во ветеринарната медицина и досега е препорачувана за третман и превенција на различни гастроинтестинални нарушувања. Меѓутоа, направени се само неколку студии за проценка на клиничката ефикасност на пробиотиците при гастроентеритис. Употребата на пробиотици кај домашните животни со ИЦЗ бара понатамошни истражувања. Докажано е дека колитисот кај луѓето и глвците е поврзан со зголемување на нивото на цитокините, како што се TNF α , IL-6, IL-12p70 и IL-23 (Becker и сор., 2006; Fuss и сор., 2006). Затоа, соодветната селекција на пробиотски соеви за третманот на ИЦЗ е важно да се базира на нивниот потенцијал за поттикнување на анти-инфламаторни шеми на цитокини (IL-10 високи, TGF-бета високи, IL-12p70 ниски, IL-23 ниски, TNF-алфа ниски) и елиминирање на цревната инфламација.

Дендритичните клетки (ДК) го раководат Т-лимфоцитниот одговор и претставуваат врска меѓу луменот на цревата и клетките на вродениот и стекнатиот имунитет. *Bifidobacterium breve* C50 продуцира BbC50sp кој индуцира матурација на ДК, нивно зголемено преживување и зголемена продукција на антиинфламаторниот IL-10. Цревните ДК ја одржуваат имуната толеранција преку транспорт на коменсалните бактерии до мезентеријалните лимфни јазли каде што се задржуваат и се превенира

нивно влегување во системскиот имунолошки оддел. Вака, ДК можат селективно да го индуцираат IgA за заштита од мукозна инвазија, ограничувајќи го имунолошкиот одговор кон цревните микроорганизми (Macpherson и Uhr, 2006; Macpherson и Harris, 2004; Macpherson и Geuking, 2005).

Помошничките Т-лимфоцити (Th cells) се субпопулација од Т-лимфоцити кои го изразуваат кластерот на диференцијација 4 (CD4). Врз основа на нивниот цитокин профил, Th-клетките се поделени на Th1, Th2, регулаторни Т-клетки и Th17-клетки. Општо прифатено е дека Th-клетките потекнуваат од заедничка прекурсорска клетка (Th0) и дека диференцијацијата кон Th1 или Th2 зависи од повеќе фактори, како што се антиген презентирачките (пр. дендритични) клетки, природата на антигенот, патиштата на антигено изложување и степенот на имунолошки одговор (Neurath и сор., 2002). Th1-клетките иницираат цитотоксичност или клеточно посредуван имунолошки одговор преку продукција на интерлеукини (IL)-2, IFN- γ , и TNF- α , и се антагонисти на Th2-клеточната функција. Th2-клетките посредуваат во хуморалниот имунитет преку продукција на доминантно IL-4, IL-5, IL-6 и IL-13 и се антагонисти на Th1-клеточната функција. Докажано е дека IL-10 го продуцираат и Th1 и Th2-клетките (Day, 1999).

Регулаторните Т-клетки можат да ја супримираат функцијата на Th-ефекторските клетки и да го намалат погрешно насочениот имунолошки одговор (Izcue и сор., 2009). Така, пробиотиците како што се *Bifidobacterium lactis* W51, *L. acidophilus* W55 и *L. plantarum* W62 можат да делуваат антиинфламаторно преку индукција на диференцијацијата на FOXP3+ Treg клетките од CD25 Т-клеточната популација. Кај глувците третирани со пробиотик постои поголем број регулаторни CD4+ клетки со површински TGF- β .

$\gamma\delta$ Т-клетките индуцираат матурација и пролиферација на ДК и директно ги активираат CD4+ $\alpha\beta$ Т-клетките овозможувајќи врска меѓу вродениот и стекнатиот имунитет (Guzy и сор., 2008). Едно истражување покажало дека глувците со дефицит на $\gamma\delta$ Т-клетки развиваат спонтан колитис, што пак може да се превенира или супримира со $\gamma\delta$ Т-клеточен трансфер (Roselli и сор., 2009). Овие резултати укажуваат дека $\gamma\delta$ Т-клетките веројатно имаат потенцијал да го намалат воспалението. Третманот со *L. acidophilus* Var 13 и *Bifidobacterium longum* Var 33 кај ТНБС модел на акутен колитис го елиминираат цревното оштетување, веројатно преку намалување на бројот на CD4+ Т-клетки лоцирани во ламина проприја и интраепителната лимфоцитна

популација. Подеталните истражувања во поодделните субпопулации покажале дека овие два пробиотици можат да го зголемат бројот на $\gamma\delta$ Т-клетки присутни во интраепителната лимфоцитна популација, со намалување на бројот на $\gamma\delta$ Т-клетки во лимфоцитната популација на ламина проприја (Roselli и сора., 2009).

Пробиотиците *L. Casei* (Carol и сора., 2006) и VSL#3 (Reiff и сора., 2009) можат да го намалат бројот на активирани Т-лимфоцити со предизвикување на нивна апоптоза преку намалување на експресијата на анти-апоптотичниот протеин Bcl-2 и зголемување на протеинот галектин 2, соодветно.

Во ламина проприја на цревата, В-клетките се диференцираат во плазма-клетки и секретираат IgA-антитела независни од Т-лимфоцитите, кои преку епителните клетки се транспортираат во цревниот лумен (Delcenserie и сора., 2008, Mazanec и сора., 1993). IgA-антителата го штитат домаќинот врзувајќи се за различни бактерии, вируси и габи (Delcenserie и сора., 2008, Mazanec и сора., 1993). Епителните клетки и ДК продуцираат молекули како што се лиганд за индукција на пролиферација (APRIL), како и CD40 лиганд (Peterson и сора., 2007). Коменсалните бактерии, како што се *Lactobacillus plantarum* NCIMB88, *L. plantarum* WCFS1, *Bacillus subtilis* JH642 и TLR- активирачките бактериски производи можат да ги индуцираат епителните клетки да продуцираат APRIL, кој поттикнува IgA-класна промена во IgA₂-имуноглобулин кој е превалентен во дисталните црева и поотпорен на бактериските протеази (van Baarlen и сора., 2009; He и сора., 2007).

Истражувањата покажале дека не само што пробиотиците можат да го стимулираат производството на IgA од плазма-клетките, туку дека таа стимулација се разликува меѓу различни соеви. Оралната примена на *Bifidobacterium lactis* Bb-12 за време од 21 ден, кај седум здрави деца довела до зголемување на вкупното фекално количество на IgA и анти-полиовирус IgA (Fukushima и сора., 1998). Оралната примена на *Bifidobacterium bifidum* Bb-11 кај глупци довела до зголемување на IgA-секретирачките клетки во МЛЧ и слезината и до зголемување на системскиот и интестиналниот IgA, ефект кој бил зголемен при инкапсулирање на *B. Bifidum*, што докажува дека ефектот зависи од количината на интактните, животоспособни клетки во цревата. Ферментирано млеко што содржи *L. casei* DN-114001, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* довело до зголемување на IgA + клетките во тенките и дебелите црева споредено со контролната група (de Moreno de LeBlanc и

сop., 2008). Споредба меѓу два *Lactobacillus* соеви, *L. johnsonii* NCC 533 и *L. paracasei* NCC 2461 кај germ-free глувци покажало дека и двата вида доведуваат до зголемување на IgA плазма-клетките, со разлика во производството на *Lactobacillus* -специфични IgA (Ibnou-Zekri и сop., 2003).

Развојот на GALT е директно зависен од цревните бактерии. ПП и лимфните јазли се неразвиени и безструктурни кај germ-free глувците (Macpherson и Harris, 2004). Цревните лимфни ткива како што се ПП, МЛЧ и изолираните лимфни фоликули продуцираат микроб-реактивни IgA-продуцирачки В-клетки, кои спречуваат прекумерен раст на непожелни бактериски видови. Глувци со дефицит на IgA имаат проширени бактериски заедници во цревата, придружено со бројни абнормално големи изолирани лимфни фоликули. Бактериските заедници во цревата се значително нарушени во отсуство на ИЛФ. Формирањето и матурацијата на лимфоидното ткиво се случува со помош на цревната микрофлора, како што се гледа од примерот дека Грам-негативниот пептидогликан е неопходен за индукција и формирање на ИЛФ преку врзување на NOD1, активирање на CCR6 и индукција на β -defensin 3 и CCL20-поседувана сигнализација (Bouskra и сop., 2008). Од сите овие примери се гледа заемната корист од интеракцијата меѓу цревните микроорганизми и имунолошкиот систем.

Различни соеви и субспециеси од ист сој можат различно да влијаат врз клетките од имунолошкиот систем. Во ова истражување е докажано дека пробиотикот *L. paracasei* subsp. *paracasei* B21060 директно ја инактивира *in vitro* пролиферацијата на хуманите CD4+ Т-клетки. Овој ефект е специфичен за оваа лоза, затоа што два други пробиотици, *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19 и *L. casei* subsp. *casei* DG, не го супримираат растот на CD4+ Т-клетките (Pařia и сop., 2007).

Некои истражувања покажале дека бактериската ДНК (жива или мртва) може да биде одговорна за некои корисни ефекти на пробиотиците. *L. paracasei* subsp. *paracasei* B21060 го прикажува својот имуномодулаторен ефект само кога е применет како живи бактерии. *L. paracasei* subsp. *paracasei* B21060 ја супримира и пролиферацијата на ПП (Pařia и сop., 2007).

Врз основа на досегашните истражувања постои генерална претпоставка според која пробиотиците се делат на две категории според своите имуномодулаторни одлики: имуностимулаторни пробиотици, кои доминантно вршат индукција на ИЛ-12

продукцијата, ја промовираат активацијата на NK-клетките и Th1-клеточниот развој и ја засилуваат имунолошката одбрана во превенцијата на инфекции и канцер; и имунорегулаторни пробиотици, кои го индуцираат IL-10-имунолошкиот одговор, го промовираат развојот на Treg-клетките и го контролираат прекумерниот имунолошки одговор, со што ги регулираат инфламаторните болести како што се алергиите, ИЦЗ и автоимуните болести (Kap и сор., 2011).

Од друга страна, постојат пробиотици како што се *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) и *Lactobacillus rhamnosus* GG, за кои е докажано дека можат ефикасно да делуваат кај различни типови болести предизвикани од компромитирана имунолошка функција или прекумерен имунолошки одговор (Drisko и сор., 2003), што го отежнува објаснувањето на механизмот на нивното делување.

Неколку истражувања поврзани со пробиотикот *Lactobacillus casei* Shirota (LcS), со помош на анимални модели на канцер и инфекции покажале дека главната улога на пробиотикот се состои во активација на имунокомпетентни клетки, како што се NK-клетките, макрофагите и Т-клетките (Takagi и сор., 2001; Miake и сор., 1985). Истиот пробиотик покажал позитивни ефекти против алергии и ИЦЗ кои биле докажани кај соодветни анимални модели. Во овој случај претпоставката е дека заштитниот механизам се состои во регулирање на Th1/Th2-рамнотежата и намалување на продукцијата на IL-6 (Shida и сор., 2002; Matsumoto и сор., 2005). Според овие наоди, пробиотикот LcS има способност не само да ја засили имунолошката одбрана против канцер и инфекции, туку и да го контролира прекумерниот имунолошки одговор за да ја намали инфламацијата.

Лактобацилите, како и другите пробиотици и цревни коменсални бактерии, се смета дека влијаат врз цревниот имунолошки систем на неколку начини: со нивен транспорт низ М-клетките во фоликуларно-поврзаниот епител и со понатамошно нивно препознавање од страна на макрофагите и дендритичните клетки во ПП; дендритичните клетки во ламина проприја ги протегаат своите дендрити за препознавање на пробиотиците во цревниот лумен; интралуминалните пробиотици ја модулираат цитокината продукција во цревните епителни клетки, што резултира со регулација на одговорот на имунокомпетентните клетки, вклучувајќи ги макрофагите, дендритичните клетки, Т-клетките и В-клетките во ламина проприја; и ингестираните живи пробиотици ја преживуваат гастроинтестиналната средина за да стигнат до

подолните делови од цревата каде што ја обновуваат цревната микробиота која е нарушена од различни причини, како што се цревните инфекции и употребата на антибиотици, ја подобруваат цревната средина и на тој начин индиректно влијаат врз имунолошкиот систем (Kap и сор., 2011).

2. 9. Имунохистохемискиот метод во проучувањето на ИЦЗ

Идентификацијата на различни клетки од имунолошкиот систем е неопходна за изучување на патогенезата на инфламаторните цревни заболувања. Тоа го прави имунохистохемискиот метод особено важен во овие истражувања. Притоа, најчесто се користи метода со директна имуофлуоресценција на смрзнати ткивни пресеци, при која не постои можност за анализа на хистолошката структура, што може да доведе до поставување на погрешна дијагноза. Имунохистохемискиот метод на ткива фиксирани во формалин и вклопени во парафин овозможува истовремена идентификација на различните клетки и на морфолошките промени. Употребата на криостатски ткивни пресеци и алтернативни фиксативи, покрај вообичаената обработка на ткивата за вклопување во парафин, довела до одредени подобрувања, што сепак, не се доволни за воочување на хистолошките детали како при фиксацијата во формалин за патохистолошка дијагностика. Познавањето на клеточните субпопулации во имунолошкиот систем при ИЦЗ е доста широко проучено во последните 10 години благодарение на примената на моноклонални антители. Притоа, истражувањата повеќе се однесуваат на флуоцитометриски анализи, а помалку на морфолошката дистрибуција на одредени субпопулации на лимфоцити. Познавањето на лимфоцитот на цревата е неопходно за разбирање на патогенезата на болеста и на значењето на примената на пробиотици за превенирање или лечење на истата. Многу од авторите користат различни методи на истражување со цел установување на односот на имунолошките клетки во организмот на животните и луѓето. Најголем дел од овие истражувања се однесуваат на застапеноста на овие клетки во периферната крв кај здравите животни, а за жал постојат значително помалку податоци за распространетоста на имунолошките клетки во внатрешните органи, посебно при појава на болест.

Најчесто применувани клеточни маркери за следење на клетките од имунолошкиот систем на цревата при ИЦЗ, како и при различни третмани на истото се: CD3, CD20, CD79 α , MAC387, CD68.

CD3-комплексот служи како Т-клеточен ко-рецептор кој нековалентно се поврзува со Т-клеточниот рецептор (TCR) (Smith-Garvin и сора., 2009).

CD3 (анг. Cluster of differentiation 3) протеинскиот комплекс претставува значајна карактеристика на Т-клеточната линија, па затоа анти-CD3-антителата можат ефикасно да се користат како Т-клеточни маркери. CD3-клеточниот антиген е уникатен за Т-клеточната линија, но сепак, можна е негова експресија на неколку други видови клетки како што се: Пуркиниевите клетки во мозокот (Garson и сора., 1982), макрофагите, Хоџкинс и Ред-Стернберг клетките (Cibull и сора., 1989). CD3 се изразува рано во претимочитната кортикална фаза лоциран во перинуклеарниот простор (Furley и сора., 1986). Кај повеќе од 95% од тимоцитите CD3 се појавува во цитоплазмата, а подоцна и на мембраната. Со созревањето на тимоцитите, CD3 се губи од цитоплазмата и се наоѓа на клеточната површина кај пост-кортикалните Т-клетки. Се претпоставува дека интрацелуларната појава на CD3 претставува најран сигнал на Т-клеточната линија (Campana и сора., 1987).

CD20 (анг. Cluster of differentiation 20) е познат како В-лимфоцитен површински антиген В1 и Вp35 и се експресира на речиси сите В-клетки, освен плазма-клетките. CD20 е важен во регулацијата на В-клеточната активација и пролиферација. Тој е исто така важен и за регулирањето на интрацелуларниот калциум, со што е директно вклучен во трансмембранскиот влез на калциум (Bubien и сора., 1993). Со оглед на тоа што CD20 се изразува на малигните В-клетки, станал цел на повеќе терапевтски агенти вклучени во третманот на В-клеточните лимфоми и леукемија.

Според досегашните истражувања најголемиот дел од В-клеточната популација кај глумците во значајна мера го експресираат површинскиот CD20, а таа експресија е паралелна со човечката (Stashenko и сора., 1980; Loken и сора., 1987).

CD79 (анг. Cluster of differentiation 79) претставува трансмембрански протеин (димер) кој формира комплекс со В-клеточниот рецептор (ВКР) и генерира сигнал како резултат на препознавањето на антигенот од страна на ВКР. Тој претставува пан-В-клеточен маркер кој се изразува од пре-В-клеточната фаза на диференцијација до фаза на плазма-клетка (Mason и сора., 1995).

CD79 се изразува речиси ексклузивно на В-клетките и В-клеточните неоплазми. Неговите компоненти CD79A и CD79B во текот на В-клеточната онтогенеза се

изразуваат пред појавата на CD20, а исчезнуваат подоцна од CD20 во доцната (плазма-клетки) фаза од В-клеточната диференцијација, поради што антителата за CD79А и CD79В се корисни во докажување на В-клетките во речиси сите фази од нивната диференцијација, како и за разликување на В-клеточни неоплазми од Т-клеточни неоплазми или од миелоидни неоплазми (Reiguo и сор., 2001).

Антителата за CD79а селективно ги обележуваат В-клетките во лимфните јазли и тоа посилено обележани се мантил зоните отколку герминативните центри. Антителата, исто така, ги бојат плазма-клетките во лимфоидното ткиво (Mason и сор., 1995). Антителата за CD79b го бојат ткивото слично како и CD79а, со таа разлика што плазма-клетките во лимфоидното ткиво се негативни за CD79b (Mason и сор., 1992).

CD68 (анг. Cluster of Differentiation 68) претставува трансмембрански гликопротеин кој се поврзува со липопротеините со ниска густина. Се изразува на моноцитите/макрофагите, а негов еквивалент кај глумците е макросалинот. Особено е корисен како маркер за макрофагната линија, вклучувајќи ги моноцитите, хистиоцитите, циновските клетки, Купферовите клетки и остеокластите.

CD68 во најголем процент се јавува кај моноцитно/макрофагната линија, но во помала мера се јавува и кај полиморфонуклеарните леукоцити (неутрофилите и базофилите, но не и кај еозинофилите). CD68-антигенот се наоѓа и кај некои нехематопоеетски органи како што се бубрежните тубули, клетки со меланоцитно, епително и ендотелно (папочна врвца) потекло како и во серумот и урината (Karen и сор., 1990).

Ткивните макрофаги настануваат од клетките на моноклеарниот фагоцитен систем и претставуваат финална фаза во диференцијацијата на циркулаторните моноцити (Gordon, 1986). Тие се широко распространети низ телото и претставуваат голема структурна и функционална хетерогеност. Од многуте имуни функции во кои учествуваат, фагоцитозата на туѓите и некротичните матери и антигената презентација се најважните (Gordon и сор., 1992).

Се смета дека CD68 е селективен за моноцитно/макрофагната линија. Оттука, антителата против CD68 се широко користени како маркери во дијагностиката и истражувањата на моноцитите/макрофагите. Неколку моноклонални антитела го препознаваат CD68-антигенот и групирани се на база на пан-макрофагната реактивност

на ткивните пресеци: Ki-M6, Ki-M7, Y2/131 и Y1/82A, EBM11, KP1, Ki-M1P, PG-M1. Нивната специфичност за CD68 е потврдена преку Western blotting и трансфекциски студии (Saito и соp., 1991).

Mouse monoclonal antibody (MAC 387) е специфично за моноцити и ткивни хистиоцити, при што особено интензивно ја бои цитоплазмата на клетки од моноцино/макрофагните серии кај парафинските пресеци. Антителото покажува широка реактивност со голем број ткивни хистиоцити, вклучувајќи ги инфилтративните и реактивните хистиоцити, алвеоларните макрофаги, Купферовите клетки, макрофагите од фоликуларните центри, макрофагите од црвената пулпа на слезината, тумор-инфилтративните макрофаги, синусните хистиоцити и епителоидните циновски клетки (David и соp., 1987).

3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Литературата е релативно сиромашна со податоци за механизмите со кои функционалните производи со пробиотици/синбиотици го вршат антиинфламаторниот ефект при различни болести како и за безбедносниот профил на третманот. Наша цел е да направиме корелација меѓу различните компоненти на имунолошкиот систем со помош на патохистолошката и имунохистохемиската метода, преку следење на имунолошките клетки, како и однесувањето на мукозниот блок кај стаорци со предизвикан колитис, а третирани со микроинкапсулиран синбиотик. Имајќи го ова предвид и поради неможноста од поистоветување на воочените ефекти на една специфична пробиотска лоза со уникатни биотерапевтски својства со други бактериски лози, како и утврдување на механизмите со кои тие влијаат, во рамките на оваа докторска дисертација ќе се истражат:

1. Макроскопските промени во слузницата на колонот кај стаорците со индуциран колитис кои се третирани со микроинкапсулиран синбиотик;
2. Микроскопските промени во слузницата на колонот кај стаорците со индуциран колитис кои се третирани со микроинкапсулиран синбиотик;
3. Имунохистохемиска детекција на:

Дистрибуција на CD3 Т-лимфоцитите во колонот кај стаорците со индуциран колитис кои се третирани со микроинкапсулиран синбиотик;

Дистрибуција на CD20 В-лимфоцитите во колонот кај стаорците со индуциран колитис кои се третирани со микроинкапсулиран синбиотик;

Дистрибуција на CD79 В-лимфоцитите во колонот кај стаорците со индуциран колитис кои се третирани со микроинкапсулиран синбиотик;

Дистрибуција на MAC 387-макрофагите во колонот кај стаорците со индуциран колитис кои се третирани со микроинкапсулиран синбиотик;

Дистрибуција на CD68-макрофагите во колонот кај стаорците со индуциран колитис кои се третирани со микроинкапсулиран синбиотик.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

4. 1. Материјали

За изведување на предвидените испитувања во рамките на овој докторски труд, користен е прехранбен производ–ајран (Здравје Радово, Македонија), набавен од малопродажната мрежа во Македонија и лиофилизирана пробиотичка култура од родот *Lactobacillus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Chr. Hansen, Denmark). Како пребиотик, користен е инулин збогатен со олигофруктоза, смеса од олигофруктоза со степен на полимеризација 2-8 (DP 2-8) и долго-верижна фракција на инулин (DP 10-60), Synergy 1 (Orafti® Synergy 1, Orafti-Rue L. Maréchal, Tienen, Belgium). Пробиотските клетки и пребиотикот се микроинкапсулирани во комплекс од анјонски и катјонски полисахаридни полимери од природно потекло, натриум алгинат и цитозан. Синбиотските микрочестички беа подготвени со методот на распрснување со сушење, со последователно вкрстено вмрежување/полиелектролитно комплексирање со CaCl₂ во 1% раствор на оцетна киселина (Petreska Ivanovska и сор., 2012). Финалните микрочестички, со и без синбиотик беа инкорпорирани во прехранбениот производ ајран (Petreska Ivanovska и сор., 2018). Синбиотските микрочестички беа подготвени на Фармацевтскиот факултет при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

Во индукцијата и дијагностиката на инфламаторно цревно заболување кај експериментален животински модел - колитис кај стаорци предизвикан со ТНБС се користени следниве хемикалии:

2,4,6-тринитробензен сулфонска киселина (Picrylsulfonic acid solution, 5% м/в), Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA.

о-дианизидин дихидрохлорид, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA.

хексадецилтриметиламониум бромид (НТАВ), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany.

водород пероксид 30%, Алкалоид, Скопје, Македонија.

формалдехид 35%, Алкалоид, Скопје, Македонија.

апсолутен етанол 99,9%, ACS, ISO, Reag. PhEur, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany.

ксилол, мешавина на изомери, р.а., Алкалоид, Скопје, Македонија.

Nematoxylin for microscopy, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA.

Eosin B for microscopy Certistain, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany.

Paraffin wax, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA.

фосфатен пуфер 50 mmol/l, pH 6,0 (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄).

Brain Heart Infusionbroth, Oxoid Ltd., Hampshire, UK.

глицерол p.a., Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Spain.

4.2 Експериментален дизајн

Сите експерименти со животните беа извршени во согласност со OECD-начелата за добра лабораториска практика (OECD Principles of Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM (98) 17, as revised in 1997) и македонската легислатива, која е усогласена со Директивата 2010/63/EУ за заштита на животните кои се користат за научни потреби (Petreska Ivanovska и сор., 2017).

Во експериментот беа користени женски стаорци Wistar, со телесна маса од 180 до 250 g и старост од 10 до 14 недели, набавени од националниот акредитиран снабдувач (Сервис за лабораториски животни при Универзитетот “Св. Кирил и Методиј”, Факултет за природни науки и математика, Скопје, Република Македонија). Животните беа сместени во метаболички кафези на собна температура во климатизирана просторија, со промена на циклусот ден/ноќ на секои 12 часа и пристап до храна и вода *ad libitum*. Експериментот е изведен во лабораторијата за работа со експериментални животни при Институтот за фармакологија и токсикологија на Медицинскиот факултет во Скопје, според протоколот прикажан во табела 1.

Табела 1. Протокол за определување на антиинфламаторниот ефект на функционален ајран со пробиотик, синбитик или синбиотска микрочестична формулација, во експериментален модел на колит (Petreska Ivanovska и сор., 2017).

Група (Wistar стаорци, n=6)	Интраколонски третман на животинскиот модел (по 14 дена од почетокот на експериментот)	Перорален третман со пробиотски/синбиотски функционален ајран (во времетраење од 21 ден)
Група I (негативна контрола)	0,9% NaCl	/
Група II (позитивна контрола)	30 mg/kg TNBS	/
Група III (инкапулиран <i>L. casei</i> + Synergy 1)	30 mg/kg TNBS	Ајран со инкапулиран синбиотик (8,5-8,9 log CFU/g) (еднаш /24 часа)
Група IV (инкапулиран <i>L. Casei</i> + Synergy 1)	30 mg/kg TNBS	Ајран со инкапулиран синбиотик (8,5-8,9 log CFU/g) (два пати /24 часа)
Група V (микрочестички без синбиотик)	30 mg/kg TNBS	Ајран со празни цитозан- Са-алгинатни честички

Стаорците беа поделени по случаен избор во 5 групи (n=6). Времетраењето на експериментот изнесуваше 21 ден, а индукцијата на инфламацијата беше направена по 14 дена од почетокот на третманот според моделот на Морис и сор. (Morris и сор., 1989), соодветно модифициран од Petreska Ivanovska и сор. (2017), според кој параметрите на инфламација го достигнуваат максималното ниво 6-тиот ден од индукцијата (Morris и сор., 1989; Mladenovska и сор., 2007; Peran и сор., 2007). Клиничките податоци упатуваат дека третманот со пробиотици е поефикасен во превенција од појава на инфламаторно цревно заболување или негово повторување отколку во редуција на активната инфламација (Hörmannspurger и Haller, 2010). Дваесет и четири часа пред хемиската индукција на колит, стаорците беа изгладнети и лесно анестезирани со етер. Раствор на ТНБС во 50% етанол (30 mg/kg), во волумен од 0,25 mL, беше применет интраколонски, со катетер инсертиран во должина од 4 до 8 cm во аналниот отвор на стаорците. Контролните животни беа третирани со ист волумен 0,9% NaCl, интраколонски. Дозата на ТНБС, применета во ова истражување

(30 mg/kg), пониска е од дозите кои вообичаено се користат во протоколот за индукција на инфламација кај стаорци (120 и 150 mg/kg). Изборот на дозите на хемискиот индуктор на инфламацијата е во согласност со природата на третманот со функционален прехранбен производ за кој се очекува пред сè да покаже превентивно дејство, поради што е предизвикан поблаг степен на инфламација. Третманот со ајран и ајран со инкапсулиран синбиотик, соодветно беше продолжен уште 7 дена по индукцијата на колитот, а потоа стаорците беа жртвувани со цел да се одредат параметрите на инфламација, односно ткивно оштетување.

Експериментот опфати 5 експериментални групи и тоа: негативна контрола (I); позитивна контрола (II), експериментални групи, од кои едната беше третирана со ајран со инкапсулиран синбиотик еднаш на ден (III), втората со ајран со инкапсулиран синбиотик двапати на ден (IV) и третата група со ајран што содржи празни цитозан-Са-алгинатни честички (без пробиотик/синбиотик), со цел да се процени влијанието на полимерите врз инфламацијата (V). Позитивната и негативната контролна група третирани со конвенционален ајран беа вклучени во експериментот, со цел да се процени влијанието на прехранбениот производ врз инфламацијата.

4.3 Методи

4.3.1. Хистохемиски метод

По фиксирање на материјалот во 10% неутрален формалин, ткивата се дехидрираат низ серија алкохоли, се расветлуваат во ксилол и се вклопуваат во парафин. Парафинските блокови со микротом се сечат на слајдови со дебелина од 3 до 5 микрометри, се бојат со Хематоксилин-Еозин и методот Periodic Acid Schiff (PAS). Овој метод е важен за утврдување на разликите на ткивната структура, како и за однесувањето на гоблет-клетките и продукцијата на муцин во различни фази од експериментот.

4.3.2. Имунохистохемиски метод

За изработка на имунохистохемискиот метод е користен En Vision Kit (Dako ChemMate, Denmark), а од примарните антитела се користени следните: monoclonalrabbit-anti-human CD3 за Т-лимфоцити (ДАКО), monoclonalmouse-anti-human CD79 α cy и CD20cy за В-лимфоцити (ДАКО), monoclonalmouse-anti-human CD68 и monoclonalmouse-anti-human MAC387 (ДАКО) за макрофаги. Утврдувањето на дистрибуцијата на овие клетки во различни фази на експериментот е важно за подетално разбирање на имнуолошкиот одговор на цревата при воспаление, како и за објаснување на механизмот со кој синбиотикот влијае врз тој процес.

Примероците од колон кои беа фиксирани во 10% формалин, рутински се процесирани низ серија од алкохоли и ксилол, вкалапени во парафин и исечени со микротом на слајдови со дебелина 3-5 μ m. Потоа, извршена е нивна депарафинизација во ксилол (2x10 min) и дехидратација во серија од алкохоли (96%, 70%, 50% по5 min).

За блокирање на ендогената пероксидаза, исечоците се инкубираат 20 мин. во 3% водороден пероксид (H₂O₂).

Како преттретман за овој метод, за демаскирање на антигените, користен е цитратен пуфер со рН 6,0 и рН 9,0, со загревање во микробранова печка на 500W во траење од 20 мин. Се испираат со пуфер за испирање (3x2 мин).

Инкубацијата со примарните антитела за CD3 Т-лимфоцитите, CD79 α cy и CD20cy В-лимфоцити, CD68 и MAC387 (ДАКО) за макрофаги траеше 20 мин.

Следните разредувања беа користени за антителата: CD3- 1:50, CD79 α cy- 1:100, CD20- 1:100, MAC387-1:200, додека за CD68 не се користеше разредување.

Потоа се нанесува HRP и се инкубира 20 мин.

Сите испирања во текот на боењето се направени со фосфатен пуфер (PBS, pH 7,2).

Хромоген, 3,3'-диаминобензидин тетрахидрохлорид (DAB - DAKO), кој служи за визуелизација на Ag-At реакцијата, нанесен е на исечоците и инкубиран 5 мин на собна температура, по што беа испрани со PBS и обоени со Маер хематоксилин за контрастирање.

4.3.3. Определување на степенот на ткивно оштетување и инфилтрација со воспалителни клетки

Табела 2. Определување на степенот на ткивно оштетување и инфилтрација со воспалителни клетки.

Инфилтрација со воспалителни клетки		Промени на епител	Структура на мукозата
Степен на оштетување	Опсег		
Минимален +	Мукоза	Фокални ерозии	Минимална загуба на гоблет клетки
Умерен ++	Мукоза и субмукоза	Ерозии	+/- фокални улцерации, умерена загуба на гоблет-клетки
Силен +++	Трансмурален		Ирегуларни крипти со загуба на крипти, опсежни улцерации + гранулационо ткиво, опсежна загуба на гоблет-клетки

Степенот на оштетување беше означен како минимален (+), умерен (++) и силен (+++). Како минималниот степен на оштетување беа означени оние промени кои ја зафаќаа само мукозата, во вид на фокални ерозии и минимална загуба на гоблет-клетки. При умерен степен на оштетување, промените ги зафаќаат мукозата и субмукозата и тоа во вид на ерозии со присуство или отсуство на фокални улцерации и умерена загуба на гоблет-клетки. При силниот степен на оштетување (+++) промените ги зафаќаат сите слоеви на цревата и се придружени со ирегуларни крипти и загуба на крипти, опсежни улцерации + гранулационо ткиво, како и опсежна загуба на гоблет-клетки (табела 2).

5. РЕЗУЛТАТИ

5. 1. Макроскопски и микроскопски промени и дистрибуција на Т-лимфоцитите, В-лимфоцитите и макрофагите во колонот кај стаорците од – негативната контролна група (група I)

5. 1. 1. Макроскопски промени

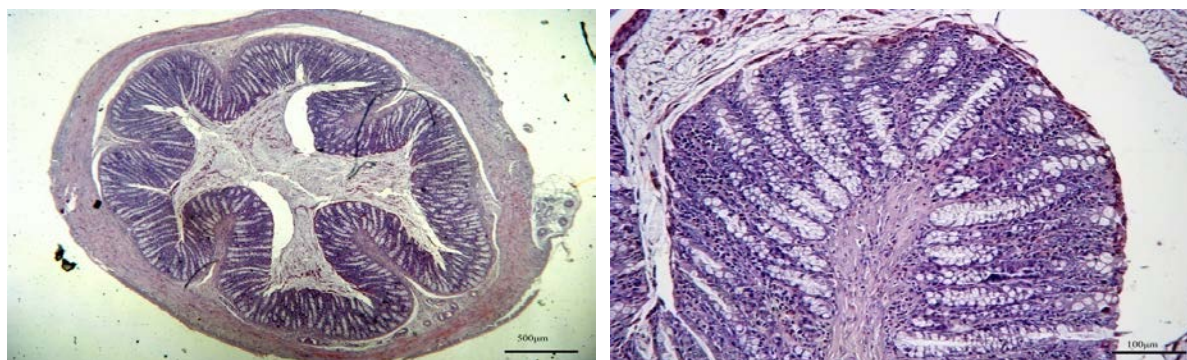
Не се забележани промени во макроскопскиот изглед кај негативната контролна група.



Слика1. Фотографија на екстрахиран колон од контролна група без индуцирана инфламација

5. 1. 2. Микроскопски промени (Х.Е.)

Контролната група покажа нормална структура на колонот: здрава мукоза со ентероцити и гоблет-клетки, како и сврзно ткиво помеѓу нив, мускуларис мукоза и нормална субмукоза и мускуларис екстерна. Лимфоцитите во ламина проприја се ретко забележливи. Местимични лимфоидни нодули се идентификувани во субмукозата. Отсуствуваат инфламаторни инфилтрати. Нормалните крипти се поврзани со соодветната ламина мускуларис.



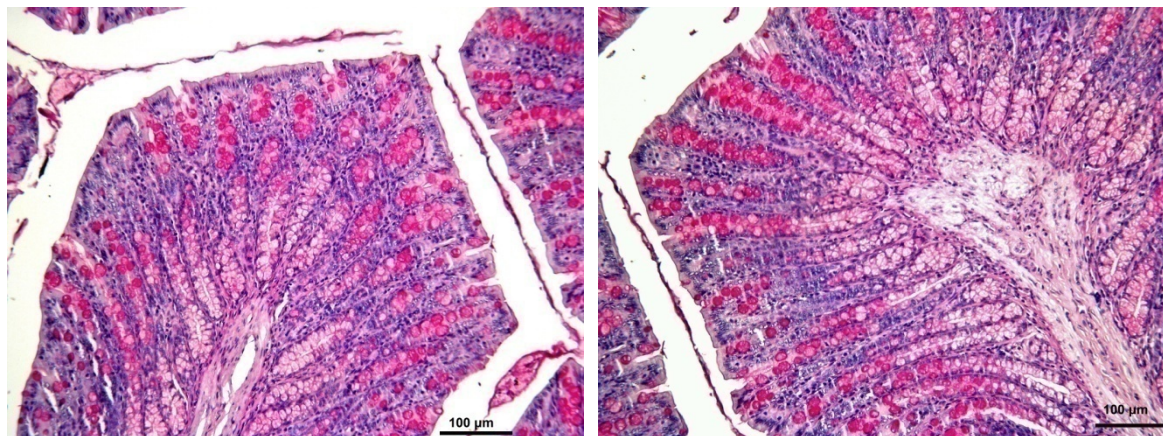
а.

б.

Слика 2. Стаорци, контролна група без индуциран колитис, колон, Х.Е. а. x20 и б.х100

5.1. 3. PAS (Periodic Acid Schiff) боeње

Негативната контрола при боeњето со PAS методот покажа нормална структура на ткивото со правилен распоред на позитивно обоени гоблет-клетки кои лачат муцин.



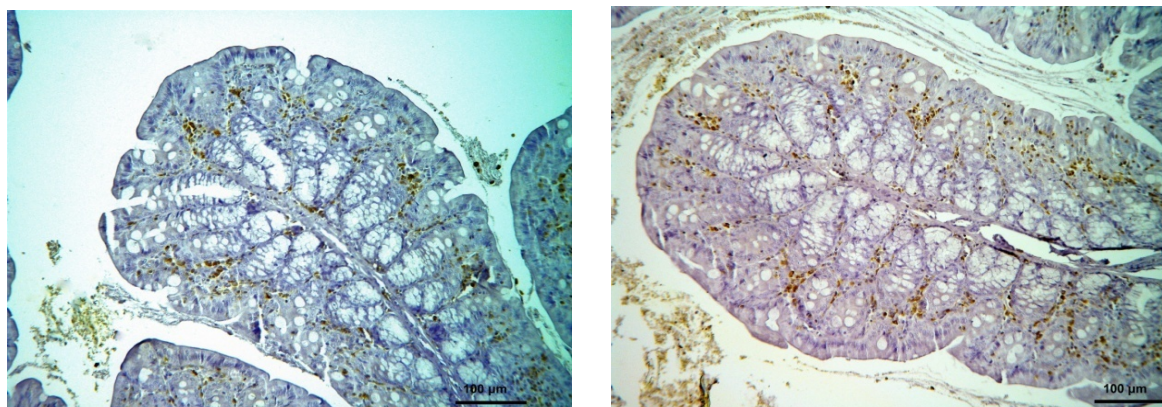
а.

б.

Слика 3 а, б. Стаорци, контролна група без индуциран колитис, колон, PAS, x 100

5. 1. 4. Дистрибуција на CD3 Т-лимфоцитите

Кај контролните групи е забележан мал број CD3-позитивни клетки карактеристичен за здраво ткиво, претежно распоредени во мукозата. Кај сите стаорци CD3-клетките главно се забележани во ламина епителијалис сместени помеѓу другите клеточни елементи, субепителните региони како поединечни клетки подлабоко помеѓу криптиите и длабоката ламина проприја, но во најголем број локализирани субепително.



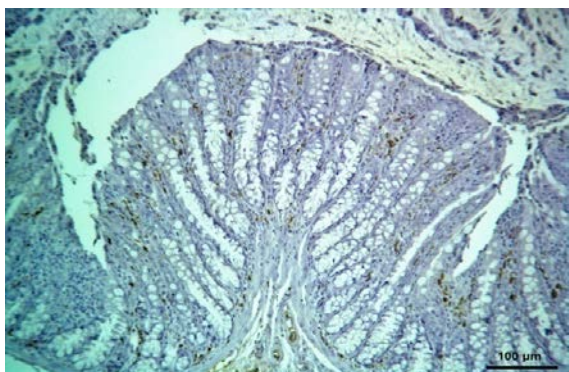
а.

б.

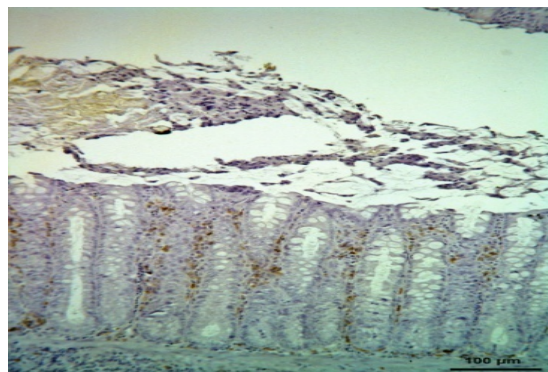
Слика 4. а, б. Стаорци, контролна група, колон, CD3-позитивни клетки, ламина проприја, ламина епителијалис, крипти на колонот, En Vision x 100.

5. 1. 5. Дистрибуција на CD20 В-лимфоцитите

Во парафинските пресеци од колонот кај стаорците од контролната група, боени со En vision методот, забележан е мал процент на CD20-лимфоцити карактеристичен за нормално ткиво, распоредени претежно во мукозата и тоа во ламина проприја и во glandуларниот епител. В-клетките кај оваа група претежно се сконцентрирани во централната област на лимфоидните фоликули.



а.

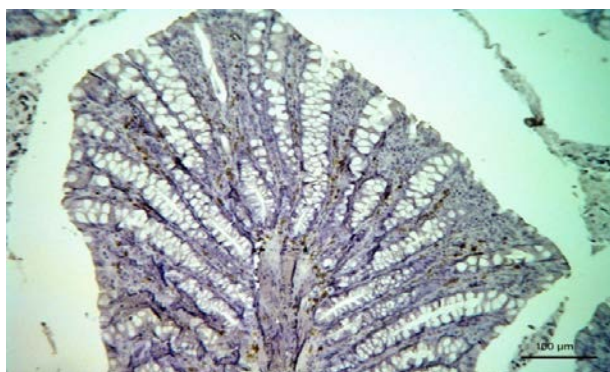


б.

Слика 5. а, б. Стаорци, контролна група, колон, CD20-позитивни клетки, туника мукоза, En Vision x 100.

5. 1. 6. Дистрибуција на CD79α В-лимфоцитите

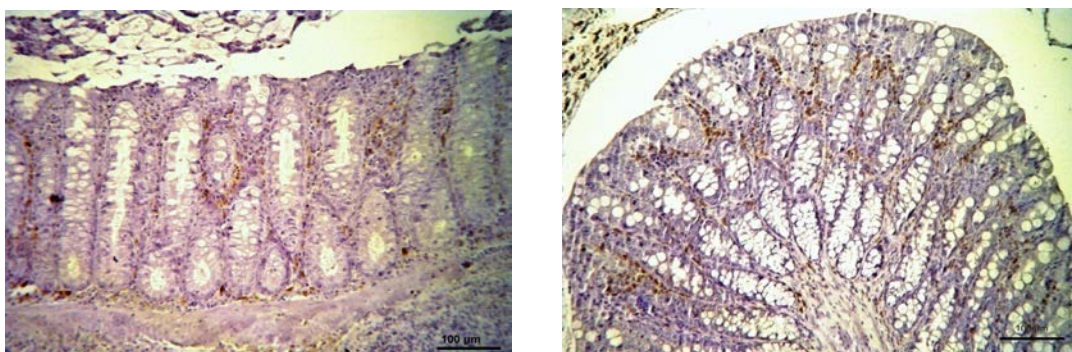
Со имунохистохемиската анализа на пресеци од колонот кај стаорците од контролната група, боени со методот En vision, воочен е мал број CD79α-позитивни клетки со нормална дистрибуција во ламина проприја, додека во glandуларниот епител ги има во многу мали количини. Малку поголема нивна агрегација има во солитарните лимфни фоликули на колонот кај стаорците.



Слика 6. Стаорци, контролна група, колон, CD79α-позитивни клетки, ламина проприја, En Vision x 100.

5. 1. 7. Дистрибуција на CD68-позитивни клетки

Во парафинските исечоци од колонот кај стаорците од контролната група забележани се мал број CD68-позитивни клетки претежно во ламина проприја и субмукозата. Нешто поголема концентрација на овие клетки има во областа на куполата од ПП во колонот.



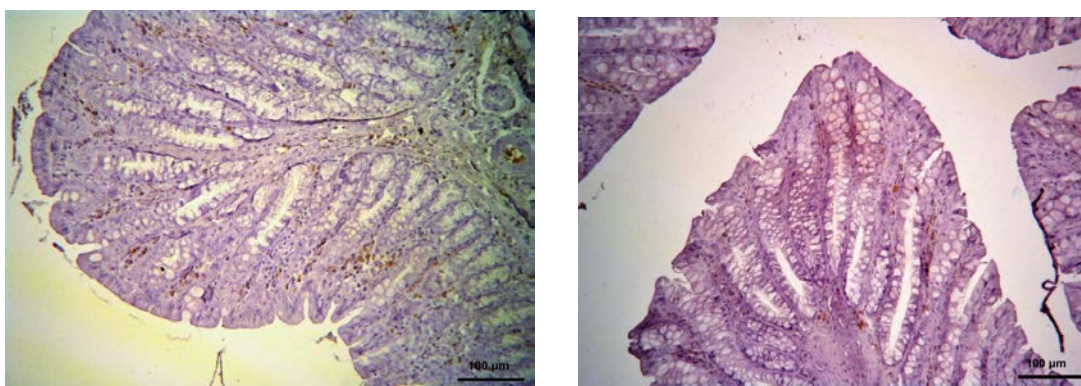
а.

б.

Слика 7. а, б. Стаорци, контролна група, колон, CD68-позитивни клетки, туника мукоза, En Vision x 100.

5. 1. 8. Дистрибуција на MAC387-позитивни клетки

Со имунохистохемиската анализа на пресеците од колонот кај контролната група беа забележани само поединчни MAC387-позитивни клетки во колонот. Оваа клеточна популација е дифузно распространета во ламина проприја, помеѓу цревните жлезди. Најголем број позитивни MAC387-клетки се сместени субепително и во околината на базата на Либеркиниевите крипти. Поединечни MAC387-позитивни клетки, се воочуваат во субмукозата и субсерозата на колонот.



а.

б.

Слика 8. а, б. Стаорци, контролна група, колон, MAC387-позитивни клетки, ламина проприја, En Vision x 100.

5. 2. Макроскопски и микроскопски промени и дистрибуција на Т-лимфоцитите, В-лимфоцитите и макрофагите во колонот кај стаорците од – позитивната контролна група (група II)

5. 2. 1. Макроскопски промени

За разлика од негативната, кај позитивната контролна група се забележани следните промени: задебелување на слузница со хиперемични подрачја, проширување на дисталниот дел од колонот и присуство на мека и неконзистентна столица. Постојат оштетувања на мукозата во форма на улцерации.



а.



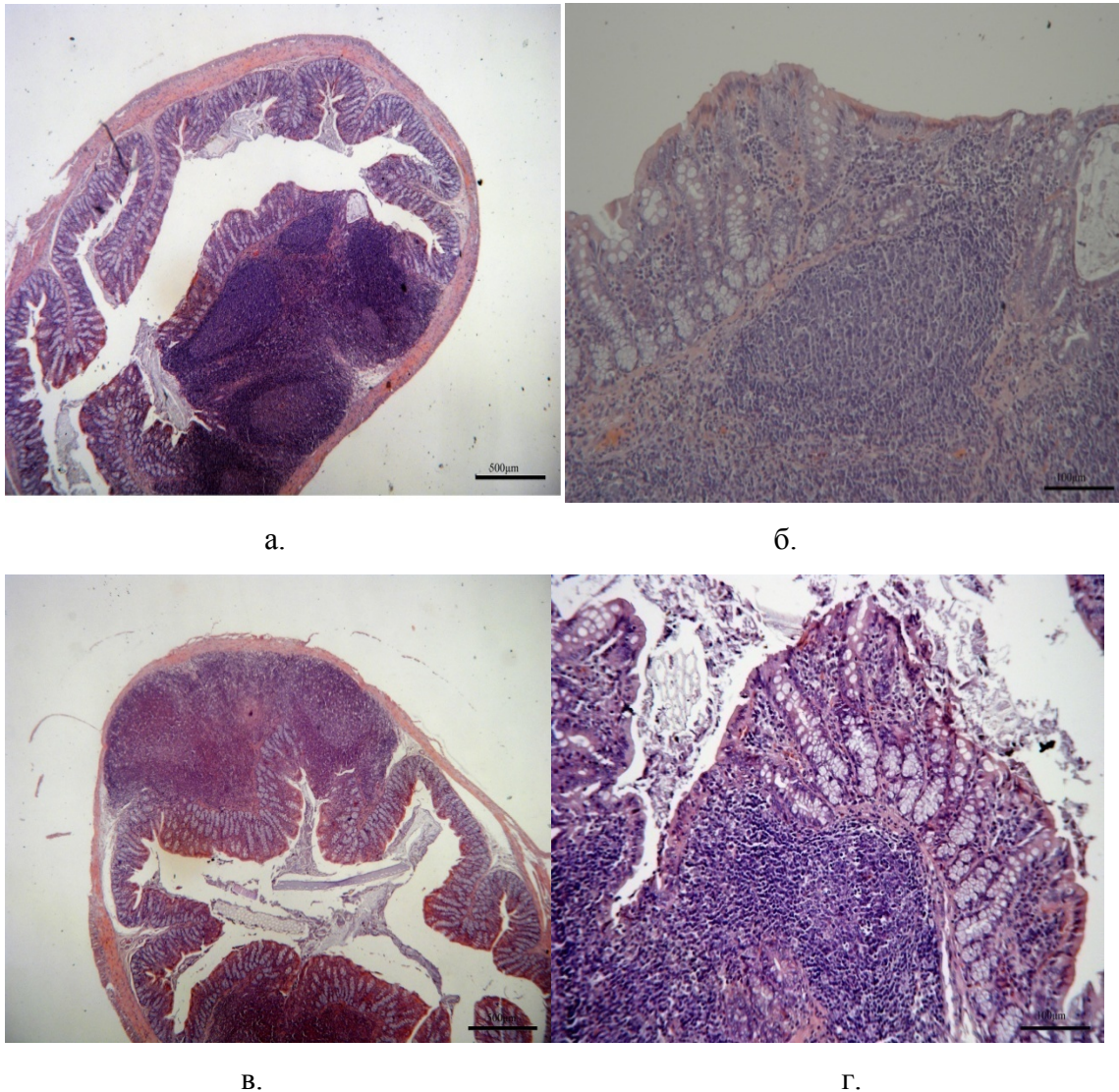
б.

Слика 9. Фотографија од екстрахиран колон од контролна група со индуцирана инфламација; а) надворешен изглед на колонот; б) надолжен пресек на колонот.

5. 2. 2. Микроскопски промени (Х.Е.)

На микроскопскиот преглед кај позитивната контрола беа забележани суперфицијални ерозии, задебелување на сидот на колонот со истенчување на мукозата и задебелување на мускуларис мукоза, како и хронични инфламаторни процеси кои ја афектираат мукозата и субмукозата. Исто така, забележани беа и неколку делови со нормална мукоза, но со присуство на силна фоликуларна хиперплазија во мускуларис екстерна и делови со хеморагични промени со точкести крварења, губење на мукозата и замена со гранулационо ткиво, како и инфламаторни процеси. На некои места се

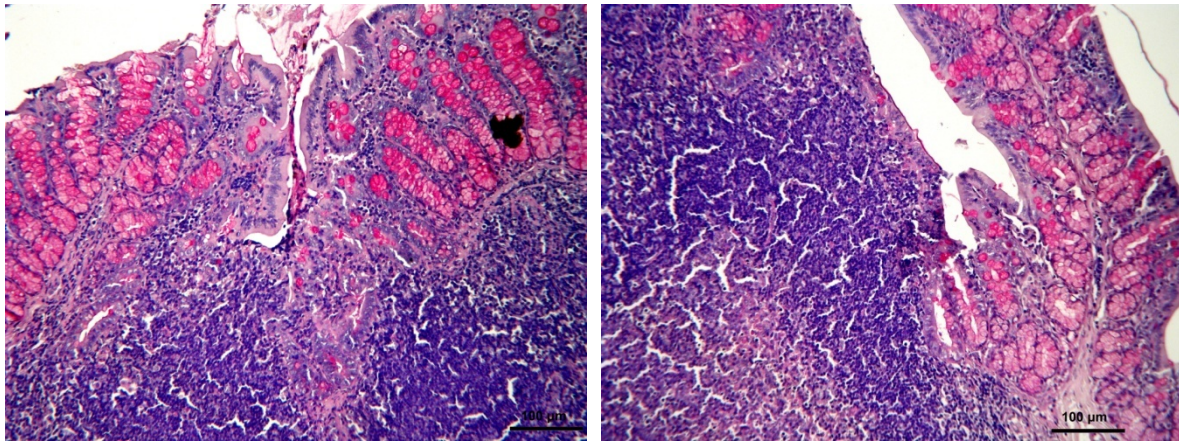
забележуваат и улцерозни промени на *tunica mucosa* и *submucosa*. Покрај силното ткивно оштетување, ТНБС предизвика масивна инфилтрација со имунолошки клетки во колнот. Инфилтрацијата ја сочинуваат макрофаги, лимфоцити и леукоцити.



Слика 10. Стаорци, контролна група со индуциран колитис, колон, Х.Е. а, в. x20 и б, г. x100

5. 2. 3. PAS (Periodic Acid Schiff) бојење

Со помош на PAS-методот, кај групата со индуциран колитис беше утврдено намалување на бројот на гоблет-клетки поради деструкција на криптиите и намалување на количината на муцин. Интензитетот на бојењето на цитоплазмата кај овие клетки е значително послаб во споредба со контролната група. Покрај тоа, се забележуваат и целосно небоени подрачја на жлездената слузница на колонот.



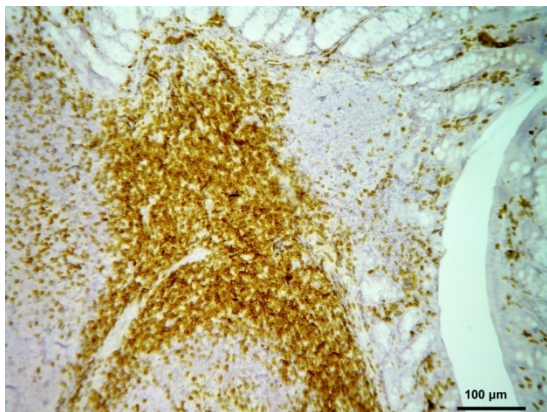
а.

б.

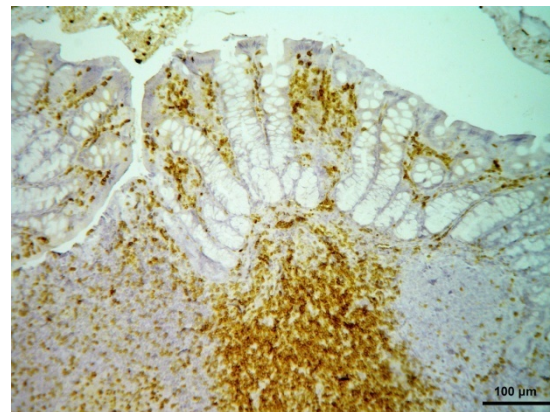
Слика 11. а, б. Стаорци, контролна група со индуциран колитис, колон, редукција на гоблет-клетки и муцин, PAS x 100.

5. 2. 4. Дистрибуција на CD3 Т-лимфоцитите

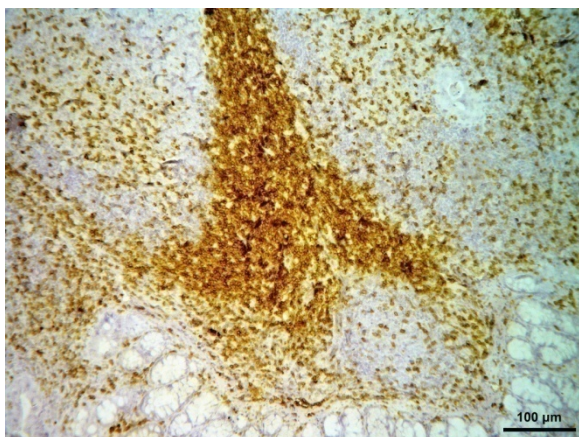
Имунохистохемиското боење на пресеците од колонот кај стаорците од позитивната контролна група покажаа висока концентрација на CD3-позитивни клетки распоредени во целата структура на колонот: мукозата (каде што беше присутна), субмукозата, мускуларисот и во некои случаи дури и серозата. Овие клетки се воочени интраепително на површината и во криптите на колонот. Бројот на позитивни интраепителни лимфоцити сместени во криптите на колонот е поголем во однос на нивниот број кај стаорците од негативните контролни групи. Ретки клетки од ламина проприја на мукозата на колонот покажуваат имунореактивност на CD3-антителото. Т-лимфоцитите ја сочинуваат периферната обвивка од лимфоидните агрегати, додека во централниот дел се помалку застапени.



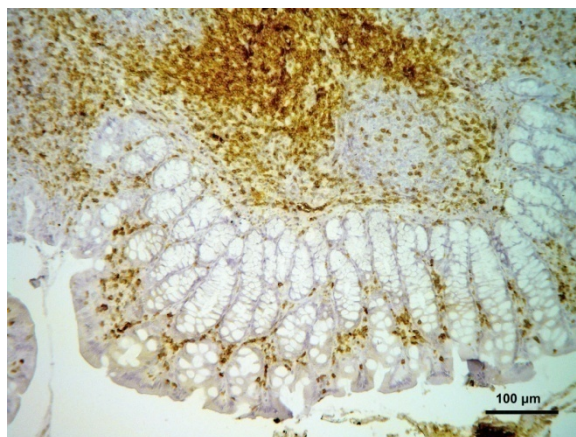
а.



б.



в.

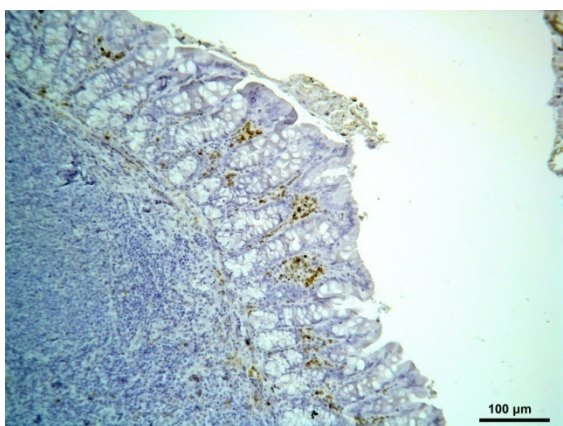


г.

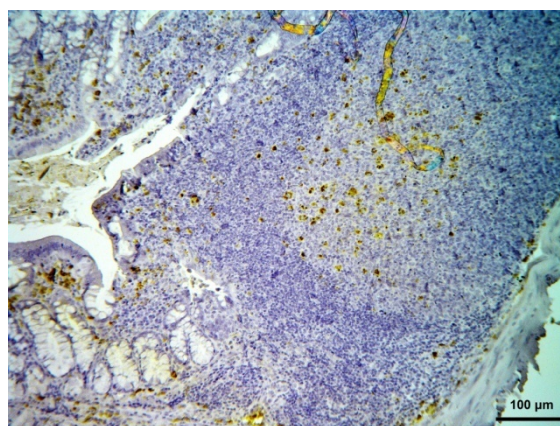
Слика 12. а, б, в, г. Стаорци, контролна група со индуциран колитис, колон, CD3-позитивни клетки, туника мукоза, туника субмукоза, En Vision x 100.

5. 2. 5. Дистрибуција на CD20 В-лимфоцитите

Стаорците од контролната група со индуциран колитис покажаа повисока концентрација на CD20-позитивни клетки во споредба со негативната контрола распоредени во целата структура на колонот: мукозата (каде што беше присутна), субмукозата, мускуларисот и во некои случаи дури и серозата. Нивната интраепителна дистрибуција е зголемена, а најголема концентрација на овие клетки има во областите со воспалителен инфилтрат.



а.

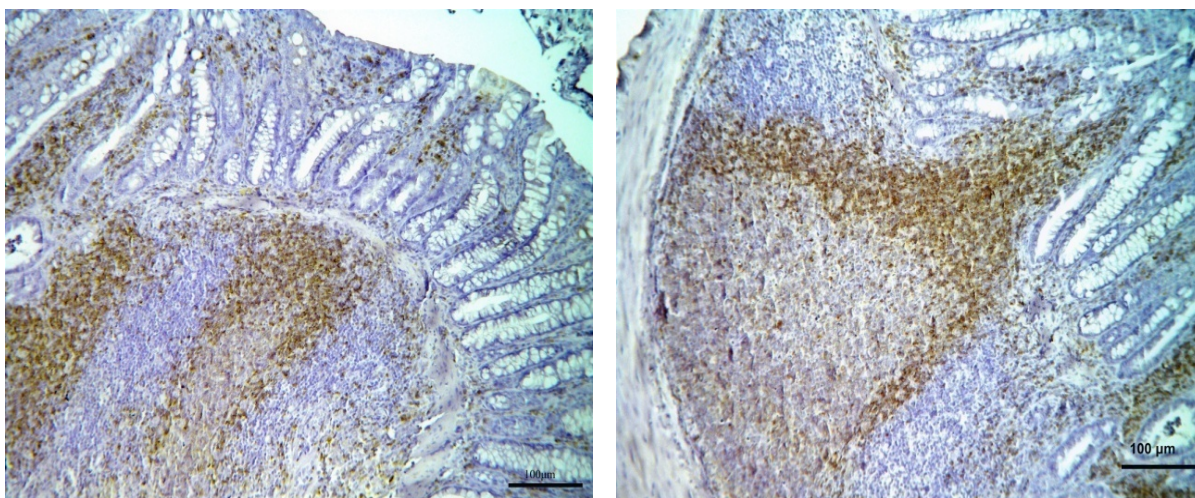


б.

Слика 13. а, б. Стаорци, контролна група со индуциран колитис, колон, CD20-позитивни клетки, туника мукоза, туника субмукоза, En Vision x 100.

5. 2. 6. Дистрибуција на CD79 α В-лимфоцитите

Кај стаорците со индуциран колитис, со помош на имунохистохемискиот метод е утврдено дека CD79 α -позитивните клетки се сместени во густите клеточни инфилтрати во ламина проприја во мукозата и субмукозата на колонот. В-клетките претежно се сконцентрирани во централната област на лимфоидните агрегати. Кај оваа група, нивното присуство во епителот е нешто поголемо во споредба со негативната контрола. Количина на CD79 α -позитивни клетки во мукозата и субмукозата е значително поголема во споредба со CD20-позитивните клетки.



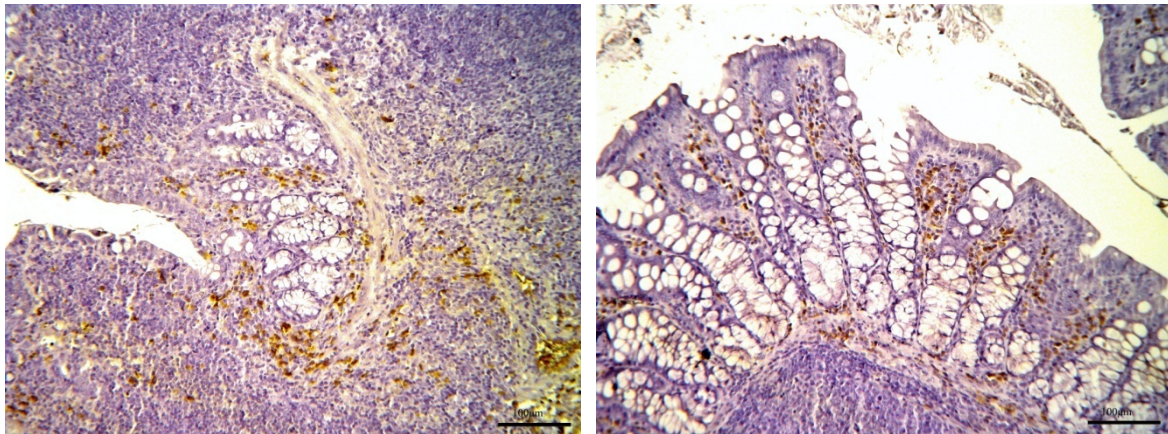
а.

б.

Слика 14. а, б. Стаорци, контролна група со индуциран колитис, колон, CD79 α -позитивни клетки во густ клеточен инфилтрат, En Vision x 100

5. 2. 7. Дистрибуција на CD68-позитивни клетки

Апликацијата на TNBS предизвика значителна инфилтрација со CD68-позитивни клетки во ламина епителијалис, длабоката ламина проприја, помеѓу криптите и во близина на криптите во колитичната група, особено каде што воспалението е посилено, во областите со улцерации.



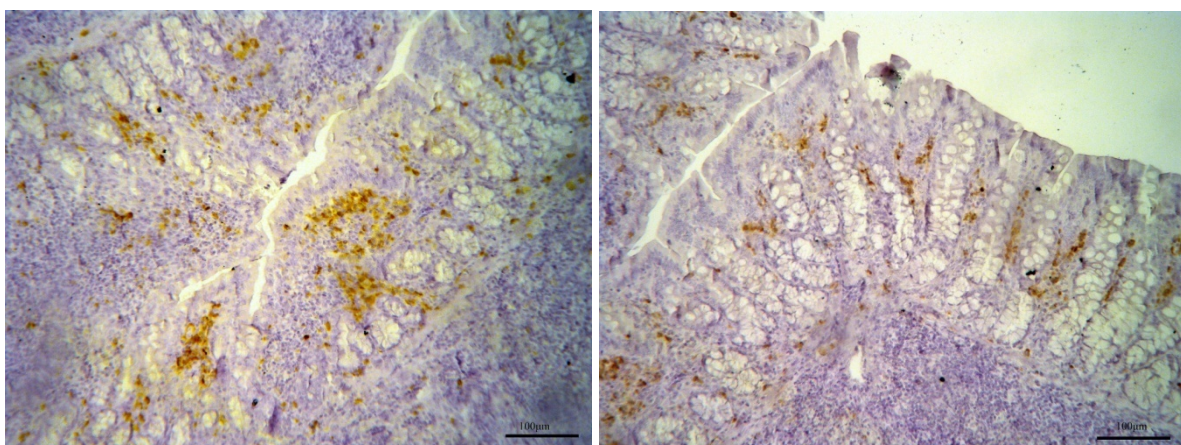
а.

б.

Слика 15. а, б. Стаорци, контролна група со индуциран колитис, колон, CD68-позитивни клетки во воспалитениот инфилтрат и ламина епителијалис, En Vision x 100.

5. 2. 8. Дистрибуција на MAC387-позитивни клетки

MAC387 ги обои полиморфонуклеарните неутрофили и некои мононуклеарни клетки во значително поголем број во споредба со негативната контрола. Овие клетки се дифузно распространети низ средишниот дел на ламина проприја помеѓу жлездите на колонот. Нивното присуство е значително поголемо во ламина епителијалис и во лимфоидните агрегати во мукозата и субмукозата, а нивна најголема популација е забележана во близина на местата со улцерации каде што беа идентификувани MAC387-позитивни клетки со дендритична морфологија.



а.

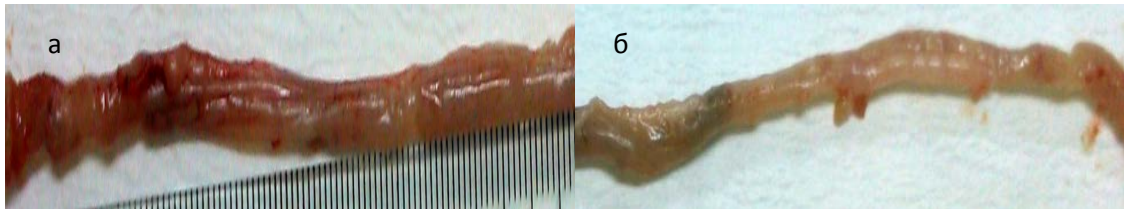
б.

Слика 16. а, б. Стаорци, контролна група со индуциран колитис, колон, MAC387-позитивни клетки во воспалитениот инфилтрат и ламина епителијалис, En Vision x 100.

5. 3. Макроскопски и микроскопски промени и дистрибуција на Т-лимфоцитите, В-лимфоцитите и макрофагите во колонот кај стаорците од – групите третирани со инкапсулиран синбиотик еднаш и два пати на ден (група III, IV)

5. 3. 1. Макроскопски промени

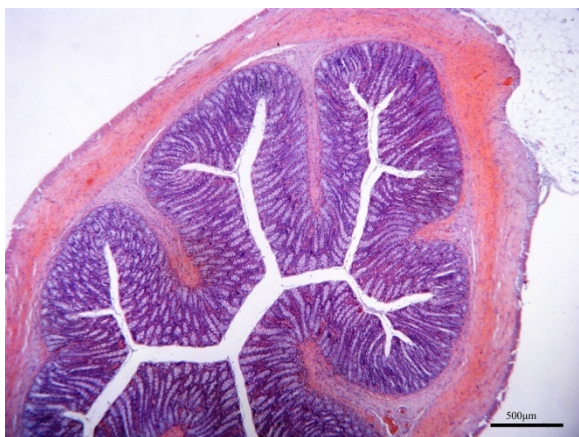
Макроскопскиот изглед на колонот кај стаорците со индуциран колитис, а кои беа третирани со ајран со инкапсулиран синбиотик е претставен со промени кои се со значително помал интензитет во споредба со групата со индуциран колитис. Не е утврдена разлика во макроскопските и микроскопските промени во колонот помеѓу групите со еднократна и двократна апликација на ајран што содржи инкапсулиран синбиотик. Сидот на колонот кај овие две групи е умерено задебелен со блага хиперемича и иницирани крвни садови, без присуство на ерозии и улцерации. Дисталниот дел на колонот е проширен со значајна задршка на цревна содржина со леплива конзистенција.



Слика17. Фотографија од екстрахиран колон од стаорци третирани со ајран со инкапсулиран синбиотик; еднаш на ден (а) и два пати на ден (б).

5. 3. 2. Микроскопски промени (Х.Е.)

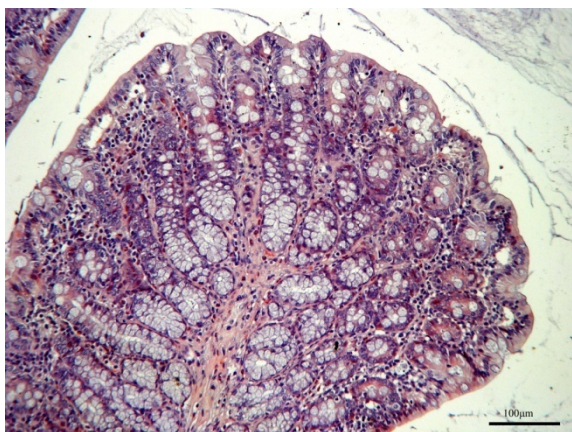
Наодот кај стаорците третирани со инкапсулиран синбиотик покажува значителна редукција на оштетувањето на колонот. Постои умерена субепителна полиморфонуклеарна инфилтрација со пунктативни мукозни ерозии. Субмукозата се одликува со дилатирани крвни садови. Хиперплазијата на одделни сегменти и пролиферацијата на лимфатично ткиво во *tunica mucosa* упатува на постоење на репаративен процес.



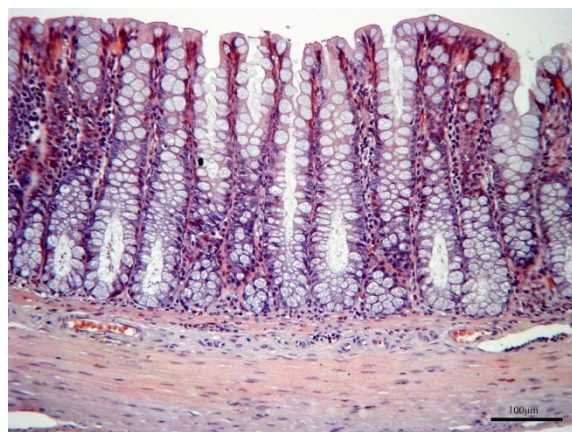
а.



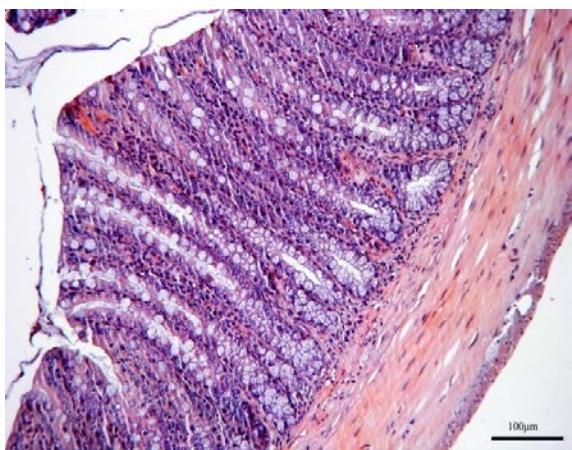
б.



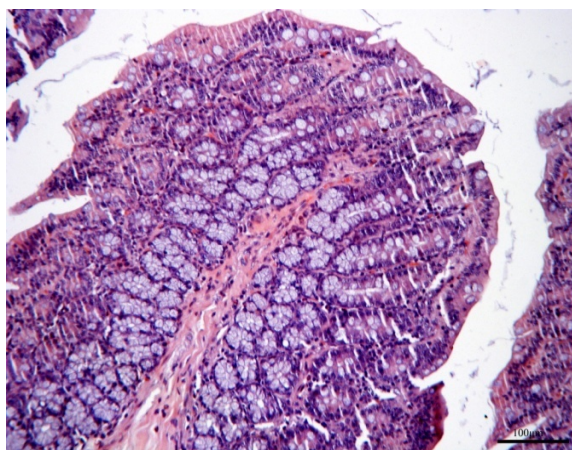
в.



г.



д.

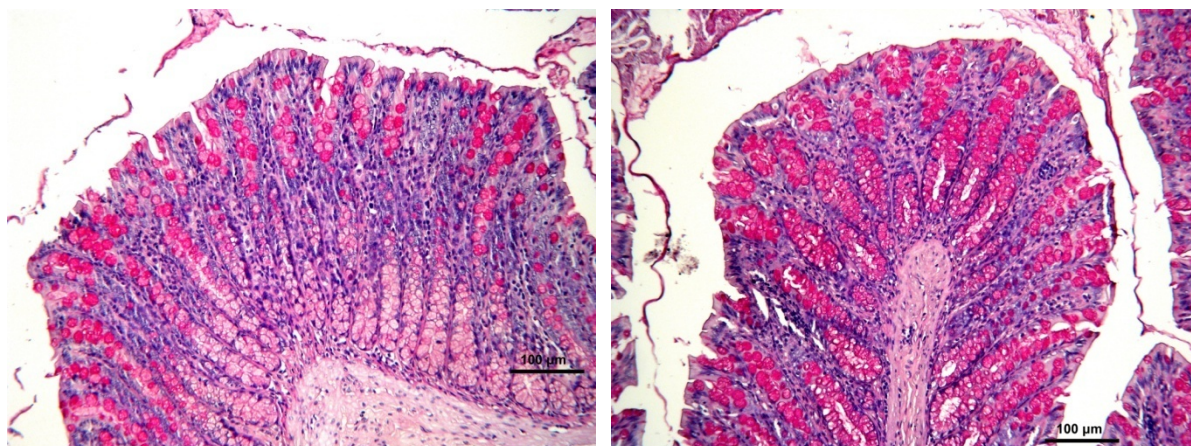


е.

Слика 18. Стаорци, група третирана со ајран што содржи инкапсулиран синбиотик, колон, Х.Е. а, б. x 20 и в, г, д, е. x 100

5. 3. 3. PAS (Periodic Acid Schiff) боeње

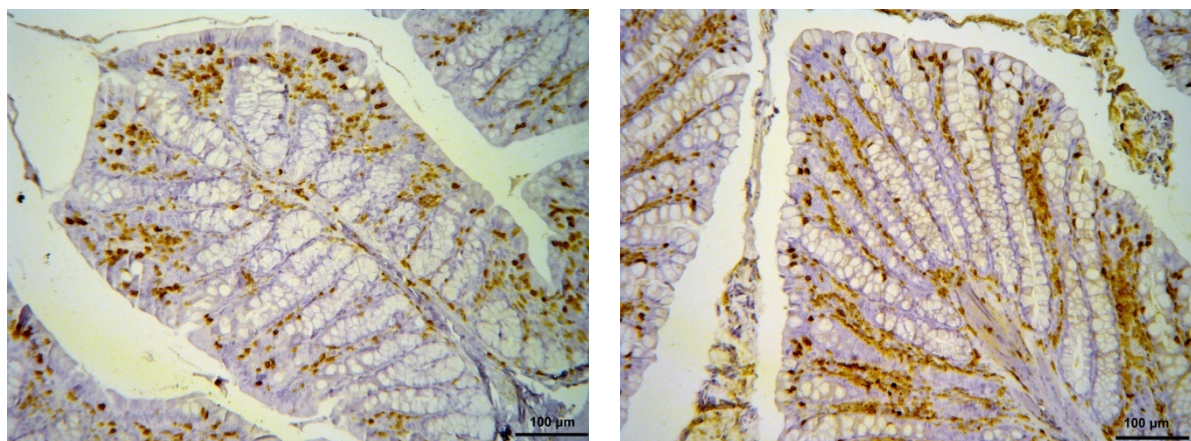
Боeњето со PAS методот (Periodic Acid Schiff) кај групите третирани со синбиотик покажа зачувување на бројот на гоблет-клетките и продукција на муцин во зачуваното ткиво.



Слика 19. а, б. Стаорци, група третирана со ајран што содржи инкапсулиран синбиотик, колон, правилен распоред на гоблет клетки и муцин, PAS x 100.

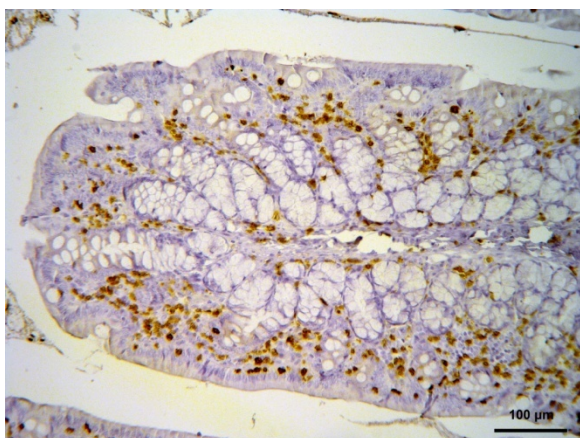
5. 3. 4. Дистрибуција на CD3 Т-лимфоцитите

Апликацијата на ајран со инкапсулиран синбиотик значајно го намали степенот на инфилтрација на воспалителни клетки во колонот. CD3 Т-клетките се со нормална дистрибуција во ламина проприја и ламина епителијалис помеѓу другите клеточни елементи, субепителниот регион и подлабоко помеѓу криптите и длабоката ламина проприја, со тоа што се застапени во значително помал број во споредба со колитичната група.

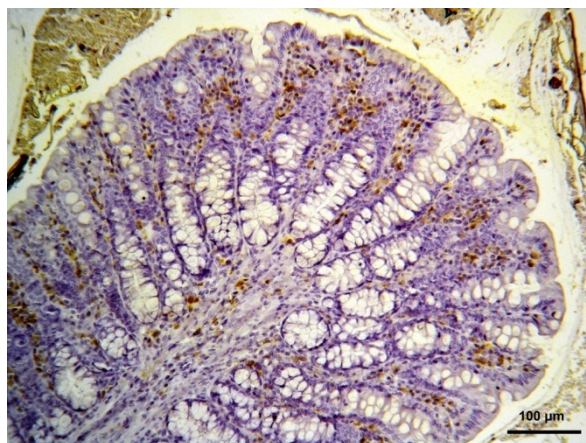


а.

б.



В.

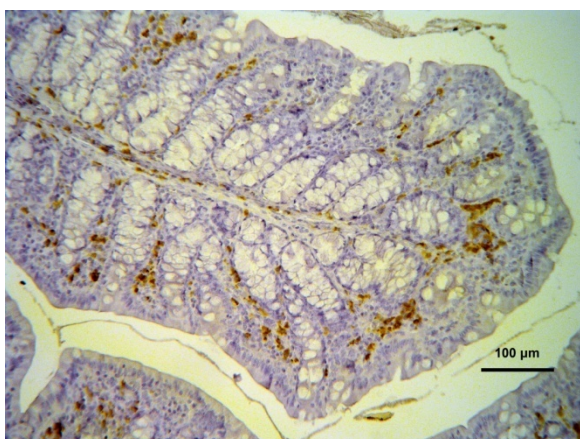


Г.

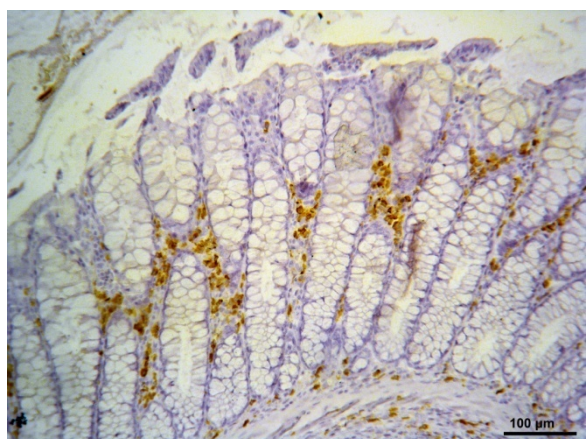
Слика 20. Стаорци, група третирана со ајран што содржи инкапсулиран синбиотик, колон, CD3-позитивни клетки, ламина проприја, ламина епителијалис, крипти на колонот, En Vision x 100.

5. 3. 5. Дистрибуција на CD20 В-лимфоцитите

Кај стаорците третирани со инкапсулиран синбиотик, CD20-позитивните лимфоцити беа забележани во мукозата и субмукозата со намален број во споредба со колитичните групи. Нивната дистрибуција претежно е во ламина проприја и во glandуларниот епител, како и во централната област на лимфоидните фоликули.



а.

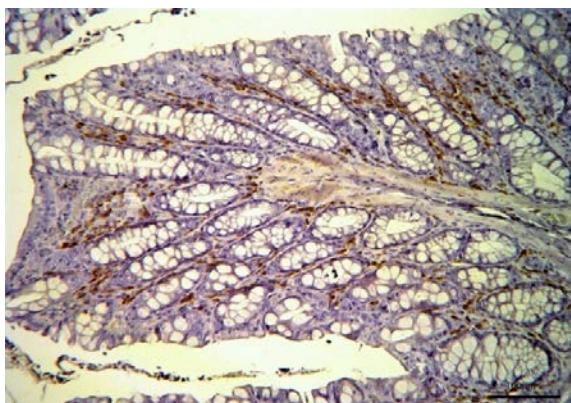


б.

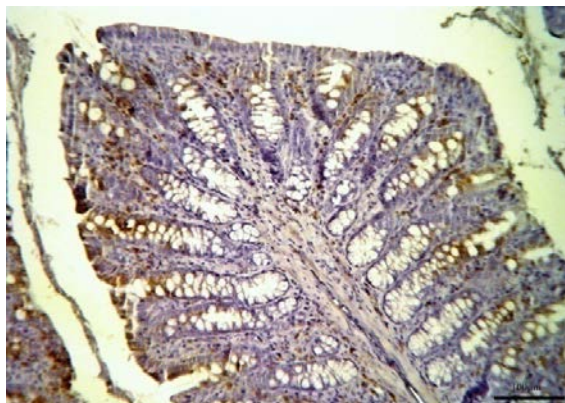
Слика 21. Стаорци, група третирана со ајран што содржи инкапсулиран синбиотик, колон, CD20-позитивни клетки, туника мукоза, En Vision x 100.

5. 3. 6. Дистрибуција на CD79 α В-лимфоцитите

Имунохистохемиската анализа на пресеците од колонот кај оваа група покажаа умерена концентрација на CD79 α -позитивни клетки ограничени на ламина проприја. Нивното присуство во ламина епителијалис и во солитарните лимфни фоликули е во многу помал број споредено со колитичните групи.



а.

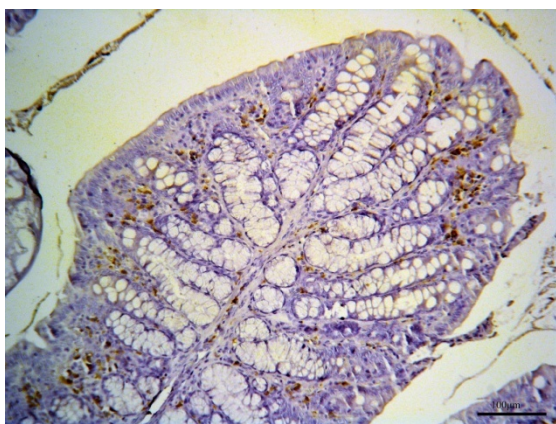


б.

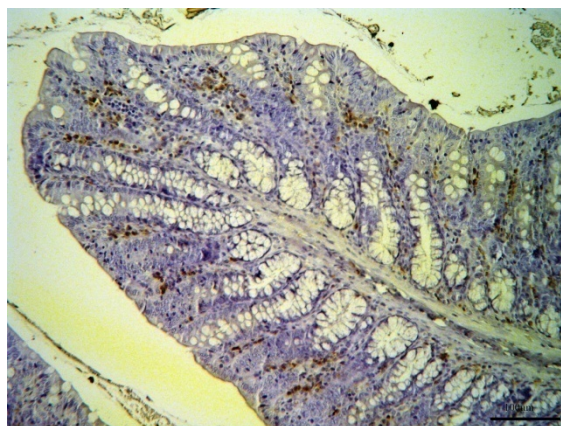
Слика 22. а, б. Стаорци, група третирана со ајран што содржи инкапсулиран синбиотик, колон, CD79 α -позитивни клетки, ламина проприја, ламина епителијалис, En Vision x 100.

5. 3. 7. Дистрибуција на CD68-позитивни клетки

Апликацијата на ајран со инкапсулиран синбиотик значајно го намали бројот на CD68-позитивните клетки во колонот. CD68-сигналите беа вратени во нормална состојба, односно нивната дистрибуција е локализирана во ламина проприја и субмукозата како и куполата од ПП во колонот.



а.

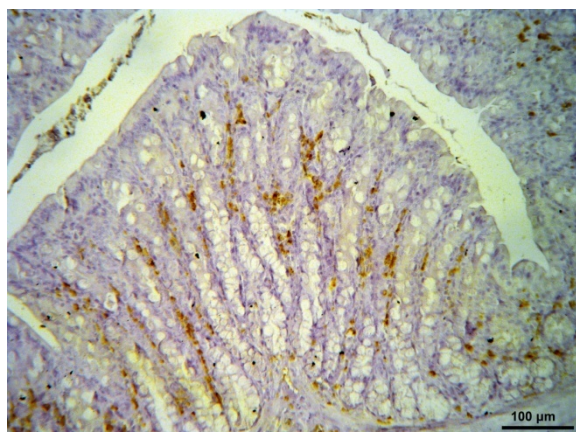


б.

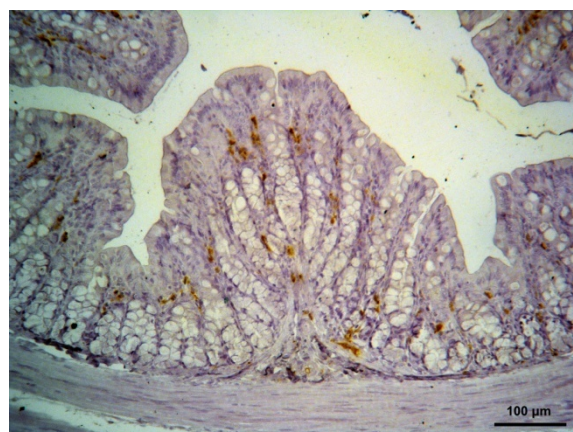
Слика 23. а, б. Стаорци, група третирана со ајран што содржи инкапсулиран синбиотик, колон, CD68-позитивни клетки, ламина проприја, ламина епителијалис, En Vision x 100.

5. 3. 8. Дистрибуција на MAC387-позитивни клетки

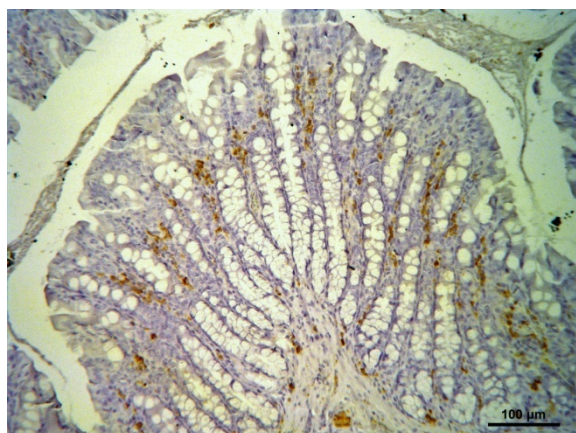
Со имунохистохемиската анализа на пресеците од колонот кај колитичната група третирана со ајран со инкапсулиран синбиотик забележано е скромно присуство на MAC387-позитивни клетки во сите слоеви на цревето, особено во ламина проприја помеѓу цревните жлезди, субепително и во околината и базата на Либеркиниевите крипти, како и во субмукозата на колонот.



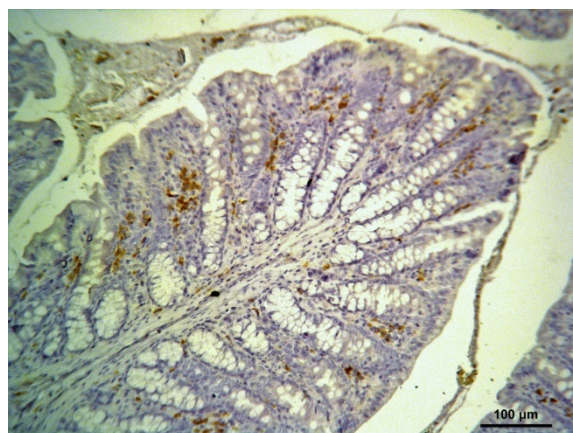
а.



б.



в.



г.

Слика 24. Стаорци, група третирана со ајран што содржи инкапсулиран синбиотик, колон, MAC387-позитивни клетки, туника мукоза, туника субмукоза, En Vision x 100.

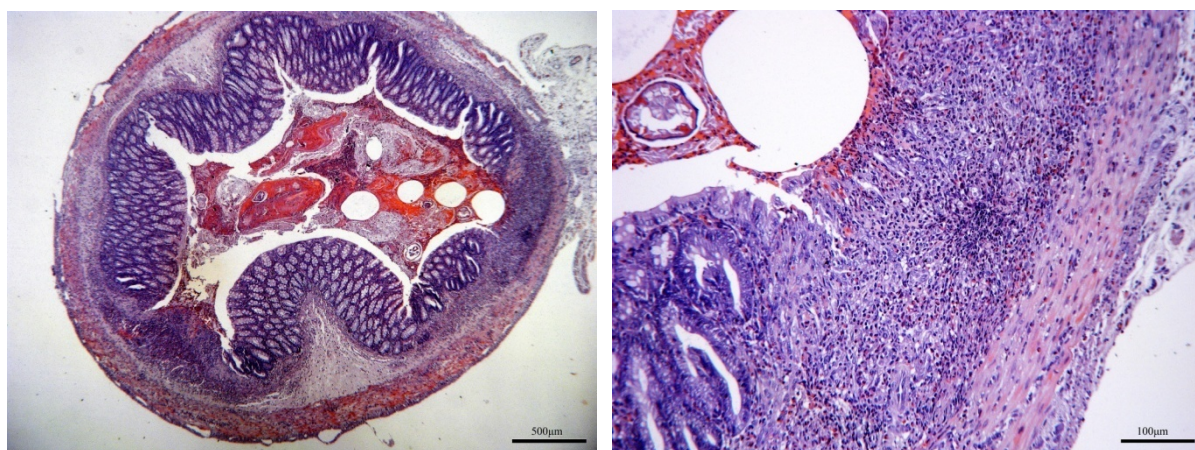
5. 4. Макроскопски и микроскопски промени и дистрибуција на Т-лимфоцитите, В-лимфоцитите и макрофагите во колонот кај стаорците од –групата третирана со празни микрочестички (група V)

5. 4. 1. Макроскопски промени

Оваа група стаорци примаа ајран со празни микрочестички интрагастрично, со цел да се елиминира влијанието на биополимерите користени во производството на микрочестичките. Притоа, ајранот со празни микрочестички не покажа антиинфламаторно дејство, така што макроскопскиот и микроскопскиот наод соодветствуваат со наодот кај групата од позитивната контрола. Макроскопски се забележува задебелување на сидот на колонот со хиперемични подрачја и суперфицијални ерозии.

5. 4. 2. Микроскопски промени (Х.Е.)

На микроскопскиот преглед беа забележани суперфицијални ерозии и задебелување на сидот на колонот. Апликацијата на ТНБС предизвика силно трансмурално воспаление, карактеризирано со инфилтрација на инфламаторни клетки. Воспалението беше придружено со мултифокално пропаѓање на цели крипти и појава на улцерации, губење на гоблет-клетките и фиброза. Дополнителна карактеристична промена на акутната инфламација е појавата на едем на субмукозата со точкести крварења во мукозата и субмукозата, како и инфилтрација со воспалителни клетки.



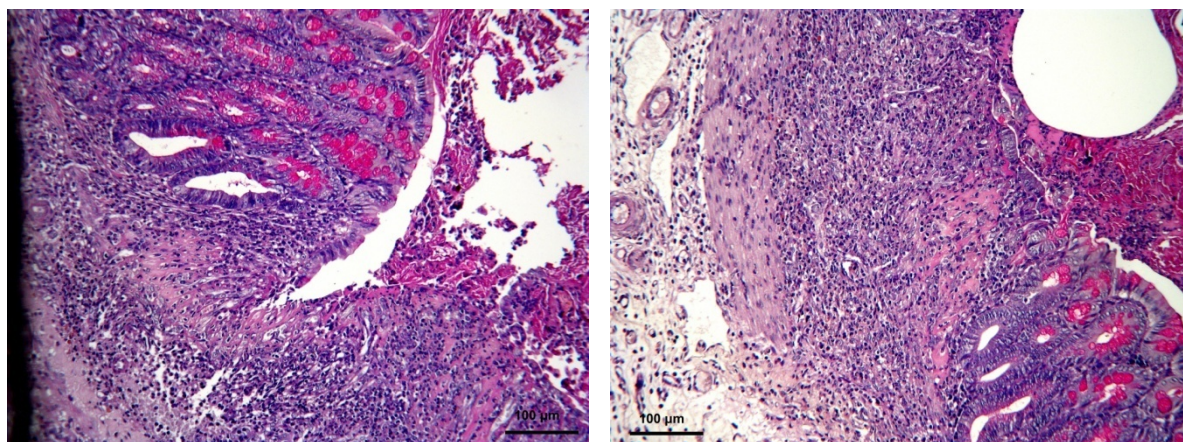
а.

б.

Слика 25. а, б. Стаорци, група третирана со ајран што содржи празни микрочестички, колон, Х.Е. а. x 20 и б. x 100

5. 4. 3. PAS (Periodic Acid Schiff) боeње

Како и кај позитивната контролна група, боeњето со PAS-методот кај оваа група покажа намалување на бројт на гоблет-клетки поради деструкција на криптите и намалување на количината на муцин.



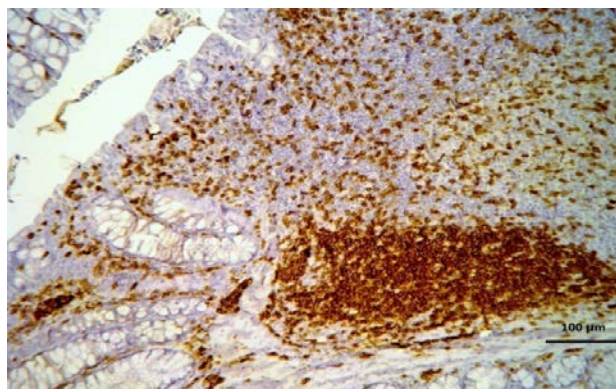
а.

б.

Слика 26. Стаорци, група третирана со ајран со празни микрочестички, колон, редуција на муцинот, PAS x 100.

5. 4. 4. Дистрибуција на CD3 Т-лимфоцитите

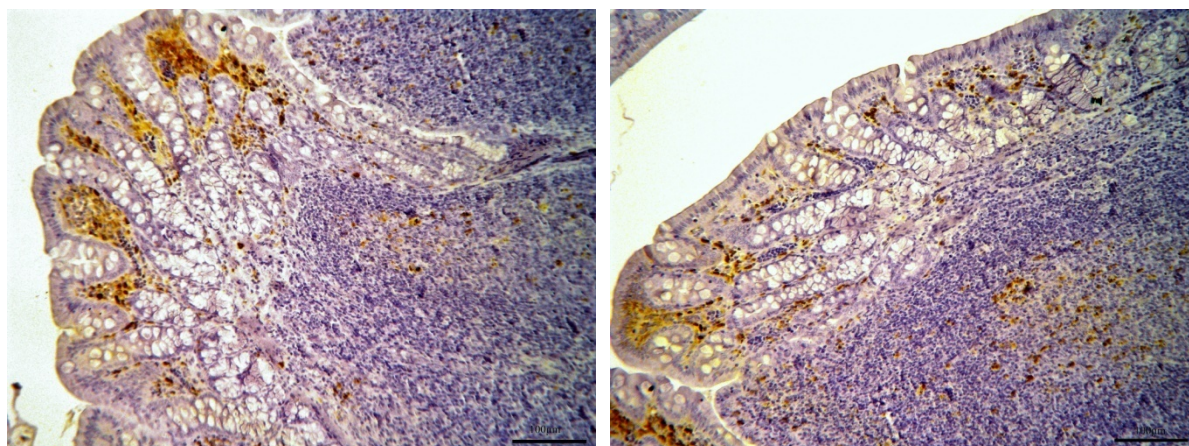
Имунохистолошкиот преглед кај оваа група покажа дека дистрибуцијата на CD3-позитивните клетки е иста како онаа кај групата од позитивната контрола. Нивната дистрибуција е зголемена во сите слоеви на колонот. Нивниот број во ламина епителијалис и во криптите на колонот е поголем во споредба со контролната група. Нивна најголема дистрибуција е забележана во мукозата (епител), субмукозата, како и периферијата на лимфоидните агрегати, а помалку се застапени во ламина проприја.



Слика 27. Стаорци, група третирана со ајран со празни микрочестички, колон, CD3-позитивни клетки, туника мукоза, туника субмукоза, En Vision x 100.

5. 4. 5. Дистрибуција на CD20 В-лимфоцитите

Стаорците кои примаа ајран со празни микрочестички имаа повисока дистрибуција на CD20-антителото во споредба со негативната контрола чиј распоред беше главно во мукозата (каде што беше присутна) и субмукозата на колонот, како и во централната област на лимфоидните агрегати.



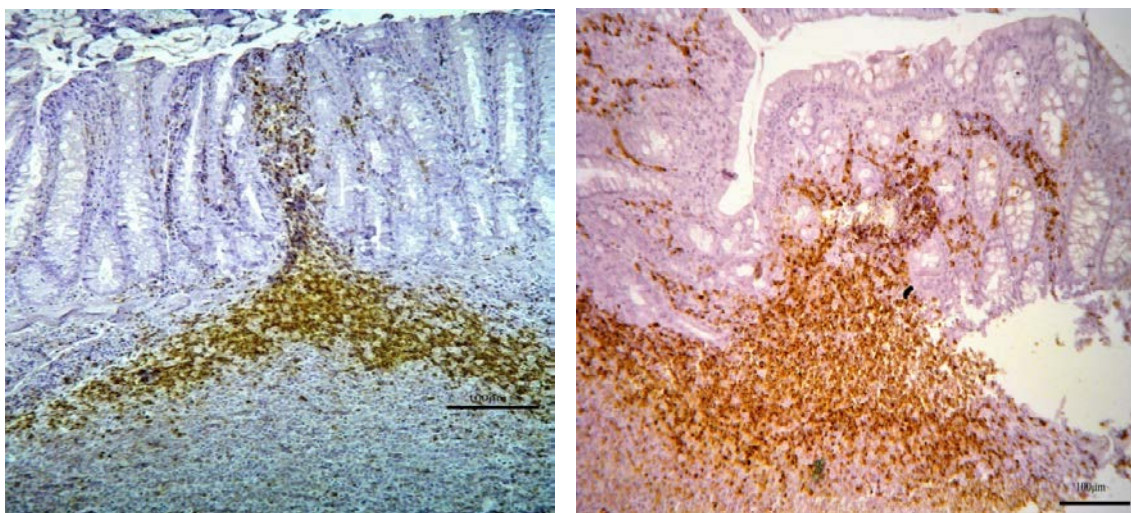
а.

б.

Слика 28. а, б. Стаорци, група третирана со ајран со празни микрочестички, колон, CD20-позитивни клетки во воспалителен инфилтрат, туника мукоза, туника субмукоза, Ep Vision x 100.

5. 4. 6. Дистрибуција на CD79 α В-лимфоцитите

Кај стаорците од оваа група со помош на имунохистохемискиот метод беше утврдено дека CD79 α -позитивните клетки се сместени во клеточните инфилтрати во ламина проприја во мукозата како и во субмукозата на колонот. Нивната количина е значително поголема во споредба со CD20-позитивните клетки. CD79 α -позитивните клетки во најголем број ги има во централната област на лимфоидните агрегати, додека во епителот ги има во помал број.



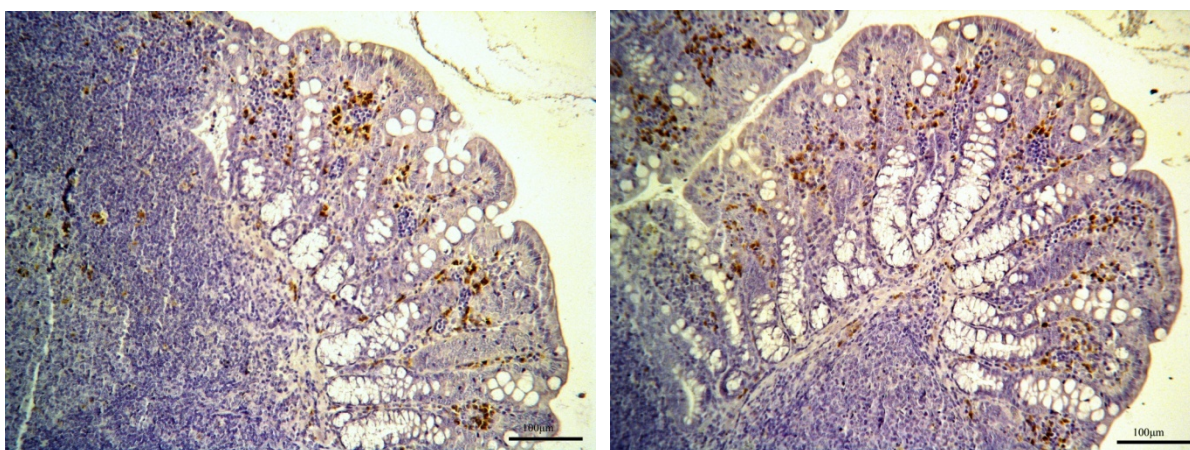
а.

б.

Слика 29. а, б. Стаорци, група третирана со ајран со празни микрочестички, колон, CD79 α -позитивни клетки во воспалителен инфилтрат, туника мукоза, туника субмукоза, En Vision x 100.

5. 4. 7. Дистрибуција на CD68-позитивни клетки

Имунохистохемиското боeње кај оваа група покажа дека CD68-позитивните клетки се во зголемен број во споредба со негативните контролни групи и се лоцирани во епителниот слој, длабоката ламина проприја, помеѓу криптите и во близина на криптите, особено во областите со улцерации.



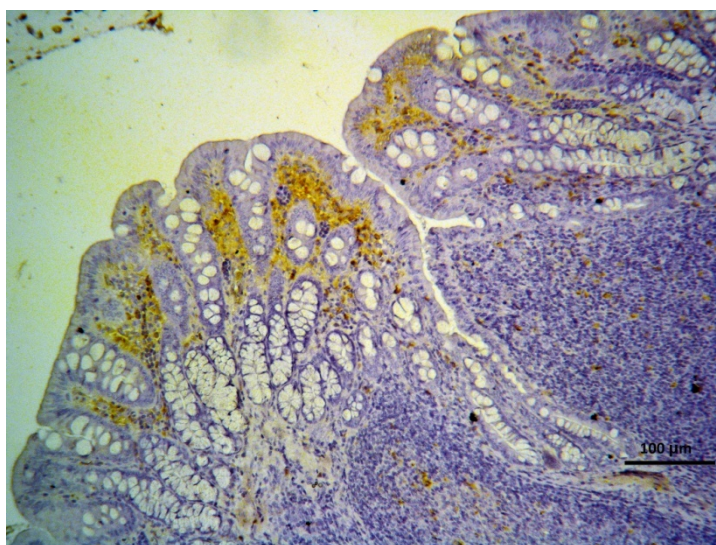
а.

б.

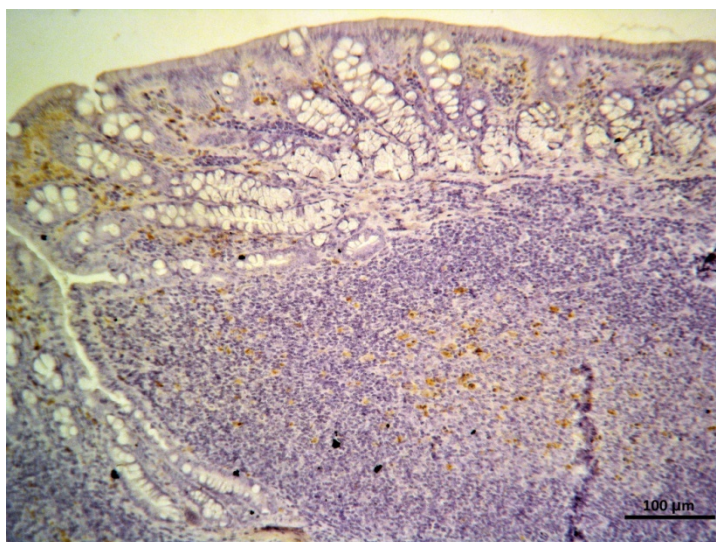
Слика 30. а, б. Стаорци, група третирана со ајран со празни микрочестички, колон, CD68-позитивни клетки, туника мукоза, туника субмукоза, En Vision x 100.

5. 4. 8. Дистрибуција на МАС387-позитивни клетки

Зголемен број од МАС387-позитивни клетки во споредба со стаорците од негативните контролни групи е идентификуван кај групата што примаше ајран со празни честички чија количина е особено голема во близина на местата со ерозии. Нивната дистрибуција е претежно во средишниот дел на ламина проприја, помеѓу жлездите на колонот. Поголема нивна застапеност има во ламина епителијалис и во лимфоидните агрегати во мукозата и субмукозата.



а.



б.

Слика 31. а, б. Стаорци, група третирана со ајран со празни микрочестички, колон, МАС387-позитивни клетки, туника мукоза, туника субмукоза, En Vision x 100.

Табела 2. Степен на ткивно оштетување и инфилтрација со воспалителни клетки

Група	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5
Степен на ткивно оштетување (со загуба на гоблет-клетки и муцин)	/	+++	+	+	+++
CD3	+	+++	++	++	+++
CD20	+	++	+	+	++
CD79	+	+++	++	++	+++
CD68	+	++	+	+	++
MAC387	+	++	+	+	++

6. ДИСКУСИЈА

Истражувањата во рамките на оваа докторска дисертација имаа за цел запознавање на неспецифичниот и специфичниот дел од мукозниот блок, како и локалниот имунолошки одговор на слузницата од колонот при третман со ајран со инкапсулиран синбиотик кај стаорците со ТНБС-индуциран колитис. Во досегашните истражувања е докажано дека различни соеви и субспециеси од ист сој можат различно да влијаат врз клетките од имунолошкиот систем (Kan и сop., 2011; Paria и сop., 2007; Carissa и James, 2010; Heilmann и Suchodolski, 2015), поради што постои потреба за истражување на имуномодулаторните одлики на секој потенцијален пробиотик одделно.

Според претходните истражувања, ТНБС-моделот на експериментален колитис е соодветен за истражување на храна и лекови со антиколитична активност и многу од неговите патолошки и клинички одлики се слични со оние на КБ (Stroberi сop., 2002; Morris и сop., 1989). Во нашето истражување, направивме проценка на ефектите на микроинкапсулираниот синбиотик врз индуциран колитис со цел да одредиме дали може да го регулира воспалителниот имунолошки одговор при колитис.

Досегашните истражувања со експериментални модели на КБ, кои се одликуваат со акутен воспалителен одговор, забележале задебелување на мукозата и субмукозата на колонот, ерозии, улцерации и инфилтрација со имунолошки клетки (Taupin и Podolsky, 2003; McVay и сop., 2006; ; Wehkamp и сop., 2005; Simms и сop., 2008). Во нашето истражување, ТНБС- индуцираниот експериментален колитис се одликува со присуството на макроскопски и микроскопски лезии кои соодветствуваат со зголемување на масата на колонот. Забележавме дека задебелувањето е придружено со значителен едем, оштетувања на мукозата, фокални улцерации и зголемена инфилтрација со макрофаги, лимфоцити и полиморфонуклеарни леукоцити во мукозата и субмукозата на колонот. Исто така, забележани беа и неколку делови со нормална мукоза, но со присуство на силна фоликуларна хиперплазија во мускуларис екстерна и делови со хеморагични промени со точкести крварења, губење на мукозата и замена со гранулационо ткиво, како и инфламаторни процеси. Воспалението беше придружено со мултифокално пропаѓање на цели крипти и појава на улцерации, губење на гоблет-клетките и фиброза. Овој наод соодветствува за моделот на

индуциран колитис со ТНБС (Strober и сop., 2002; Morris и сop., 1989), како и со одликите на КБ (Abraham и Cho, 2009; Daniele и сop., 2014).

Во нашето истражување, синбиотикот беше ефективен во третманот на специфичните мукозни елементи при ТНБС-индуцираниот колитис, без разлика меѓу групата со еднократна и двократна апликација на синбиотикот. Притоа, подобро е епителното заздравување и дебелината на мукозата на колонот, враќајќи ги блиску до нормалните вредности. Сидот на колонот кај овие две групи е умерено задебелен, со блага хиперемича и иницирани крвни садови, без присуство на ерозии и улцерации.

Исто така, хистолошки, како што е и потврдено со редукцијата на оштетувањето на колонот, синбиотскиот третман резултираше со заздравување од инфламаторниот процес. Постои умерена субепителна полиморфонуклеарна инфилтрација со пунктативни мукозни ерозии, како и дилатирани крвни садови во субмукозата.

Цревните епителни клетки (ЦЕК) се иницијална точка на контакт помеѓу домаќинот и цревните микроби. ЦЕК се прва одбранбена линија против патогените бактерии и тие екстензивно комуницираат со коменсалните микроби и пробиотици. Пробиотиците можат да ги афектираат ЦЕК на повеќе начини, како што се подобрување на бариерната функција (Zyrek и сop., 2007; Resta-Lenert и Barrett, 2003; Otte и Podolsky, 2004), зголемената продукција на муцин (Mack и сop., 2003), индукција на антиминобни и протеини на топлотен шок (Schlee и сop., 2008), попречување на патогените организми (Chen и сop., 2006) и модулирање на сигналните патишта и клеточно преживување.

Резултатите од PAS-боењето кај контролните стаорци, по должината на жлездената зона, покажаа интензивно обоени цревни жлезди, составени од мешовити клетки кои секретираат муцин. Кај стаорците од позитивната контрола значително е намалена количината на муцин што може да биде настанато како резултат на намалување на бројот на мукозните клетки поради некроза и десквамација или поради долготрајниот инфламаторен процес во колонот. Кај групата стаорци третирани со инкапсулиран синбиотик има компензаторно зголемување на бројот на гоблет-клетките во зачуваното ткиво и зголемена продукција на муцин.

T-клетките имаат централна улога во организацијата на инфламаторниот инфилтрат во цревата при ИЦЗ (Shanaharn, 1993). Тие се главната популација на

имунорегулаторни имунолошки клетки во цревната мукоза и поради нивната способност да реагираат специфично со локалните антигени и да секретираат широка лепеза на лимфокини (Roitt и сор., 1996), тие се одговорни за деструктивната реакција во воспалената мукоза при ИЦЗ кај луѓето (Anderson, 1992). CD3-протеинскиот комплекс претставува значајна карактеристика на Т-клеточната линија, па затоа анти-CD3-антителата можат ефикасно да се користат како Т-клеточни маркери (Runjan и Kevin, 1994).

Во нашето истражување, меѓу епителните клетки во колонот кај стаорците од негативната контролна група се наоѓаат втиснатати CD3-позитивни клетки кои кај стаорците од позитивната контрола се среќаваат во значително поголем број, што кажува дека тие претставуваат прва одбранбена линија. Поединечни имунореактивни клетки се сместени подлабоко во криптите, како и дифузно распространети во интерфоликуларната зона. Бројот на Т-клетките беше значително зголемен во glandуларниот епител во колонот кај стаорците од позитивната контрола, споредено со негативната контрола. Всушност, тие се единствениот субсет на лимфоцити во glandуларниот епител на колонот во ова истражување. Не е позната причината за поставеноста на Т-лимфоцитите најблиску до луменот на цревата. Веројатно е дека тие потекнуваат од ламина проприја. За кучињата се претпоставува дека Т-клетките мигрираат од ламина проприја, кон луменот како одговор на антигена стимулација (Jergens и сор., 1996) и дека барем кај човекот можат да се вратат во ламина проприја и циркулацијата после пробувањето (тестирањето) на антигенот за нивно делување во заштитничка улога (Guilford и сор., 1996; Berk, 1985). Постојат сè повеќе докази дека примарната улога на интраепителните Т-клетки е имуносупресија што може да биде значајно за развојот на орална толеранција (Brandtzaeg и сор., 1989). CD3-позитивните клетки се распоредени во целата структура на колонот: мукозата (каде што беше присутна), субмукозата, мускуларисот и во некои случаи дури и серозата. Ретки клетки од ламина проприја на мукозата на колонот покажуваат имунореактивност на CD3-антителото. Т-лимфоцитите ја сочинуваат периферната обвивка од лимфоидните агрегати, додека во централниот дел се помалку застапени.

Досегашните истражувања покажаа дека бројот на цревните Т-лимфоцити е зголемен при ИЦЗ (Haas и сор., 2014; Rossi и сор., 2014; Karaca и сор., 2015). Во нашиот модел на колитис, забележавме дека инфилтрацијата со CD3-позитивни клетки е зголемена по администрацијата на ТНБС кај двете групи, но на крајот на третманот

се намали кај групите со колитис што беа третирани со микроинкапсулиран синбиотик. Притоа CD3-T-клетките се со нормална дистрибуција во ламина проприја и ламина епителијалис помеѓу другите клеточни елементи, субепителниот регион и подлабоко помеѓу криптиите и длабоката ламина проприја. Овој податок покажува дека синбиотикот ја превенираше T-лимфоцитната инфилтрација.

Кај животните со ИЦЗ е забележано зголемено присуство на плазма-клетки во ламина проприја заедно со CD3+, CD4+ и CD8+ T-клетките, неутрофили, макрофаги, додека намален е бројот на маст-клетките (Haas и сор., 2014; Stonehewer и Simpson, 1998; German и сор., 2001). CD20-антигенот се експресира на речиси сите B-клетки, освен плазма-клетките. CD79 α во текот на B-клеточната онтогенеза се изразуваат пред појавата на CD20, а исчезнуваат подоцна од CD20 во доцната (плазма-клетки) фаза од B-клеточната диференцијација, поради што антителата за CD79 α се корисни во докажувањето на B-клетките во речиси сите фази од нивната диференцијација, како и за разликување на B-клеточни неоплазми од T-клеточни неоплазми или од миелоидни неоплазми (Peiguo и сор., 2001).

Во нашето истражување е забележана и различна експресија на CD20 и CD79 α -антигенот. Во колонот кај стаорците од негативната контролна група се наоѓаат ретки CD20-позитивни лимфоцити распоредени претежно во ламина проприја и во glandуларниот епител на мукозата. CD79 α -позитивните клетки се сместени претежно во ламина проприја на мукозата. Нешто поголема акумулација од CD20 и CD79 α -клетки се наоѓа во солитарните лимфни фоликули на колонот. Кај стаорците од позитивната контролна група CD20-позитивните клетки покажуваат повисока концентрација распоредени во мукозата (каде што беше присутна), субмукозата, мускуларисот и во некои случаи дури и серозата. Нивната интраепителна дистрибуција е исто така зголемена, а најголема концентрација на овие клетки има во областите со воспалителен инфилтрат. CD79 α -позитивните клетки пак се сместени во централната област на густите клеточни инфилтрати во ламина проприја во мукозата и субмукозата на колонот. Кај оваа група нивното присуство во епителот е нешто поголемо во споредба со негативната контрола. Притоа инфилтрацијата со CD79 α -клетки е значително поголема во споредба со инфилтрацијата со CD20-позитивните клетки. Овој податок кажува дека кај ваквиот модел на колитис, покрај T-лимфоцитите, во воспалението доминираат и зрелите плазма-клетки.

Концентрацијата на В-клетките е значително зголемена кај позитивната контрола во споредба со нормалните. В-клетките исто така се јавуваат во поголем број кај заболените со ИЦЗ (Eade и сор., 1980). Постојат податоци кои укажуваат дека В-клетките се застапени во поголем број од Т-клетките кај пациентите со колитис (Strober и James, 1986). Истражувањата кај луѓето покажуваат дека В-клетките се активирани и кај КБ и кај УК (Deusch и Reich, 1992).

Кај групите со еднократен и двократен третман со ајран со инкапсулиран синбиотик, дистрибуцијата на овие клетки е квантитативно и локациски слична со нивната дистрибуција во колонот кај стаорците од негативните контролни групи. Синбиотикот предизвика намалување на CD20 и CD79 α -позитивни клетки во ламина проприја и во glandуларниот епител на мукозата, како и во субмукозата, а со тоа и до намалување на воспалителните инфилтрати.

Малото присуство на В-клетки во glandуларниот епител кај сите групи е во согласност со наодите кај хуманите истражувања (Hoang и сор., 1992), иако постојат податоци дека по неколку В-клетки се најдени во интраепителната лимфоцитна популација (Guilford и сор., 1996; Van der Heijden и Stok, 1987; Cerf-Bensussan и сор., 1983).

Цревните мононуклеарни фагоцити се наоѓаат во специфична средина која се карактеризира со константна изложеност на цревната микрофлора и антигени од храната. Дендритичните клетки (ДК) заедно со макрофагите се наоѓаат распространети низ сврзното ткиво под епителниот слој, ламина проприја на цревата. Претставници од двете главни мононуклеарни фагоцитни фамилии се исто така лоцирани во мукозно поврзаното лимфоидно ткиво (MALT), вклучувајќи ги ПП и ИЛФ (Farache и сор., 2013). Улогите на ДК и макрофагите се карактеристични и се дополнуваат меѓусебно во одржувањето на цревната хомеостаза и имунолошката одбрана. ДК се транслоцираат од ламина проприја преку лимфотокот до мезентеријалните лимфни чворови (МЛЧ), каде што вршат презентација на антигените на наивните Т-клетки, се поларизираат кон ефекторски одговор и така воспоставуваат адаптивна гранка од имунолошкиот систем (Vekiaris и сор., 2014). За макрофагите се смета дека придонесуваат кон локалното чистење на ткивото од бактерии, ги спроведуваат предупредувачките сигнали од другите имунолошки клетки, секретираат цитокини за воспоставување на локалната хомеостатска мрежа од имунолошки клетки и

учествуваат во Т-клеточната рестимулација и одржување во рамките на ламина проприја (Zigmond и Jung, 2013).

Се смета дека CD68 е селективен за моноцитно/макрофагната линија, па така антителата против CD68 се широко користени како маркери во дијагностиката и истражувањата на моноцитите/макрофагите (Claire и David, 1993). Mouse monoclonal antibody (MAC 387) е специфично за моноцити и ткивни хистиоцити, при што особено интензивно ја бои цитоплазмата на клетки од моноцитно/макрофагните серии кај парафинските пресеци (David и сор., 1987).

Во нашето истражување, кај негативната контролна група се забележани мал број CD68-позитивни клетки, претежно во ламина проприја и субмукозата и нешто поголема нивна концентрација во областа на куполата од ПП во колонот. MAC387-позитивните клетки во колонот кај оваа група беа дифузно распространета во ламина проприја, помеѓу цревните жлезди, а во поголем број MAC387-позитивни клетки беа сместени субепително и во околината на базата на Либеркиниевите крипти. Поединечни позитивни клетки, обележани со MAC387-антитело беа воочени во субмукозата и субсерозата на колонот.

Во нашиот модел на колитис, забележавме дека инфилтрацијата со CD68 и MAC387-позитивни клетки е зголемена по администрацијата на ТНБС во ламина епителијалис, длабоката ламина проприја, помеѓу криптите и во близина на криптите во колитичната група, особено каде што воспалението е посилено, во областите со воспалителен инфилтрат и улцерации. Зголемувањето на бројот на макрофагите се совпаѓа со други истражувања кои покажуваат дека бројот на цревните макрофаги е зголемен при ИЦЗ (Tahira и сор., 1997), како и при индуциран колитис (Reineske и сор., 2012; Karaca и сор., 2012; Ashok и сор., 2015).

Концентрацијата на CD68 и MAC387-позитивни клетки на крајот на третманот се намали кај групата со колитис + синбиотик. CD68-позитивните клетки се во нормален број и се локализирани во ламина проприја и субмукозата, како и куполата од ПП во колонот. MAC387-позитивни клетки пак, во намален број се распоредени во сите слоеви на црево, особено во ламина проприја помеѓу цревните жлезди, субепително и во околината и базата на Либеркиниевите крипти, како и во субмукозата и субсерозата на колонот. Овој податок покажува дека синбиотикот ја превенираше макрофагната инфилтрација во колонот.

Групата што беше третирана со ајран со празни микрочестички имаше идентичен патохистолошки и имунохистохемиски наод со групата од позитивната контрола. Поради тоа заклучивме дека терапевтскиот потенцијал се должи на синбиотикот аплициран во форма на микроинкапсулирани честички.

Со ова истражување докажавме дека имунохистохемискиот метод претставува значајна алатка во расветлувањето на потенцијалните антиинфламаторни и имуномодулаторни својства на пробиотиците. Со помош на овој метод бевме во можност да ги следиме однесувањата на различните компоненти од имунолошкиот систем во различни фази од експериментот, преку предизвикување на колитис, до третманот со ајран со инкапсулиран синбиотик.

Најзначаен имунопатолошки наод од дадениот експеримент е дистрибуцијата на имунолошките клетки во различни фази од експериментот. Главно, зголемената инфилтрација со лимфоцити и макрофаги во ламина проприја и епителот кај стаорците од позитивната контрола беше спречена кај стаорците од групите со еднократен и двократен третман со ајран со инкапсулиран синбиотик. Оштетувањето на епителниот слој на цревата е предизвикано од етанолот. Тоа оштетување се гледа во изумирањето на епителните и гоблет клетките, а со тоа е попречена и продукцијата на муцин. Сето ова доведува до олеснето навлегување на хаптенизирачкиот молекул на ТНБС кој се врзува за ендогените протеини. Како резултат на тоа се формираат кислородни радикали со голема реактивност кои вршат неспецифично оштетување на сидот на колонот. Воспалителниот инфилтрат предизвикан со ова оштетување е составен од Т и В-лимфоцити, плазма-клетки и макрофаги. Најобемна е инфилтрацијата со Т-лимфоцити во ламина проприја и епителниот слој, што кажува дека овие клетки се прва одбрамбена линија. Инфилтрацијата со плазма-клетки е поголема од таа на В-лимфоцитите, но сепак е помала од инфилтрацијата со Т-лимфоцити. Т-лимфоцитите при воспалението се дистрибуирани во местата со оштетувања на мукозата, но нивниот број е зголемен и помеѓу епителните клетки и ламина проприја во деловите од колонот каде што мукозата е зачувана со цел да се спречи понатамошно нејзино оштетување. Активирани интраепителни леукоцити секретираат интерферон кој ја зголемува способноста на ентероцитите да го презентираат антигенот, а и самите можат да предизвикаат цитолиза на патогенот. Во ПП, Т-лимфоцитите од парафоликуларните региони реагираат со антиген презентирачките клетки (АПЦ) и антигените пептиди и се активираат. В-лимфоцитите во фоликуларните области на ПП се примарно

активирани во интеракција со антигенот и нивните површински имуноглобулини. Активацијата на В-лимфоцитите е засилена преку помошничките Т-лимфоцити (анг. helper), така што В-лимфоцитите пролиферираат во герминативните центри на фоликулите во ПП. Повеќето В-лимфоцити во оваа фаза се IgA-позитивни. Сите лимфоцити ги напуштаат ПП преку крвните садови до мезентеријалните лимфни чворови и слезината, каде што се продолжува понатамошната клеточна активација. Активирани лимфоцити потоа се враќаат до цревата, било директно или преку периферната циркулација. Оние кои директно доаѓаат до цревата се диференцираат во ефекторски клетки и влегуваат во ламина проприја. Во ламина проприја плазма-клетките и цитотоксичните лимфоцити го уништуваат патогенот. Во ламина проприја пак зголемената инфилтрација со вродени имунолошки клетки (неутрофили, макрофаги, дендритични клетки и НК Т-клетки) доведува до зголемување на локалното ниво на тумор некротизирачки фактор α (TNF- α), интерлевкин -1β , и интерферон $-\gamma$ (Cлага и Judy, 2009). Кај стаорците од групите кои примаа ајран со инкапсулиран синбиотик, сите параметри на инфламација беа намалени. Епителниот слој е зачуван, а зачувани се и гоблет-клетките, поради што имаме нормална продукција на муцин. Отсуствува воспалителниот инфилтрат поради што имавме значително помал број на CD3+, CD20+, CD79 α +, CD68+ и MAC387+ клетки во сидот на колонот. Овој ефект веројатно се должи на мукоатхерентниот потенцијал на синбиотикот за површината на епителот и зајакнување на епителната бариера поради што има намален влез на ТНБС, а со тоа и намалено оштетување на ткивото. Хиперплазијата на одделни сегменти и пролиферацијата на лимфатично ткиво во *tunica mucosa* упатува на постоење на репаративен процес.

Врз основа на досегашните истражувања, пробиотиците се делат на две категории според своите имуномодулаторни одлики: имуностимулаторни пробиотици кои доминантно вршат индукција на IL-12 продукцијата, ја промовираат активацијата на НК-клетките и Th1-клеточниот развој и ја засилуваат имунолошката одбрана во превенцијата на инфекции и канцер; имунорегулаторни пробиотици кои го индуцираат IL-10 имунолошкиот одговор, го промовираат развојот на Treg-клетките и го контролираат прекумерниот имунолошки одговор, со што ги регулираат инфламаторните болести како што се алергиите, ИЦЗ и автоимуните болести (Кап и сор., 2011). Со нашето истражување докажавме дека пробиотикот *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* спаѓа во имунорегулаторни пробиотици.

Лактобацилите, како и другите пробиотици и цревни коменсални бактерии, се смета дека влијаат врз цревниот имунолошки систем на неколку начини: со нивен транспорт низ М-клетките во фоликуларно поврзаниот епител и со понатамошно нивно препознавање од страна на макрофагите и дендритичните клетки во ПП; дендритичните клетки во ламина проприја ги протегаат своите дендрити за препознавање на пробиотиците во цревниот лумен; интралуминалните пробиотици ја модулираат цитокината продукција во цревните епителни клетки, што резултира со регулација на одговорот на имунокомпетентните клетки, вклучувајќи ги макрофагите, дендритичните клетки, Т-клетките и В-клетките во ламина проприја; и ингестираните живи пробиотици ја преживуваат гастроинтестиналната средина за да стигнат до подолните делови од цревата каде што ја обновуваат цревната микробиота, која е нарушена како резултат на различни причини како што се цревните инфекции и употребата на антибиотици, ја подобруваат цревната средина и на тој начин индиректно влијаат врз имунолошкиот систем (Kap и sor., 2011).

За испитуваниот синбиотик веќе е докажан неговиот мукоатхерентен потенцијал (Petreska Ivanovska и sor., 2017). Генерално е прифатено дека пробиотската ефикасност се подобрува доколку лозата е атхерентна, со што се зголемува времето на престој на пробиотиците во ГИТ во *in vivo* услови (Van Tassell и Miller, 2011). Согласно ова, се зголемува можноста за продукција на поволни ефекти, како што е стимулацијата на имуниот систем преку продолжениот временскиот период во кој пробиотикот остварува контакт со интестиналниот тракт (Forestier и sor., 2001). Благодарение на мукоатхерентниот потенцијал, синбиотикот го штити епителниот слој од оштетувања.

Цревните микробиолошки заедници претставуваат активни учесници во имунологијата и физиологијата кај цицачите. Пробиотиците вклучуваат членови на видови од домашните гастроинтестинални микробиолошки заедници, но и организми кои можат да бидат натрапници на воспоставениот микробиом. Истражувањата на коменсалните микроби и микробиоми ќе пронајдат нови класи на корисни микроби и пробиотици. Преку утврдување на ефектите врз клетките на цицачите, *in vitro* и во анимални модели, пробиотиците несомнено можат да предизвикаат биолошки значајни промени во гастроинтестиналниот тракт независно од присуството на воспоставените комплексни микробиолошки екосистеми. Пробиотиците помагаат за откривање на важните сигнални патишта во мукозниот имунитет. Тие исто така можат да послужат и

за тестирање на имунологијата и физиологијата на гастроинтестиналниот тракт кај цицачите и можат да откријат нови терапевтски пристапи во борбата против хуманите и анималните болести.

7. ЗАКЛУЧОК

1. Апликацијата на ТНБС предизвика структурни промени на колонот во форма на суперфицијални ерозии, улцерозни промени на *tunica mucosa* и *submucosa* и инфилтрација со макрофаги, лимфоцити и леукоцити во колонот.

2. Во нашето истражување, третман со ајран со микроинкапулиран синбиотик резултираше со заздравување од инфламаторниот процес предизвикан со ТНБС. Притоа, подобро е епителното заздравување и дебелината на мукозата на колонот, враќајќи ги блиску до нормалните вредности. Постои умерена субепителна полиморфонуклеарна инфилтрација, како и хиперплазијата на одделни сегменти и пролиферацијата на лимфатично ткиво во *tunica mucosa*, што упатува на постоење на репаративен процес.

3. PAS-боењето утврди намалување на бројот на гоблет-клетки и количината на муцин кај стаорците од позитивната контролна група, како и зголемување на бројот на гоблет-клетките и количината на муцин во зачуваната мукоза кај групите третирани со ајран со инкапулиран синбиотик.

4. Дифузниот мононуклеарен клеточен инфилтрат во колонот кај позитивните контролни групи претежно беше составен од CD3 Т-лимфоцити, CD79 α и CD20-B лимфоцити, CD68 и MAC387-позитивни макрофаги.

5. Т-лимфоцитите се прва одбранбена линија во мукозата на колонот. Кај стаорците од негативните контролни групи, CD3-антителото беше утврдено во најголем процент во субепителниот регион, помеѓу криптите и длабоката ламина проприја додека во ламина епителијалис е ретко забележливо, сместено помеѓу другите клеточни елементи. Концентрацијата на овие клетки беше значително повисока кај позитивната контрола, распоредени се во сите слоеви на колонот-мукозата (каде што беше присутна), субмукозата, мускуларисот и во некои случаи дури и серозата, како и периферната обвивка на лимфоидните агрегати. Кај групите третирани со еднакратна и двократна апликација на ајран со инкапулиран синбиотик CD3 Т-лимфоцитите беа со нормална дистрибуција,

слична со онаа кај негативните контролни групи, претежно во ламина проприја и ламина епителијалис.

6. CD20-позитивните клетки квантитативно беа помалку застапени во ткивото на колонот во споредба со CD79 α -позитивните клетки. Кај стаорците од негативните контролни групи, CD20-позитивни клетки се среќаваа во мукозата, а CD79 α -позитивните клетки беа забележани во ламина проприја и солитарните лимфни фоликули на колонот, додека во glandуларниот епител се ретко забележливи. Кај стаорците од позитивните контролни групи, CD20-клетките покажаа повисока концентрација во споредба со негативната контрола, распоредени во целата структура на колонот: мукозата (каде што беше присутна), субмукозата, мускуларисот и во некои случаи дури и серозата, како и централната област на лимфоидните агрегати, додека CD79 α -клетките беа забележани во истите подрачја, како и во густы клеточни инфилтрати во ламина проприја, со многу поголем број во споредба со CD20-позитивните клетки. Кај групите третирани со еднократна и двократна апликација на ајран со инкапсулиран синбиотик, CD20 В-лимфоцитите беа со нормална дистрибуција слична со онаа кај негативните контролни групи, претежно во ламина проприја и ламина епителијалис, додека CD79 α -клетките беа со намален број во однос на позитивните контроли, претежно во ламина проприја. Поголемата инфилтрацијата со CD79 α -клетки во споредба со CD20-позитивните клетки, покажува дека кај ваквиот модел на колитис, покрај Т-лимфоцитите, во воспалението доминираат и зрелите плазма-клетки.

7. CD68 и MAC387-позитивни макрофаги кај контролните стаорци беа забележани во мал број, распоредени во сите слоеви на колонот. Нивниот број кај колитичните групи беше значително зголемен и тоа во длабоката ламина проприја, помеѓу криптиите и во близина на криптиите. Третманот со ајран со инкапсулиран синбиотик еднаш и два пати на ден го намали сигналот на ова антитело во сите слоеви на колонот.

8. Со ова истражување докажавме дека имунохистохемискиот метод претставува значајна алатка во расветлувањето на потенцијалните

антиинфламаторни и имуномодулаторни својства на пробиотиците. Со помош на овој метод бевме во можност да ги следиме однесувањата на различните компоненти од имунолошкиот систем во различни фази од експериментот, преку предизвикување на колитис, до третманот со ајран со инкапсулиран синбиотик.

9. Досегашните истражувања покажуваат дека секој пробиотик се одликува со уникатни својства. Тоа ја наметнува потребата за детално истражување на секој потенцијален пробиотик. Во ова истражување е прикажан имуномодулаторниот ефект на нов функционален производ кој содржи микроинкапсулиран синбиотик. Синбиотикот доведе до зајакнување на епителната бариера, намалена инфилтрација со воспалителни клетки, како и поттикнување на репаративен процес. Докажаните антиинфламаторни својства претставуваат основа за понатамошни истражувања на применетата лоза и упатуваат на негова потенцијална примена во превенција на инфламаторните цревни заболувања.

Листа на кратенки

APC- антиген презентирачки клетки

BALT- Bronchus Associated Lymphoid Tissue (мак. лимфоидно ткиво поврзано со бронхиите)

BKP- B-клеточен рецептор

CD- кластер на диференцијација

GALT- Gut Associated Lymphoid Tissue (мак. лимфоидно ткиво поврзано со интестинумот)

GWAS- Genome-wide association studies (мак. студии поврзани со геномот)

Ig- имуноглобулин

IL- интерлеукин

INF- интерферон

MALT- Mucosa Associated Lymphoid Tissue (мак. мукозно поврзано лимфоидно ткиво)

NALT- Nasopharynx Associated Lymphoid Tissue (мак. лимфоидно ткиво на назофаринксот)

NK T клетки- Natural Killer T клетки (мак. природни T клетки-убијци)

TGF- β - transforming growth factor β (мак. трансформиращки фактор за раст β)

TNF α - англ. Tumor necrosis factor alpha (мак. тумор некротичен фактор алфа)

Treg- регулаторни T клетки

ГИТ- гастроинтестинален тракт

ДК- дендритични клетки

ДСС - декстран содиум сулфат

ИЛФ- изолирани лимфни фоликули

ИЦЗ- инфламаторни цревни заболувања

КП- крипто плочи

М клетки- микрофолд клетки

МЛЧ- мезентеријални лимфни чворови

ПП- пајерови плочи

СЛИТ- солитарни интестинални лимфоидни ткива

СЛО- секундарни лимфни органи

Th- хелпер Т клетки

ТНБС- тринитробензен сулфонска киселина

УК- улцерозен колитис

КБ- Кророва болест

ЦЕК - цревни епителни клетки

9. ЛІТЕРАТУРА

- Abe, F., Ishibashi, N., Shimamura, S. (1995). Effect of Administration of Bifidobacteria and Lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J.Dairy Sci* 78: 2838–2846.
- Abraham, C., Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2009; 361:2066–2078. [PubMed: 19923578]
- Adachi, S., Yoshida, H., Honda, K., Maki, K., Saijo, K., Ikuta, K., Saito, T., Nishikawa, S.I. (1998). Essential role of IL-7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage. *Int. Immunol.* 10, 1–6.
- Adachi, S., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S. (1997). Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo. *Int. Immunol.* 9, 507–514.
- Ahasan, A.S.M.L., Agazzi, A., Invernizzi, G., Bontempo, V., Savoini, G. (2015). The Beneficial Role of Probiotics in Monogastric Animal Nutrition and Health. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research* 2.
- Albert, E.J., Kenneth, W. S. 2012. Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Frontiers in Bioscience E4*, 1404-1419, January 1, 2012
- Allenspach, K., Rufenacht, S., Sauter, S., Groner, A., Steffan, J., Strehlau, G., Gaschen, F. 2006. Pharmacokinetics and Clinical Efficacy of Cyclosporine Treatment of Dogs with Steroid-Refractory Inflammatory Bowel Disease. *J Vet Intern Med*;20:239–244
- Allenspach, K., Wieland, B., Groner, A., Gaschen, F. 2007. Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *J Vet Intern Med* 21 700-708
- Amre, D.K., D'Souza, S., Morgan, K., Seidman, G., Lambrette, P., Grimard, G. 2007. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *The American journal of gastroenterology*. 102:2016–2025. [PubMed: 17617201]
- Ananthkrishnan, A.N., Cagan, A., Gainer, V.S. 2013. Normalization of plasma 25-hydroxy vitamin D is associated with reduced risk of surgery in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*;19:1921–1927.
- Anderson, N. V. (1992). *Veterinary Gastroenterology*, 2nd edn. Pennsylvania, USA, Lea and Febiger

- Andoh, A., Sakata, S., Koizumi, Y., Mitsuyama, K., Fujiyama, Y., & Benno, Y. (2007). Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 13, 955–962.
- Arslan, H.H., Saripinar, A. D., Terzi, G. et al (2012). Therapeutic effects of probiotic bacteria in parvoviral enteritis in dogs, *Revue Méd Vét* 163(2): 55-59.
- Ashok, K. P., Salmiah, I., Zeinab, S., Norhaizan, M. E. 2015. Allicin Alleviates Dextran Sodium Sulfate- (DSS-) Induced Ulcerative Colitis in BALB/c Mice. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2015, Article ID 605208, 13 pages
- Ashwell, M., 2002. Concepts of Functional Foods. ILSI-International Life Sciences Institute, Brussels.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*;307:1915-20.
- Bamias, G., Corridoni, D., Pizarro, T.T., Cominelli, F.(2012). New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine*. 2012; 59:451–459. [PubMed: 22795953]
- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics*. 40:955–962. [PubMed: 18587394]
- Becker, C., Dornhoff, H., Neufert, C., Fantini, M.C., Wirtz, S. (2006) Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* 177: 2760–2764.
- Bekiaris, V., Persson, E.K., Agace, W.W. 2014. Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. *Immunol Rev* 260:86–101. doi:10.1111/imr. 12194
- Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2007). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature immunology*. 2007; 8:345–350. [PubMed: 17375096]
- Bosco, N., Brahmabhatt, V., Oliveira, M. 2013. Effects of increase in fish oil intake on intestinal eicosanoids and inflammation in a mouse model of colitis. *Lipids Health Dis*;12:81.
- Bouskra, D., Brezillon, C., Berard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates

intestinal homeostasis. *Nature* 456, 507–510.

Brandtzaeg, P., Halstensen, T. S., Kett, K. (1989). Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97, 1562-1584

Brenna, Ø., Furnes, MW., Drozdov, I., van Beelen, Granlund, A., Flatberg, A., et al. (2013). Relevance of TNBS-Colitis in Rats: A Methodological Study with Endoscopic, Histo and Transcriptomic Characterization and Correlation to IBD. *PLoS ONE* 8(1): e54543. doi:10.1371/journal.pone.0054543

Bruckner, M., Westphal, S., Domschke, W. 2012. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate shows therapeutic antioxidative effects in a murine model of colitis. *J Crohns Colitis*;6:226–235.

Bubien, J.K., Zhou, L.J., Bell, P.D., Frizzell, R.A., Tedder, T.F.(1993). Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol.* 121, 1121-1132.

Burgener, I.A., König, A., Allenspach, K., Sauter, S.N., Boisclair, J., Doherr, M.G., Jungi, T.W. (2008). Upregulation of toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 553-560

Bybee, S.N., Scorza, A.V., Lappin, M.R. (2011). Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhoea in cats and dogs housed in an animal shelter, *J Vet Internal Med* 25(4): 856-860.

Berl, I. E. (1985). *Bockus Gastroenterology*, Vol. 4. 4th edn. Philadelphia, USA, W.B. Saunders Company. pp2108-2118

Campana, D., Thompson, J.S., Amlot, P., Brown, S., Janossy, G. 1987. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol*; 138:648-655.

Carissa M. T and James V. 2010. Probiotics-host communication Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 1:3, 148-163

Carol, M., Borrueal, N., Antolin, M., Llopis, M., Casellas, F., Guarner, F. 2006. Modulation of apoptosis in intestinal lymphocytes by a probiotic bacteria in Crohn's disease. *J Leukoc Biol*; 79:917-22.

Cave, N.J. (2003). Chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract of

companion animals. *N Z Vet J* 2003; 51: 262-274

Cerf-Bensussan, N., Schneeberger, E. E., Bhan, A. K. (1983) Immunohistologic and immunoelectron microscopic character&a&n of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of mono&ma1 antibodies. *Journal of Immunology* 130,2615-2622

Chen, X., Kokkotou, E.G., Mustafa, N., Bhaskar, K.R., Sougioultzis, S., O'Brien, M. 2006. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *J Biol Chem*; 281:24449-54.

Chow, J., Tang, H.,&Mazmanian, S. K. (2011). Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol* 23, 473–480.

Cibull, M.L., Stein, H., Gatter, K.C., Mason, D.Y. (1989). The expression of the CD3 antigen in Hodgkin's disease. *Histopathology* 1989; 15:597-605.

Claire, L., H., David, L. S. 1993. Molecular Cloning of CD68, a Human Macrophage Marker Related to Lysosomal Glycoproteins. *Blood*, Vol 81, No 6: pp 1607-1613

Clara, A., Judy H. C. 2009. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2009;361:2066-78.

Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., Rowland, I. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat. Res.*, 2005, 591:276-289.

Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P. 2010. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine*. 16:90–97.

Corridoni, D., Pastorelli, L., Mattioli, B., Locovei, S., Ishikawa, D., Arseneau, K.O., et al. (2012) Probiotic bacteria regulate intestinal epithelial permeability in experimental ileitis by a TNF-dependent mechanism. *PloS one*. 2012; 7:e42067. [PubMed: 22848704]

Danese, S., Sans, M., Fiocchi, C. 2004. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity reviews*. 3:394–400. [PubMed: 15288007]

Daniele, C., Kristen, O. A., and Fabio C. (2014). Inflammatory Bowel Disease. *Immunol Lett*. 2014 October ; 161(2): 231–235. doi:10.1016/j.imlet.2014.04.004.

Danis, M., Southerland, L.I., Garrett, J.M., Smith, J.L., Hielema, F., Pickard, C.G., et al.(1991). A prospective study of advance directives for life-sustaining care. *The New*

- England journal of medicine. 1991; 324:882–888. [PubMed: 2000110]
- David, J. F., David B. J., Dennis H. W. 1987. Identification of Tissue Histiocytes on Paraffin Sections by a New Monoclonal Antibody¹. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 35, No. 11, pp. 1217-1226, 1987
- Day, M.J. 1999. *Clinical Immunology of the dog and cat*. Iowa State University Press, 9 pp.
- Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:313-38.
- de Moreno de LeBlanc, A., Chaves, S., Carmuega, E., Weill, R., Antoine, J., Perdigon, G. 2008. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology*; 213:97-108.
- Deasy, J. M., Steele, G., Jr., Ross, D. S., Lahey, S. J., Wilson, R. E., and Madara, J. (1983). Gut-associated lymphoid tissue and dimethylhydrazine-induced colorectal carcinoma in the Wistar/Furth rat. *J Surg Oncol* 24, 36–40.
- Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., Roy, D. 2008. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol*; 10:37-54.
- Dennis, J. S., Kruger, J. M., Mullaney, T. P. 1993. Lymphocytic/plasmacytic colitis in cats: 14 cases (1985- 1990). *J Am Vet Med Assoc* 202, 313-318 (84, 66).
- Desrochers, A.M., Dolente, B.A., Roy, M.F., et al. (2005). Efficacy of *Saccharomyces boulardii* for treatment of horses with acute enterocolitis. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:954–959.
- Deusch, K., Reich, K. (1992). Immunological aspects of inflammatory bowel disease. *Endoscopy* 24,568-571
- Divers, T., Pelligrini-Masini, A., McDonough, S. (2006). Diagnosis of inflammatory bowel disease in a Hackney pony by gastroduodenal endoscopy and biopsy and successful treatment with corticosteroids. *Equine Vet Educ* 2006;18(6):368–71.
- Drisko, J.A., Giles, C.K., Bischoff, B.J. 2003. Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Altern Med Rev*; 8:143-55.
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., & Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is

broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102, 448–455.

Durkin, H. G., Bazin, H., & Waksman, B. H. (1981). Origin and fate of IgE bearing lymphocytes. I Peyer's patches as differentiation site of cells Simultaneously bearing IgA and IgE. *J Exp Med* 154, 640–648.

Eade, O. E., ST. Andre-Ukena, S., Moulton, C., Macpherson, B., Beeken, W. L. (1980) Lymphocyte subpopulations of intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Cur* 21.675-682

Eberl, G., Littman, D.R. (2004). Thymic origin of intestinal $\alpha\beta$ T cells revealed by fate mapping of ROR γ t+ cells. *Science* 305, 248–251.

Ellinger, D.K., Muller, L.D., Glantz, P.J. (1980). Influence of feeding fermented colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of dairy calves. *J Dairy Sci* 63: 478-482.

FAO/WHO. Working group for drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2pdf> 2002.

Farache, J., Zigmond, E., Shakh, G., Jung, S. 2013. Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunol Cell Biol* 91:232–9. doi:10.1038/icb.2012.79

Fujimori, S., Gudis, K., Mitsui, K., Seo, T., Yonezawa, M., Tanaka, S. (2009). A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. *Nutrition* 25, 520–525.

Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., et al. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003; 52:65–70. [PubMed: 12477762]

Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A., Mitsuoka, T. 1998. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol*; 42:39-44.

Furley, A.J., Mizutani, S., Wellbecher, K. 1986. Developmentally regulated rearrangement and expression of genes encoding the T cell receptor-T3 complex. *Cell*: 4675-87.

Fuss, I.J., Becker, C., Yang, Z., Groden, C., Hornung, R.L. (2006) Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 12:9–15.

Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., et al. (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation*. 2004; 113:1490–1497. [PubMed: 15146247]

Garson, J.A., Beverley, P.C.L., Coakham, H.B., Harper, E.L. (1982). Monoclonal antibodies against human T-lymphocytes label Purkinje neurons of many species. *Nature* 1982; 298: 375-377.

Gaudier, E., Michel, C., Segain, J.P., Cherbut, C., Hoebler, C. (2005). The probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. *J. Nutr.*, 2005, 135(12):2753-2761.

Gebert, A., and Pabst, R. (1999). M cells at locations outside the gut. *Semin Immunol* 11, 165–70.

Geier, M.S., Butler, R.N., Howarth, G.S. (2007). Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, 115:1-11.

German, A. J., Hall, E. J., Kelly, D. F., Watson, A. D. and Day, M. J. (2000). An immunohistochemical study of histiocytic ulcerative colitis in boxer dogs. *J Comp Pathol* 122, 163- 175 (2000)

German, A. J., Hall, E. J. and Day, M. J. (2001). Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *J Vet Intern Med* 15, 14-25 (2001)

Giaroni, C., De Ponti, F., Cosentino, M., Lecchini, S., Frigo, G. 1999. "Plasticity in the enteric nervous system," *Gastroenterology*, vol. 117, no. 6, pp. 1438–1458

Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B., (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*, 17:259–275.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K.M., Brigidi, P. 2003. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 124:1202–1209. [PubMed: 12730861]

- Gordon, H. A., Bruckner-Kardoss, E., & Wostmann, B. S. (1966). Aging in germ-free mice: life tables and lesions observed at natural death. *J Gerontol* 21, 380–387.
- Gordon, H., Hooper, L.V., McNevin, M.S., Wong, M., Bry, L. (1997): Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium and diffuse GALT. *Am. J. Physiol. Sep;273:3, Pt1, G565-70.*
- Gordon, S. (1986). Biology of the macrophage. *J Cell Sci Suppl* 4:267
- Gordon, S., Fraser, I., Nath, D., Hughes, D., Clarke, S. (1992). Macrophages in tissues and in vitro. *Curr Opin Biol* 4:25
- Gormley, P. D., Powell-Richards, A. O., Azuara-Blanco, A., Donoso, L. A., and Dua, H. S. (1998). Lymphocyte subsets in conjunctival mucosa-associated lymphoid tissue after exposure to retinal-S-antigen. *Int Ophthalmol* 22, 77–80.
- Green, W.B., Eaton, K., Krakowka, S. (1997): Porcine gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT): stimulation by colonization with the gastric bacterial pathogen, *Helicobacter pylori*. *Vet Immunology Immunopathology*, May;56(1-2):119-31.
- Grove, D. I., Mahmoud A. A., Warren, K. S. (1977). Suppression of cell-mediated immunity by metronidazole. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 54, 422-427
- Gruber, L., Kisling, S., Lichti, P. 2013. High fat diet accelerates pathogenesis of murine Crohn's disease-like ileitis independently of obesity. *PLoS One*;8:e71661.
- Guilford, W. G., Center, S. A., Strombeck, D. R., Williams, D. A., Meyer, D. J. (1996). *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*, 3rd edn. Philadelphia, USA, W.B. Saunders
- Guilford, W. G., Jones, B. R., Markwell, P. J., Arthur, D. G., Collett, M. G., Harte, J. G. 2001. Food sensitivity in cats with chronic idiopathic gastrointestinal problems. *J Vet Intern Med* 15, 7-13
- Guslandi, M. (2011). Efficacy of a symbiotic product during clinical relapse of ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 45, 475–476.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M. 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci*; 45 (7): 1462-4

- Guzy, C., Paclik, D., Schirbel, A., Sonnenborn, U., Wiedenmann, B., Sturm, A. 2008. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 induces gdT cell apoptosis via caspase- and FasL-dependent pathways. *Int Immunol*; 20:829-40.
- Haas, E., Rutgen, B.C., Gerner, W., Richter, B., Tichy, A., Galler, A., Bilek, A., Thalhammer, J.G., Saalmuller, A., Luckschander-Zeller, N. 2014. Phenotypic Characterization of Canine Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in Dogs with Inflammatory Bowel Disease. *J Vet Intern Med*;28:1708–1715
- Hall, E.J., German, A.J. 2005. Diseases of the Small Intestine. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, PA: WB Saunders;1367–1375.
- Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., et al. (2002). Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 168, 57–64.
- Hart, M.L., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M. et al (2012). Open-label trial of a multi-strain synbiotic in cats with chronic diarrhoea, *J Fel Med Surg*14(4): 240-245.
- He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J. 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*; 26:812-26.
- Heilmann, R.M., Suchodolski, J.S. 2015. Is inflammatory bowel disease in dogs and cats associated with a Th1 or Th2 polarization?, *Veterinary Immunology and Immunopathology* , <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.10.008>
- Henker, J., Müller, S., Laass, M. W., Schreiner, A., & Schulze, J. (2008). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for successful remission/maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study. *Z Gastroenterol* 46, 874–875.
- Hermiston, M.L., Gordon, J.I. (1995). Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 270, 1203–1207.
- Herstad, H.K., Nesheim, B.B., L'Abée-Lund, T. (2010). Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis – a controlled clinical trial, *J Small Anim Pract* 51(1): 34-38.

Himmel, M. E., Hardenberg, G., Piccirillo, C. A., Steiner, T. S., & Levings, M. K. (2008). The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the Pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology* 125, 145–153.

Homer, C.R., Richmond, A.L., Rebert, N.A., Achkar, J.P., McDonald, C. 2010. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 139:1630–1641. 1641 e1631-1632. [PubMed: 20637199]

Hoving, J.C., Kirstein, F., Nieuwenhuizen, N.E., Fick, L.C., Hobeika, E., Reth, M., Brombacher, F., (2012). B cells that produce immunoglobulin E mediate colitis in BALB/c mice. *Gastroenterology* 142,96–108.

Howlett, J., 2008. Functional foods: from science to health and claims, International Life Sciences Institute, ILSI Press, 1st Ed., Washington DC, USA.

Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E.J., von der Weid, T. 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infect Immun*; 71:428-36.

Ilan, Y., Weksler-Zangen, S., Ben-Horin, S., Diment, J., Sauter, B., Rahbani, E., Engelhardt, D., Roy Chowdhury, N., Roy Chowdhury, J., & Goldin, E. (2000). Treatment of experimental colitis by oral tolerance induction: A central role for suppressor lymphocytes. *American Journal of Gastroenterology*, 95, 966– 973.

Ilaria, P., Daniele, F., Roberta, C., Carmine, S., Flavio, C., Massimo, C. F., Giorgio, C., Enzo, G., Laura, D. I., Francesco, M. P., Francesco, P., Giovanni, M. 2007. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 Suppresses Human T-Cell Proliferation. *INFECTION AND IMMUNITY*, p. 1730–1737 Vol. 75, No. 4

Janeczko, S., Atwater, D., Bogel, E., Greiter-Wilke, A., Gerold, A., Baumgart, M., Bender, H., McDonough, P. L., McDonough, S. P., Goldstein, R. E., Simpson, K. W. (2008). The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. *Vet Microbiol* 128, 178-93

Jason, M. S., Judy H. C., Bruce E. S., Neal S. L. 2015. Bridging the Gap Between Host Immune Response and Intestinal Dysbiosis in Inflammatory Bowel Disease: Does Immunoglobulin A Mark the Spot?. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2015;13:842–846

- Jergens, A. E. (1999). Inflammatory bowel disease. Current perspectives. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29, 501- 521, vii (1999)
- Jergens, A. E., Gamet, Y., Moore, F. M., Niyo, Y., Tsao C., Smith, B.(1999). Colonic lymphocyte and plasma cell populations in dogs with lymphocytic-plasmacytic colitis. *Am J Vet Res* 60, 515-520
- Jergens, A. E., Moore, F. M., Kaiser, M. S., Haynes, J. S., Kinyon, J.M. (1996). Morphometric evaluation of immunoglobulin A-containing and immunoglobulin G-containing cells and T cells in duodenal mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease or nonspecific gastroenteritis. *AJVR* 57(S), 697-704
- Jergens, A.E., Crandell, J., Morrison, J.A., Deitz, K., Pressel, M., et al. (2010). Comparison of oral prednisone and prednisone combined with metronidazole for induction therapy of canine inflammatory bowel disease: a randomized controlled trial. *J Vet Intern Med* 24: 269–277.
- Jergens, A.E., Moore, F.M., Haynes, J.S. 1992. Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats: 84 cases (1987–1990). *J Am Vet Med Assoc*;201(10):1603–1608.
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012; 491:119–124. [PubMed: 23128233]
- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol*; 78:80–88.
- Kamada, N., Chen, G., & Nunez, G. (2012). A complex microworld in the gut: harnessing pathogen–commensal relations. *Nat Med* 18, 1190–1191.
- Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 13, 321–335.
- Kamikozuru, K., Fukunaga, K., Hirota, S., Hida, N., Ohda, Y., Yoshida, K., et al. (2009). The expression profile of functional regulatory T cells, CD4 + CD25^{high}/forkhead box protein P3⁺, in patients with ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Clin Exp Immunol* 156, 320–327.
- Kan, S., Masanobu, N., Satoru, N. (2011) Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: A possible mechanism by which probiotics

exert multifunctional immune regulatory activities, *Gut Microbes*, 2:2, 109-114, DOI: 10.4161/gmic.2.2.15661

Kanamori, Y., Ishimaru, K., Nanno, M., Maki, K., Ikuta, K., Nariuchi, H., Ishikawa, H. (1996). Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J. Exp. Med.* 184, 1449–1459.

Karaca, T., Uz, Y.H., Demirtas, S., Karaboga, I., Can, G. 2015. Protective effect of royal jelly in 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Iran J Basic Med Sci*; 18:370-379

Karacaa, T., Sëimsëekb, N., Usluc, S., Kalk, Y., Canb, I., Karab, A., Yörükç, M. 2012. The effect of royal jelly on CD3⁺, CD5⁺, CD45⁺ T-cell and CD68⁺ cell distribution in the colon of rats with acetic acid-induced colitis. *Allergol immunopathol (Madr)*. 40(6): 357-361

Karen A. F. P., Adrien S., Jacqueline L. C., Paul S. W., David, Y. M. 1990. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *International Immunology*, Vol. 2, No. 10

Katsumata, S.(1954). Effects of oral administration of lactic acidbacteria preparation on enterobacterial flora in rats. *Journalof the Japan Pediatric Society*, vol. 58, no. 10, pp. 893–899

Kaufmann, H.J., Taubin, H.L. 1987. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Annals of internal medicine*. 107:513–516. [PubMed: 3498419]

Kelley, R. L., Minikhiem, D., Kiely, B., O'Mahony,L., O'Sullivan, D., Boileau, T., Park, J. (2009). Clinical benefits ofprobiotic canine-derived *Bifidobacterium animalis*strainAHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. *Vet Ther*10,121-130

Kelly, K.A., Scollay, R. (1992). Seeding of neonatal lymph nodes by T cells and identification of a novel population of CD3-CD4⁺ cells. *Eur. J. Immunol.* 22, 329–334.

Kelsall, B., and Strober, W. (1999). Gut-associated lymphoid tissue: antigen handling andT-lymphocyte responses. In *Mucosal Immunity* (O. L. Pearay, J. Mestecky, M. ELamm, W. Strober, J. Bienenstock, and J. R. McGhee, eds.), pp. 293–317. Academic Press, San Diego.

- Kim, I., Kong, H., Lee, Y., Hong, S., Han, J., et al. (2009). Dexamethasone 21-sulfate improves the therapeutic properties of dexamethasone against experimental rat colitis by specifically delivering the steroid to the large intestine. *Pharm Res* 26: 415–421.
- Kiyono, H., and Fukuyama, S. (2004). NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 699–710.
- Kleinschmidt, S., Meneses, F., Nolte, I., Hewicker-Trautwein, M. (2007). Characterization of mast cell numbers and subtypes in biopsies from the gastrointestinal tract of dogs with lymphocyticplasmacytic or eosinophilic gastroenterocolitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 120: 80-92
- Knapp, W., Dorken, B., Gilks, W.R., Rieber, E.P., Schmidt, R.E., Stein, H., von dem Borne AEGK, (eds). (1989). *Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens*. Oxford, UK, Oxford
- Koeppel, K.N., Bertschinger, H., van Vuuren, M. (2006). The use of a probiotic in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*), *J S African Vet Assoc* 77(3): 127-130.
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 146, 1489–1499.
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukás, M., Fixa, B., Kascák, M., et al. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617–1623.
- Kruis, W., Schütz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G., & Stolte, M. (1997). Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 11, 853–858.
- Kuehbacher, T., Ott, S.J., Helwig, U., Mimura, T., Rizzello, F., Kleessen, B., Gionchetti, P., Blaut, M., Campieri, M., Folsch, U.R., Kamm, M.A., Schreiber, S. (2006). Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy in pouchitis. *Gut*, 2006, 55:833-841.
- Kuper, C. F., De Heer, E., van Loveren, H., and Vos, J. G. (2002). Immune System. In *Handbook of Toxicologic Pathology* (W. M. Hascheck-Hock, C. G. Rousseaux, and M. A. Wallig, eds.), Vol. 2, pp. 585–644. Academic Press, New York.
- Loftus EV Jr, Sandborn WJ. (2002) Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America*. 2002; 31:1–20. [PubMed: 12122726]

- Loken, M. R., Shah, V. O., Dattilio, K. L. and Civin, C. I. 1987. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 70:1316.
- Lomax, A. E., Fernández, E., Sharkey, K. A.(2005). Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 17, no. 1, pp. 4–15
- Lorenz, R. G., and Newberry, R. D. (2004). Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1029, 44–57.
- Lorenz, R.G., Chaplin, D.D., McDonald, K.G., McDonough, J.S., Newberry, R.D. (2003). Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. *J. Immunol.* 170, 5475–5482.
- Luckschander, N., Allenspach, K., Hall, J., Seibold, F., Grne, A., Doherr, M., Gaschen, F. 2006. Perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody and response to treatment in diarrheic dogs with food responsive disease or inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med* 20, 221-227
- MacDonald, T. T. (2003). The mucosal immune system. *Parasite Immunol* 25, 235–46.
- Macdonald, T.T., Monteleone, G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005; 307:1920–1925. [PubMed: 15790845]
- Macfarlane, S., Macfarlane, G. T., Cummings, J. H., (2006). Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther*, 24:701-714.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M.A. 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*; 52:827-33.
- Macpherson, A.J., Geuking, M.B., McCoy, K.D.2005. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*; 115:153-62.
- Macpherson, A.J., Harris, N.L.2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*; 4:478-85.
- Macpherson, A.J., Uhr, T.2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*; 303:1662-5.
- Malchow, H.A. 1997. Crohn's disease and *Escherichia coli*: a new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol*; 25 (4): 653-8

- Marshall-Jones, Z.V., Baillon, M.L., Croft, J.M. et al (2006). Effects of *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 as a probiotic in healthy adult cats, *Am J Vet Res* 67(6): 1,005-1,012.
- Mason, D.Y., Cordell, J.L., Brown, M.H., et al. (1995). CD79a: A novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood*. 1995;86:1453-1459.
- Mason, D.Y., van Noesel, C.J., Cordell, J., et al. (1992). The B29 and mb-1 polypeptides are differentially expressed during human B cell differentiation. *Eur J Immunol* 1992;22:2753-6.
- Matsumoto, S., Hara, T., Hori, T., Mitsuyama, K., Nagaoka, M., Tomiyasu, N. 2005. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the downregulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*; 140:417-26.
- Matsunaga, H., Hokari, R., Kurihara, C. 2008. Omega-3 fatty acids exacerbate DSS-induced colitis through decreased adiponectin in colonic subepithelial myofibroblasts. *Inflamm Bowel Dis*;14:1348-1357.
- Mazanec, M.B., Nedrud, J.G., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E. 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today*; 14:430-5.
- Mbodji, K., Charpentier, C., Guerin, C. 2013. Adjunct therapy of n-3 fatty acids to 5-ASA ameliorates inflammatory score and decreases NF-kappaB in rats with TNBS-induced colitis. *J Nutr Biochem*;24:700-705.
- McVay, L.D., Keilbaugh, S.A., Wong, T.M. 2006. Absence of bacterially induced RELMβ reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. *J Clin Invest*;116:2914-23.
- Mebius, R.E., Rennert, P., Weissman, I.L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4⁺CD3⁻LTβ⁺ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 7, 493-504.
- Mebius, R.E., Streeter, P.R., Michie, S., Butcher, E.C., Weissman, I.L. (1996). A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4⁺ CD3⁻ cells to colonize lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11019-11024.
- Melanie, F. (2015). Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues. *Mucosal Immunology* (Fourth Edition) (31-42). doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00003-3.

- Miake, S., Nomoto, K., Yokokura, T., Yoshikai, Y., Mutai, M. 1985. Protective effect of *Lactobacillus casei* on *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Infect Immun*; 48:480-5.
- Min-Tze Liong. (2008). Roles of Probiotics and prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and in-vivo Evidence. *Int. J. Mol. Sci.*, 2008, 9:854-863.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E. (2008). Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J Gastroenterol*. 2008; 43:1–17. [PubMed: 18297430]
- Mladenovska, K., Raicki, R. S., Janevik, E. I., Ristoski, T., Pavlova, M. J., Kavrakovski, Z., Dodov, M. G., Goracinova, K., (2007). Colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid from chitosan-Ca-alginate microparticles. *Int J Pharm*, 342:124-136.
- Morfitt, D. C., and Pohlenz, J. F. (1989). Porcine colonic lymphoglandular complex: distribution, structure, and epithelium. *Am J Anat* 184, 41–51.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., Wallace, J. L., (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96:795-803.
- Mowat, A. M., and Viney, J. L. (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156, 145–66.
- Nagalingam, N. A., & Lynch, S. V. (2012). Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 18, 968–980.
- Narita, M., Kawashima, K., and Shimizu, M. (1996): Viral antigen and B and T lymphocytes in lymphoid tissues of gnotobiotic piglets infected with Hog cholera virus. *J. Comp. Path.*, Vol. 114, 257-263.
- Neurath, M., Fuss, I., Strober, W. (2000) TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 19: 51–62.
- Neurath, M.F., Finotto, S., Glimcher, L.H. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.* 8, 567–573.
- Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E., Strober, W., (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* 182,1281–1290.

- Noti, M., Corazza, N., Mueller, C., Berger, B., Brunner, T. (2010). TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis. *The Journal of experimental medicine*. 2010; 207:1057–1066. [PubMed: 20439544]
- Ohkusa, T., Sato, N., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M., & Okayasu, I. (2002). *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol* 17, 849–853.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R. (1990). A novel method for the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702.
- Ott, S. J., Kuhbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., et al. (2008). Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* 43, 831–841.
- Otte, J.M., Podolsky, D.K. 2004. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 286:613-26.
- Owen, R. L., Piazza, A. J., and Ermak, T. H. (1991). Ultrastructural and cytoarchitectural features of lymphoreticular organs in the colon and rectum of adult BALB/c mice. *Am J Anat* 190, 10–8.
- Pabst, O., Herbrand, H., Friedrichsen, M., Velaga, S., Dorsch, M., Berhardt, G., Worbs, T., Macpherson, A.J., Forster, R. (2006). Adaptation of solitary intestinal lymphoid tissue in response to microbiota and chemokine receptor CCR7 signaling. *J. Immunol.* 177, 6824–6832.
- Pabst, O., Herbrand, H., Worbs, T., Friedrichsen, M., Yan, S., Hoffmann, M.W., Korner, H., Bernhardt, G., Pabst, R., and Forster, R. (2005). Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* 35, 98–107.
- Pabst, R. (1987). The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat Embryol (Berl)* 176, 135–44.

- Pabst, R., Rothkotter, H.J. (1999). Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet. Immunology and Immunopathology*, 72, 167-173.
- Panwala, C.M., Jones, J.C., Viney, J.L., (1998). A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J. Immunol.* 161, 5733–5744.
- Parvez, S., Malik, K.A., Kang, S.A., Kim, K.-Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, 100:1171-1185.
- Peiguo G.C., Daniel, A. A. 2001. CD79: A Review. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 9(2): 97–106, 2001
- Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Bailon, E., Henriksson, A., Xaus, J., Zarzuelo, A., Galvez J. (2007). A comparative study of the preventive effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, 103:836-844.
- Perry, G. A., and Sharp, J. G. (1988). Characterization of proximal colonic lymphoid tissue in the mouse. *Anat Rec* 220, 305–12.
- Peters, I., Helps, C., Calvert, E., Hall E., Day, M. (2005). Cytokine mRNA quantification in duodenal mucosa from dogs with chronic enteropathies by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Vet Intern Med* 19, 644-653
- Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L., Gordon, J.I. 2007. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe*; 2:328-39.
- Petreska Ivanovska, T., Petrushevska-Tozi, L., Dabevska Kostoska, M., Geskoski, N., Grozdanov, A., Stain, C. Stafilov, T., Mladenovska, K., 2012. Microencapsulation of *L. casei* in chitosan-Ca-alginate microparticles using spray-drying method. *Mac J Chem Chem Eng*, 31(1):115-123.
- Petreska Ivanovska, T., Mladenovska, K., Zhivikj, Z., Jurhar Pavlova, M., Gjurovski, I., Ristoski, T., Petrushevska-Tozi, L., 2017. Synbiotic loaded chitosan-Ca-alginate

microparticles reduces inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Pharm*, 527:126-134.

Petreska Ivanovska, T., Zhivikj, Z., Bogdanovska, L., Mladenovska, K., Petrushevskatozi, L., 2018. Application of *Lactobacillus casei* 01 and oligofructose-enriched inulin in ayran. *Maced J Chem Chem Eng*, 37(1):43-52.

Pohlmann, A., Tilling, L.C., Robinson, A., Woolmer, O., McCleary, S., et al. (2009). Progression and variability of TNBS colitis-associated inflammation in rats assessed by contrast-enhanced and T2-weighted MRI. *Inflamm Bowel Dis* 15: 534–545.

Poritz, L.S., Garver, K.I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., Koltun, W.A. (2007). Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J.Surg.Res.* 140, 12–19.

Prescott, S.L., and Bjorksten, B. (2007). Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, 120:255–262.

Radice, G.L., (2013). N-cadherin-mediated adhesion and signaling from development to disease: lessons from mice. *Prog.Mol.Biol.Transl.Sci.* 116, 263–289.

Rafter, J. Probiotics and colon cancer. *Best Pract. Res. Cl. Ga.*, (2003), 17(5):849-859.

Reiff, C., Delday, M., Rucklidge, G., Reid, M., Duncan, G., Wohlgemuth, S. 2009. Balancing inflammatory, lipid and xenobiotic signaling pathways by VSL#3, a biotherapeutic agent, in the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*; 15:1721-36.

Reinecke, K., Eminel, S., Dierck, F., Roessner, W., Kersting, S. и cop. (2012) The JNK Inhibitor XG-102 Protects against TNBS-Induced Colitis. *PLoS ONE* 7(3): e30985.

Rembacken, B. J., Snelling, A. M., Hawkey, P. M., Chalmers, D. M., & Axon, A. T. (1999). Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635–639.

Resta-Lenert, S., Barrett, K.E. 2003. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*; 52:988-97.

Roediger, W.E., Rae, D.A.1982. Trophic effect of short chain fatty acids on mucosal handling of ions by the defunctioned colon. *Br J Surg*;69:23–25.

Roitt, I., Brostoff, I., Male, D. (1996). *Immunology*. 4th edn. London, Times Mirror International Publishers Ltd. Pp. 2.1.2.18

Roselli, M., Finamore, A., Nuccitelli, S., Carnevali, P., Brigidi, P., Vitali, B. 2009. Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and Bifidobacterium strains is associated with an expansion of gdT and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis*; 15:1526-36.

Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Palumbo, P. A., Steiner, J.M., et al. (2014). Comparison of Microbiological, Histological, and Immunomodulatory Parameters in Response to Treatment with Either Combination Therapy with Prednisone and Metronidazole or Probiotic VSL#3 Strains in Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* 9(4): e94699. doi:10.1371/journal.pone.0094699

Runjan, C., Kevin, G. 1994. CD3: Structure, Function, And Role of Immunostaining in clinical practice. *Journal of pathology*, VOL. 173:303-307

Sabin, F.R. (1902). On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am. J. Anat.* 1, 367–389.

Sabin, F.R. (1904). On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig. *Am. J. Anat.* 3, 183–195.

Saito, N., Pulford, K.A.F., Breton-Gonus, J., Mason, D.Y., Cramer, E.M. 1991. Ultrastructural localisation of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am J Pathol* 139:1053,

Sartor, R. B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577–594.

Sauter, S. N., Allenspach, K., Gaschen, F., Grne, A., Ontsouka, E., Blum, J. W. (2005). Cytokine expression in an ex vivo culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: modulation by probiotic bacteria. *Domest Anim Endocrinol* 29, 605-622

- Schepens, M.A., Schonewille, A.J., Vink, C. 2009. Supplemental calcium attenuates the colitis-related increase in diarrhea, intestinal permeability, and extracellular matrix breakdown in HLA-B27 transgenic rats. *J Nutr*; 139:1525–1533.
- Schlee, M., Harder, J., Koten, B., Stange, E.F., Wehkamp, J., Fellermann, K. 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte b-defensin 2. *Clin Exp Immunol*; 151:528-35.
- Schreiner, N.M., Gaschen, F., Gröne, A., Sauter, S.N., Allenspach, K. (2008). Clinical signs, histology, and CD3-positive cells before and after treatment of dogs with chronic enteropathies. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1079-1083
- Schumacher, J., Edwards, J.F., Cohen, N.D. (2000) Chronic Idiopathic Inflammatory Bowel Diseases of the Horse. *J Vet Intern Med* 2000;14:258–265
- Shanahan, F. (1993). Pathogenesis of ulcerative colitis. *The Lancet* 342,407-41 I
- Shen, C., de Hertogh, G., Bullens, D.M., Van Assche, G., Geboes, K., et al. (2007). Remission-inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: mechanisms beyond neutralization? *Inflamm Bowel Dis* 13: 308–316.
- Shida, K., Takahashi, R., Iwadate, E., Takamizawa, K., Yasui, H., Sato, T. 2002. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy*; 32:563-70.
- Shorter, R.G., Huizenga, K.A., Spencer, R.J. (1972). A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease. *The American journal of digestive diseases*. 1972; 17:1024–1032. [PubMed: 5082428]
- Silverberg, M.S., Cho, J.H., Rioux, J.D., McGovern, D.P., Wu, J., Annesse, V.2009. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nature genetics*. 41:216–220. [PubMed: 19122664]
- Silverstein, M.D., Lashner, B.A., Hanauer, S.B., Evans, A.A., Kirsner, J.B. 1989. Cigarette smoking in Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*. 84:31–33. [PubMed: 2912028]

Simms, L.A., Doecke, J.D., Walsh, M.D., Huang, N., Fowler, E.V., Radford-Smith, G.L. 2008. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*;57:903-10.

Simpson, K. W., Dogan, B., Rishniw, M., Goldstein, R. E., Klaessig, S., McDonough, P. L., German, A. J., Yates, R. M., Russell, D. G., Johnson, S. E., Berg, D. E., Harel, J., Bruant, G., McDonough S. P., Schukken, Y. H. (2006). Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in boxer dogs. *Infect Immun* 74, 4778-4792

Sminia, T., and Kraal, G. (1999). Nasal-associated lymphoid tissue. In *Mucosal Immunity* (O. L. Pearay, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, and J. R. McGhee, eds.), pp. 357–64. Academic Press, San Diego.

Smith, M.E.F., Costa, M.J., Weiss, S.W. (1991). Evaluation of CD68 and other histiocytic antigens in angiomatoid malignant fibrous histiocytoma. *Am J Surg Pathol* 15:757

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S. (2009) T cell Activation. *Annual Review of Immunology* 27, 591-619

Song, D., Ibrahim, S., Hayek, S., (2012). Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science, Probiotics, Prof. Everlon Rigobelo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0776-7, InTech, DOI: 10.5772/50121.

Soos, P., Schubert, H.J., Depner, K.R. (2000): Effects of classical swine fever infection on the porcine leukocyte subsets. *Acta Vet Hung.*, 48(1):35-42.

Sparkes, A. H., Papasouliotis, K., Sunvold, G., Werrett, G., Gruffydd-Jones, E. A., Egan, K., Gruffydd- Jones, T. J., Reinhart, G. (1998). Effect of dietary supplementation with fructo-oligosaccharides on fecal flora of healthy cats. *Am J Vet Res* 59, 436-440

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E. (2012). Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 145–149.

Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotech.*, 2005, 16:198- 203

Stashenko, P., Nadler, L. M., Hardy, R. and Schlossman, S. F. 1980. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol.* 125:1678.

Stein, J., Ries, J., & Barret, K. (1998). Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis: Possible role of mast cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 274, G203– G209.

Stokkers, P.C., Reitsma, P.H., Tytgat, G.N., van Deventer, S.J. 1999. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut.* 45:395–401. [PubMed: 10446108]

Stonehewer, J., Simpson, J. W. (1998) Evaluation of B and T lymphocytes and plasma cells in colonic mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease. *Research in Veterinary Science* 1998, 65, 59-63.

Strober, W., Fuss, I.J., Blumberg, R.S. (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:495–549. [PubMed: 11861611]

Strober, W., James, S. P. (1986). The immunological basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Immunology* 6:6,415-432

Strober, W., Watanabe, T. 2011. NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. *Mucosal immunology.* 4:484–495. [PubMed: 21750585]

Sutherland, L., Singleton, J., Sessions, J., Hanauer, S., Krawitt, E., et al. (1991). Double-Blind, Placebo Controlled Trial of Metronidazole in Crohn's-Disease. *Gut* 32: 1071–1075.

Swinney-Floyd, D., Gardner, B.A., Owens, F.N., Rehberger, T., Parrott, T. (1999). Effect of inoculation with either strain P-63 alone or in combination with *Lactobacillus acidophilus* LA53545 on performance of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 77.

Tahira, W., Patrick, S., Dennis, H. W. 1997. The Accessory Cell Populations in Ulcerative Colitis: A Comparison Between the Colon and Appendix in Colitis and Acute Appendicitis. *HUMAN PATHOLOGY* Volume 28, No. 3

Takagi, A., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, K., Morotomi, M., Yokokura, T. 2001. Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis*; 22:599-605.

Taupin, D., Podolsky, D.K. 2003. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*;4:721-32. [Erratum, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:819.]

Taylor, R.T., Lugerling, A., Newell, K.A., Williams, I.R. (2004). Intestinal cryptopatch formation in mice requires lymphotoxin alpha and the lymphotoxin beta receptor. *J. Immunol.* 173, 7183–7189.

Turner, J.R. 2006. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol*;169:1901-9.

Uhlig, H.H., McKenzie, B.S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D.J., Powrie, F., (2006). Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 25, 309–318.

Ukena, S., Singh, A., & Dringenberg, U. (2007). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One* 2, e1308.

Ung, V.Y., Foshaug, R.R., MacFarlane, S.M. 2010. Oral administration of curcumin emulsified in carboxymethyl cellulose has a potent anti-inflammatory effect in the IL-10 gene-deficient mouse model of IBD. *Dig Dis Sci*; 55:1272–1277.

van Baarlen, P., Troost, F.J., van Hemert, S., van der Meer, C., de Vos, W.M., de Groot, P.J. 2009. Differential NFκB pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106:2371-6.

Van De Pavert, S.A., Olivier, B.J., Goverse, G., Vondenhoff, M.F., Greuter, M., Beke, P., Kusser, K., Hopken, U.E., Lipp, M., Niederreither, K., Blomhoff, R., Sitnik, K., Agace, W.W., Randall, T.D., De Jonge, W.J., Mebius, R.E. (2009). Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation. *Nat. Immunol.* 10, 1193–1199.

Van Der Heijden, P. J., Stok, W. (1987) Improved procedure for the isolation of functionally active lymphoid cells from the murine intestine. *Journal of Immunological Methods* 103, 161-167

van der Logt, E.M., Blokzijl, T., van der Meer, R. 2013. Westernized high-fat diet accelerates weight loss in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, which is further aggravated by supplementation of heme. *J Nutr Biochem*;24:1159–1165.

Van der Sluis, M., De Koning, B.A., De Bruijn, A.C., Velcich, A., Meijerink, J.P., Van Goudoever, J.B., Buller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., Einerhand, A.W., (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117–129.

Veerappan, G. R., Betteridge, J., Young, P. E. (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*, vol. 14, no. 4, pp. 324–333

Veiga-Fernandes, H., Coles, M.C., Foster, K.E., Patel, A., Williams, A., Natarajan, D., Barlow, A., Pachnis, V., Kioussis, D. (2007). Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis. *Nature* 446, 547–551.

Venturi, A., Gionchetti, P., Rizzello, F., Johansson, R., Zucconi, E., Brigidi, P., et al. (1999). Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 13, 1103–1108.

Wagner, C.S., Cresswell, P. 2012. TLR and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor signals differentially regulate exogenous antigen presentation. *Journal of immunology*. 188:686–693.

Washabau, R.J., Holt, D.E. (2005). Diseases of the large intestine. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th ed. St. Louis: Elsevier-Saunders, 2005: 1378-1407

Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E. 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Croh 's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*;102:18129-34.

Westermarck, E., Skrzypczak, T., Harmoinen, J., Steiner, J., Ruaux, C., Williams, D., Eerola, E., Sundbck, P., and Rinkinen, M. (2005). Tylosin-responsive chronic diarrhea in dogs. *J Vet Intern Med* 19, 177-186

- Wigle, J.T., Oliver, G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98, 769–778.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc.* 2007; 2:541–546. [PubMed: 17406617]
- Xavier, R.J., Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007; 448:427–434. [PubMed: 17653185]
- Xenoulis, P.G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J.M., Van House, A.M., Suchodolski, J.S. (2008) Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; 66: 579-589
- Yoshida, H., Honda, K., Shinkura, R., Adachi, S., Nishikawa, S., Maki, K., Ikuta, K., Nishikawa, S.I. (1999). IL-7 receptor alpha⁺ CD3⁽⁻⁾ cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Intern. Immunol.* 11, 643–655.
- Zhao, H., Zhang, H., Wu, H. 2012. Protective role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC Gastroenterol*;12:57.
- Zigmond, E., Jung, S. 2013. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol* () 34:162–8. doi:10.1016/j.it.2013.02.001
- Zocco, M. A., dal Verme, L. Z., Cremonini, F., Piscaglia, A. C., Nista, E. C., Candelli, M., et al. (2006). Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 23, 1567–1574.
- Zyrek, A.A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., Schmidt, M.A. 2007. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol*; 9:804-16.