

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

**Milena Đorđević**

**MORFOLOŠKE, IMUNOFENOTIPSKE I  
KLINIČKE KARAKTERISTIKE  
LIMFOCITNO – PLAZMOCITNOG  
DUODENITISA PASA**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2013.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**Milena Đorđević**

**MORPHOLOGICAL,  
IMMUNOPHENOTYPIC AND  
CLINICAL CHARACTERISTICS OF  
DOGS WITH  
LYMPHOCYtic - PLASMACYTIC  
DUODENITIS**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2013.**

**Mentor:**

**dr Vanja Krstić, redovni profesor**  
**Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine**  
**Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači**

Članovi komisije:

dr Vanja Krstić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine  
Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači

dr Sanja Aleksić-Kovačević, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine  
Katedra za patološku morfologiju

dr Olivera Lozanče, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine  
Katedra za anatomiju domaćih životinja

dr Nikola Krstić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine  
Katedra za radiologiju i radijacionu higijenu

dr Milenko Uglješić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet  
Katedra za internu medicinu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Veliku zahvalnost za pomoć u izradi ove disertacije dugujem:*

- *svom mentoru profesoru dr Vanji Krstić, na bezgranično dobroj volji, znanju i iskustvu koje mi je preneo i nesebičnoj podršci koju mi je pružio u izradi ove disertacije*
- *profesorki dr Sanji Kovačević, na ogromnoj pomoći koju mi je pružila u izradi ove disertacije, na strpljenju, razumevanju, kao i na velikom broju stručnih i korisnih saveta*
- *profesoru dr Miodragu Miriloviću na pomoći u izradi ove disertacije*
- *kolektivu Katedre za patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine koja je pomogla realizaciju ove disertacije*
- *kolektivu Katedre za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači Fakulteta veterinarske medicine koja je pomogla realizaciju ove disertacije*
- *kolektivu Katedre za anatomiju Fakulteta veterinarske medicine na interesovanju sa kojim su pratili moj rad i brojnim dragocenim uslugama*

# MORFOLOŠKE, IMUNOFENOTIPSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE LIMFOCITNO – PLAZMOCITNOG DUODENITISA PASA

## REZIME

Limfocitno – plazmocitni duodenitis (LPD) pasa je oblik inflamatorne bolesti creva. LPD predstavlja enteropatiju hroničnog toka i praćen je nespecifičnim kliničkim simptomima, od kojih su najvažniji dijareja i povraćanje.

Najvažnija morfološka karakteristika imunološkog odgovora kod limfocitno - plazmocitnog duodenitisa (LPD) pasa je nalaz mononuklearnog ćelijskog infiltrata u sluznici duodenuma. Nakon dobro obavljenog kliničkog pregleda i detaljne anamneze, može se pretpostaviti moguće mesto inflamacije. Prikupljanje preciznih podataka, uzimanje sveobuhvatne anamneze i vršenje detaljnog kliničkog pregleda pasa je od neprocenjivog značaja za pravilno postavljanje dijagnoze. Klinički znaci vezani za LPD nisu specifični. Imaju cikličan karakter, ređe progresivan klinički tok. Najčešći simptomi uključuju hroničnu ili rekurentnu dijareju, povraćanje, gubitak težine i promenu apetita.

Ispitivanjem je obuhvaćeno ukupno 60 odraslih pasa, različite rase i oba pola: 54 psa sa simptomima dijareje i povraćanja, koje je trajalo duže od tri nedelje, kao i šest klinički zdravih pasa koji su služili kao kontrolna grupa. Ispitivanja su obuhvatila pse koji su bili pacijenti ambulante klinike Fakulteta veterinarske medicine (FVM) u Beogradu. Prema anamnestičkim podacima, svi psi su pre dolaska u ambulantu FVM bili neuspešno lečeni antibioticima i svi su bili slobodni od crevnih parazita. Urađene su hematološke i biohemijske analize krvi, zatim radiološka, ultrazvučna i endoskopska dijagnostika. Uzorci mukoze duodenuma, uzeti biopsijom, ispitani su patohistološkim i imunohistohemijskim metodama.

Analizom rezultata dobijenih u ovom istraživanju, ustanovljeno je da oboleli psi, koji su u kliničkoj slici imali hroničnu dijareju, hronično povraćanje, izmenjeno ponašanje i promenjen apetit, boluju od sledećih enteropatija: kataralni duodenitis je

utvrđen kod 5 pasa, kod 3 psa je postavljena dijagnoza eozinofilnog duodenitisa dok je kod 46 pasa dijagnostikovano limfocitno – plazmocitno duodenitis (LPD).

Detaljnim opisom morfoloških promena na biopsijskim uzorcima sluznice duodenuma pasa obolelih od LPD (promene na crevnim resicama, stepen oštećenja crevnog epitela, postojanje proširenja kriпти, prisustvo dilatiranih limfnih sudova i fibroze) kao i praćenjem zastupljenosti intraepitelnih limfocita (IEL), limfocita, plazma ćelija, eozinofilnih granulocita i neutrofilnih granulocita u infiltratu sluznice, formirane su različite morfološke grupe. U uzorcima duodenuma u kojima dominiraju limfociti i plazma ćelije, uočeno je skraćenje crevnih resica na 75 - 50% normalne dužine, a same promene su okarakterisane kao blage do umerene. Crevne resice su zadebljale, a neke su fuzionisane. Na epitelnim ćelijama zapažaju se degenerativne promene, kao i deskvamacija epitelnih ćelija. Zapaženo je blago do umereno proširenje kriпти (10 - 25% kriпти je prošireno). *Lamina propria* je edematozna zbog prisustva obilnog ćelijskog infiltrata velikim brojem mononuklearnih ćelija, među kojima dominiraju limfociti i plazma ćelije. Plazma ćelije sa ekscentrično postavljenim jedrima obično u grupama ispunjavaju laminu propriju crevnih resica. Kriptide su razdvojene sa 10 – 20 limfocita i plazma ćelija. Pojedinačni limfociti, smešteni intaepitelno, zapažaju se na epitelu crevnih resica, i to kao individualne ćelije, a retko u grupama (grozdovima).

Imunohistohemijskim ispitivanjem uzoraka sluznice duodenuma obolelih pasa u našem materijalu, uočena je ekspresija CD3+ (T limfocita) i CD79+ (B limfocita). Kod ispitanih uzoraka, kod 31 psa u inflamatornom infiltratu dominiraju ćelije CD3+ imunofenotipa. Pozitivna imunohemijska reakcija je ispoljena nalazom precipitata tamnosmeđe boje u predelu ćelijske membrane T limfocita, tako da je prisutan tzv. membranski precipitat. Reakcija ređe zastupljenih B limfocita, više je difuznog karaktera. B limfociti dominiraju u 2 slučaja. U 13 slučajeva postoji ravnomerno mešoviti limfocitno - plazmocitni infiltrat.

Analizom statističkih pokazatelja za CIBDAI (engl. canine inflammatory bowel disease activity index) i CCECAI (engl. canine chronic enteropathy clinical activity index) unutar grupe pasa obolelih od LPD, ustanovljena je signifikantna razlika ( $p \leq 0,05$ ) između prosečne vrednosti za CIBDAI i CCECAI kod pasa sa mešovitim infiltratom i prosečne vrednosti kod pasa sa pretežno plazmocitnim infiltratom. Statistički vrlo značajno ( $p \leq 0,01$ ) je veća prosečna vrednost za CIBDAI i CCECAI kod

pasa sa mešovitim infiltratom u odnosu na prosečnu vrednost za CIBDAI i CCECAI kod pasa sa pretežno limfocitnim infiltratom.

**Ključne reči:** pas, endoskopija, limfocitno - plazmocitni duodenitis (LPD)

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:** Klinička dijagnostika, patologija i terapija životinja

**UDK broj:** 636.7:616

# **MORPHOLOGICAL, IMMUNOPHENOTYPIC AND CLINICAL FEATURES OF LYMPHOCYTIC – PLASMOCYTIC DUODENITIS IN DOGS**

## **SUMMARY**

Lymphocytic - plasmocytic duodenitis (LPD) in dogs is a form of chronic inflammatory bowel disease. LPD is a chronic enteropathy accompanied with non specific clinical symptoms out of which diarrhea and vomiting are the most significant.

The most important morphological feature of the immune response in this type of inflammatory bowel disease is the finding of mononuclear infiltrates in the mucosa of the duodenum. After thorough clinical examination and detailed patient's history the inflammation site can be described. Gathering of precise data, history, and a detailed clinical examination are of the utmost importance for the diagnosis. Clinical signs of LPD are not specific. They have a cyclic character and a seldom progressive clinical course. The most common symptoms include chronic or recurrent diarrhea, vomiting, weight loss, and changes in appetite.

The study involved 60 adult dogs of different breeds and both sexes: 54 dogs with symptoms of diarrhea and vomiting that persisted longer than three weeks and six clinically healthy dogs that served as controls. The investigation included dogs which were patients at the ambulatory clinic at the Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade (Serbia). According to anamnestic data all dogs were previously unsuccessfully treated with antibiotics and were free of intestinal parasites. Hematological and biochemical blood tests, radiology, ultrasonography and endoscopy tests were carried out. Biopsy samples of the duodenal mucosa were investigated with pathohistological and immunohistochemical methods.

By analysis of the results obtained in this study it was shown that dogs, which in the clinical picture had chronic diarrhea, chronic vomiting, abnormal behavior and altered appetite, suffered from the following enteropathies: catarrhal duodenitis was found in 5 dogs, 3 dogs were diagnosed with eosinophilic duodenitis and 46 dogs were diagnosed with lymphocytic - plasmocytic duodenitis (LPD).



Different morphological groups were formed according to detailed description of morphological changes of the duodenal mucosa biopsy samples of LPD affected dogs (changes of the villi, degree of intestinal epithelium damage, expansion of crypts, dilated lymph vessels and fibrosis). Relevant factors were as well: incidence of intraepithelial lymphocytes (IEL), lymphocytes, plasma cells, eosinophilic and neutrophilic granulocytes in the mucosa infiltrate. The duodenal samples were dominated by lymphocytes and plasma cells and shortening of the villi at 75 - 50% of the normal length were observed. The observed changes were characterized as mild to moderate. The villi were thickened, and some have merged. On epithelial cells degenerative changes and desquamation of epithelial cells were observed. A mild to moderate enlargement of crypts (10 - 25% crypts were extended) was recorded. The lamina propria was edematous due to the presence of an abundant cellular infiltrate of a large number of mononuclear cells, predominantly lymphocytes and plasma cells. Plasma cells with eccentrically placed nuclei in groups usually fill the lamina propria of the villi. Crypts were separated by 10 - 20 lymphocytes and plasma cells. Individual lymphocytes, located in the epithelium (IEL), can be observed in the epithelium of the villi, as individual cells, and rarely in groups (clusters).

Immunohistochemical examination of duodenal mucosa samples revealed expression of CD3+ (T lymphocytes) and CD79+ (B lymphocytes). In the investigated samples, in 31 dogs in the inflammatory infiltrate CD3+ cells were the dominant cell type. Positive immunochemical reaction was exhibited by a dark brown precipitate in the area of the cell membrane of T lymphocytes, i.e. so-called membranous precipitate. The reaction of the few B lymphocytes was of a more diffuse character. B lymphocytes dominated in 2 cases. In 13 cases there was an evenly mixed lymphocytic - plasmocytic infiltrate.

The analysis of statistical indicators for CIBDAI (engl. canine inflammatory bowel disease activity index) and CCECAI (engl. canine chronic enteropathy clinical activity index) within the group of dogs affected by LPD, determined a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) between the mean values for CIBDAI and CCECAI in dogs with mixed infiltrate and the average values for dogs with a mainly plasmocytic infiltration. The average value for the CIBDAI CCECAI in dogs with a mixed infiltrate was

statistically highly significant ( $p \leq 0.01$ ) compared to the average value for CIBDAI and CCECAI in dogs with a predominantly lymphocytic infiltrate.

**Key words:** dog, endoscopy, lymphocytic - plasmacytic duodenitis (LPD)

**Scientific field:** Veterinary medicine

**Field of academic expertise:** Clinical diagnostics, pathology and therapy of animals

**UDK number:** 636.7:616

## Spisak skraćenica koje su korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji:

<b>Ag</b>	antigen
<b>ALT</b>	alanin transaminaza
<b>AP</b>	alkalna fosfataza
<b>APC</b>	antigen prezentujuće ćelije
<b>AST</b>	aspartat aminotransferaza
<b>At</b>	antitelo
<b>CCECAI</b>	engl. canine chronic enteropathy clinical activity index
<b>CCL25</b>	engl. C-chemokine ligand 25
<b>CCR9</b>	engl. C-chemokine receptor 9
<b>CD25</b>	marker
<b>CIBD</b>	engl. cryptogenic inflammatory bowel disease
<b>CIBD</b>	engl. cryptogenic inflammatory bowel disease“
<b>CIBDAI</b>	engl. canine inflammatory bowel disease activity index
<b>EGE</b>	eozinofilni gastroenteritis
<b>ENS</b>	enterički nervni system
<b>FAE</b>	engl. follicle associated epithelium
<b>Fc</b>	engl. fragment crystalline
<b>GALT</b>	engl. gut - associated lymphoid tissue (crevu pridruženo limfno tkivo)
<b>GALT</b>	engl. gut associated lymphoid tissue
<b>GI</b>	gastrointestinalni

<b>HE</b>	hematoksilin-eozin
<b>HEV</b>	engl. high endothelial vessels
<b>HUC</b>	histiocitni ulcerativni colitis
<b>i.v.</b>	intravenska
<b>IBC</b>	inflamatorna boleest creva
<b>IBD</b>	engl. inflammatory bowel disease
<b>IEL</b>	intraepitelni limfociti
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>IgA</b>	imunoglobulin A
<b>IgM, IgG, IgE</b>	imunoglobulini
<b>IL</b>	interleukin
<b>iTreg</b>	indukovane Treg (regulatorne T ćelije)
<b>LL</b>	latero – lateralna projekcija
<b><i>lnn.</i></b>	<i>lymphonodi</i>
<b>LPD</b>	limfocitno – plazmocitni duodenitis
<b>LPE</b>	limfocitno-plazmocitni enteritis
<b>LPL</b>	<i>lamina propria</i> limfociti
<b>LPM</b>	lamina proprija mukoze ( <i>lamina propria mucosae</i> )
<b>LSAB2</b>	streptavidin-biotin imunohistohemijska metoda
<b>MAdCAM – 1</b>	engl. mucosal addressin cell-adhesion molecule – 1
<b>MALT</b>	engl. mucosa - associated lymphoid tissue (mukozi pridruženo limfno tkivo)
<b>MHC</b>	engl. major histocompatibility complex

<b>MLN</b>	engl. mesenterial lymph nodes (mezenterijalni limfni čvorovi)
<b>N.A.V.</b>	<i>nomina anatomica veterinaria</i>
<b>nTreg</b>	postojeće (natural) Treg (regulatorne T ćelije)
<b>PAMP</b>	engl. pathogen associated molecular patterns
<b>pIgR</b>	polimerni imunoglobulinski receptor
<b>PLE</b>	engl. protein losing enteropathy
<b>PP</b>	Pejerove ploče ( <i>noduli lymphatici aggregati</i> )
<b>ROS</b>	engl. reactive oxygen species
<b>SC</b>	sekretorna komponenta
<b>SigA</b>	sekretorni IgA
<b>TCR</b>	engl. T-cell receptor
<b>TGFβ</b>	engl. tumor growth factor β
<b>Th3</b>	regulatorne T ćelije
<b>TLR</b>	engl. toll like receptors
<b>Tr1</b>	regulatorne T ćelije
<b>VD</b>	ventro – dorzalna projekcija
<b>WSAVA</b>	engl. World Small Animal Veterinary association

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Morfološko-fiziološke osobnosti duodenuma pasa	4
2.2. Imunološki sistem mukoze creva	12
2.3. Inflamatorne bolesti creva pasa	21
3. CILJ I ZADACI	42
4. MATERIJAL I METODE	43
4.1. Materijal	43
4.2. Metode	43
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	51
5.1. Klinički nalaz	51
5.2. Hematološki nalaz	55
5.3. Biohemijski nalaz	57
5.4. Koprološki nalaz	61
5.5. Ultrazvučni nalaz	62
5.5.1. Kontrolna grupa	62
5.5.2. Oboleli psi	62
5.6. Radiološki nalaz	64
5.6.1. Kontrolna grupa	64
5.6.2. Oboleli psi	64

5.7. Endoskopski nalaz	65
5.7.1. Kontrolna grupa	65
5.7.2. Oboleli psi	65
5.8. Patohistološki nalaz	67
5.8.1. Kontrolna grupa	67
5.8.2. Oboleli psi	67
5.9. Imunohistohemijski nalaz	72
5.9.1. Kontrolna grupa	72
5.9.2. Oboleli psi	73
5.10. Odnos hematoloških i biohemijskih parametara između obolelih pasa i kontrolne grupe pasa	74
5.11. Odnos pojedinih hematoloških i biohemijskih parametara i tipa infiltrata kod pasa obolelih od LPD	85
5.12. Odnos indeksa CIBDAI i CCECAI pasa obolelih od različitih tipova duodenitisa: limfocitno - plazmocitnog duodenitisa, eozinofilnog duodenitisa i kataralnog duodenitisa	93
5.13. Odnos indeksa CIBDAI i CCECAI i tipa infiltrata pasa obolelih od LPD	97
6. DISKUSIJA	101
7. ZAKLJUČCI	110
8. LITERATURA	112

## 1. UVOD

Hronične enteropatije čine više od polovine svih digestivnih poremećaja kod pasa. Inflammatory bowel disease – IBC (engl. inflammatory bowel disease - IBD) pasa je zajednički naziv za niz hroničnih enteropatija koje se primarno odlikuju zapaljenjem sluznice gastrointestinalnog sistema i nespecifičnim simptomima.

Limfocitno – plazmocitni duodenitis (LPD) pasa je oblik inflamatorne bolesti duodenuma. LPD predstavlja enteropatiju hroničnog toka i praćen je nespecifičnim kliničkim simptomima, od kojih su najvažniji dijareja i povraćanje. Najvažnija morfološka karakteristika imunološkog odgovora, u ovom tipu inflamatorne bolesti creva, je nalaz mononuklearnog infiltrata u sluznici duodenuma. Klasifikacija IBC-a, izvršena je upravo na osnovu dominantne populacije ćelija u infiltratu zida creva, kao i na osnovu mesta gde se infiltracija odigrala. U infiltratu se mogu naći limfociti, plazma ćelije, eozinofilni granulociti, makrofagi, a ređe neutrofilni granulociti. Vrlo je čest i mešoviti infiltrat kada su ćelijske populacije izmešane i preklapaju se u različitim kombinacijama. Limfocitno-plazmocitni enteritis je najčešći oblik IBC tankih creva pasa.

Inflammatory bowel disease je dobro poznata i kod ljudi. Važno je navesti da skraćenica CIBD (engl. cryptogenic inflammatory bowel disease) kod ljudi objedinjuje dva oboljenja i to su ulcerativni kolitis i Kronova bolest, a koje pokazuju izvesne sličnosti sa određenim oblicima IBC pasa.

Patogeneza IBC je vrlo kompleksna (Whitley i sar., 2010). Ona je primer izmenjenog imunološkog odgovora na velikoj mukoznoj površini gde egzogeni antigeni (iz lumena creva) imaju značaja u nastanku bolesti i održavanju tako promenjenog stanja (Whitley i sar., 2010). Mehanizmi koji stoje u pozadini nastanka IBC pasa nisu još uvek razjašnjeni (Allenspach, 2003). Iako uzrok nastanka IBC kod životinja i ljudi nije jasan, i histološki i klinički podaci ukazuju na imunološku podlogu razvoja bolesti (German i sar., 2008). Umešanost imunoloških mehanizama u nastanak bolesti potvrđuje povećan broj ćelija zapaljenja u gastrointestinalnoj mukози kod pacijenata obolelih od IBC, zatim uspeh tradicionalne terapije IBC-a koja podrazumeva posebnu ishranu u kojoj su zastupljeni



„novi“ proteini koji ranije nisu korišćeni u ishrani (engl. novel proteins) kao i upotreba lekova za koje se zna da menjaju imunološki odgovor (napr. kortikosteroidi, azatiopirin, sulfasalazin). Ove činjenice ipak nisu dovoljne da se IBC svrsta u primarno imunološka obolenja (Jergens i sar., 1996).

U pogledu etiopatogeneze IBC, u literaturi se iznose dve osnovne hipoteze. Prema prvoj hipotezi, inflamacija u crevima nastaje kao posledica poremećenog imunološkog odgovora. Poremećen imunološki odgovor može biti posledica defektne supresorske funkcije GALT-a (engl. gut associated lymphoid tissue) ili, pak, poremećeni imunološki odgovor može predstavljati primarno imunološki poremećaj. Druga hipoteza podrazumeva da inflamacija započinje kao posledica imunološkog odgovora, ali na antigene na koje ne bi trebao da se razvija imunološki odgovor, tj. na normalne sastojke lumena creva (antigeni hrane ili rezidentna crevna flora). U svakom slučaju, i ćelijska komponenta (aktivirani intestinalni T i B limfociti, plazma ćelije, dendritske ćelije, makrofagi) i molekulski elementi (sistem komplementa, prostaglandini, leukotrijeni, proinflamatorni citokini, interleukini, proteaze, azot oksid, slobodni kiseonikovi radikali) učestvuju skupa u nastanku i održavanju zapaljenja mukoze (Jergens, 2008).

Klinički simptomi reflektuju lokalizaciju oštećenja tkiva (Jergens i sar., 1996). Nakon dobro obavljenog kliničkog pregleda i detaljne anamneze, može se pretpostaviti moguće mesto inflamacije. Prikupljanje preciznih podataka, uzimanje sveobuhvatne anamneze i vršenje detaljnog kliničkog pregleda pasa je od neprocenjivog značaja za pravilno postavljanje dijagnoze (Gaschen i sar., 2011). Klinički simptomi IBC se pripisuju ćelijskom infiltratu i medijatorima inflamacije (The WSAVA International Standardization Group, 2010). Klinički simptomi su direktna posledica gastrointestinalnog zapaljenja i njegovog uticaja na gastrointestinalnu permeabilnost, motilitet, apsorpciju hranljivih sastojaka i na centar za povraćanje (Jergens i sar., 1996). Klinički znaci vezani za IBC nisu specifični. Imaju cikličan karakter, ređe progresivan klinički tok. Najčešći simptomi uključuju hroničnu ili rekurentnu dijareju, povraćanje, gubitak težine i promenu apetita (Gaschen i sar., 2011; Kobayashi i sar., 2007; Lecoindre i sar., 2006; Jergens, 2004; Craven i sar., 2004; Jergens i sar., 1996).

Definitivna dijagnoza IBC zahteva mikroskopski pregled uzoraka sluznice gastrointestinalnog sistema koji su dobijeni biopsijom. Izvođenje biopsije mukoze je zapravo, jedini dijagnostički postupak kojim se može obezbediti uzorak tkiva potreban za sigurno postavljanje dijagnoze IBC i za pružanje informacija za prognozu kao i za individualizaciju terapije. Endoskopija je metoda izbora pošto je minimalno invazivna, nije skupa, a i brza je. Uz to, ovom metodom je moguće dobiti veći broj uzoraka koji se mogu koristiti za citološka i histološka ispitivanja kao i za imunohistoheмиjske analize.

Ipak, do danas, etiopatogeneza ove bolesti pasa nije u svemu poznata, a nisu poznate ni sve imunofenotipske karakteristike ćelija u infiltratu, koje bi bile značajne za razumevanje etiopatogeneze. Bliže definisanje ćelijskih populacija sa morfološkog i imunofenotipskog aspekta, doprineće boljem razumevanju patogeneze limfocitno – plazmocitnog duodenitisa pasa, što će u korelaciji sa kliničkim nalazom omogućiti postavljanje precizne dijagnoze i primenu adekvatne terapije. Stoga su ispitivanja u ovoj disertaciji bila usmerena u tom pravcu.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. MORFOLOŠKO - FIZIOLOŠKE OSOBENOSTI DUODENUMA PASA

Digestivni sistem psa (*apparatus digestorius s. systema digestorium*) se sastoji od digestivnog tubusa i pomoćnih organa (Evans, 1993; Miller, 1964). Prema Konigu i saradnicima (2009) delovi digestivnog tubusa su: usna duplja (*cavum oris*), ždrelo (*pharynx*), jednjak (*esophagus s. oesophagus*), želudac (*ventriculus s. gaster*), tanko crevo (*intestinum tenue*), debelo crevo (*intestinum crassum*) i analni kanal (*canalis analis*). Deo digestivnog tubusa kaudalno od ždrela, uključujući sve strukture od jednjaka do rectuma i analnog kanala predstavlja *canalis alimentarius*, tj. alimentarni kanal (Konig i sar., 2009; Evans, 1993). Isti autori navode da u pomoćne organe sistema za varenje spadaju: zubi (*dentes*), jezik (*lingua*), pljuvačne žlezde (*glandulae salivales*), jetra (*hepar*), žučna kesica (*vesica fellea*), gušterača (*pancreas*), a po Evansu (1993) i analna kesica (*sinus paranalis*).

Tanko crevo psa (*intestinum tenue*) se proteže od pilorusa želuca do ušća ileuma u debelo crevo koje se označava kao *ostium ileale* (N.A.V., 2005) *seu ostium ileocolicum*. Tanko crevo predstavlja najduži deo alimentarnog kanala. Dužina creva varira kod različitih rasa i individua u okviru iste rase. Vrlo je teško odrediti dužinu creva živih životinja. Post mortem, kada nema peristaltičkih kontrakcija, dužina creva se povećava. Kao rezultat gastrointestinalne adaptacije na određenu vrstu hrane i navike hranjenja, može se reći da je dužina creva mesojeda manja u odnosu na dužinu creva herbivora. Generalno, kod pasa je dužina creva pet puta veća od dužine tela, dok je kod herbivora taj odnos 25:1 (Konig i sar., 2009). Prema Evansu (1993), dužina creva živog psa je 3,5 puta veća od dužine njegovog tela. Zapremina creva psa iznosi oko 37% od ukupne zapremine digestivnog sistema (Evans, 1993; Banks, 1986). Duodenum psa je dugačak od 20 cm do 60 cm, zavisno od veličine životinje (Simić i Janković, 1997).

Anatomi dele tanko crevo na tri dela: *duodenum*, *jejunum* i *ileum* (Konig i sar., 2009; Budras i sar., 2002; Simić i Janković, 1997; Ellenberger i sar., 1977). Autori navode da je duodenum relativno kratak (u psa teškog 20 kg dužina duodenuma grubo iznosi oko

25 cm), jejunum je najduži (blizu 90% dužine tankog creva), a ileum najkraći, tj. predstavlja samo kratak završni deo tankog creva psa. Iako precizne granice između ova tri segmenta ne mogu da se opserviraju ni makroskopski, a ni mikroskopski, histološke razlike između duodenuma, jejunuma i ileuma ipak postoje.

Duodenum (*duodenum*) počinje od pilorusa (*pylorus*) te se pruža od želuca ka desnom trbušnom zidu po visceralnoj površini jetre. Ovaj početni, gornji deo naziva se *pars cranialis duodeni*. On je dorzalno i lateralno u kontaktu sa jetrom, a medijalno sa pankreasom. U visini devetog međurebarnog prostora, duodenum obrazuje prvu krivinu (*flexura duodeni cranialis s. prima*), zatim savija kaudalno i dodirujući parijetalni peritoneum (*peritoneum parietale*) desnog trbušnog zida, nešto ventralnije od desnog bubrega, pruža se kao njegov nishodni deo, označen kao *pars descendens duodeni*. Njegova lateralna površina je u kontaktu sa parijetalnim peritoneumom kao i sa desnim lateralnim i desnim medijalnim lobusom jetre. Dorzalno je u kontaktu sa pankreasom. Medijalno je u vezi sa slepim crevom (*cecum s. caecum*) i ascendentnim kolonom (*colon ascendens*), a od kojih je odvojen velikim omentumom (*omentum majus*). U predelu šestog slabinskog pršljena, duodenum ponovo savija i to ulevo obrazujući drugu krivinu (*flexura duodeni caudalis s. secunda*), pružajući se transverzalno u levu polovinu trbušne duplje. *Flexura duodeni caudalis* leži u horizontalnoj ravni. Od ove krivine duodenum ide ushodno, tj. nastavlja put kranijalno ka jetri i želucu gradeći *pars ascendens duodeni*. Ascendentni deo duodenuma se nastavlja u jejunum, čineći pri tome krivinu nazvanu - *flexura duodenojejunalis*. Kranijalna ivica nabora, tj. veze – *plica duodenocolica s. lig. duodenocolicum* označava prelaz duodenuma u jejunum (N.A.V., 2005; Simić i Janković, 1997; Evans, 1993).

U descendentnom delu duodenuma uočavaju se dva ispuččenja, a to su velika i mala duodenalna papila. Velika duodenalna papila (*papilla duodeni major*) nalazi se 2,6 - 6 cm kaudalno od pilorusa, a preko nje se u *pars descendens* zajedno otvaraju dva kanala, i to: žučovod (*ductus choledochus*) koji dovodi žuč iz jetre i žučne kese, i glavni izvodni kanal pankreasa (*ductus pancreaticus*). Mala duodenalna papila (*papilla duodeni minor*) nalazi se nekoliko santimetara kaudalno od *papillae duodeni major*, i tu se otvara akcesorni kanal pankreasa - *ductus pancreaticus accessorius* (Budras i sar., 2002; Ellenberger i sar., 1977).

Duodenum je pričvršćen za dorzalni trbušni zid pomoću duplikature peritoneuma, u kojoj se nalaze krvni sudovi, nervi, limfni sudovi, limfni čvorovi i masno tkivo (Ellenberger i sar., 1977). Deo duplikature peritoneuma na kojoj visi duodenum označava se kao *mesoduodenum* (Evans, 1993). Duodenum je odgovarajućim ligamentima povezan sa organima i to sa jetrom, želucem i nishodnim delom kolona (Simić i Janković, 1997). U veze duodenuma se ubrajaju: *ligamentum hepatoduodenale*, *ligamentum gastroduodenale* i *plica duodenocolica* s. *ligamentum duodenocolicum*. Kroz *ligamentum hepatoduodenale* prolazi *ductus choledochus*, *vena portae* i *arteria hepatica* (Konig i sar., 2009).

Osnovne histološke karakteristike duodenuma su u osnovi zajedničke za sve delove alimentarnog kanala (Trpinac, 1994). Alimentarni kanal predstavlja cev sa centralnom šupljinom označenom kao lumen. Zid digestivne cevi se sastoji od četiri osnovna sloja (Junqueira i sar., 1998; Stojić, 1996; Trpinac, 1994; Banks, 1986). Ovi slojevi, od lumena ka periferiji, imaju sledeći raspored: sluznica (*tunica mucosa*), podsluznica (*tela submucosa*), mišićni sloj (*tunica muscularis*) i seroza (*tunica serosa*).

Sluznicu duodenuma grade tri lamine. *Lamina epithelialis mucosae* je predstavljena epitelom na bazalnoj membrani, *lamina propria mucosae* je sačinjena od rastresitog vezivnog tkiva, a *lamina muscularis mucosae* je izgrađena od glatkih mišićnih ćelija.

*Lamina epithelialis mucosae* sastoji se od više vrsta cilindričnih ćelija poređanih u jednom redu. To su: enterociti ili apsorbivne ćelije, peharaste ćelije koje luče sluz (mukus), Panetove ćelije koje sekretornom aktivnošću i sposobnošću fagocitoze učestvuju u regulaciji crevne bakterijske flore, M ćelije koje predstavljaju specijalizovane epitelne ćelije, a nalaze se iznad limfnih folikula i Pejerovih ploča, endokrine ćelije i matične ćelije čijom deobom nastaju ostale ćelije epitela (Junqueira i sar., 1998; Trpinac, 1994).

*Lamina propria mucosae* se odlikuje bogatom mrežom krvnih i limfnih sudova, kao i difuznim limfatičnim tkivom. U ovom sloju sluznice su smešteni i limfni čvorovi, tj. folikuli koji mogu biti pojedinačni (*noduli lymphatici solitarii*) i udruženi (*noduli lymphatici aggregati*). Udruženi limfni čvorovi u sluznici creva obrazuju Pejerove ploče – PP (Evans, 1993; Junqueira i sar., 1998; Stojić, 1996; Trpinac, 1994).

*Lamina muscularis mucosae* je sloj sluznice koji je tri puta deblji kod psa nego kod ostalih domaćih životinja. Predstavljen je sa dva sloja: unutrašnjim - cirkularnim i spoljašnjim - longitudinalnim mišićnim slojem (Evans, 1993).

Na sluznici duodenuma postoje strukturne tvorevine koje povećavaju ukupnu površinu mukoze (Junqueira i sar., 1998; Trpinac, 1994; Pantić, 1987). Za razliku od ostalih sisara, psi nemaju makroskopski uočljive kružne, prstenaste nabore - *plicae circulares* (Evans, 1993). Mikroskopski se uočavaju prstasti izvrati mukoze, tj. crevne resice (*villi intestinales*) i uvrati mukoze - Liberkinijeve kripte (neodgovarajući, ali opšte prihvaćen naziv) odnosno *glandulae intestinales*, tj. intestinalne žlezde (Junqueira i sar., 1998; Trpinac, 1994). Smatra se da pas ima oko 4 miliona crevnih resica na 1 cm<sup>2</sup> površine duodenuma (Evans, 1993), a od 600 do 3000 resica na svakoj ćeliji (Stevanović, 2004; Trpinac, 1994).

Crevne resice daju somotast izgled površini sluzokože tankog creva. Svaka resica ima svoju arteriolu koja se grana u kapilarnu mrežu na slobodnom kraju resice. Drenaža se vrši venulama na bazi resice. Svaka resica ima i svoje limfne kapilare, lakteale, kao i glatke mišiće koji omogućavaju njenu kontrakciju (Junqueira i sar., 1998).

Podsluznica (*tela submucosa*), sastoji se iz rastresitog vezivnog tkiva koje labavo povezuje sluznicu za mišićni sloj crevnog zida pa, stoga, pri kontrakciji mišićnog sloja crevnog zida sluznica obrazuje mnogobrojne nabore. Vezivno tkivo je dobro vaskularizovano i sadrži brojne limfne sudove. U podsluznici zida, kako duodenuma tako i ostalih delova tankog creva (jejunum i ileum), nalazi se Meissner-ov submukozni nervni splet.

U vezivnom tkivu sluznice i podsluznice duodenuma se nalaze i klupčaste, tubulo-alveolarne duodenalne žlezde - *glandulae duodenales*, koje se razlikuju od intestinalnih žlezda pošto liče na pilorusne žlezde želuca. *Glandulae duodenales* se nalaze samo u delu duodenuma koji je u blizini pilorusa (Evans, 1993; Banks, 1986). Te tubularne žlezde se otvaraju u Liberkinijeve kripte. Žlezdane ćelije su mukoznog tipa i učestvuju u stvaranju crevnog soka. Produkt njihove sekrecije je alkalni i služi da štiti mukoznu membranu od kiselog želudačnog soka i da omogući optimalan pH za delovanje pankreasnih enzima (Stevanović, 2004).

Mišićni sloj (*tunica muscularis*), sastoji se od spoljašnjeg, tankog, uzdužnog sloja (*stratum longitudinale*) i unutrašnjeg, jačeg, kružnog sloja (*stratum circulare*) glatkih mišićnih vlakana. Između ova dva sloja nalazi se tanak sloj vezivnog tkiva i Auerbach-ov mienterični nervni splet (Junqueira i sar., 1998, Trpinac, 1994).

Seroza (*tunica serosa*) predstavlja visceralni list peritoneuma (*peritoneum viscerale*) čije su glavne karakteristike da je sjajan, gladak, vlažan, elastičan i providan (Sisson, 1953).

Vaskularizacija duodenuma psa ima svoje osobenosti. Deo aorte koji leži u trbušnoj duplji je *aorta abdominalis*. Dve njene grane koje dovode krv u tanko crevo su *arteria celiaca s. coeliaca* i *arteria mesenterica cranialis* (Janković i sar., 1996).

*Arteria celiaca* je neparan krvni sud koji se odvaja od ventralne strane trbušne aorte u predelu prvog lumbalnog pršljenja. Kod psa ona ima tri grane (od kojih samo jedna grana dovodi krv u duodenum), a to su: *arteria gastrica sinistra*, *arteria lienalis* i *arteria hepatica*. Završni deo *arteriae hepaticae* je *arteria gastroduodenalis* koja se pruža do kranijalnog dela duodenuma gde se deli na dve grane, a to su: *arteria gastroepiploica dextra* i *arteria pancreaticoduodenalis cranialis*. Ova poslednja se pruža kroz mezoduodenum uz *pars cranialis* i *pars descendens duodeni* i daje grane za duodenum - *rami duodinales* (Janković i sar., 1996). U predelu kaudalne krivine duodenuma (*flexura duodeni caudalis*) ona se anastomozira sa kaudalnom pankreatikoduodenalnom arterijom (*arteria pancreaticoduodenalis caudalis*), granom *arteriae mesentericae cranialis*.

*Arteria mesenterica cranialis* kao najveća visceralna grana aorte odvaja se, takodje, od ventralnog zida trbušne aorte, ali kaudalno od mesta nastanka *arteriae celiacae*, tj. u predelu drugog lumbalnog pršljenja. Kranijalna mezenterična arterija služi kao osovina oko koje rotiraju tanko i debelo crevo tokom embrionalnog razvoja. Labavo je vezana za duodenum sa desne strane i kaudalno. Ona se grana u mezenterijumu i dovodi krv u sve delove tankog creva izuzev kranijalnog dela duodenuma. Jedna od njenih grana je *arteria pancreaticoduodenalis caudalis* koja se od mesta nastanka pruža udesno kroz mezoduodenum do *pars descendens duodeni*. U blizini *flexurae duodeni caudalis* ona se anastomozira sa kranijalnom pankreatikoduodenalnom arterijom (*arteria pancreaticoduodenalis cranialis*), granom *arteriae celiacae*. Kaudalna

pankreatikoduodenalna arterija dovodi krv u kaudalni deo duodenuma granama - *rami duodenales*.

Vene tankog creva se sve ulivaju u portnu venu (*vena portae*), a venska krv portnom venom odlazi u jetru (Janković i sar., 1996).

Limfotok trbušnog zida i trbušnih organa se karakteriše prisustvom četiri limfna centra (*lymphocentrum*). To su: slabinski (*lymphocentrum lumbale*), celijačni (*lymphocentrum celiacum*), kranijalni mezenterični (*lymphocentrum mesentericum craniale*) i kaudalni mezenterični (*lymphocentrum mesentericum caudale*) limfni centar (N.A.V. 2005; Janković i sar., 1996).

U poređenju sa drugim životinjama, pas ima malo limfnih čvorova (*lymphonodi* – *lnn.*) trušnih organa (Budras i sar., 2002). U limfne čvorove trušnih organa pasa se ubrajaju: *lnn. lumbales aortici*, *lnn. hepatici*, *lnn. lienales*, *ln. gastricus*, *lnn. pancreaticoduodenales*, *lnn. jejunales*, *lnn. colici* i *lnn. mesenterici caudales*.

*Lnn. lumbales aortici* pripadaju slabinskom limfnom centru (*lymphocentrum lumbale*). *Lnn. hepatici*, *lnn. lienales*, *ln. gastricus* i *lnn. pancreaticoduodenales* Budras i saradnici (2002) svrstavaju u celijačni limfni centar (*lymphocentrum celiacum*), dok Ellenberger i saradnici (1977) *lnn. duodenales* svrstavaju u kranijalni mezenterični limfni centar (*lymphocentrum mesentericum craniale*). U N.A.V. (2005), *lnn. duodenales* i *lnn. omentales* kod pasa su označeni kao *lnn. pancreaticoduodenales*, nalaze se između zida creva i pankreasa i pripadaju celijačnom limfnom centru (*lymphocentrum celiacum*). *Lnn. colici* i *lnn. jejunales* pripadaju kranijalnom mezenteričnom limfnom centru dok *lnn. mesenterici caudales* pripadaju kaudalnom mezenteričnom limfnom centru.

Aferentni limfni sudovi koji nose limfu iz duodenuma ulivaju se u *lnn. hepatici* i u *lnn. duodenales* odnosno *lnn. pancreaticoduodenales*. U hepatične limfne čvorove (*lnn. hepatici*) stiže i limfa iz želuca, pankreasa i jetre, a obično ih ima dva, levi i desni. *Lnn. duodenales* odnosno *lnn. pancreaticoduodenales* leže između početnog dela duodenuma i desnog dela pankreasa, a može ih biti jedan ili dva (Budras i sar., 2002; Evans, 1993).

Eferentni limfni sudovi iz *lymphocentrum celiacum* i *lymphocentrum mesentericum craniale* grade mrežu *vasa efferentia* od koje nastaje *truncus visceralis*. Njime limfa otiče iz trbušnih organa u proširenje nazvano *cisterna chyli* pa dalje u *ductus thoracicus* koji



predstavlja glavni limfovod. Limfa iz *lymphocentrum mesentericum caudale* otiče jednim delom preko *truncus visceralis-a*, a drugim delom preko *truncus lumbalis-a* u *cisterna-u chyli*. *Ductus thoracicus*, kao najveći limfni sud tela, uliva se u kranijalnu šuplju venu - *vena cava cranialis* (Janković i sar., 1996; Miller i sar., 1969).

Nervna kontrola funkcije duodenuma odvija se kao spoljašnja i unutrašnja (Stevanović, 2004). Nervni, kao i humoralni mehanizmi, samo menjaju, smanjuju ili pojačavaju, postojeću spontanu kontraktilnost tankog creva. Naime, crevo ima sopstveni automatizam. Postoje specijalizovane pejsmejkerske ćelije koje spontano stvaraju akcione potencijale za motornu aktivnost digestivnog sistema. To su Kajalove ćelije koje pripadaju enteričkom nervnom sistemu (ENS) kao i glatkomišićne ćelije u zidu creva (Stevanović, 2004). U njima nastaju spori talasi (hipopolarizacije) koji kada dostignu jačinu praga prerastaju u akcione potencijale. Zato kažemo da crevo ima sopstveni automatizam. Frekvencija akcionih potencijala varira u različitim delovima digestivnog trakta. U duodenumu ih ima do 12 u minuti (Stevanović, 2004).

Spoljašnja nervna kontrola duodenuma se ostvaruje posredstvom vegetativnog nervnog sistema, simpatikusa i parasimpatikusa. Parasimpatikusna vlakna potiču od *nervus vagus-a*. Simpatikusna nervna vlakna potiču od *nn. splanhnici* i to iz celijačnog i kranijalnog mezenteričnog gangliona - *ganglion celiacum* i *ganglion mesentericum craniale* (Konig i sar., 2009).

Unutrašnja nervna kontrola se ostvaruje posredstvom enteričkog nervnog sistema (ENS). U duodenumu postoje intramuralne grupe neurona ozančene kao mienterični Auerbahov splet (*plexus myentericus Auerbachii*) i kao submukozni Majsnerov splet (*plexus submucosus Meissneri*). Oba pleksusa su povezana sa prevertebralnim ganglijama abdominalne duplje mrežom subseroznih nervnih vlakana. Ovi pleksusi su pod kontrolom simpatikusnog i parasimpatikusnog sistema, ali su odgovorni i za spontanu mišićnu i sekretornu aktivnost. Auerbahov splet je postavljen između longitudinalnog i cirkularnog mišićnog sloja (Stojić, 1996) i on koordinira kontrakcije creva jer programira peristaltiku, pokrete mešanja i fiziološki ileus. Majsnerov splet je smešten u vezivnom tkivu submukoze (Stojić, 1996). Neuronima ovog pleksusa inervišu kripte i crevne resice te tako kontrolišu endokrinu i sekretornu aktivnost digestivnog trakta, lokalni protok krvi, a podstiču i

nabiranje crevne sluznice. Majsnerov pleksus ima i receptorsku ulogu jer primljene informacije sa receptora šalje u Auerbahov pleksus.

Nervni i humoralni faktori samo prilagođavaju spontanu aktivnost trenutnim potrebama. Glavni stimulus za pokretanje motorne aktivnosti celog glatkomišićnog dela digestivnog trakta je istezanje zida creva (Stevanović, 2004).

Parasimpatikusna stimulacija i određeni hormoni (holecistokinin, gastrin, histamin, insulin, motilin itd.) pojačavaju motornu aktivnost, dok simpatikusna stimulacija i pojedini hormoni (adrenalin, noradrenalin, sekretin, glucagon itd.) smanjuju ekscitabilnost glatkomišićnih ćelija.

Osnovne funkcije tankog creva te i duodenuma kao njegovog sastavnog dela su varenje hrane, apsorpcija hranljivih materija kao i sekrecija crevnog soka. Mesojedima je tanko crevo glavni organ za razgradnju i apsorpciju hranljivih materija.

Varenje hrane kod psa se najvećim delom odvija u tankom crevu te u debelo crevo prelazi samo mali deo nesvarene hrane. U duodenum dospeva sadržaj iz želuca koji je u polutečnom, rastvorenom i delom razgrađenom obliku (himus). Uz pomoć brojnih enzima pankreasnog i crevnog soka i aktivnih materija iz žuči, u duodenumu se nastavlja proces varenja hrane koji je započet u želucu. Himus u malim porcijama iz želuca ulazi kroz pilorus u početni deo tankog creva, tj. duodenum, gde podleže temeljnoj mehaničkoj i hemijskoj obradi. To je moguće zato što tanko crevo psa ima dobru motoričku aktivnost, a u duodenum se ulivaju žuč i pankreasni sok čiji enzimi zajedno sa enzimima iz crevnog soka omogućavaju veoma intenzivnu hidrolizu hranljivih materija.

Crevni sok nastaje sekretornom aktivnošću duodenuma (kao i ostalog dela tankog creva). Crevni sok luče ćelije Brunerovih (*glandulae duodenales*) i Liberkinijevih (*glandulae intestinales*) žlezda (Stojić, 1996).

Resorpcija koja se obavlja u duodenumu je vrlo intenzivna. Razlozi za takav intenzitet resorpcije su višestruki. Najvažniji su velika apsorptivna površina zbog crevnih resica na sluznici i mikroresica na enterocitima, kao i odlična prokrvljenost crevnih resica kroz koje teče 60 - 70% ukupne krvi tankog creva (Stevanović, 2004). Preko 90% resorptivnih oblika hranljivih materija (voda, mineralne materije, monosaharidi, disaharidi, aminokiseline, dipeptidi i tripeptidi, nukleozidi, slobodne masne kiseline, glicerol,

monogliceridi, holesterol, fosfolipidi i vitamini) resorbuje se tokom prolaska kroz tanko crevo, potom resorptivni oblici hranljivih materija prelaze iz enterocita u portni krvotok, a preko međućelijske tečnosti u limfotok.

## **2.2. IMUNOLOŠKI SISTEM MUKOZE CREVA**

Primarne funkcije gastrointestinalnog sistema su digestija i apsorpcija hranljivih materija. Osim navedenih funkcija, gastrointestinalni sistem, predstavlja i najveći imunološki organ u telu, sa funkcijom barijere i odbrane od potencijalnih patogena, kao i istovremene tolerancije prema bezopasnim agensima i sastojcima hrane (Untersmayr i sar., 2006). Delikatna homeostaza između imunoloških reakcija i indukcije tolerancije na bezopasne agense i nutritivne komponente je ključna za pravilno funkcionisanje digestivnog sistema (Untersmayr i sar., 2006).

Da bi poboljšao efikasnost, digestivni sistem se razvijao u pravcu povećanja svoje površine. Površina gastrointestinalnog sistema čoveka je oko 200 puta veća od površine cele kože i iznosi 400 m<sup>2</sup> (Untersmayr i sar., 2006; Roitt i sar., 2001). Pošto je tako velika površina u stalnom kontaktu sa antigenima spoljašnje sredine, neophodna je dobra imunološka zaštita unutar ovog sistema. Tu se nalaze brojne resice i kripte creva obložene mukusom koji štiti crevne ćelije, zatim u dnu kripte leže specijalizovane Panetove ćelije sa sposobnošću otpuštanja antimikrobnih supstanci u lumen creva, intestinalna flora (uglavnom prisutna u kolonu) stvara prirodnu barijeru za patogene dok su brojne ćelije imunološkog sistema smeštene u mukozi creva.

Visoko specijalizovani imunološki sistem mukoza štiti mukozne površine. GALT (engl. gut - associated lymphoid tissue, ili crevu pridruženo limfno tkivo) koji čini sastavnu komponentu MALT-a (engl. mucosa - associated lymphoid tissue, ili mukozi pridruženo limfno tkivo), predstavlja najveći rezervoar imunoloških ćelija u telu.

Imunološki sistem mukoze creva u mnogo čemu se razlikuje od sistemskog imunološkog sistema. Smatra se da ova razlika reflektuje različite izazove sa kojima se sreće svaki sistem ponaosob. Mukoza creva je direktno izložena antigenima iz hrane,

virusima, različitim bakterijama i slično. Količina antigena kojima je mukoza izložena tokom jednog dana je veća nego ona kojoj je sistemski imunitet izložen tokom celog života (Mayer, 2003).

Imunološki sistem mukoze creva rađe suprimira imunološki odgovor nego što ga aktivira, koristeći više mehanizama da zaštiti domaćina od agresivnog imunološkog odgovora na sastojke iz lumena creva. To podrazumeva: pouzdanu fizičku barijeru, prisustvo enzima u lumenu creva koji menjaju prirodu samih antigena, prisustvo specifičnih regulatornih T ćelija, kako u difuznom, tako i u organizovanom limfnom tkivu creva, kao i produkciju antitela, i to najvećim delom sekretornog imunoglobulina A klase. Svi ovi mehanizmi daju imunosupresivni ton gastrointestinalnom imunološkom sistemu mukoza, a poremećaj na bilo kom nivou može dovesti do zapaljenja creva ili alergije na hranu (Mayer, 2003).

Mukozna barijera je kompleksna struktura sačinjena od ćelijske i nećelijske komponente (Nagler-Anderson, 2001). Peharaste ćelije neprekidno stvaraju mukusni sloj koji je debeo i pokriva susedni epitel. Partikule, bakterije i virusi, „uhvate“ se u sloj mukusa, te bivaju izbačeni u spoljašnju sredinu peristaltičkim pokretima creva. Ovaj sloj sprečava potencijalne patogene i antigene da prodru do epitelnih ćelija. Mukus predstavlja i rezervoar sekretornog imunoglobulina A (IgA) koji vezuje bakterije i viruse te tako sprečava njihov kontakt i vezivanje za epitel. Epitelne ćelije su međusobno spojene jakim vezama, kako apikalno tako i bazalno, te su paracelularni prostori, kao i ćelijska membrana, praktično nepropustljivi za makromolekule i peptide (Mayer, 2003). Samo joni mogu da cirkulišu. Tokom zapaljenja, međućelijske veze oslabe omogućavajući prolaz makromolekulima sve do *laminae propriae mucosae*. U takvoj situaciji može se javiti imunološka reakcija na sastojke hrane i na mikroorganizme iz lumena creva. Pretpostavlja se da povećana crevna propustljivost igra ulogu u nastanku i razvoju inflamatorne bolesti creva (Kobayashi i sar., 2007).

Prisustvo enzima u lumenu creva je možda najbitniji mehanizam kojim se sprečava ulazak antigena u GALT. Proteolitički enzimi u želucu i tankim crevima vrše svoju primarnu funkciju, tj. digestiju. Međutim, razlaganje velikih polipeptida na male dipeptide i tripeptide, zapravo, ispunjava još jedan zadatak, a to je stvaranje bezopasnih peptida od

potencijalno imunogenih proteina. Peptidi sa manje od 8 - 10 amino-kiselina u lancu su slabi imunogeni (Untersmayr i sar., 2006; Mayer, 2003; York i sar., 1999).

Regulatorne T ćelije (Treg) igraju neizmerno važnu ulogu u održavanju imunološke nereaktivnosti na sopstvene antigene i u suprimiranju prejakog imunološkog odgovora koji šteti domaćinu (Sakaguchi i sar., 2008). Regulatorne T ćelije su identifikovane i kod pasa i kod mačaka (Biller i sar., 2007). Tokom proteklih godina je definisano nekoliko vrsta regulatornih T ćelija, a sve su povezane sa imunološkim odgovorom na mukozi (Mayer, 2003). Treg ćelije se stvaraju ili u timusu kao funkcionalno zrela subpopulacija T ćelija, ili mogu nastati od naivnih CD4<sup>+</sup> pomoćničkih T limfocita, na periferiji, u MALT-u, za šta je neophodan uticaj interleukina - IL-10 i drugih inhibitornih citokina (Nandakumar i sar., 2009; Sakaguchi i sar., 2008). Osnovna podela regulatornih T ćelija je izvršena na osnovu načina njihovog nastanka, i to na već postojeće (natural) Treg – nTreg, i indukovane Treg - iTreg (Nandakumar i sar., 2009). Natural Treg su konstantno prisutne i sprečavaju aktivaciju potencijalno štetnih ili alergeni - reaktivnih T ćelija (O'Garra i sar., 2004). Ove ćelije luče IL-10 i eksprimiraju markere kao što su CD25 i Foxp3. U regulatorne T ćelije koje su od velikog značaja u imunološkom sistemu mukoze creva, spadaju Tr1 i Th3 ćelije. Glavna funkcija im je da suprimiraju imunološki odgovor u crevima, tj. da omogućе toleranciju na antigene iz hrane (Biology pages, 2011). Th3 nastaju u Pejerovim pločama i sekretuju TGFβ (engl. tumor growth factor β), imunosupresivni citokin. Interesantno je da je TGFβ faktor koji potencira zamenu klase u IgA, u B limfocitima. To vrlo pogoduje imunološkom odgovoru mukoze creva (Mayer, 2003).

Ciljane ćelije Treg ćelija, koje su za sada utvrđene, su APC (antigen prezentujuće ćelije) i efektorske T ćelije, a supresija se ostvaruje posredstvom IL-10, TGFβ, kontaktom, granzimima i perforinima (eBioscience, 2011). Najvažniji vid supresije je prema dendritskim APC, kojima Treg onemogućavaju da izvrše aktivaciju efektorskih T ćelija pošto blokiraju tzv. „drugi“ signal na dendritskim ćelijama (Biology pages, 2011).

Po definiciji, svaka T ćelija koja ima sposobnost da suprimira imunološki odgovor je regulatorna T ćelija (Nandakumar i sar., 2009). Može se onda zaključiti da i intraepitelni limfociti (IEL), spadaju u regulatorne ćelije, pošto su prema nekim autorima uključeni u oralnu toleranciju (Untersmayr i sar., 2006). Neki tipovi CD8<sup>+</sup>T ćelija, takođe, mogu biti

regulatorne ćelije pod određenim okolnostima (Rouse, 2007). Kao i Tr1, supresorne CD8+T ćelije funkcionišu stvaranjem IL-10 (Rouse, 2007).

Antitelo IgA igra glavnu ulogu u imunološkom odgovoru na mukoznim membranama. Svakodnevno, intestinalne plazma ćelije proizvode više antitela od svih ostalih limfnih organa zajedno (slezine, limfnih čvorova, kostne srži). IgA čini 70% svih antitela sisara (Macpherson i sar., 2008). Iako se se odavno zna za dominaciju IgA u crevima, fini detalji se i danas otkrivaju, a vezani su za migraciju, diferencijaciju prekursora IgA plazma ćelija, "homing", kao i za mehanizme selektivnog transcelularnog transporta IgA. IgA je najheterogeniji imunoglobulin, može se javiti u više molekularnih formi: kao monomer, dimer i polimer. Postoji i sekretorni IgA (sIgA). Razlikuju se dve subklase: IgA1 i IgA2. IgA1 je nađen u serumu i stvaraju ga B ćelije kostne srži. IgA2 luče B ćelije koje se nalaze u mukozi. U IgA2, teški i laki lanci imunoglobulina nisu povezani disulfidnim već nekovalentnim vezama. IgA antitela imaju različitu funkciju u zavisnosti od forme u kojoj se nalaze, kao i od lokacije na kojoj su. U svojoj sekretornoj formi, IgA je dominantni imunoglobulin u sekretima mukoze.

Sekretorni IgA (sIgA) ima formu dimera u kojoj su dva monomera povezana dodatnim lancima. Jedan od dodatnih lanaca je J lanac (engl. joining chain – povezujući lanac), bogat cisteinom i strukturno potpuno različit od ostalih imunoglobulinskih lanaca. Ovaj lanac se sintetiše u ćelijama koje proizvode IgA. Pošto bude izlučen od strane plazma ćelija koje se nalaze u lamini propriji mukoze (*lamina propria mucosae*), IgA se vezuje za polimerni imunoglobulinski receptor (pIgR) na bazolateralnoj strani epitelnih ćelija, koje ga preuzimaju endocitozom. Kompleks pIgR - IgA putuje kroz epitelnu ćeliju prema lumenu creva, dolazi do proteolize receptora, mada deo receptora, koji se naziva sekretorna komponenta (SC), ostaje vezan za antitelo. sIgA se oslobađa u lumen gde mu je zadatak da prepozna mikroorganizme i blokira njihovo vezivanje za epitelne ćelije. Sekretorna komponenta daje otpornost sekretornom antitelu na proteaze iz lumena. Glikoprotein iz sekretorne komponente obavlja Fc deo dimernog antitela (engl. fragment crystalline) i zaklanja mesta potencijalnog proteolitičkog cepanja. Od svih antitela, jedino još IgM može da vezuje SC (Mayer, 2003). Funkcionalna prednost sIgA uključuje multivalentnost (četiri antigen vezujuća mesta) i otpornost na dejstvo proteolitičkih enzima, a zahvaljujući

jedinstvenoj primarnoj strukturi alfa lanca kao i sekretornoj komponenti receptora koja ostaje kovalentno vezana za IgA posle njegove transcitoze kroz epitelne ćelije. Sekretorni IgA ispoljava antiinflamatorne osobine. Intaktna, nativna sIgA antitela ne mogu da aktiviraju komplement kada su u kompleksu sa antigenom, a takođe ometaju aktivaciju komplementa pokrenutu IgM i IgG antitelima. Sekretorni IgA slabo vrši opsonizaciju i uglavnom funkcioniše kao inhibitor bakterijskog/virusnog vezivanja za epitel (Macpherson i sar., 2001; Cunningham-Rundles, 2001), a može, takođe, da izvrši aglutinaciju antigena i da ih „ubaci“ u sloj mukusa odakle će, zahvaljujući pokretima creva, biti izbačeni u spoljašnju sredinu (Mayer, 2003).

Imunološke ćelije gastrointestinalnog sistema su organizovane, anatomski i funkcionalno, u dva odvojena odeljka: imunološko - induktivni i imunološko - efektorski odeljak.

U imunološko - induktivnom odeljku dolazi do prepoznavanja antigena od strane naivnih limfocita što je uslov za kasnije diferenciranje limfocita iz naivnih u efektorske ćelije koje su sposobne za obavljanje efektorskih funkcija. Ovaj odeljak čini regionalni GALT (pojedinačni limfni folikuli i udruženi limfni folikuli koji su označeni kao Pejerove ploče - PP) i mezenterijalni limfni čvorovi - MLN (engl. mesenterial lymph nodes) – Brandtzaeg i sar., 2008. Pejerove ploče predstavljaju važnu komponentu GALT-a (engl. gut-associated lymphoid tissue). Nalaze se u vezivnom tkivu mukoze (*lamina propria mucosae*) i podsluznici (*tela submucosa*) duodenuma. Mogu se naći i u drugim delovima tankog creva. Svaka Pejerova ploča sadrži 10 - 100 limfnih folikula i vidljiva je golim okom kao ovalna površina na antimezenterijalnoj strani duodenuma (Evans, 1993). Epitel koji pokriva Pejerove ploče ne formira crevne resice, već su umesto enterocita prisutne M ćelije. Pas ima 12 do 25 Pejerovih ploča u celom tankom crevu, a najviše ih ima u duodenumu (Simić i Janković, 1997). Pejerove ploče su duge od 7 mm do 85 mm, a široke od 4 mm do 15 mm. Pejerove ploče koje se nalaze kranijalno su uglavnom okrugle i leže u udubljenjima u sluznici tankog creva, dok su one kaudalnije ovalne ili u vidu traka (Sisson, 1953), i štrče iznad crevne sluznice (Evans, 1993). Pejerove ploče su brojnije i veće kod mlađih životinja. Kod starijih životinja atrofiraju (Simić i Janković, 1997). Pejerove ploče imaju anatomsku organizaciju sekundarnih limfnih organa. B limfociti su koncentrisani u

diskretnim strukturama nazvanim folikuli. U slučajevima kad su B limfociti u folikulu nedavno odgovorili na antigen, ovi folikuli imaju centralnu zonu nazvanu germinativni centar. T limfociti se nalaze na periferiji folikula.

Prodiranje antigena kroz epitelnu barijeru mukoze creva je prvi, kritičan korak u ostvarivanju imunološkog odgovora. Sposobnost intestinalnog epitela da prihvata i transportuje antigene je strateški ograničena jedino na epitel vezan za folikule - FAE (engl. folicule associated epithelium). Samo jedan sloj ćelija odvaja PP od intestinalnog lumena. Adaptacija ovog sloja ćelija za uspešno obavljanje svog zadatka se ogleda u prisustvu ćelija koje su specijalizovane za prihvatanje antigena, tj. M ćelija, kao i u odsustvu mukusa na epitelu vezanom za folikule (nema peharastih ćelija koje sekretuju mukus). M ćelije igraju glavnu ulogu u inicijaciji imunološkog odgovora pošto preuzimaju i transportuju antigene da bi ih potom predale antigen prezentujućim ćelijama (Neutra i sar., 2001). Smatra se da M ćelije predstavljaju ulazna vrata za antigene direktno u imunološko - induktivni odeljak (Brandtzaeg i sar., 2008; Untersmayr i sar., 2006; Nicoletti, 2000). M ćelije se značajno razlikuju od okolnih enterocita: četkasta ivica sačinjena od mikroresica, karakteristična za enterocite, maltene je neprimetna, a i glikokaliks nedostaje. To čini da je apikalni deo M ćelija dostupan makromolekulima i mikroorganizmima koji se nalaze u sadržaju creva te dolazi do njihove internalizacije od strane M ćelija. U zavisnosti od prirode makromolekula i mikroorganizama, mehanizam internalizacije pokazuje tri varijante (Nicoletti, 2000): - velike čestice i bakterije se fagocituju, - u slučaju virusa odvija se endocitoza posredovana klatrinskim vezikulama, - u slučaju da partikule ne adheriraju na M ćelije odvija se pinocitoza. Prema nekim autorima nije definitivno potvrđen poslednji navedeni način preuzimanja antigena (Untersmayr i sar., 2006, Chehade i sar., 2005). Internalizovani materijal se transportuje vezikulama do bazolateralne membrane M ćelija gde se vrši njegova egzocitoza. Jedna od važnih karakteristika M ćelija je da njihova bazolateralna strana formira veliki džep invaginacijom membrane, što omogućava prisan kontakt sa okolnim limfocitima i antigen - prezentujućim ćelijama (dendritskim ćelijama, makrofagama, B ćelijama i folikulo dendritskim ćelijama), a i skraćuje put koji vezikula sa potencijalnim antigenom treba da pređe (Brandtzaeg i sar., 2008). Dendritske ćelije koje se nalaze ispod M ćelija su pozicionirane tako da od M ćelija prihvataju antigene. Po



fenotipskim karakteristikama razlikujemo nezrele i zrele, tj. aktivirane dendritske ćelije (Brandtzaeg i sar., 2008; Delves i sar., 2000). Nezrele dendritske ćelije su opremljene mehanizmima za fagocitozu antigena i bakterija. One ne eksprimiraju ni kostimulatorne ni adhezivne molekule koji su neophodni za stimulaciju T ćelija. Po preuzimanju antigena i primanju aktivacionih signala, one se sele u parakorteks regionalnih mezenterijalnih limfnih čvorova. Tokom migracije sazrevaju, gube sposobnost fagocitoze, a antigen koji su preuzele od M ćelija prezentuju u stabilnoj formi u kompleksu sa MHC (engl. major histocompatibility complex) proteinima na svojoj površini. Takođe, na njihovoj površini se pojavljuju kostimulatorni i adhezivni molekuli (CD40, CD80, CD86, CD54 i drugi). Ovakva dendritska ćelija je aktivirana i spremna za interakciju sa T limfocitnim receptorima odnosno za stimulaciju T limfocita (Brandtzaeg i sar., 2008).

Sposobnost patogenih bakterija da izazovu imunološki odgovor, nasuprot toleranciji, zavisi od ekspresije molekularnih šablona vezanih za patogene – PAMP (engl. pathogen associated molecular patterns) na njihovoj površini. Ove šablone prepoznaju visoko konzervisani „Toll like“ receptori (engl. toll like receptors - TLR) na dendritskim ćelijama. Aktivacija TLR izaziva maturaciju dendritskih ćelija: ekspresiju kostimulatornih molekula neophodnih za aktivaciju T limfocita i lučenje citokina koji se vezuju za receptore na T ćelijama (Whitley i sar., 2011). Nepatogene, komensalne bakterije ne eksprimiraju pomenute šablone te nisu u stanju da aktiviraju dendritske ćelije te, stoga, ne dovode ni do aktivacije T limfocita.

Alternativno, osim M ćelija, antigene iz crevnog sadržaja mogu da „preuzmu“ i intra i subepitelne dendritske antigen prezentujuće ćelije koje „hvataju“ antigen sopstvenim transepitelnim projekcijama u lumen creva, nose ga do MLN, sazrevaju u zrele APC i stimulišu T ćelije na produktivni ili supresorski imunološki odgovor. Enterociti mogu da se ponašaju kao lokalne, neprofesionalne APC koje imaju MHC (engl. major histocompatibility complex) molekule II klase na svojoj površini, ali nemaju kostimulatorne molekule (Hershberg i sar., 2000; Blumberg i sar., 1999; Mayer, 1998). Enterociti prezentuju antigen T limfocitima u lamini propriji mukoze. U normalnoj situaciji, ovakva interakcija rezultuje selektivnoj aktivaciji regulatorne T ćelije. U

određenim stanjima, kao što je na primer, inflamatorna bolest creva, aktivacija supresorske T ćelije je neuspešna što možda objašnjava perzistentnu inflamaciju.

Pošto se u MLN ili PP odigra aktivacija i proliferacija limfocita, limfociti eferentnim limfnim sudovima ulaze u limfu, a preko grudnog limfnog kanala (*ductus thoracicus*) ulaze u sistemsku cirkulaciju. Krvnim sudovima limfociti stižu do mukoze, izlaze u tkivo ekstravazacijom kroz endotelne venule i naseljavaju imunološko - efektorska mesta (takozvani „homing“).

Imunološko - efektorski odeljak histološki obuhvata dve lamine, i to su: *lamina propria mucosae* i *lamina epithelialis mucosae*. U ovom odeljku limfociti nakon ekstravazacije i diferencijacije vrše svoju efektorsku ulogu. Proces ekstravazacije je diktiran lokalnim profilom vaskularnih adhezionih molekula i hemokina, te na taj način endotelne ćelije imaju ulogu „kontrolora“ ulaska u efektorski odeljak. Na T i B limfocitima postoje receptori za adhezivne molekule i hemokine koji ih navode u mesta bogata ligandima za te receptore (Brandtzaeg i sar., 2005). Važno je napomenuti da aktivacija B limfocita i diferencijacija u mukozni IgA sekretujućii plazmablast i plazma ćeliju, povlači za sobom i povećanje broja receptora za hemokine koji se nalaze u određenim imunološko - efektorskim mestima mukoze. I aktivacija i diferencijacija T limfocita, takođe, povlači za sobom povećanje broja receptora za hemokine koji se nalaze u određenim imunološko - efektorskim mestima mukoze. U sluznici tankih creva, naivni limfociti, aktivirani u PP i MLN, povećavaju ekspresiju  $\alpha 4\beta 7$  integrina (Guy-Grand i sar., 2002) koji interaguje sa MAdCAM – 1 (engl. mucosal addressin cell-adhesion molecule - 1) koji je eksprimiran na endotelnim HEV (engl. high endothelial vessels) intestinuma (German i sar., 1999) obezbeđujući tako „homing“ (samonavođenje) u imunološko - efektorska mesta. Hemokin ligand 25 (CCL25; engl. C-chemokine ligand 25) koga stvaraju epitelne ćelije tankog creva, takođe je umešan u migraciju limfocita u intestinalnu mukozu. Njegov receptor CCR9 (engl. C-chemokine receptor) je eksprimiran na skoro svim limfocitima tankog creva (Brandtzaeg i sar., 2008). Integrin  $\alpha E\beta 7$  se nalazi na IEL i reaguje sa E-kadherinom na epitelnim ćelijama (Brandtzaeg i sar., 2008). Sa druge strane, IgA plazmablasti debelog creva eksprimiraju CCR10 koji bivaju privučeni ligandom CCL28 koji je eksprimiran upravo u sluznici debelog creva.

Limfociti nastanjuju efektorski odeljak intestinalne mukoze: laminu epitelijalis mukoze nastanjuju intraepitelni limfociti označeni kao IEL, dok laminu propriu mukoze nastanjuju *lamina propria* limfociti označeni kao LPL (Guy-Grand i sar., 2005).

LPL su predstavljeni T limfocima (CD4+ i CD8+ T limfociti) i B limfocitima. *Lamina propria* T limfociti imaju jedinstven fenotip. Ove ćelije predstavljaju finalno diferencirane efektorske T ćelije čiji su putevi stimulacije različiti od onih za T limfocite periferne krvi. Sekretuju velike količine citokina kao što je IFN $\gamma$ , IL4, IL5. To su najvećim delom CD4+ T limfociti. *Lamina propria* B limfociti su aktivirane B ćelije i plazma ćelije koje sekretuju najvećim delom IgA.

IEL su jedinstvena populacija limfocita u telu različita od LPL. IEL su predstavljeni T limfocitima sa značajnom citolitičkom i imunoregulatornom aktivnošću. T - ćelijski receptor - TCR (engl. T-cell receptor), prepoznaje peptidne antigene prezentovane u sklopu MHC molekula i predstavlja heterodimer koji se sastoji od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca. Pet do deset procenata T ćelija u organizmu eksprimira receptore sastavljene od  $\gamma$  i  $\delta$  lanaca, koji po strukturi liče na  $\alpha\beta$ TCR, ali pokazuju potpuno drugačiju specifičnost. T ćelije koje eksprimiraju  $\gamma\delta$ TCR najviše su zastupljene u epitelnim tkivima (Abbas i sar., 2006). Čak 10-40% IEL pripada  $\gamma\delta$ T limfocitima (Roitt i sar., 2001). Prema nekim autorima (Untersmayr i sar., 2006), oko 50 % IEL u crevima su  $\gamma\delta$ T limfociti.  $\gamma\delta$ T limfociti su slabo definisanog porekla i uloge. Po svojim karakteristikama nalaze se na granici između urođenog i stečenog imuniteta. Nekada se smatralo da su IEL zaduženi za prvi kontakt sa antigenom (Ferguson, 1977). Danas se zna da je to zadatak M ćelija. IEL luče u velikoj količini IFN $\gamma$  i IL5. Moguća funkcija je imunološki nadzor nad mutiranim ili virusom inficiranim ćelijama (Roitt i sar., 2001) kao i eliminacija oštećenih i inficiranih ćelija intestinalnog epitela (Fogle, 2007). Neki autori (Untersmayr i sar., 2006) ukazuju da je moguće da su zaduženi za oralnu toleranciju. Međutim, IEL su izvor citokina Th2 tipa - IL13, koji podržava produkciju IgE i alergijsku reakciju.  $\gamma\delta$ TCR molekuli prepoznaju proteinske i neproteinske antigene koje uglavnom ne prezentuju klasični MHC molekuli (Untersmayr i sar., 2006, Allison i sar., 2001), što ukazuje da prepoznaju konformaciju, a to je tipična odlika alergena hrane, te je moguće da učestvuju u odgovoru na alergene hrane.

### 2.3. INFLAMATORNE BOLESTI CREVA PASA

Termin „hronične enteropatije“ pasa se koristi da objedini grupu hroničnih intestinalnih obolenja različite etiologije i različitog patološkog mehanizma nastanka poremećaja, ali sa sličnim kliničkim manifestacijama. Osnovne karakteristike hroničnih enteropatija su hronična dijareja i povraćanje (Gaschen i sar., 2011). U hronične enteropatije pasa spada niz bolesti koje zahvataju tanko i debelo crevo. Većina hroničnih enteropatija su primarno obolenja creva. Ipak, kod nekih bolesti ove grupe kod kojih je žarište van gastrointestinalnog trakta, odraz obolenja je klinički fenotip sličan primarnim enteropatijama (Gaschen i sar., 2011). U tabeli 1 su navedeni najčešći uzroci hroničnih enteropatija pasa, uključujući parazitske, bakterijske i gljivične infekcije, neodgovarajuću reakciju na hranu, poremećaje intestinalne mikroflore i idiopatsku inflamatornu bolest creva. Hronične enteropatije su česte kod pasa i čine više od 50% digestivnih poremećaja kod ove vrste (Lecoindre i sar., 2006).

Tabela 1. Najčešći uzroci hroničnih enteropatija pasa

Parazitska infekcija	Nematode, Protozoe (Giardia)
Bakterijska infekcija	kampilobakterijska, klostridijalna infekcija
Disbakterioza	<i>antibiotic responsive diarrhea</i> (ARD)
Gjivična infekcija	histoplazmoza
Neodgovarajuća reakcija na hranu	intolerancija ili alergija na hranu
Idiopatska inflamacija	inflamatorna bolest creva (IBC) sa limfocitno-plazmocitnom, eozinofilnom, neutrofilnom ili granulomatoznom infiltracijom
	rasno specifična: -ulcerativni kolitis boksera -enteropatija sa gubitkom proteina kod svilenog „Wheaten“ terijera -Basenji enteropatija

Inflamatorna bolest creva (IBC) je zajednički naziv za grupu hroničnih enteropatija koje se odlikuju zapaljenjem gastrointestinalnog sistema (Simpson i sar., 2011) i posledično nespecifičnim simptomima, koji mogu biti postojani ili rekurentni. Kod IBC pasa, u zidu creva, u lamini propriji mukoze (*lamina propria mucosae*), nagomilavaju se ćelije zapaljenja, a na zidu creva dolazi i do drugih morfoloških promena (Gaschen i sar., 2011). Ćelijski infiltrat uključuje različite populacije ćelija: limfocite, plazma ćelije, eozinofilne granulocite, makrofage i neutrofilne granulocite koji naseljavaju sluznicu creva.

IBC je dobro poznata i kod ljudi (Cerquetella i sar., 2010). Važno je navesti da skraćenica CIBD koja potiče od engleskog naziva „cryptogenic inflammatory bowel disease“, označava, ustvari, IBC ljudi, a tu spadaju ulcerativni kolitis i Kronova bolest (Harvey i sar., 1980) koje pokazuju izvesne sličnosti sa određenim oblicima IBC pasa (Lecoindre i sar., 2006). Pseći granulomatozni enterokolitis podseća na Kronovu bolest kod ljudi (Eldredge i sar., 2007), dok hronični kolitis (limfocitno - plazmocitni kolitis) ima sličnosti sa ulcerativnim kolitisom kod ljudi (Jergens i sar., 1996). Sadašnji podaci navode da su ulcerativni kolitis i Kronova bolest dva različita kraja spektra humanih idiopatskih inflamatornih bolesti creva. Ipak, ove bolesti se svrstavaju u zajedničku grupu IBC, pošto imaju preklapajuće kliničko-patološke osobenosti, dele određene zajedničke imunološke poremećaje i idiopatske su (Jergens i sar., 1996).

Klasifikacija IBC je izvršena na osnovu dominantne populacije ćelija u infiltratu zida creva kao i na osnovu toga gde se infiltracija odigrala (Jergens, 2008; German i sar., 2003). U infiltratu lamine proprije mukoze mogu se naći limfociti, plazma ćelije, eozinofilni granulociti, makrofagi i neutrofilni granulociti (Marks i sar., 2011). Vrlo je čest i mešoviti infiltrat u lamini propriji mukoze zida creva - ćelijske populacije su izmešane i preklapaju se u različitim kombinacijama (Washabau i sar., 2010). U okviru inflamatornih bolesti tankih creva razlikujemo limfocitno - plazmocitni enteritis (LPE), eozinofilni enteritis i eozinofilni gastroenteritis (EGE). U debelom crevu, prepoznati su limfocitno - plazmocitni kolitis, eozinofilni kolitis, histiocitni ulcerativni kolitis (HUC) i granulomatozni kolitis (Nelson i sar., 2003). Ovakva podela zapravo nema mnogo smisla pošto se zna da istovremeno može biti zahvaćeno i tanko i debelo crevo, a čak može biti

istovremeno zahvaćen i želudac, na primer limfocitno - plazmocitni enterokolitis ili eozinofilni gastroenterokolitis (Hall i sar., 2009; Nelson i sar., 2003).

Limfocitno - plazmocitni enteritis pasa (LPE) je tip inflamatorne bolesti tankih creva, hroničnog karaktera, koga karakteriše ćelijski infiltrat u kome dominiraju limfociti i plazma ćelije. LPE je najčešći oblik IBC tankih creva pasa (Jergens, 2008; Eldredge i sar., 2007; Cowell, 2004; Jergens i sar., 1996).

Eozinofilni enterokolitis je tip IBC pasa. Na biopsijama, povećan broj eozinofila može biti uočen u želucu, tankim crevima ili kolonu.

Granulomatozni enteritis je sličan humanoj Kronovoj bolesti. Stvara se zadebljanje zida creva te posledično suženje tog dela tankog creva zbog inflamacije okolnog tkiva i limfnih čvorova. Na biopsijama su nađeni makrofagi (Eldredge i sar., 2007).

Neutrofilni enterokolitis se odlikuje ćelijskim infiltratom sastavljenim pretežno od neutrofilnih granulocita. Ovaj oblik enterokolitisa naziva i piogranulomatozni enterokolitis.

Histiocitni ulcerativni kolitis se javlja skoro isključivo kod boksera. Simptomi se javljaju pre nego što pas napuni 2 godine. Ćelijski infiltrat je predstavljen makrofagima (Eldredge i sar., 2007).

Patogeneza IBC je vrlo kompleksna (Whitley i sar., 2010). Ona je primer izmenjenog imunološkog odgovora na velikoj mukoznoj površini gde egzogeni antigeni (iz lumena creva) imaju značaja u nastanku bolesti i održavanju tako promenjenog stanja (Whitley i sar., 2010). Mehanizmi koji stoje u pozadini nastanka IBC pasa nisu još uvek razjašnjeni (Allenspach, 2003). Iako uzrok nastanka IBC kod životinja i ljudi nije jasan, ipak podaci, kako histološki tako i klinički, ukazuju na imunološku podlogu razvoja ove bolesti (German i sar., 2008). Umešanost imunoloških mehanizama u nastanak bolesti potvrđuje povećan broj ćelija zapaljenja u gastrointestinalnoj mukozi kod pacijenata, uspeh tradicionalne terapije IBC-a koja podrazumeva posebnu ishranu u kojoj su zastupljeni proteini koji ranije nisu korišćeni u ishrani (engl. novel proteins) kao i upotreba lekova za koje se zna da menjaju imunološki odgovor (napr. kortikosteroidi, azatiopirin, sulfasalazin). Ove činjenice ipak nisu dovoljne da se IBC svrsta u primarno imunološka obolenja (Jergens i sar., 1996).

U pogledu etiopatogeneze IBC, u literaturi se iznose dve osnovne hipoteze.

Prema prvoj hipotezi, inflamacija nastaje kao posledica poremećenog imunološkog odgovora. Poremećen imunološki odgovor može biti posledica defektne supresorske funkcije GALT-a (engl. gut associated lymphoid tissue), ili pak, poremećeni imunološki odgovor može predstavljati primarno imunološki poremećaj. Poremećaji u supresorskoj funkciji GALT-a se smatraju razlogom hipersenzitivnog odgovora karakterističnog za IBC (Lecoindre i sar., 2006). Po ovoj teoriji, supresija je poremećena te klonovi limfocita izmiču kontroli i pokreću imunološki odgovor na različite crevne antigene (Jergens i sar., 1996). Takav imunološki odgovor izaziva značajno gastrointestinalno zapaljenje, što za uzvrat povećava propustljivost crevnog zida te omogućava priliv raznovrsnih antigena. Rezultat je sve više ugrožena supresorska funkcija GALT-a, novi ciklusi inflamacije, propustljivost se još više povećava i dolazi do sve većeg oštećenja tkiva (Jergens i sar., 1996).

Druga hipoteza podrazumeva da inflamacija započinje kao posledica imunološkog odgovora, ali na antigene na koje ne bi trebao da se razvija imunološki odgovor: na normalne sastojke lumena creva (antigeni hrane ili rezidentna crevna flora). U svakom slučaju, i ćelijska komponenta (aktivirani intestinalni T i B limfociti, plazma ćelije, dendritske ćelije, makrofagi) i molekularni elementi (sistem komplekta, prostaglandini, leukotrijeni, proinflamatorni citokini, interleukini, proteaze, azot oksid, slobodni kiseonikovi radikali) učestvuju skupa u nastanku i održavanju zapaljenja mukoze (Jergens, 2008).

Jedno od objašnjenja je postojanje primarne lezije na mukoznoj propustljivoj membrani (Kobayashi i sar., 2007). Hronično povećanje propustljivosti crevne epitelne barijere, to jest njena disfunkcija, dovodi do povećanog kretanja antigena kroz intestinalni epitel i posledično do povećane izloženosti imunološkog sistema antigenima (Korzenik, 2005). Povećana crevna propustljivost je uočena kod ljudi obolelih od Kronove bolesti i još zanimljivije je što je navedeni poremećaj ustanovljen i kod rođaka pacijenata, a koji nemaju nikakve simptome bolesti (Kobayashi i sar., 2007). To navodi na razmišljanje o postojanju genetičke predispozicije i umešanosti genetičkih faktora (Whitley i sar., 2010; Lecoindre i sar., 2006). Kod pasa sa IBC, propustljivost mukoze, merena kroz administraciju laktuloze i

ramnoze, bila je u korelaciji sa stepenom histološkog oštećenja (Cerquetella i sar., 2010; Kobayashi i sar., 2007).

Malo je podataka da je IBC autoimuna bolest (Whitley i sar., 2010) mada neki autori podržavaju tu hipotezu (Snook, 1990). Dalja istraživanja u ovom smeru će sigurno pokazati ulogu fenomena autoimunosti u patogenezi IBC kod pasa.

Brojna istraživanja ukazuju na izuzetan značaj intestinalne mikroflore u imunološkom odgovoru (Lecoindre i sar., 2006). IBC se danas sve više posmatra kao posledica nekontrolisanog zapaljenja creva koje je rezultat kombinacije spoljašnjih faktora (od kojih su najvažniji sastojci hrane i mikrobi koji se nalaze u lumenu creva) i faktora imunoregulacije kod genetski prijemčivih jedinki (Simpson i sar., 2011; Chichkowski i sar., 2008; Sartor, 2006). Komensalna mikroflora predstavlja glavni faktor sredine koji igra ulogu u nastanku i održavanju IBC (Lecoindre i sar., 2006; Rutgers i sar., 1998). Antigeni koji imaju odlučujuću ulogu u poremećenom imunološkom odgovoru su poreklom od bakterija (Hendrickson i sar., 2002) i to su uglavnom antigeni rezidentne mikroflore (Simpson i sar., 1994). U svakom slučaju, mnogi istraživači danas proučavaju interakciju između genetske prijemčivosti jedinki i mikrosredine creva – napr. bakterije i sastojci hrane (Simpson i sar., 2011; Allenspach, 2011).

Genetski uticaj još nije definitivno potvrđen u IBC pasa, ali su izvesne pasmine, poput nemačkog ovčara, boksera, rotvajlera, pod povećanim rizikom od ovog obolenja (Allenspach, 2011; Washabau i sar., 2010; Fogle, 2007). Genetski uticaj, tj. rasna predispozicija je prihvaćena kod boksera kod kojih se razvija histiocitni ulcerativni kolitis (Cerquetella i sar., 2010). Nasledni poremećaji sluznice kolona se povezuju sa poremećajem brzine regeneracije ćelija i poremećajem u fiziohemijskoj barijeri površine sluznice, što favorizuje nespecifični atak mikroorganizama komensalne flore kolona na sluznicu. Radovi Gomeza (1977) su nagovestili mogućnost postojanja poremećaja enzima histiocita što otežava hidrolizu lizozoma i posledično dovodi do nemogućnosti uništavanja bakterija. Glutenom indukovana enteropatija kod setera je verovatno nasledna i ima mnogo sličnosti sa celijačnom bolesti ljudi (Strombeck i sar., 1996). Imunoproliferativna enteropatija kod Basenji pasa je nasledna IBC, limfocitno - plazmocitnog tipa (Gaschen i sar., 2011; Cerquetella i sar., 2010). Odlikuje se hipergamaglobulinemijom povezanom sa



porastom koncentracije IgA u krvi (Breitschwerdt i sar., 1980). Ova IBC je analog imunoproliferativnom enteritisu kod ljudi. Mekodlaki „*Wheaten*“ terijer i „*Lundehund*“ rase pasa takođe obolevaju od ozbiljnog PLE (engl. protein losing enteropathy) pri čemu postoje indikacije da je u pitanju nasledni faktor . Kod nemačkih ovčara i šar-pej-a postoji visoka učestalost imunodeficijencije IgA u krvi i u sluznici, što možda objašnjava predispoziciju ovih rasa za nastanak IBC-a (German i sar., 2000).

Nije utvrđeno da pol i starost utiču na nastanak IBC kod pasa. Istraživanja Jergens-a i saradnika (1996) su ukazala da 27% obolelih pasa ima dve godine i manje. Ipak, najviše slučajeva je ustanovljeno kod pasa srednjih godina i starijih.

Klinički simptomi reflektuju lokalizaciju oštećenja tkiva (Jergens i sar., 1996), nakon dobro obavljenog kliničkog pregleda i detaljne anamneze, može se pretpostaviti moguće mesto inflamacije, to jest da li je zahvaćeno tanko ili debelo crevo, ili oba (Gaschen i sar., 2011). Obično su simptomi jače izraženi ako je u pitanju tanko crevo (Gaschen i sar., 2011). Sa napretkom dijagnostičkih testova i veće dostupnosti abdominalne imidžing dijagnostike, često se previdi važnost utvrđivanja detaljnog kliničkog fenotipa pasa koji boluju od hroničnih enteropatija (Gaschen i sar., 2011). Prikupljanje preciznih podataka, uzimanje sveobuhvatne anamneze i vršenje detaljnog kliničkog pregleda pasa je od neprocenjivog značaja za pravilno postavljanje dijagnoze. Klinički simptomi IBC se pripisuju ćelijskom infiltratu i medijatorima inflamacije (Washabau i sar., 2010). Klinički simptomi su direktna posledica gastrointestinalnog zapaljenja i njegovog uticaja na gastrointestinalnu permeabilnost i motilitet, na apsorpciju hranljivih sastojaka i na centar za povraćanje (Jergens i sar., 1996). Klinički znaci vezani za IBC nisu specifični. Imaju cikličan karakter, ređe progresivan klinički tok. Najčešći simptomi uključuju hroničnu ili rekurentnu dijareju, povraćanje, gubitak težine i promenu apetita (Gaschen i sar., 2011; Kobayashi i sar., 2007; Lecoindre i sar., 2006; Jergens, 2004; Craven i sar., 2004; Jergens i sar., 1996). Mogu se javiti i tenezmi, hematohezija, mukozna stolica, bol u stomaku (Jergens i sar., 1996). Dijareja je najčešći simptom kod pasa. Kod pasa kod kojih je IBC zahvatila tanko crevo, dijareja ima odlike dijareje tankog creva: stolica je profuzna, tečna, normalne ili povećane učestalosti, prisutna je hitnost. IBC kolona dovodi do nastanka tradicionalnog „kolon sindroma“ (Lecoindre i sar., 2006): povećana je frekvenca

defekacije, karakter stolice je sluzav, postoje tenezmi. Hematohezija se takođe može uočiti (Hall i sar., 1994). Povraćanje je važan simptom IBC. Sadržaj je obično vodenast, retko hrana, a može biti i krvav ukoliko postoje ulceracije, pogotovo duodenuma (Jergens i sar., 1992). IBC je najčešći uzrok hroničnog povraćanja i proliva kod pasa (Marks i sar., 2011; Cowell, 2004). Postoji pozitivna korelacija između stepena oštećenja tkiva kod IBC i gubitka težine (Jergens i sar., 1992). To je najverovatnije posledica gubljenja integriteta mukoze tankih creva što dovodi do malasimilacije (smanjene apsorpcije hranljivih sastojaka hrane). Promena apetita uočena kod pasa obolelih od IBC, varira od bulimije do anoreksije. Teški slučajevi IBC se mogu zakomplikovati gubitkom proteina što se označava kao enteropatija sa gubitkom proteina (PLE - engl. protein losing enteropathy).

U poslednjih 8 godina su se razvila dva sistema koja utvrđuju intenzitet bolesti na osnovu kliničkih simptoma. To su CIBDAI (engl. canine inflammatory bowel disease activity index) i CCECAI (engl. canine chronic enteropathy clinical activity index).

Parametri uzeti u obzir su dobijeni anamnezom i kliničkim pregledom, što je prikazano u tabeli 2 i tabeli 3.

Oba indeksa su se pokazala kao vrlo uspešna da se sa izvesnom dozom sigurnosti odredi ozbiljnost bolesti, da se odredi terapija (Malewska i sar., 2011) i da se prati odgovor na terapiju (Jergens i sar., 2010; Munster i sar., 2010; Garcia-Sancho i sar., 2007; Allenspach i sar., 2007; Luckschander i sar., 2006; Jergens i sar., 2003). Jedna studija je pokazala da indeksi koreliraju sa ishodom bolesti (Allenspach i sar., 2007), ali to nije potvrđeno u drugim studijama (Jergens i sar., 2010; Munster i sar., 2010). Za sada nije utvrđena korelacija ni CIBDAI ni CCECAI sa patohistološkim nalazom (Allenspach i sar., 2007).

Tabela 2. Indeks aktivnosti (**CIBDAI**) koji se koristi kod pasa koji boluju od IBC (Jergens, 2003)

<b><u>A-Ponašanje / aktivnost</u></b>	0 = normalna 1 = blago smanjena 2 = srednje smanjena 3 = jako smanjena
<b><u>B-Apetit</u></b>	0 = normalan 1 = blago smanjen 2 = srednje smanjen 3 = jako smanjen
<b><u>C-Povraćanje</u></b>	0 = nema 1 = blago (1 epizoda nedeljno) 2 = srednje (2-3 epizode nedeljno) 3 = jako (više od 3 epizode nedeljno)
<b><u>D-Konzistencija stolice</u></b>	0 = normalna 1 = blago mekan feces 2 = veoma mekan feces 3 = vodenast proliv
<b><u>E-Učestalost defekacije</u></b>	0 = normalna 1 = blago povećana (2-3 puta dnevno) ili krv i / ili mukus u stolici 2 = srednje povećana (4-5 puta dnevno) 3 = jako povećana (više od 5 puta dnevno)
<b><u>F-Gubitak težine</u></b>	0 = nema 1 = blago (manje od 5% telesne težine) 2 = srednje (5-10% telesne težine) 3 = jako (više od 10% telesne težine)

Procena rezultata: CIBDAI = A + B + C + D + E + F

CIBDAI 0-3: nema klinički značaj

CIBDAI 4-5: blaga IBC

CIBDAI 6-8: IBC srednjeg intenziteta

CIBDAI 9 i više: intenzivna IBC

Tabela 3. Indeks aktivnosti (**CCECAI**) koji se koristi kod pasa koji boluju od hronične enteropatije (Allenspach, 2007)

$$\text{CCECAI} = \text{A} + \text{B} + \text{C} + \text{D} + \text{E} + \text{F} + \text{G} + \text{H} + \text{I}$$

<b>G- Koncentracija serum albumina</b>	0 ≥ 20 g/l 1 = 15-19,9 g/l 2 = 12-14,9 g/l 3 < 12 g/l
<b>H- Ascites i periferni edem</b>	0 = nema 1 = blagi ascites ili periferni edem 2 = srednji ascites ili periferni edem 3 = ozbiljan ascites / pleuralna efuzija i periferni edem
<b>I- Pruritus</b>	0 = nema 1 = poneka epizoda češanja 2 = regularne epizode koje prestaju kada pas spava 3 = pas se redovno budi iz sna da bi se češao

Procena rezultata:

CCECAI 0-3: nema klinički značaj

CCECAI 4-5: blaga enteropatija

CCECAI 6-8: enteropatija srednjeg intenziteta

CCECAI 9-11: intenzivna enteropatija

CCECAI 12: vrlo intenzivna enteropatija

Postavljanje dijagnoze IBC bi za kliničare trebalo da podrazumeva integraciju i kliničkih i patohistoloških kriterijuma. IBC nije samo mikroskopskim pregledom uočljiv problem (Washabau i sar., 2010). Postavljanje dijagnoze IBC vrši se putem eliminacije jer podrazumeva isključivanje svih drugih bolesti koje imaju sličnu simptomatologiju i, takođe, izazivaju gastrointestinalnu inflamaciju. Bolesti koje bi diferencijalno dijagnostički došle u obzir navedene su u tabeli 4.

Tabela 4. Diferencijalna dijagnoza IBC kod pasa (Lecoindre, 2006; Tams, 2003)

Intolerancija na hranu, alergija na hranu
Limfangiektazija
Đardijaza, trihuroza
Iritabilni sindrom creva
Metaboličke bolesti, bolesti jetre
Pankreatitis
Intestinalni tumori (limfom, adenokarcinom, mastocitom)
Tumori APUD sistema
Neuromišićna obolenja
Cekokolična intususcepcija
Sindrom bakterijskog preumnožavanja
Hiperkalcemija
Dijabetska ketoacidoza

Kriterijumi koji moraju biti zadovoljeni da bi se postavila dijagnoza inflamatorne bolesti creva pasa (Washabau i sar., 2010) dati su u tabeli 5.

Tabela 5. Kriterijumi koji moraju biti zadovoljeni da bi se postavila dijagnoza IBC

<ul style="list-style-type: none"><li>• klinički simptomi traju najmanje 3 nedelje ( dijareja, povraćanje)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• postojanje neadekvatanog kliničkog odgovora na promenu ishrane (koja podrazumeva primenu hipoalergijske strogo kontrolisane dijeta), na primenu antibiotika i na primenu antihelminthske terapije</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• isključenje metaboličkih poremećaja i drugih primarno gastrointestinalnih poremećaja</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• mikroskopskim pregledom postavljena dijagnoza na osnovu nalaza inflamatornog celularnog infiltrata</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• postojanje kliničkog odgovora na antiinflamatorne i imunosupresivne lekove</li></ul>

Definitivna dijagnoza IBC zahteva mikroskopski pregled uzorka sluznice gastrointestinalnog sistema koji je dobijen biopsijom. Biopsijski uzorak neophodan za definitivnu dijagnozu IBC može se dobiti ili putem endoskopije ili hirurškim putem - laparatomijom. Izvođenje biopsije mukoze je jedini dijagnostički postupak kojim se može obezbediti uzorak tkiva potreban za sigurno postavljanje dijagnoze IBD i za pružanje informacija za prognozu i individualizaciju terapije. Endoskopija je metoda izbora pošto je minimalno invazivna (Krstić i sar., 2007), brzo se obavlja i od značaja je da nije skupa. Ovom metodom moguće je dobiti veći broj uzoraka koji se mogu koristiti kako za citološka

i histološka ispitivanja tako i za imunohistohemijske analize. Veličina biopsijskih uzoraka kao i subjektivnost u interpretaciji rezultata su odlučujući faktori pri postavljanju dijagnoze IBC.

Prepoznavanje i interpretacija zapaljenjskih promena iz uzoraka dobijenih endoskopskom biopsijom mukoze gastrointestinalnog sistema, stavili su veterinarske patologe pred veliki izazov. Fundamentalna pitanja u ovom dijagnostičkom procesu jesu: - da li je biopsijski uzorak kvantitativno i kvalitativno odgovarajući za postavljanje dijagnoze, - šta je priroda zapaljenjske reakcije (limfocitno - plazmocitna, neutrofilna, eozinofilna, granulomatozna ili piogranulomatozna), - koje jačine je zapaljenjska reakcija, kao i - kada zapaljenjski odgovor može biti prethodnica limfoidnih neoplazmi?

Kada se imaju u vidu ograničenja mikroskopskog istraživanja delova tkiva obojenih hematoksilin-eozin metodom, jasno je da bolju procenu pruža imunohistohemijski pregled dopunjen rezultatima morfometrije. Danas su na raspolaganju softveri za morfometriju koji na osnovu broja ćelija specifičnih fenotipova po jedinici površine u lamini propriji (*lamina propria mucosae*) ili u lamini epitelijalis mukoze (*lamina epithelialis mucosae*) mogu ustanoviti suptilne promene ćelijskog sadržaja u tkivu (Jergens, 1996). Međutim, malo je verovatno da će ovako dugotrajne i skupe procedure postati rutinska klinička dijagnostika.

Patohistologija IBC pasa, tj. patohistološko ispitivanje radi se zbog potrebe razlikovanja normalnog od obolelog tkiva, da bi se opisala priroda i težina promena na tkivu i da bi se obezbedila tačna morfološka i etiološka dijagnoza, čime se poboljšava formulacija odgovarajuće terapije i prognoza lečenja (Washabau i sar., 2010).

Neke patohistološke dijagnoze na tkivnim uzorcima creva se relativno lako postavljaju (napr. adenocarcinoma). Nasuprot tome, interpretacija zapaljenjskih promena na sluznici creva i razlikovanje tih promena od alimentarnog limfoma, znatno je kompleksnija. Karakterizacija gastrointestinalnog zapaljenja do nedavno je bila otežana zbog nedostatka prihvaćenih, standardnih kriterijuma za procenu histopatoloških promena u tkivnom uzorku.

U toku proteklih 20 godina, više nezavisnih grupa razvilo je i primenilo sisteme klasifikacije koji definišu prirodu i težinu gastrointestinalnih inflamatornih promena (Münster i sar., 2006; Zentek i sar., 2002; Kull i sar., 2001; Baez i sar., 1999; Jergens i sar.,

1999; Stonehewer i sar., 1998; Yamasaki i sar., 1996; Spinato i sar., 1990; Roth i sar., 1990). U većini ovih studija, priroda gastrointestinalnih zapaljenja određivana je primarno, nekada i jedino, na osnovu dominantne populacije ćelija zapaljenja (na primer: limfocita, plazma ćelija, eozinofilnih granulocita, neutrofilnih granulocita, makrofaga) u lamini propriji mukoze. U mnogo slučajeva morfološke i citoarhitektonske promene epitela i mukoze bile su potcjenjene. Težina gastrointestinalnog zapaljenja obično je gradirana četvorostepeno (normalno, blago, umereno i značajno). Iako ovaj pristup izgleda logičan, specifični kriterijumi definisani od strane različitih grupa značajno se razlikuju, tako da je bilo nemoguće uporediti patohistološke promene u različitim studijama (zbog različitih kriterijuma). Čak i kada su primenjeni specifični kriterijumi javljaju se suštinske varijacije u patohistološkim interpretacijama promena na uzorcima tkiva. Willard i saradnici (2002) izveštavaju u svom članku o nedostatku uniformnog nalaza u 50% uzoraka dobijenih biopsijom, a ispitanih od strane pet različitih patologa. Ovakve interpretativne varijacije predstavljale su problem za rutinsku dijagnozu IBC i drugih gastrointestinalnih obolenja kao i za praćenje procesa bolesti kod pacijenata koji su podvrgnuti endoskopiji nakon primenjene terapije. Štaviše, multicentrični dijagnostički i terapijski klinički ogledi nisu bili mogući sa ovakvom varijabilnošću histopatoloških interpretacija (Washabau i sar., 2010). Zbog toga je grupa za gastrointestinalnu (GI) standardizaciju, uz podršku WSAVA (engl. World Small Animal Veterinary Association), razvila dijagnostičke i terapijske standarde gastrointestinalnih bolesti kod pasa i mačaka. WSAVA i Grupa za GI standardizaciju razvili su model u nadi da će on biti kritički procenjen u profesionalnim krugovima i, nakon toga, biti prihvaćen kao međunarodni standard za definiciju inflamatornih promena u gastrointestinalnom sistemu pasa i mačaka. Jedan od prvih zadataka ove grupe bio je uspostavljanje konsenzusa o normalnoj histološkoj morfologiji gastrointestinalnog sistema, sa namerom daljeg razvijanja patohistoloških standarda koji opisuju prirodu i težinu zapaljenja sluznice creva uz prateće morfološke promene.

Normalna histološka morfologija gastrointestinalnog sistema pasa može donekle varirati pod uticajem životnog doba i zrelosti tkiva (Baum i sar., 2007; Paulsen i sar., 2003), zatim načina ishrane i toka lečenja. Usled toga ceo problem se može smatrati prilično kontraverznom. Nedostatak saglasnosti o normalnoj histološkoj morfologiji bio je jedan od



razloga za pogrešne dijagnoze gastrointestinalnog zapaljenja kod mnogih pasa. Grupa za GI standardizaciju koristila je pristup koji se zasniva na čvrstim medicinskim dokazima da bi uspostavila referentne okvire za normalan histološki nalaz u gastrointestinalnom sistemu pasa i mačaka.

Sluznica duodenuma pasa je bila predmet pručavanja brojnih studija. Osobine sluznice duodenuma pasa su procenjivane morfološkim i imunohistohemijskim metodama (Janeczko i sar., 2008; Waly i sar., 2001; German i sar., 1999; Hart i sar., 1978). Normalna dužina resica kod odraslog psa iznosi  $722 \pm 170 \mu\text{m}$ , normalna dubina kripte iznosi  $1279 \pm 203 \mu\text{m}$ , a normalni odnos dužine resica prema kripti iznosi  $0,68 \pm 0,30$  (Janeczko, 2008; Paulsen i sar., 2003; Hart i sar., 1978). Kod zdravih pasa srednji broj peharastih ćelija je  $3,6 \pm 3,56$  po dužini od 100 vilusnih enterocita, i  $9,3 \pm 3,09$  peharastih ćelija po 100 kriptalnih enterocita (German i sar., 1999). Intraepitelnih limfocita (IEL) u resicama kod pasa brojčano je manje nego kod mačaka. Taj odnos kod pasa iznosi  $20,6 \pm 9,5$  na 100 enterocita, a kod mačaka  $47,8 \pm 11,7$  na 100 enterocita. Ali, broj kriptalnih IEL kod pasa ( $5,2 \pm 2,3$  na 100 enterocita), sličan je onom kod mačaka ( $4,6 \pm 1,7$  na 100 enterocita) - Waly i sar., 2001. Kod pasa, ukupan broj leukocita veći je u kriptalnoj lamini propriji ( $156,3 \pm 24,9$  na  $10.000 \mu\text{m}^2$ ) nego u lamini propriji na bazi resice ( $128,3 \pm 26,6$  na  $10.000 \mu\text{m}^2$ ) ili u lamini propriji na vrhu resice ( $100,7 \pm 43,89$  na  $10.000 \mu\text{m}^2$ ) - Gomez i sar., 1977. Slično tome, u predelu *laminae propriae* kripte, kod pasa, ima više eozinofilnih granulocita ( $9,8 \pm 7,51$  na  $10.000 \mu\text{m}^2$ ) nego u lamini propriji na bazi resice ( $3,7 \pm 3,52$  na  $10.000 \mu\text{m}^2$ ) ili na vrhu resice ( $3,8 + 6,06$  na  $10.000 \mu\text{m}^2$ ) - German i sar., 1999.

Morfološki kriterijumi uspostavljeni su u cilju bolje procene prirode i težine zapaljenja sluznice duodenuma.

Patohistološki standardi koji opisuju prirodu i težinu zapaljenja sluznice duodenuma, a baziraju se na morfološkim i zapaljenskim kriterijumima navedeni su u tabeli 6.

Tabela 6. Morfološke i zapaljenske promene tipične za sluznicu duodenuma pasa

<b>Morfološki kriterijumi</b>	<b>Zapaljenski kriterijumi</b>
Promene na crevnim resicama	Intraepitelni limfociti u lamini epitelijalis mukoze
Oštećenje epitela	Limfociti i plazma ćelije u LPM
Proširenje kripti	Eozinofilni granulociti u LPM
Dilatacija glavnog limfnog suda - lakteala	Neutrofilni granulociti u LPM
Fibroza mukoze	

Legenda: LPM – lamina propria mukoze (*lamina propria mucosae*)

Day i saradnici su 2008 godine predložili patohistološke standarde koji bi olakšali postavljanje dijagnoze IBC kod pasa u biopsijskim uzorcima creva. Posmatrane su promene na crevnim resicama, na epitelu, na kriptama, na limfnim sudovima resica (laktealima) kao i fibrozne promene na sluznici. Navedene promene su standardizovane odredjenim parametrima, a to je prikazano na sledećim tabelama: tabela 7, tabela 8, tabela 9, tabela 10 i tabela 11.

Tabela 7. Promene na crevnim resicama

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>Dugačke, tanke, uniformne resice kada je presek longitudinalan. Procena dužine resica je moguća samo kod pravilne orijentacije uzorka tkiva dobijenog biopsijom.</p>
<p><u>Blage promene na resicama</u></p> <p>Dužina resica je redukovana na 75% normalne dužine. Neke resice su povećane debljine. Nisu uniformne.</p>
<p><u>Umerene promene na resicama</u></p> <p>Dužina resica je redukovana na 50% normalne dužine. Neke resice su povećane debljine, a neke su se spojile međusobno (fuzionisale su se).</p>
<p><u>Značajne promene na resicama</u></p> <p>Dužina resica je redukovana na &lt; 25% normalne dužine. Intenzivno fuzionisanje resica. Površina sluznice može u teškim slučajevima biti savrnjena.</p>

Tabela 8. Promene na epitelu

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>Jednoslojan cilindričan epitel. Kod pasa normalan broj peharastih ćelija je u proseku 3 na 100 enterocita.</p>
<p><u>Blago oštećenje epitela</u></p> <p>Proređenost ćelija, degeneracija, vakuolizacija u fokalnim žarištima površinskog epitela.</p>
<p><u>Umereno oštećenje epitela</u></p> <p>Uočljivije degenerativne promene sa fokalnim gubitkom epitela.</p>
<p><u>Značajno oštećenje epitela</u></p> <p>Raširene ulceracije epitela.</p>

Tabela 9. Promene na kriptama

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>Uniformne, uzane kripti orjentisane perpendikularno na površinu. Cilindričan epitel sa ponekom peharastom ćelijom (kod psa otprilike 9 na 100 enterocita). Dilatacija kripti je u granicama normale.</p>
<p><u>Blago proširenje kripti</u></p> <p>Preko 10% kripti na preseku je prošireno, nepravilnog oblika ili sadrži u lumenu eozinofilni materijal ili degenerisane neutrofilne granulocite (ova pojava se označava kao apsces kripti).</p>
<p><u>Umereno proširenje kripti</u></p> <p>Preko 25% kripti na preseku je prošireno, iskrivljeno ili su prisutni apscesi.</p>
<p><u>Značajno proširenje kripti</u></p> <p>Preko 50% kripti na preseku je prošireno, iskrivljeno ili su prisutni apscesi.</p>

Tabela 10. Promene na limfnim sudovima resica – laktealima

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>Centralni lakteal, zahvata oko 25% <i>laminae propriae</i> crevne resice po širini, na uzdužnom preseku.</p>
<p><u>Blaga laktealna dilatacija</u></p> <p>Centralni lakteal je proširen, zahvata oko 50% <i>laminae propriae</i> crevne resice po širini, na uzdužnom preseku. Resice uglavnom šire nego normalno.</p>
<p><u>Umerena laktealna dilatacija</u></p> <p>Centralni lakteal je proširen, zahvata oko 75% <i>laminae propriae</i> crevne resice po širini, na uzdužnom preseku. Resice uglavnom šire nego normalno.</p>
<p><u>Značajna laktealna dilatacija</u></p> <p>Centralni lakteal je značajno uvećan i zahvata skoro 100% <i>laminae propriae</i> resice. Preostala <i>lamina propria</i>, gde se uočava, je edematozna. Resice su značajno proširene, posebno na vrhovima, dajući vrećast izgled.</p>

Tabela 11. Fibrozne promene na sluznici

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>Uzane trake strome, od 1 do 2 fibroblasta u širinu, razdvajaju kripte.</p>
<p><u>Blaga fibroza sluznice</u></p> <p>Kripte razdvojene trakama strome, do 5 fibroblasta u širinu.</p>
<p><u>Umerena fibroza sluznice</u></p> <p>Kripte razdvojene trakama strome, do 10 fibroblasta u širinu. Kripte variraju u širini, neke su atrofične.</p>
<p><u>Značajna fibroza sluznice</u></p> <p>Kripte razdvaja matriks kolagena, &gt; 10 fibroblasta u širinu. Kripte mogu biti atrofične ili potpuno nestale i zamenjene fibrotičnim matriksom.</p>

Kriterijumi za procenu inflamacije uspostavljeni su u cilju boljeg razumevanja stepena oštećenja zida duodenuma. Day i saradnici su 2008 godine proučavali zastupljenost: intraepitelnih limfocita u lamini epitelijalis mukoze (*lamina epithelialis mucosae*) crevnih resica, limfocita i plazma ćelija u lamini propriji mukoze (*lamina propria mucosae*), eozinofilnih granulocita u lamini propriji mukoze (*lamina propria mucosae*) kao i neutrofilnih granulocita u lamini propriji mukoze (*lamina propria mucosae*). Isti autori su predložili patohistološke standarde, a koji su prikazani na sledecim tabelama: tabela 12, tabela 13, tabela 14 i tabela 15.

Tabela 12. Prisustvo intraepitelnih limfocita - IEL u epitelu crevnih resica

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>Normalan broj IELje oko 5-10 IEL, na posmatranim poljima uniformne veličine na epitelu crevnih resica.</p>
<p><u>Blag porast u broju intraepitelnih limfocita</u></p> <p>Blagi porast u broju na 20-30 IEL na posmatranim poljima uniformne veličine na epitelu crevnih resica. Uglavnom se uočavaju individualne ćelije.</p>
<p><u>Umeren porast u broju intraepitelnih limfocita</u></p> <p>Otprilike 30-50 IEL na posmatranim poljima uniformne veličine na epitelu crevnih resica. Ćelije se mogu naći i fokalno u grupama.</p>
<p><u>Značajan porast u broju intraepitelnih limfocita</u></p> <p>Oko 50-100 IEL na posmatranim poljima uniformne veličine na epitelu crevnih resica. Ćelije se nalaze u grupama (grozdovima).</p>

Tabela 13. Prisustvo limfocita i plazma ćelija u lamini propriji (*lamina propria mucosae*)

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>U LPM resice oko 25% područja u posmatranim poljima može biti zauzeto limfocitima i plazma ćelijama. Između kripte se mogu naći 1-2 limfocita i plazma ćelije.</p>
<p><u>Blag porast broja limfocita i plazma ćelija u LPM</u></p> <p>Limfociti i plazma ćelije mogu da okupiraju 25-50% područja lamine proprije resice u posmatranim poljima. Kripte mogu biti razdvojene sa do 5 limfocita i plazma ćelija.</p>
<p><u>Umeren porast broja limfocita i plazma ćelija u LPM</u></p> <p>Limfociti i plazma ćelije mogu da okupiraju 50-75% područja lamine proprije resice u posmatranim poljima. Kripte mogu biti razdvojene sa do 10 limfocita i plazma ćelija.</p>
<p><u>Značajan porast broja limfocita i plazma ćelija u LPM</u></p> <p>Limfociti i plazma ćelije mogu da okupiraju 75-100% područja lamine proprije resice u posmatranim poljima. Kripte mogu biti razdvojene sa do 20 limfocita i plazma ćelija.</p>

Legenda: LPM – lamina proprija mukoze (*lamina propria mucosae*)

Tabela 14. Prisustvo eozinofilnih granulocita u u lamini proprij (lamina propria mucosae)

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>Normalan broj eozinofilnih granulocita je oko 2-3 ćelije u posmatranim poljima. Eozonofilni granulociti mogu biti brojniji kod mladih životinja.</p>
<p><u>Blag porast broja eozinofilnih granulocita u LPM</u></p> <p>Blago povećanje broja eozonofilnih granulocita je do oko 5-10 ćelija u posmatranim poljima. Mononuklearne ćelije su dominantna populacija ćelija.</p>
<p><u>Umeren porast broja eozinofilnih granulocita u LPM</u></p> <p>Umereno povećanje broja eozonofilnih granulocita do oko 10-20 u posmatranim poljima. Mononuklearne ćelije ipak dominiraju u tkivnoj populaciji leukocita ili im broj može biti sličan.</p>
<p><u>Značajan porast broja eozinofilnih granulocita u LPM</u></p> <p>Eozonofilni granulociti dominiraju u tkivnoj populaciji leukocita.</p>

Legenda: LPM – lamina proprija mukoze (lamina propria mucosae)

Tabela 15. Prisustvo neutrofilnih granulocita u u lamini proprij (lamina propria mucosae)

<p><u>Normalna sluznica</u></p> <p>Neutrofilni granulociti nisu prisutni.</p>
<p><u>Blago povećanje broja neutrofilnih granulocita u LPM</u></p> <p>Blagi infiltrat (5-10 neutrofilnih granulocita po vidnom polju) u lamini proprij. Mononuklearne ćelije dominiraju.</p>
<p><u>Umereno povećanje broja neutrofilnih granulocita u LPM</u></p> <p>Blagi infiltrat (20-30 neutrofilnih granulocita po vidnom polju) u lamini proprij gde mogu da im se pridruže makrofagi. Neutrofilni granulociti i mononuklearne ćelije prisutne u istom broju.</p>
<p><u>Značajno povećanje broja neutrofilnih granulocita u LPM</u></p> <p>Neutrofilni granulociti su dominantna populacija u vidnom polju i nije ih lako izbrojati. Mogu im se pridružiti makrofagi.</p>

Legenda: LPM – lamina proprija mukoze (lamina propria mucosae)

Na tabelama, i to od tabele 7 do tabele 15, sve promene su definisane na nivou uvećanja mikroskopom od 40 puta.

Korišćeno je prosto numeričko označavanje stepena patohistoloških promena gde je normalno = 0; blago = 1; umereno = 2; značajno = 3. Na ovaj način je omogućeno dobijanje opšteg histološkog rezultata za tkivo od interesa.



### 3. CILJEVI I ZADACI

Cilj ove disertacije je ispitivanje i korelacija kliničkih manifestacija, morfoloških i imunofenotipskih karakteristika limfocitno - plazmocitnog duodenitisa pasa.

U cilju izučavanja kliničkih manifestacija, postavljeni su sledeći zadaci:

- Ispitivanje vrednosti kliničkih, hematoloških i biohemijskih parametara koji omogućavaju izračunavanje vrednosti kliničkih indeksa: CIBDAI i CCECAI
- Radiološka i ultrazvučna dijagnostika
- Endoskopska ispitivanja duodenuma i izvođenje endoskopske biopsije

U cilju razjašnjenja morfogeneze limfocitno - plazmocitnog duodenitisa pasa, postavljeni su sledeći zadaci:

- Patohistološka ispitivanja tkivnih uzoraka duodenuma uzetih endoskopskom biopsijom
- Određivanje distribucije CD3+ (T) i CD79+ (B) limfocita u sluznici duodenuma pasa obolelih od limfocitno - plazmocitnog duodenitisa
- Statistička korelacija kliničkih i morfoloških manifestacija bolesti

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. MATERIJAL**

Ispitivanja su obuhvatila 54 obolela psa, oba pola, uzrasta od 5 meseci do 14 godina, različitih rasa, koji su bili pacijenti ambulatne klinike Fakulteta veterinarske medicine (FVM). U ispitivanje je uključeno i 6 zdravih pasa koji su služili kao kontrola. Prema anamnestičkim podacima, svi oboleli psi su duže od tri nedelje ispoljavali simptome dijareje i/ili povraćanja, neuspešno su lečeni antibioticima i bili su slobodni od crevnih parazita.

Nakon kliničkog pregleda životinje, uzorkovanja krvi za hematološke i biohemijske analize, uzorkovanja fecesa za koprološko ispitivanje, rađen je ultrazvučni pregled životinje, radiološka ispitivanja digestivnog sistema, kao i endoskopski pregled tokom koga su uzimani uzorci tkiva zida duodenuma endoskopski vođenom biopsijom.

Uzorci krvi i fecesa za hematološka, biohemijska i koprološka ispitivanja slati su odmah u laboratoriju klinike FVM. Biopsijski uzorci duodenuma (8 – 10 uzoraka po životinji) odlagani su u bočice sa 10% formalinom i tako prosleđivani u laboratoriju za patologiju FVM.

### **4.2. METODE**

Materijal je obrađen odgovarajućim metodama u okviru:

- Kliničke dijagnostike
- Hematoloških ispitivanja
- Biohemijskih ispitivanja
- Koprološkog ispitivanja
- Ultrazvučne dijagnostike

- Radiološkog ispitivanja
- Endoskopskog ispitivanja uz izvođenje endoskopske biopsije
- Patohistoloških ispitivanja
- Imunohistohemijskih ispitivanja
- Statističke analize

**KLINIČKA ISPITIVANJA.** Korišćeni su metodi adspekcije, palpacije, auskultacije i termometriranje. Habitus životinje je konstatovan korišćenjem metode adspekcije. Trijas (pokazatelj vitalnih funkcija organizma) je određivan korišćenjem svih navedenih metoda. Termometriranjem je konstatovana telesna temperatura životinja.

**HEMATOLOŠKA ISPITIVANJA.** Nakon pripreme kože, uzorkovanje krvi vršeno je iz cefalične (*vena cephalica*) ili jugularne vene (*vena jugularis*) u vacutainer posude sa antikoagulansom (EDTA). Hematološke analize urađene su uz pomoć automatskog hematološkog analizatora (Abacus Junior Vet Hematology Analyzer SN130612, Hungary) u modu predviđenom za pse.

**BIOHEMIJSKA ISPITIVANJA.** Krv namenjena za biohemijska ispitivanja, takođe, je uzorkovana iz cefalične (*vena cephalica*) ili jugularne vene (*vena jugularis*) u vacutainer posude bez antikoagulansa. Nakon koagulisanja krvi, izvršeno je centrifugovanje i izdvajanje seruma, u kome su uz pomoć poluautomatskog biohemijskog spektrofotometra (Vet evolution - Biochemical System International VT00300, Italy) određeni sledeći parametri: aspartat aminotransferaza (AST), alanin transaminaza (ALT), alkalna fosfataza (AP), ukupni proteini i albumini.

**KOPROLOŠKA ISPITIVANJA - KOPROSKOPIJA.** Izmet namenjen kako makroskopskom tako i mikroskopskom pregledu, sakupljan je 72 sata i držan u frižideru do ispitivanja.

Makroskopski su posmatrani: konzistencija, boja, miris fecesa kao i prisustvo stranih primesa - krvi, sluzi, gnoja, čitavih helminata ili njihovih delova.

Mikroskopska ispitivanja bazirala su se na kvalitativnoj metodi flotacije. Flotacijom, rastvorima velike gustine, postiže se izdvajanje parazitskih elemenata iz izmeta i njihovo koncentrisanje u veoma maloj zapremini. Kao rastvori za flotaciju u rutinskoj dijagnostici koriste se zasićeni vodeni rastvor natrijum-hlorida i zasićeni vodeni rastvor cink-sulfata. Prvi rastvor je manje gustine (1180 – 1200 g/l) i u stanju je da isflotira tzv. laka jaja helminata i većinu oocista kokcidija. Rastvor cink-sulfata (gustina 1400 g/l) primenjuje se za flotiranje tzv. teških jaja helminata. Jaja parazita *Toxocara canis* spadaju u laka jaja. Jaja parazita *Trichuris vulpis* spadaju u teška jaja.

Za izvođenje metode flotacije koristi se sledeći pribor: rastvor za flotaciju, posude za rastvaranje izmeta, cediljka, epruvete sa stalkom, predmetnice i pokrovnice. Postupak rada je sledeći: 5 – 10 g izmeta se isitni i homogenizuje u rastvoru za flotaciju, procedi kroz cediljku i sadržaj prespe u epruvete, formira se konveksan nivo tečnosti tako da pokrovnica koja se odmah postavi u potpunosti naleže na površinu suspenzije. Po isteku 20 – 30 minuta očitavaju se rezultati.

„SensPERT Giardia Test Kit“ (IDEXX laboratories, USA), funkcioniše na principima imunohromatografije, a namenjen je za detektovanje antigena *Giardia lamblia* u fecesu. Dva antitela (At) u kitu se specifično vezuju za različite epitope antigena (Ag) *Giardia lamblia*. Pošto celulozna podloga upije antigene *Giardia lamblia*, oni migriraju dok se ne vežu za antitelo koje se već nalazi u podlozi te tako nastaje kompleks antitelo – antigen (At - Ag). Za taj kompleks se sada vezuje drugo antitelo iz podloge formirajući sendvič At - Ag - At što se može očitati kao crtica na podlozi od celuloze na kojoj se izvodi test.

**ULTRAZVUČNA ISPITIVANJA.** Za ultrazvučni pregled korišćen je ultrazvučni aparat ALOCA 2000 i sonda od 5MHz.

Da bi se izveo ultrazvučni pregled, neophodna je prethodna priprema pacijenta koja podrazumeva uskraćivanje hrane od 12 do 24 sata pre pregleda. Pas se postavlja u leđni položaj sa maksimalno ispruženim zadnjim ekstremitetima. Polje pregleda je prethodno

pripremljeno brijanjem dlake. Po stavljanju gela na pripremljeno polje može se pristupiti ultrazvučnom pregledu.

**RADIOLOŠKA ISPITIVANJA.** Za radiološki pregled je korišćen aparat SELENOS 4, EI Niš. Radiološka ispitivanja su uključila nativni rendgenski pregled abdomena i specijalni rendgenski pregled duodenuma sa pozitivnim kontrastnim sredstvom (60% vodena suspenzija barijum-sulfata).

Priprema pacijenta za pregled se sastojala u jednodnevnom gladovanju, bez ograničavanja unošenja tečnosti. Aplikovana je klizma od 2 do 4 časa pre pregleda, u cilju evakuacije crevnog sadržaja.

Aplikacija pozitivnog kontrasta se može izvršiti ako je, neposredno pre aplikacije kontrasta, životinji stavljen u usta „drveni zalogaj“. „Drveni zalogaj“ se fiksira za donju i gornju vilicu, a prilagođen je izgledu tvrdog nepca i veličini usne duplje pacijenta. Kroz fiksirani „zalogaj“ se plasira gumena sonda u visini farinksa. Pomeranjem sonde napred - nazad, nadraži se sluzokoža, što dovodi do akta gutanja i prolaska sonde u jednjak. Sonda se zatim lagano potisne u želudac. Po izvršenoj kontroli da li je sonda u želucu, tj. da nije eventualno u traheji, lagano se aplicira kontrastno mleko. Količina aplicirane kaše barijum - sulfata iznosi 6 - 10 ml/kg telesne mase. Aplikacija se vrši pomoću brizgalice koja je fiksirana za kraj sonde u porcijama 10 - 20 ml. Po završenoj aplikaciji, sonda se izvlači iz jednjaka, skida se „zalogaj“ i nastavlja pregled.

Tehnički uslovi za rendgenografiju podrazumevaju tačno određenu kondiciju za snimanje i definisane projekcije u kojima se snimanje vrši. Kondicije za snimanje (KV i mAs) su prilikom snimanja bile prilagođene veličini svake životinje. Projekcije za snimanje su standardna LL (latero – lateralna) i VD (ventro – dorzalna) projekcija.

Koristili smo sledeći vremenski program :

- Prvi rendgenogram – nativni snimak, tj. pre davanja kontrasta
- Drugi rendgenogram – neposredno po aplikaciji kontrasta
- Treći rendgenogram – 1 sat posle aplikacije kontrasta
- Četvrti rendgenogram – 3 - 4 sata posle aplikacije kontrasta

- Peti rendgenogram – 5 - 6 sati posle aplikacije kontrasta
- Šesti rendgenogram – 24 sata posle aplikacije kontrasta

Ovaj vremenski program rendgenografije predstavlja načelnu šemu za snimanje kod pregleda digestivnog sistema pasa kao i drugih domaćih karnivora. Nije uvek potrebno da se načini svih šest rendgenograma.

**ENDOSKOPSKA ISPITIVANJA.** Za endoskopski pregled korišćen je endoskop sa video kamerom STORC, koji se sastoji od endoskopa (prečnika 9 mm), radnog kanala (prečnika 2,2 mm i dužine 140 cm) i izvora svetla. Za izvođenje endoskopske biopsije je korišćen biopser „aligator“.

Pre ovog zahvata obavezna je priprema pacijenta koja podrazumeva uskraćivanje hrane u periodu od 12 do 24 sata pre pregleda, kao i uskraćivanje vode 4 sata pre pregleda.

Endoskopski pregled se izvodi u opštoj inhalacionoj anesteziji. Premedikacija se postiže intravenskom (i.v.) aplikacijom diazepama (u dozi od 0,5 mg/kg) ili i.v. aplikacijom kombinacije midazolama (u dozi od 0,4 mg/kg) i butorfanola (u dozi od 0,2 mg/kg). Indukcija se vrši i.v. aplikacijom propofola (u dozi od 4 mg/kg), a nakon intubacije održavanje opšte inhalacione anestezije se sprovodi izofluranom (u koncentraciji od 1,5% do 2%).

Nakon uvođenja u anesteziju, životinja se postavlja u levi bočni položaj, postavlja se otvarač za usta i pristupa se pregledu. Glava i vrat pacijenta su maksimalno ispruženi, endoskop je usmeren centralno kroz orofarinks i ide dorzalno do larinksa tako da se dobro uočava kranijalni ezofagealni sfinkter. Ovaj sfinkter predstavlja ulaz u ezofagus, normalno je zatvoren i vidi se kao naborana mukoza zvezdastog oblika. Insuflacijom vazduha i blagim pritiskom vrha endoskopa na kranijalni ezofagealni sfinkter, vrh endoskopa lako napreduje u vratni deo jednjaka. Po pregledu jednjaka i želuca, endoskop se uvodi u duodenum. Da bi se ušlo u duodenum, vrh endoskopa treba dovesti do pilorusa. Pilorus se otvara lakim pritiskom endoskopa uz povremenu insuflaciju vazduha i/ili ispiranje vodom, što olakšava prolaz endoskopa u duodenum. Vrh endoskopa obično izaziva prolazno „crvenilo“ zida pilorusa ili duodenuma pri prolasku kroz njih. Da bi se video lumen duodenuma, insuflira se mala količina vazduha i vrh endoskopa se povuče za nekoliko

milimetara unazad. Sluznica duodenuma tada postaje lako vidljiva pri čemu intestinalne resice dobijaju izgled somota. Svetlost sa vrha endoskopa odbija se od vrhova resica, često dajući odsjaj. Pod blagim pritiskom, vrh endoskopa prolazi kroz lumen duodenuma koliko je god moguće, uz minimalnu insuflaciju vazduha. Normalna peristaltika tankih creva obično olakšava dalji prolaz vrha endoskopa, a često je potrebno 2 - 3 minuta da bi endoskop stigao na željeno mesto. Ponekad endoskop zastane dok prolazi iz proksimalnog duodenalnog segmenta u descendentni deo duodenuma.

Tkivni uzorci sluznice duodenuma uzimaju se endoskopski vođenom biopsijom. Mukoza tankih creva nije kompaktna, te se uzorci uzimaju forcepsom koji na vrhu ima šolje. Koristi se tehnika biopsije koja se vrši tako što se šolje forcepsa mogu otvoriti čim prođu vrh endoskopa. Forceps se gura napred dok se ne naiđe na otpor. Krvarenja su obično minimalna.

Biopsijski uzorci se, u odnosu na kvalitet uzorka, mogu klasifikovati na adekvatne, marginalne i neadekvatne.

Biopsijom je uzimano 8 - 10 uzoraka tkiva od svakog psa. Uzorci tkiva su pažljivo skidani sa biopsijskog forcepsa i pripremani na način kojim se izbegavaju artefakti. Uzorak je skidan sa forcepsa korišćenjem hipodermalne igle, pri čemu se vodilo računa da se ne stvori artefakt istezanjem ili kidanjem mukoze. Uzorci su fiksirani u pufersanom formalinu.

**PATOHISTOLOŠKA ISPITIVANJA.** Uzorci duodenuma (8 - 10 tkivnih isečaka od svakog psa) koji su dobijeni endoskopskom biopsijom, a određeni za patohistološka i imunohistohemijska ispitivanja, fiksirani su u 10% neutralnom formalinu u trajanju od 48 sati do 72 sata. Posle fiksiranja tkivo je procesovano u automatskom tkivnom procesoru (dehidracija kroz seriju alkohola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i zatim uklopljeno u parafinske blokove sa mrežicom za biopsijske uzorke. Parafinski isečci debljine od 3 µm do 5 µm bojeni su rutinskom hematoksilin - eozin (HE) metodom.

Patohistološka ispitivanja su uključila detaljan opis morfoloških promena na biopsiranim uzorcima sluznice duodenuma (promene na crevnim resicama, stepen oštećenja crevnog epitela, postojanje proširenja kripte, prisustvo dilatiranih limfnih sudova i fibroze)

kao i praćenje zastupljenosti intraepitelnih limfocita (IEL), limfocita, plazma ćelija, eozinofilnih granulocita i neutrofilnih granulocita u infiltratu sluznice.

**IMUNOHISTOHEMIJSKA ISPITIVANJA.** Imunohistoheмиjska ispitivanja su vršena na parafinskim isečcima zida duodenuma, prethodno fiksiranim u formalinu. Korišćena je streptavidin - biotin imunohistoheмиjska metoda (LSAB2) u cilju izučavanja ekspresije ćelija pozitivnih na CD3+ (T limfocita) i CD79+ (B limfocita). Podaci o razređenju primarnih antitela, inkubaciji i metodi demaskiranja antigena prikazani su u tabeli 16.

Tabela 16. Primarna antitela korišćena za imunohistoheмиjske analize

Primarno antitelo	Razređenje	Inkubacija	Demaskiranje antigena
Monoclonal rabbit - antihuman CD3 (DAKO A 0452)	1:50	60 minuta/18 C	Citratni pufer pH = 6 560W/21minut
Monoclonal mouse - antihuman CD79 (DAKO M 7051)	1:50	60 minuta/18 C	Citratni pufer pH = 6 560W/21minut

U deparafinisanim i prosvetljenim tkivnim isečcima je najpre izvršeno demaskiranje antigena, maskiranih fiksiranjem u formalinu. Demaskiranje CD3 i CD79 antigena vršeno je zagrevanjem u mikrotalasnoj peći na 560W u trajanju od 21 minut, u citratnom puferu pH = 6. Endogena peroksidaza blokirana je u 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu, na temperaturi od 18<sup>0</sup>C u trajanju od 15 minuta. Sva ispiranja i razblaženja tokom reakcije rađena su u PBS-u pH = 7,2 - 7,4. Preinkubacija je vršena u 10% normalnom kozjem serumu u PBS-u, u trajanju od 20 minuta. Odmah zatim isečci su inkubirani primarnim antitelima i



odgovarajućim kitom za vizuelizaciju. Za detekciju je korišćen kit: DAKO Cytomation LSAB2 System-HRP (DAKO, K 0675). Antigen - antitelo kompleks koji je nastao u tkivu postao je vidljiv primenom hromogena diaminobenzidina (DAB+, Dako, K3468) u trajanju od 10 do 15 minuta. Na mestu pozitivne reakcije javlja se precipitat smeđe boje. Kontrastiranje isečaka izvršeno je u hematoksilinu (Mayer-ov hematoksilin) u trajanju od nekoliko sekundi. Nakon bojenja iseći su montirani pomoću vodenog medijuma za montiranje Glycergel (Dako, C563). Kao negativna kontrola korišćeni su istovetni tkivni iseći koji nisu tretirani primarnim antitelima. Kao pozitivna kontrola korišćeni su tkivni iseći kod kojih je prethodno imunohistohemijski potvrđeno prisustvo ispitivanih antigena.

STATISTIČKA ANALIZA. U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog istraživanja kao osnovne statističke metode koristili smo deskriptivne statističke parametre. Ovi parametri su nam omogućili opisivanje dobijenih rezultata i njihovo tumačenje. Od deskriptivnih statističkih parametara koristili smo: aritmetičku sredinu, standardnu devijaciju, standardnu grešku, interval varijacije i koeficijent varijacije. Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika između ispitivanih grupa koristili smo dva testa. Prvi test koji smo koristili, potpuno slučajan plan (ANOVA), je grupni test i na osnovu njega smo ustanovljavali postojanje signifikantnih razlika između posmatranih grupa ukupno. Drugi test koji je korišćen je pojedinačni, Tukey test ili t-test, pomoću kojih su ustanovljavane statistički signifikantne razlike između grupa pojedinačno. Signifikantnost razlika ustanovljavana je na nivoima značajnosti od 5% i od 1%. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u statističkom paketu PrismaPad 4.00.

## 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 5.1. KLINIČKI NALAZ

#### OPŠTI PREGLED

##### Anamneza

Uzeta je anamneza za svakog od 54 obolela psa. Ovako dobijeni podaci bili su iskorišćeni za izračunavanje kliničkih indeksa CIBDAI i CCECAI. Podaci su navedeni u tabelama 17, 18, 19 i 20.

Tabela 17. Podaci dobijeni anamnezom potrebni za izračunavanje indeksa CIBDAI

Anamnestički podaci	Skala promena	Broj životinja
A Ponašanje	0	4
	1	33
	2	17
	3	0
B Apetit	0	4
	1	36
	2	14
	3	0

Anamnestički podaci	Skala promena	Broj životinja
C Povraćanje	0	19
	1	35
	2	0
	3	0
D Konzistencija stolice	0	0
	1	41
	2	13
	3	0

Anamnestički podaci	Skala promena	Broj životinja
E Učestalost defekacije	0	4
	1	24
	2	26
	3	0

Anamnestički podaci	Skala promena	Broj
F Gubitak težine	0	3
	1	36
	2	15
	3	0

Tabela 18. Izračunate vrednosti indeksa CIBDAI

Vrednost indeksa CIBDAI	Broj pasa
0 - 3	3
4 - 5	11
6 - 8	29
$\geq 9$	11

Za izračunavanje indeksa CCECAI, osim anamnestičkih podataka navedenih u tabeli 17, korišćeni su i anamnestički podaci navedeni u tabeli 19, kao i rezultati biohemijske analize krvi (koncentracija serumskih albumina) koji su navedeni u tabeli 22.

Tabela 19. Dodatni anamnestički podaci potrebni za izračunavanje indeksa CCECAI

Anamnestički podaci	Skala promena	Broj životinja
G Koncentracija serumskih albumina	0	49
	1	5
	2	0
	3	0
H Ascites i periferni edemi	0	54
	1	0
	2	0
	3	0
I Pruritus	0	51
	1	3
	2	0
	3	0

Pošto je CCECAI izračunat kao zbir, tj.  $CCECAI = A + B + C + D + E + F + G + H + I$ , uočava se da se vrednost CCECAI poklapa sa vrednošću CIBDAI, kod svih osim kod 8 pasa. Od toga, kod 5 pasa je koncentracija serum albumina između 15 g/l i 19,9 g/l, te im je vrednost parametra G jednaka jedinici. Kod 3 psa je uočena poneka epizoda češanja te im je vrednost parametra I jednaka jedinici. Takav rezultat i kod ovih osam pasa dovodi do uvećanja njihovog indeksa CCECAI za 1 poen.

Tabela 20. Izračunate vrednosti indeksa CCECAI

Vrednost indeksa CCECAI	Broj pasa
0 - 3	3
4 - 5	9
6 - 8	31
9 - 11	10
≥ 12	1

### Habitus

Kliničkim pregledom je ustanovljena loša kondicija pasa kao i stanje loše uhranjenosti. Kod 51 od 54 ispitivana psa, konstatovan je gubitak težine (tabela 17). Konstitucija, telesna građa i položaj tela u prostoru su bez osobenosti. Temperament je izmenjen kod 50 od 54 životinja što je prikazano u tabeli 17.

### Trijas

Trijas je određen na osnovu vrednosti za telesnu temperaturu, puls i disanje. Trijas je bio u granicama normale kod svih životinja.

### **SPECIJALNI PREGLED**

Nakon opšteg pregleda životinje, pristupilo se specijalnom pregledu, odnosno detaljnom ispitivanju pojedinih organa i organskih sistema. Pri pregledu kože i dlačnog pokrivača uočena su određena odstupanja. Kod 47 pasa uočena je promena u elastičnosti kože (proba se izvodi na leđima) i procenjena je dehidracija od 5% do 10%. Pri pregledu dlačnog pokrivača kod 48 pasa ustanovljeno je lakše čupanje dlake. Pri pregledu ostalih organa i organskih sistema nisu uočene promene.

## 5.2. HEMATOLOŠKI NALAZ

Vrednosti hematoloških parametara kod ispitivanih pasa, kao i referentne vrednosti za zdrave pse prikazani su u tabeli 21.

Tabela 21. Vrednosti hematoloških parametara kod ispitivanih pasa kao i referentne vrednosti za zdrave pse

Psi su, radi bolje preglednosti, razvrstani na osnovu kasnije postavljene patohistološke dijagnoze. Za prva 3 psa (sa brojevima 1-3) postavljena je dijagnoza eozinofilnog duodenitisa, za narednih 46 je postavljena dijagnoza limfocitno - plazmocitnog duodenitisa (od toga kod 2 psa sa rednim brojevima 4 i 5 dominiraju plazma ćelije, kod pasa sa brojevima od 6 do 36 dominiraju limfociti, kod 13 pasa obeleženih brojevima od 37 do 49 uočen je mešoviti limfocitno - plazmocitni infiltrat), dok je kod 5 pasa sa brojevima od 50 do 54, postavljena dijagnoza kataralnog duodenitisa. Šest pasa sa brojevima od 55 do 60 predstavljaju kontrolnu grupu.

	Leukociti x 10 <sup>9</sup> /l	Limfociti x 10 <sup>9</sup> /l	Eozinofili %	Eritrociti x 10 <sup>12</sup> /l
Referentne vrednosti	6-17	1-4,8	0-2	5,5-8,5
Pas 1	10,95	2,9	3,5	6,62
2	16,81	4,1	4,9	6,85
3	12,02	3,8	4,2	5,98
4	17,10	5,2	2,2	6,23
5	18,95	5,6	2,1	6,12
6	17,95	5,4	0,1	7,59
7	17,98	5,5	0,3	7,20
8	19,75	5,9	0,2	6,90
9	20,12	7,2	0,2	6,79
10	18,72	6,1	0,1	6,95
11	18,95	6,2	0,1	6,02

12	19,02	7,1	0,9	6,75
13	17,68	5,3	0,5	7,20
14	19,21	6,1	0,2	7,15
15	18,05	6,0	0,1	7,12
16	19,63	6,9	0,5	6,73
17	19,82	6,9	0,7	6,09
18	18,51	6,5	0,2	7,90
19	20,02	7,5	0,3	7,15
20	19,03	7,1	0,1	7,70
21	19,59	6,9	0,1	6,72
22	18,95	6,1	0,5	6,49
23	18,35	7,5	0,5	6,98
24	18,21	6,9	0,1	7,02
25	17,95	7,2	0,3	7,65
26	19,97	7,3	0,2	7,01
27	19,64	7,2	0,1	6,20
28	18,95	6,8	0,2	6,63
29	18,75	6,6	0,4	6,72
30	17,52	4,9	0,1	7,18
31	18,12	5,4	0,5	6,95
32	18,53	5,5	0,3	7,74
33	18,02	5,3	0,2	7,95
34	18,21	5,9	0,1	8,05
35	19,50	6,8	1,2	6,96
36	20,72	7,1	1,5	5,65
37	21,65	8,5	0,1	5,70
38	22,05	9,1	0,9	6,12
39	19,73	6,8	0,1	6,05
40	23,05	8,1	0,2	5,95
41	21,92	6,8	0,5	6,28
42	19,01	6,9	0,1	6,33
43	22,12	6,7	0,5	5,92
44	21,15	8,1	0,6	5,80
45	18,03	6,9	0,1	5,75

46	21,12	7,8	0,7	6,51
47	20,25	6,9	0,2	7,21
48	17,95	5,8	0,3	6,98
49	19,25	7,8	0,2	6,12
50	16,90	4,5	0,1	7,29
51	17,95	3,9	0,2	8,10
52	18,12	4,2	0,1	7,65
53	18,15	4,9	0,1	7,35
54	19,02	3,8	0,1	6,08
55	9,05	3,5	0,2	6,95
56	12,01	2,7	0,4	7,67
57	6,52	4,7	0,2	5,70
58	18,12	2,5	1,1	8,20
59	10,70	1,5	0,5	7,53
60	12,98	4,0	0,2	6,82

### 5.3. BIOHEMIJSKI NALAZ

Rezultati biohemijskih analiza prikazani su u tabeli 22.

Tabela 22. Rezultati biohemijske analize krvi ispitivanih pasa, kao i referentne vrednosti za zdrave pse

Psi su, radi bolje preglednosti, razvrstani na osnovu kasnije postavljene patohistološke dijagnoze. Za prva 3 psa (sa brojevima 1-3) postavljena je dijagnoza eozinofilnog duodenitisa, za narednih 46 je postavljena dijagnoza limfocitno - plazmocitnog duodenitisa (od toga kod 2 psa sa rednim brojevima 4 i 5 dominiraju plazma ćelije, kod pasa sa brojevima od 6 do 36 dominiraju limfociti, kod 13 pasa obeleženih brojevima od 37 do 49 uočen je mešoviti limfocitno - plazmocitni infiltrat), dok je kod 5 pasa sa brojevima od 50 do 54, postavljena dijagnoza kataralnog duodenitisa. Šest pasa sa brojevima od 55 do 60 predstavljaju kontrolnu grupu.



	ALT	AST	AP	Ukupni proteini	Albumini
Referentne vrednosti	10-50 U/L	10-58 U/L	do 190 U/L	50-80 g/L	28-40 g/L
1	38	18	90	55	35
2	12	26	78	55	32
3	25	47	85	53	32
4	42	50	146	52	29
5	49	55	164	53	29
6	39	49	50	50	29
7	16	27	83	51	29
8	27	21	25	47	26
9	38	40	158	39	19
10	48	50	91	45	26
11	37	36	95	46	26
12	23	30	109	45	26
13	12	21	99	52	29
14	21	15	41	51	27
15	29	31	23	51	30
16	34	20	25	51	27
17	42	45	115	45	25
18	25	29	150	50	29
19	38	40	132	45	24
20	15	20	90	42	25
21	18	21	89	42	25
22	26	24	70	45	26
23	42	49	56	40	26
24	36	45	120	39	25

25	12	21	96	41	27
26	45	30	112	39	23
27	38	41	65	40	25
28	27	29	48	41	25
29	22	29	93	48	27
30	35	41	132	53	30
31	39	38	21	45	27
32	38	35	48	52	27
33	15	12	95	55	29
34	38	21	74	56	31
35	22	29	67	40	26
36	12	41	80	41	24
37	27	20	120	38	18
38	49	40	75	40	21
39	36	31	112	38	26
40	37	24	130	37	18
41	16	25	96	39	19
42	42	29	78	50	29
43	15	21	115	39	19
44	21	12	56	41	22
45	45	28	81	50	27
46	23	45	57	40	21
47	18	36	48	43	26
48	19	25	105	54	29
49	26	18	98	51	29
50	39	29	80	55	31
51	23	50	95	52	30
52	27	24	47	56	32

53	48	41	78	65	32
54	26	12	96	70	35
55	37	23	121	65	31
56	27	39	73	72	38
57	39	45	96	55	30
58	22	12	118	76	37
59	12	38	54	58	33
60	42	39	38	69	36

Rezultate ispitivanja biohemijskih parametara krvi pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa možemo predstaviti i na način prikazan u tabeli 23.

Tabela 23. Rezultati ispitivanja biohemijskih parametara krvi pasa obolelih od LPD (obeleženi kao LPD psi) i kontrolne grupe pasa

		ALT (IU/l)	AST (IU/l)	AP (IU/l)	Ukupni proteini (g/L)	Albumini (g/L)
$\bar{X}$	LPD psi	29.87	31.28	87.67	45.48 <sup>a</sup>	25.70 <sup>a</sup>
	Kontrolna grupa	29.83	32.67	83.33	65.83 <sup>a</sup>	32.50 <sup>a</sup>
SD	LPD psi	11.24	11.07	36.33	5.605	3.379
	Kontrolna grupa	11.58	12.50	34.07	8.134	3.507
SE	LPD psi	1.657	1.632	5.357	0.8263	0.4982
	Kontrolna grupa	4.729	5.103	13.91	3.321	1.432
CV (%)	LPD psi	37.63	35.39	41.44	12.32	13.15

	Kontrolna grupa	38.83	38.27	40.88	12.36	10.79
$X_{\min}$	LPD psi	12	12	21	37	18
	Kontrolna grupa	12	12	38	55	28
$X_{\max}$	LPD psi	49	55	164	56	31
	Kontrolna grupa	42	45	121	76	37

Ista slova pokazuju statistički značajnu razliku između obolelih pasa i pasa iz kontrolne grupe za ukupne proteine i albumine. Slovo  $a = p \leq 0,01$ .

#### 5.4. KOPROLOŠKI NALAZ

Iako je jedan od kriterijuma pri odabiru pasa, za potrebe ovog istraživanja, bio negativan test na prisustvo crevnih parazita, urađene su ponovne analize na prisustvo parazita *Toxocara canis*, *Trichuris vulpis* i *Giardia lamblia*. Rezultati su prikazani u tabeli 24.

Tabela 24. Rezultati koprološkog istraživanja

Broj životinja kod kojih su u fecesu nađena jaja <i>Trichuris vulpis</i>	/
Broj životinja kod kojih je u fecesu potvrđeno prisustvo antigena <i>Giardia lamblia</i>	/
Broj životinja kod kojih su u fecesu nađena jaja <i>Toxocara canis</i>	/
Broj životinja kod kojih nisu pronađeni paraziti	60

## 5.5. ULTRAZVUČNI NALAZ

### 5.5.1. Kontrolna grupa

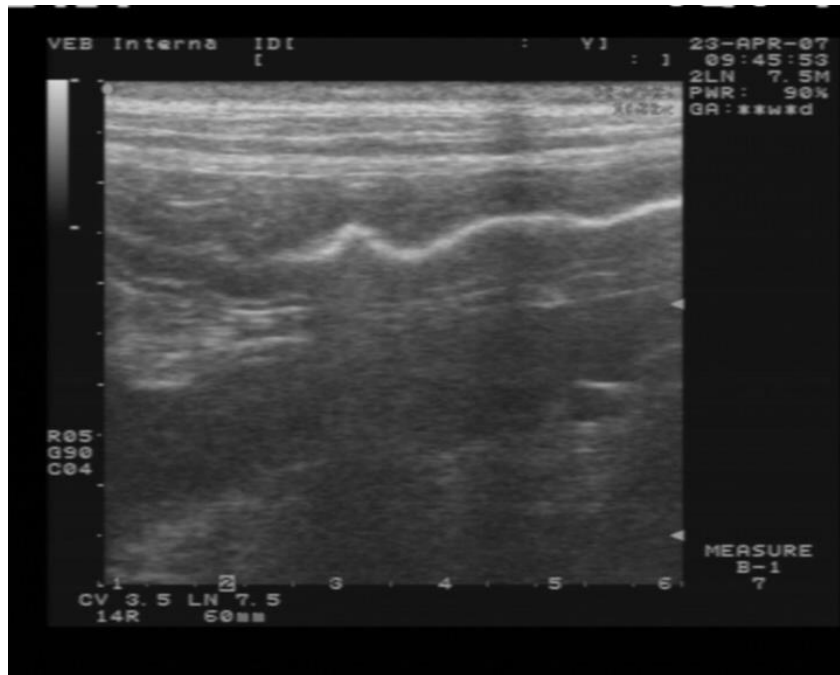
Ultrazvučni nalaz kod pasa kontrolne grupe je bio bez osobnosti.

### 5.5.2. Oboleli psi

Ultrazvučni pregled abdomena je obavljen kod 54 obolela psa. Ultrazvučnim pregledom creva, kod obolelih pasa zapažen je valovit izgled zida duodenuma (slika 1). Kod 40 pasa mukoza je izrazito hipoehogena i debljina zida je oko 6 mm. Kod 5 pasa je debljina zida tankih creva u granicama normale (oko 3 mm). Kod 3 psa se zapažaju sitna zrnasta beličasta polja na zadebljalom zidu creva, a debljina zida creva je oko 6 mm (slika 2).



Slika 1. Uvećana debljina zida creva



Slika 2. Valovit izgled zida duodenuma

## 5.6. RADIOLOŠKI NALAZ

### 5.6.1. Kontrolna grupa

Rendgenski nalaz kod pasa kontrolne grupe je bio bez osobenosti.

### 5.6.2. Oboleli psi

Na rendgenskim snimcima duodenuma urađenim u VD i LL projekciji uz upotrebu pozitivnog kontrastnog sredstva ustanovili smo spastičnost i neujednačenost lumena creva kod svih ispitivanih jedinki, a naročito kod 46 slučajeva.

U najvećem broju slučajeva promene su dijagnostikovane bulbarno, granica metalne senke barijum sulfata sa okolnim senkama mekog tkiva je narezuckana, diskontinuirana i magličasta. Reljef sluzokože je deformisan zbog postojanja spazma i edema, pa ona dobija mramorisan izgled usled barijumskih depozita prilepljenih uz hipertrofične nabore mukoze. Zbog prisustva sluzi, krvi i deskvamiranog epitela, zapažena je pahuljasta flokulacija (fragmentacija) kontrastne smeše na sloj sluznog pokrivača, sa duplom konturom zida duodenuma.

Kod 3 psa kod kojih je postojala osnovana sumnja na limfangiektaziju, ustanovljene su sledeće promene: laka dilatacija lumena, minimalna segmentacija, a uvećani folikuli su davali utisak da je sluzokoža pseudo-polipoidnog ili nodularnog izgleda. Akumulacija gasa u vidu transparentnih polja, bila je redovan pratilac ovih zapaljenskih promena.

Osim morfoloških, rendgenskom dijagnostikom su ustanovljeni i motorni i sekretorni poremećaji dvanaestopalačnog creva. Oni su se manifestovali njegovom hiperperistaltikom i ubrzanom pasažom kontrasta prema kaudalnim partijama tankih creva, tako da se kod 39 pasa duodenum u rendgenskoj slici pojavljivao već nekoliko minuta nakon administracije barijuma, umesto posle 20 do 30 minuta.

## 5.7. ENDOSKOPSKI NALAZ

### 5.7.1. Kontrolna grupa

Pri endoskopskom pregledu kontrolne grupe pasa zapaža se crvenkasta do žutocrvena ravnomerna obojenost mukoze. Nema prisustva ni pene niti sluzi.

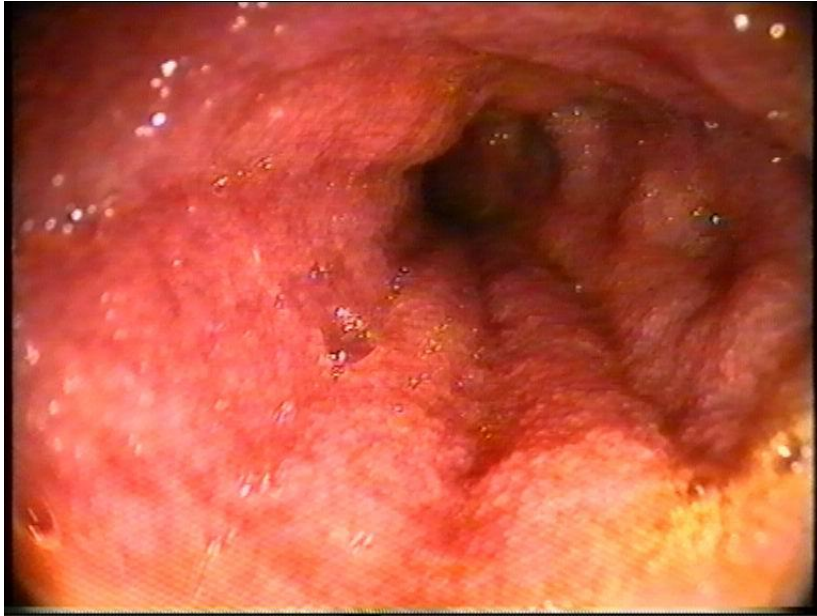
### 5.7.2. Oboleli psi

Pri endoskopskom pregledu obolelih pasa (slika 3), u lumenu se uočava dosta žućkasto-beličaste pene (slika 4). Kod obolelih pasa, zapažena je hiperemičnost i edem sluznice duodenuma (slika 5). Zbog toga je sluznica izgledala somotasto i to ili celom dužinom ili, pak, parcijalno. Pri biopsiji sluznica je lako krvarila. Kod 18 pasa je sluznica duodenuma bila manje hiperemična, ali sa edematoznim poljima. Kod 3 psa se mogla uočiti jaka hiperemija i edem sluznice duodenuma, a na njoj površini su se zapažala sitno zrnasta polja, bele boje, posuta po sluznici i veličine zrna pirinča (slika 6). Sa ovako promenjenih mesta su uzeti biopsijski uzorci.



Slika 3. Izvođenje endoskopije psa

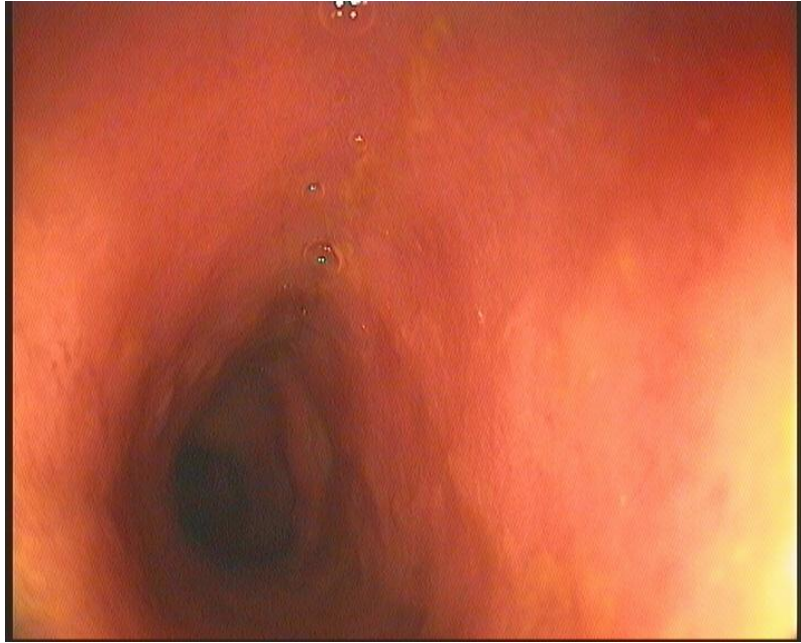




Slika 4. Žučkasto beličasta pena u lumenu duodenuma



Slika 5. Hiperemija i edem sluznice duodenuma



Slika 6. Sitno zrnasta polja na površini sluznice duodenuma

## 5.8. PATOHISTOLOŠKI NALAZ

### 5.8.1. Kontrolna grupa

Histološkim pregledom zida duodenuma zdravih pasa uočavaju se uniformne crevne resice, sa očuvanim crevnim epitelom. Kripte su uglavnom malog lumena, osim pojedinačnih kripta koje su umereno dilatirane. Centralni lakteal zauzima do 25% širine lamine proprije resice, na uzdužnom preseku. U lamini propriji se zapaža mali broj pojedinačnih limfocita, plazma ćelija i po koji eozinofil. Između kripta nalaze se 1-2 limfocita ili plazma ćelije. U epitelnom sloju se mogu naći pojedinačni intraepitelni limfociti.

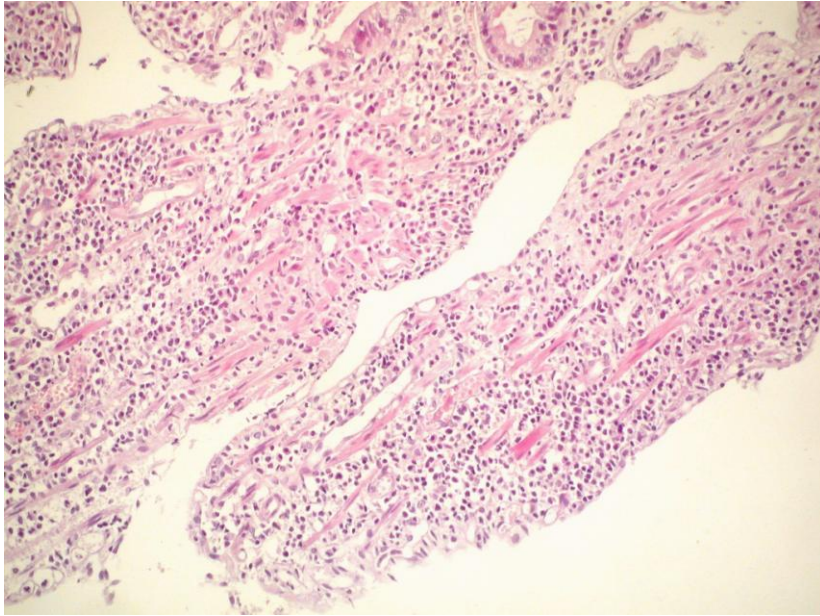
### 5.8.2. Oboleli psi

Patohistološkim pregledom tkivnih uzoraka sluznice duodenuma obolelih pasa, izdvojile su se tri grupe patomorfoloških promena: prva grupa uzoraka su uzorci u kojima

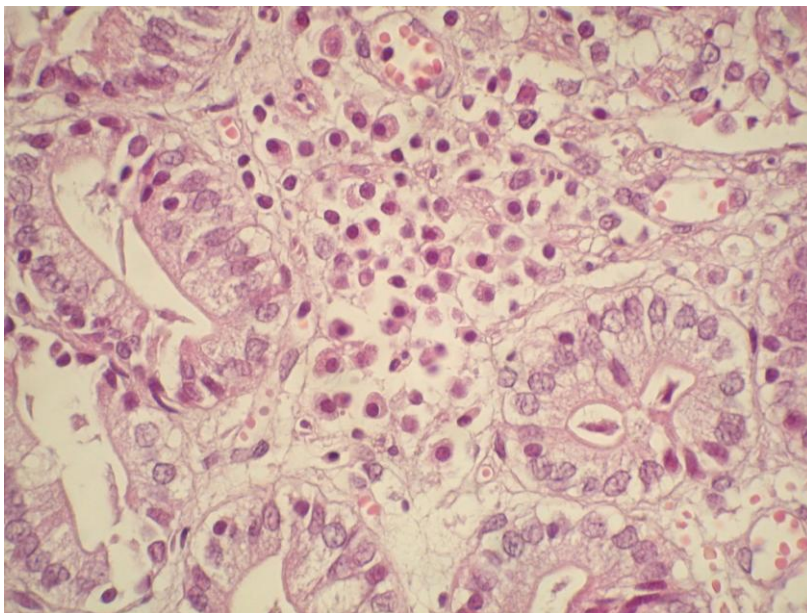
postoji infiltrat u lamini propriji sluznice duodenuma u kome dominiraju limfociti i plazma ćelije (46 slučajeva); u drugoj grupi uzoraka, takođe postoji infiltrat, ali sastavljen pretežno od eozinofilnih granulocita (3 slučaja), dok u trećoj grupi uzoraka nema ćelijskog infiltrata u sluznici duodenuma (5 slučajeva).

Detaljnim opisom morfoloških promena na biopsijskim uzorcima sluznice duodenuma (promene na crevnim resicama, stepen oštećenja crevnog epitela, postojanje proširenja kripti, prisustvo dilatiranih limfnih sudova i fibroze) kao i praćenjem zastupljenosti intraepitelnih limfocita (IEL), limfocita, plazma ćelija, eozinofilnih granulocita i neutrofilnih granulocita u infiltratu sluznice, došlo se do dole opisanih rezultata.

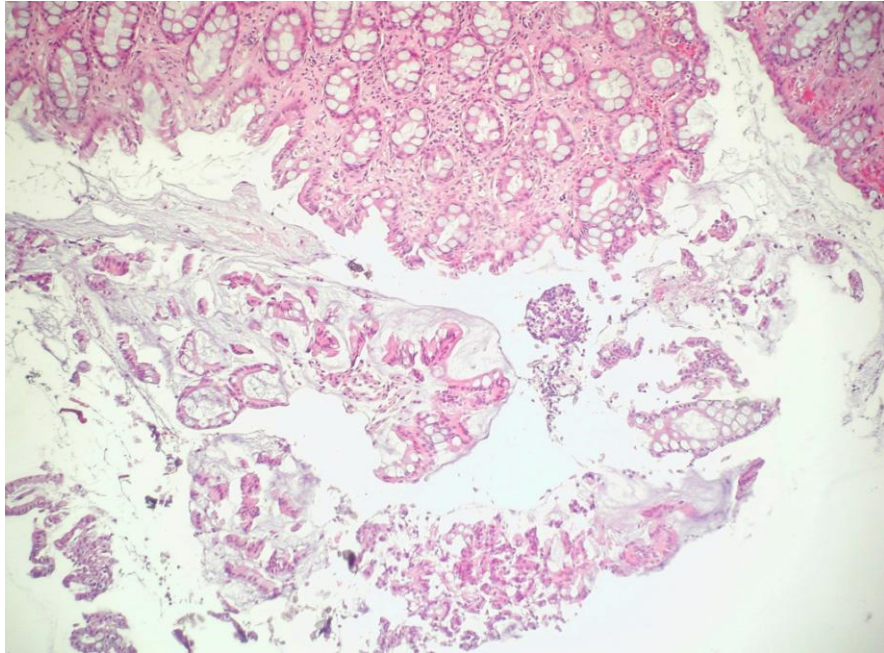
U **prvoj grupi** uzoraka u kojoj dominiraju limfociti i plazma ćelije, uočene su promene na crevnim resicama koje su okarakterisane kao blage do umerene. Dužina crevnih resica je redukovana na 75-50% njihove normalne dužine. Crevne resice su zadebljale, a neke su fuzionisane - međusobno spojene (slika 7). Promene na crevnom epitelu su okarakterisane kao blago do umereno oštećenje epitela. Na enterocitima i epitelnim ćelijama crevnih kripti zapažaju se degenerativne promene (slika 8), kao i deskvamacija epitelne ćelije (slika 9). Zapaženo je blago do umereno proširenje kripti (10% do 25% kripti je prošireno). Kripte su izmenjenog, nepravilnog oblika i ispunjene su detritusom (slika 10). Limfni sudovi resica su prošireni, i to od blago do umereno proširenih (centralni lakteal zahvata 50% do 75% crevne resice po širini, na uzdužnom preseku). *Lamina propria mucosae* je edematozna zbog prisustva obilnog ćelijskog infiltrata. U lamini propriji duodenuma, kod 46 pasa, uočena je infiltracija velikim brojem mononuklearnih ćelija, u kojima dominiraju limfociti i plazma ćelije. Limfociti su uglavnom difuzno rasuti u lamini propriji, dok plazma ćelije, sa ekscentrično postavljenim jedrima, obično u grupama ispunjavaju laminu propriju crevnih resica (slika 11). Kripte su razdvojene sa 10 – 20 limfocita i plazma ćelija. Pojedinačni limfociti, smešteni intraepitelno (intraepitelni limfociti – IEL), zapažaju se na epitelu crevnih resica, i to kao individualne ćelije, a retko i u grupama – grozdovima (slika 12).



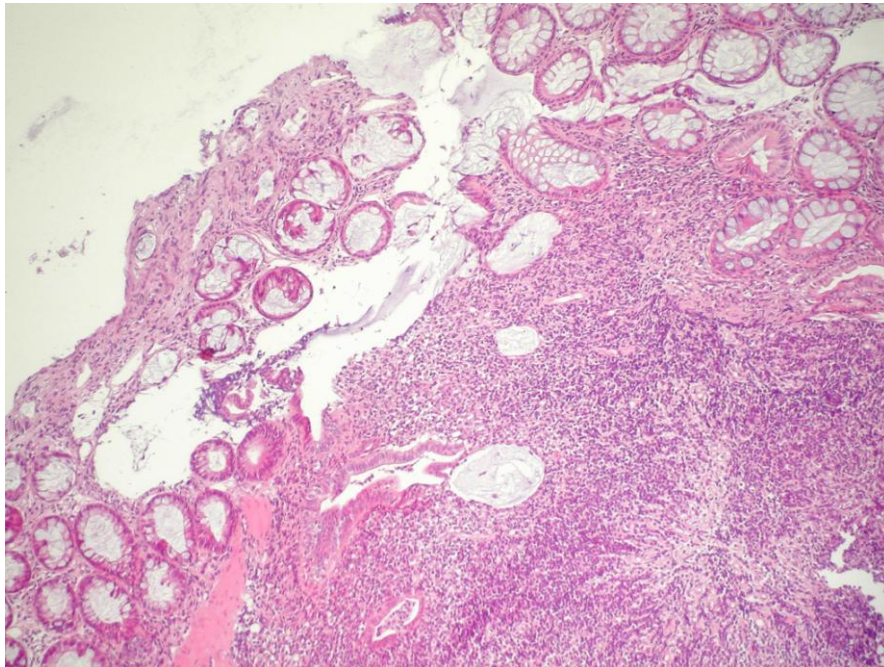
Slika 7. Crevne resice su zadebljale i fuzionisane, HE



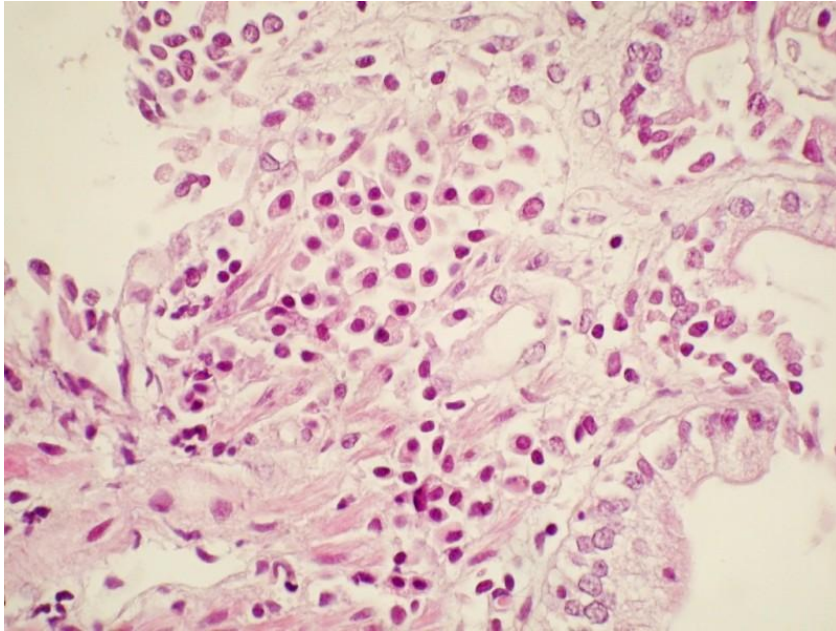
Slika 8. Degenerativne promene na epitelnim ćelijama, HE



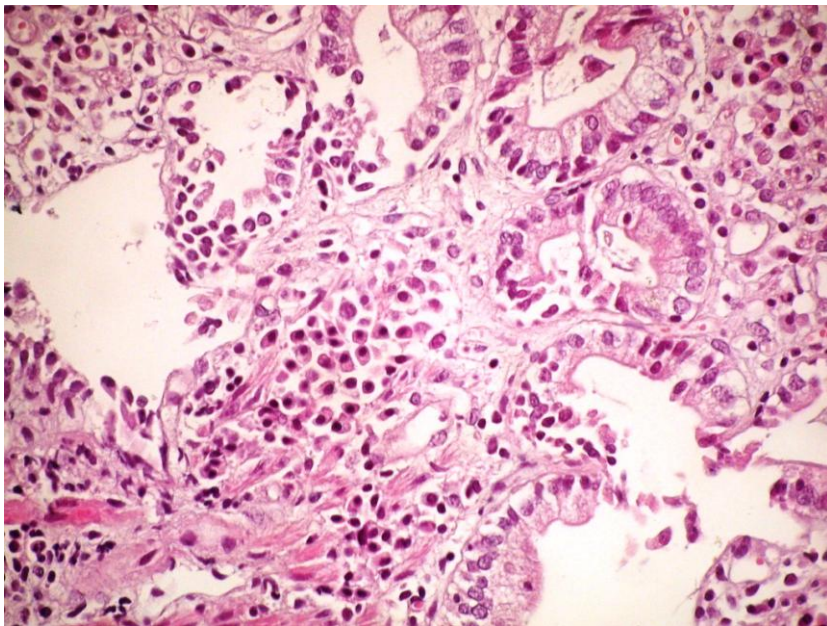
Slika 9. Deskvamacija epitelnih ćelija, HE



Slika 10. Kripte nepravilnog oblika ispunjene detritusom, HE



Slika 11. Grupe plazma ćelija ispunjavaju laminu propriju, HE



Slika 12. Intraepitelni limfociti nalaze se pojedinačno ili u grupama, HE

U **drugoj grupi** uzoraka u kojoj dominiraju eozinofilni granulociti, promene na crevnim resicama su okarakterisane kao blage. Zapaža se blagi stepen oštećenja crevnog epitela kao i proširenja kripte (do 10% kripte je prošireno). Centralni lakteal ne zauzima više od polovine crevne resice na uzdužnom preseku. U lamini proprijii duodenuma kod ova 3 psa uočena je infiltracija velikim brojem eozinofilnih granulocita mada je zapaženo i prisustvo mononukleara u infiltratu. Koprološki nalaz kod pasa iz ove grupe bio je negativan.

U **trećoj grupi** uzoraka u kojoj nije zapažena ćelijska infiltracija u sluznici duodenuma, promene se svode na kataralno – mucinozni enteritis.

Opisane patohistološke promene kod prve dve grupe uzoraka upućuju na inflamatornu bolest creva, a kod treće grupe na kataralni duodenitis (tabela 25).

Tabela 25. Postavljena patohistološka dijagnoza

Postavljena patohistološka dijagnoza	Broj pasa
Limfocitno - plazmocitni duodenitis	46
Eozinofilni duodenitis	3
Kataralni duodenitis	5

## 5.9. IMUNOHISTOHEMIJSKI NALAZ

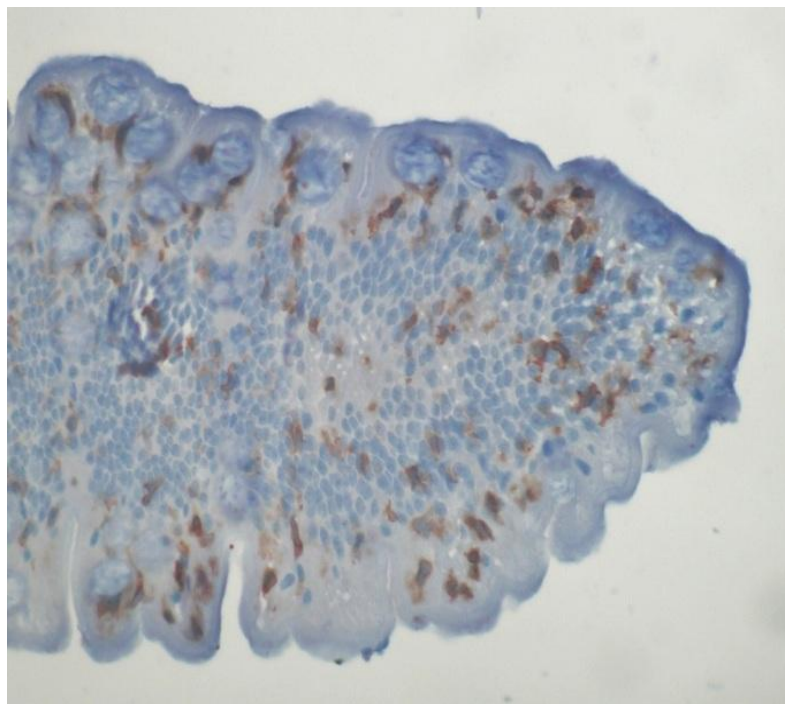
### 5.9.1. Kontrolna grupa

U uzorcima sluznice duodenuma zdravih pasa, CD3 ekspimiraju pojedinačni T limfociti u lamini proprijii mukoze i u lamini epitelialis mukoze.

Isto tako, u uzorcima sluznice duodenuma ovih pasa, CD79 ekspimiraju pojedinačni B limfociti smešteni uglavnom u lamini proprijii (*lamina propria mucosae*).

### 5.9.2. Oboleli psi

Imunohistohemijskim ispitivanjem uzoraka sluznice duodenuma obolelih pasa, na preparatima bojenim LSAB2 tehnikom uočena je ekspresija CD3+ (T limfocita) i CD79+ (B limfocita). Kod ispitanih uzoraka, kod 31 psa, u inflamatornom infiltratu dominiraju ćelije CD3+ imunofenotipa (slika 13). Pozitivna imunohemijska reakcija je ispoljena nalazom precipitata tamnosmeđe boje u predelu ćelijske membrane T limfocita, tako da je prisutan tzv. membranski precipitat. Reakcija ređe zastupljenih B limfocita, više je difuznog karaktera. B limfociti dominiraju u 2 slučaja. U 13 slučajeva postoji ravnomerno mešoviti limfocitno - plazmocitni infiltrat.



Slika 13. U infiltratu dominiraju CD3+ T limfociti, IHC – LSAB



## 5.10. ODNOS HEMATOLOŠKIH I BIOHEMIJSKIH PARAMETARA IZMEĐU OBOLELIH PASA I KONTROLNE GRUPE PASA

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na broj leukocita kod pasa obolelih od LPD kao i kontrolne grupe pasa, prikazani su u tabeli 26.

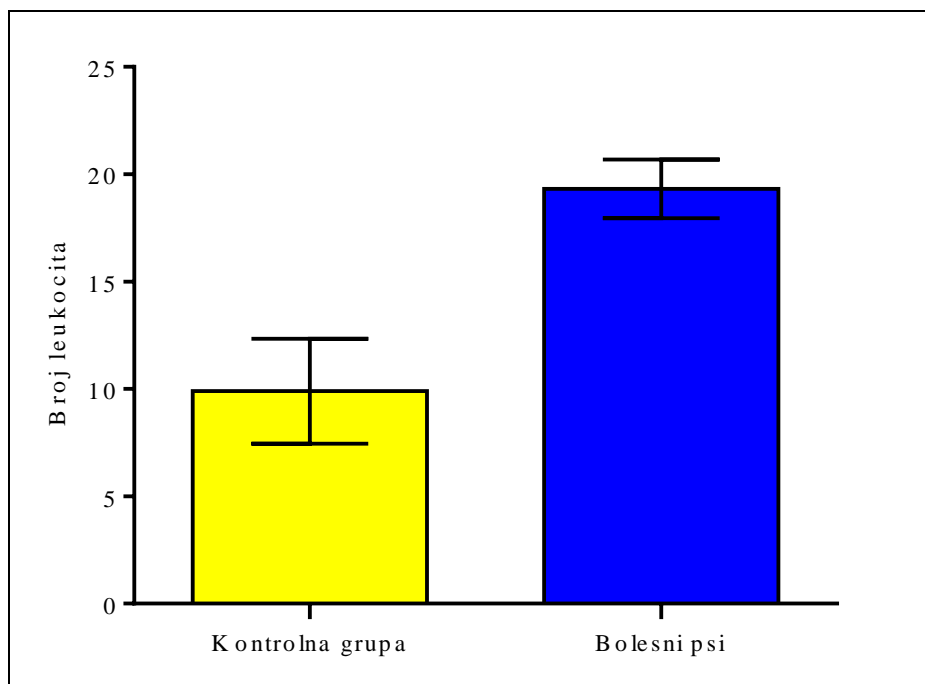
Tabela 26. Deskriptivni statistički parametri broja leukocita kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa

$\times 10^9/L$

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Kontrola</b>	9,90 <sup>x</sup>	2,45	0,9982	6,52	12,98	24,71
<b>Bolesni</b>	19,32 <sup>x</sup>	1,37	0,2016	17,10	23,05	7,08

Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .

Analizirajući deskriptivne statističke parametre koji se odnose na broj leukocita kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa (tabela 26), ustanovljeno je da je u kontrolnoj grupi on iznosio prosečno ( $9,90 \pm 2,45$ ) i bio statistički signifikantno manji ( $p \leq 0,01$ ) od prosečnog broja leukocita kod bolesnih pasa ( $19,32 \pm 1,37$ ), što je prikazano i na grafikonu 1. Izračunati koeficijent korelacije kod kontrolne grupe pasa bio je relativno visok (24,71%) što ukazuje na veće variranje broja leukocita kod kontrolne grupe pasa, dok je koeficijent korelacije bolesnih pasa bio vrlo nizak (7,08%) što nas navodi na zaključak da je broj leukocita kod ove grupe pasa bio visok, ali približno isti kod svih pasa.



Grafikon 1. Prosečne vrednosti broja leukocita ( $\times 10^9/L$ ) kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa.

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na broj limfocita kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa, prikazani su u tabeli 27.

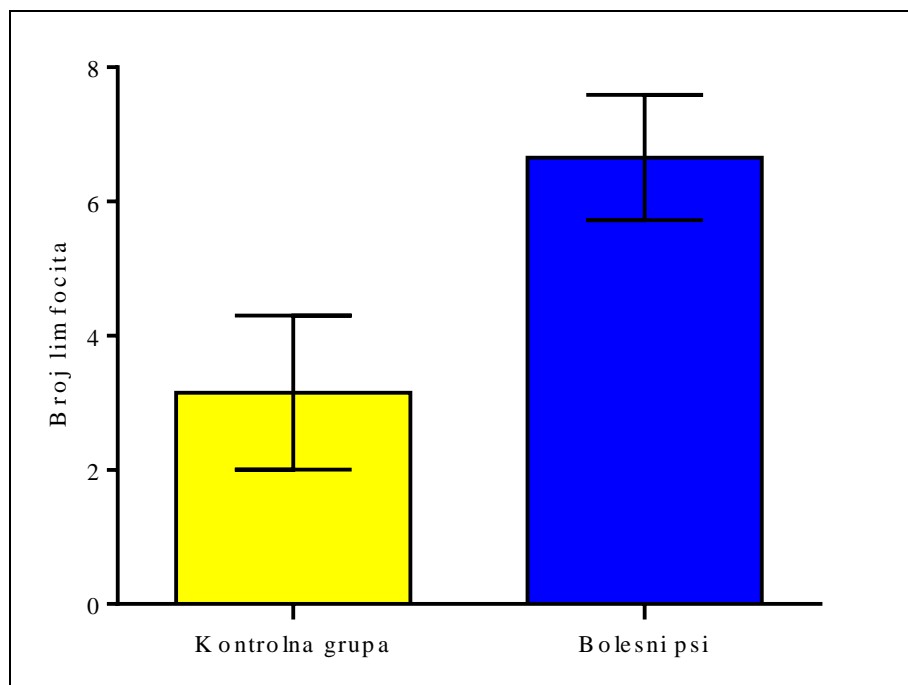
Tabela 27. Deskriptivni statistički parametri broja limfocita kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa

$\times 10^9/L$

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Kontrola</b>	3,15 <sup>x</sup>	1,15	0,4689	1,50	4,70	36,46
<b>Bolesni</b>	6,65 <sup>x</sup>	0,93	0,1377	4,90	9,10	14,04

Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .

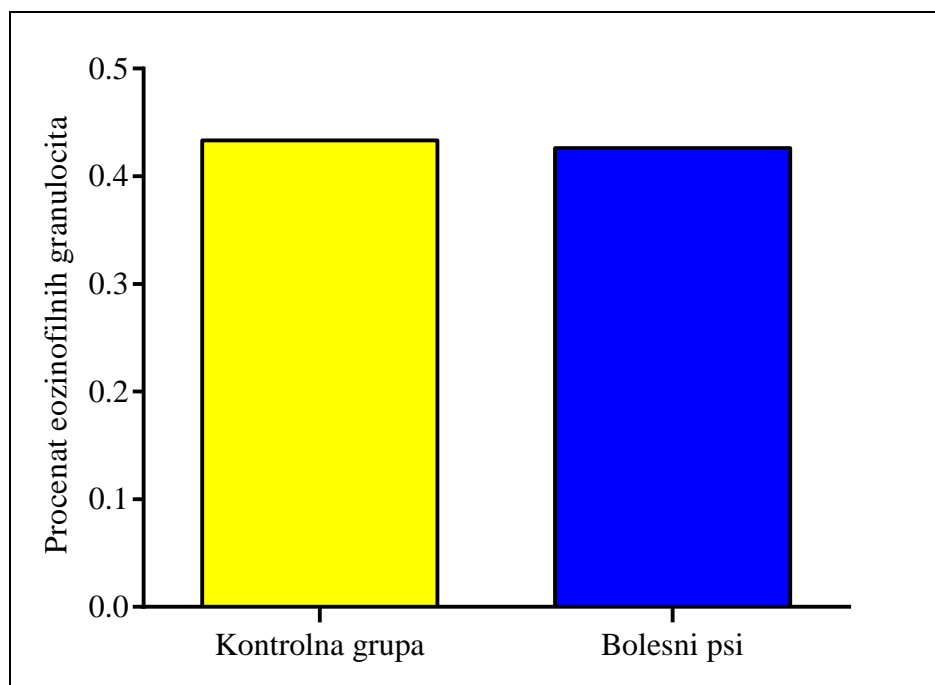
Analizirajući deskriptivne statističke parametre koji se odnose na broj limfocita kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa (tabela 27), ustanovljeno je da je u kontrolnoj grupi on iznosio prosečno ( $3,15 \pm 1,15$ ) i bio statistički signifikantno manji ( $p \leq 0,01$ ) od prosečnog broja limfocita kod bolesnih pasa ( $6,65 \pm 0,93$ ), što je prikazano i na grafikonu 2. Izračunati koeficijent korelacije kod kontrolne grupe pasa bio je vrlo visok (36,46%) što ukazuje na veće variranje broja limfocita kod kontrolne grupe pasa i nehomogenost ovog parametra, dok je koeficijent korelacije bolesnih pasa bio nizak (14,04%) što nas navodi na zaključak da je broj limfocita kod ove grupe pasa bio visok, ali sa malim odstupanjem od aritmetičke sredine.



Grafikon 2. Prosečne vrednosti broja limfocita ( $\times 10^9/L$ ) kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa.

Rezultati dobijeni analizom **procentualne zastupljenosti eozinofilnih granulocita** kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa prikazani su na grafikonu 3.

Analizirajući kretanje procenta pojave eozinofilnih granulocita u ispitivanim grupama (kontrolna grupa i bolesni psi), ustanovili smo da je on prosečno iznosio 0,43%. Na osnovu toga ustanovljeno je da ne postoji statistički signifikantna razlika kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa.



Grafikon 3. Prosečne vrednosti broja eozinofilnih granulocita (procentualno izraženo) kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa.

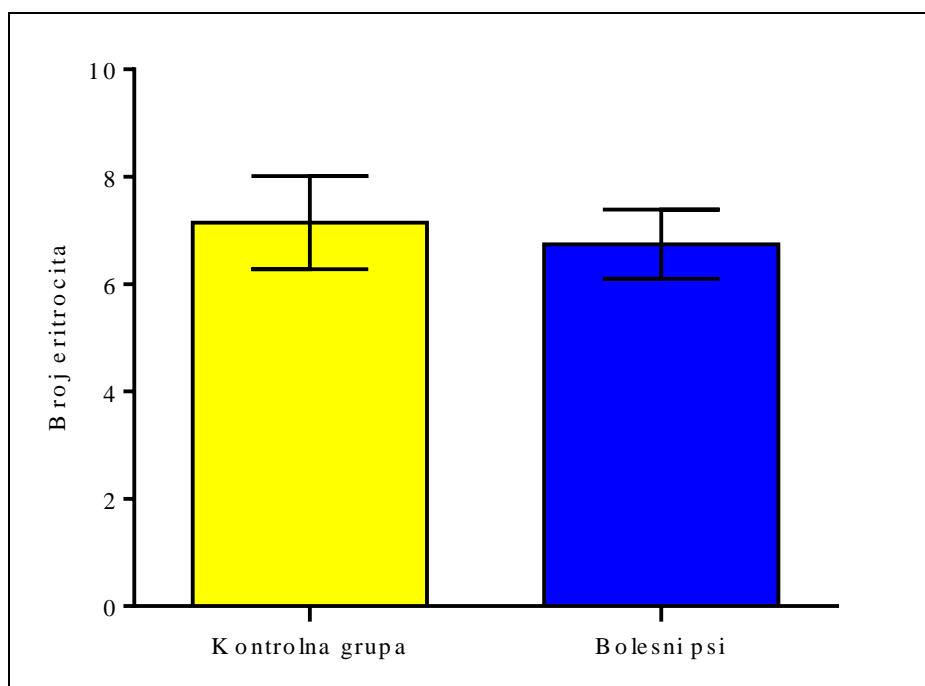
Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na broj eritrocita kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa prikazani su u tabeli 28.

Tabela 28. Deskriptivni statistički parametri broja eritrocita kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa

$\times 10^{12}/L$

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Kontrola</b>	7,15	0,87	0,3544	5,70	8,20	12,15
<b>Bolesni</b>	6,74	0,65	0,0953	5,65	8,05	9,59

Analizirajući deskriptivne statističke parametre koji se odnose na broj eritrocita kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa (tabela 28), ustanovljeno je da je prosečan broj eritrocita u ispitivanim grupama (kontrolna grupa i bolesni psi) bio vrlo sličan ( $7,15 \pm 0,87$  i  $6,74 \pm 0,65$ ) tako da nije ustanovljena statistički signifikantna razlika ( $p \geq 0,05$ ) što je prikazano i na grafikonu 4. Izračunati koeficijenti korelacije kod obe grupe ispitivanih životinja su niski i vrlo slični (12,15% kod kontrolne grupe i 9,59% kod bolesnih pasa) što ukazuje na homogenost ispitivanog parametra.



Grafikon 4. Prosečne vrednosti broja eritrocita ( $\times 10^{12}/L$ ) kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa.

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na koncentraciju **ukupnih proteina** kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa, prikazani su u tabeli 29.

Tabela 29. Deskriptivni statistički parametri za ukupne proteine kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa

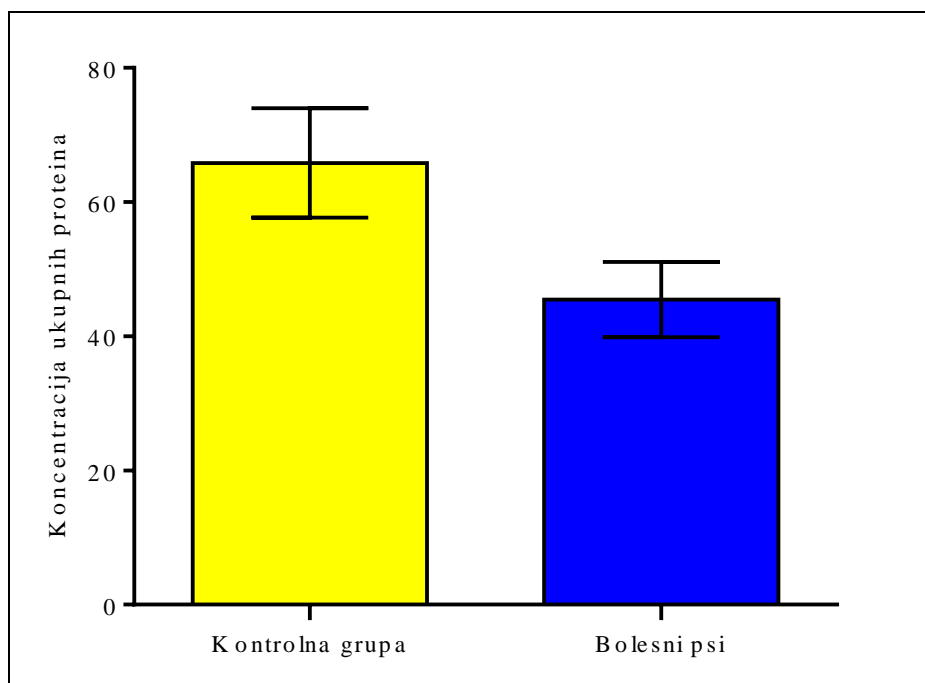
g/L

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Kontrola</b>	65,83 <sup>x</sup>	8,13	3,3210	55,00	76,00	12,36
<b>Bolesni</b>	45,48 <sup>x</sup>	5,61	0,8263	37,00	56,00	12,32

*Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .*

Analizirajući deskriptivne statističke parametre koji se odnose na koncentraciju ukupnih proteina kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa (tabela 29), ustanovljeno je da je prosečna koncentracija ukupnih proteina u kontrolnoj grupi ( $65,83 \pm 8,13$ ) bila statistički signifikantno veća ( $p \leq 0,01$ ) od prosečne koncentracije ukupnih proteina kod bolesnih pasa ( $45,48 \pm 5,61$ ), što je prikazano i na grafikonu 5. Izračunati koeficijenti korelacije kod obe grupe ispitivanih životinja su niski i vrlo slični (12,36% kod kontrolne grupe i 12,32% kod bolesnih pasa) što ukazuje na homogenost ispitivanog parametra.





Grafikon 5. Prosečne vrednosti koncentracije ukupnih proteina (g/L) kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa.

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na koncentraciju serumskih **albumina** kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa, prikazani su u tabeli 30.

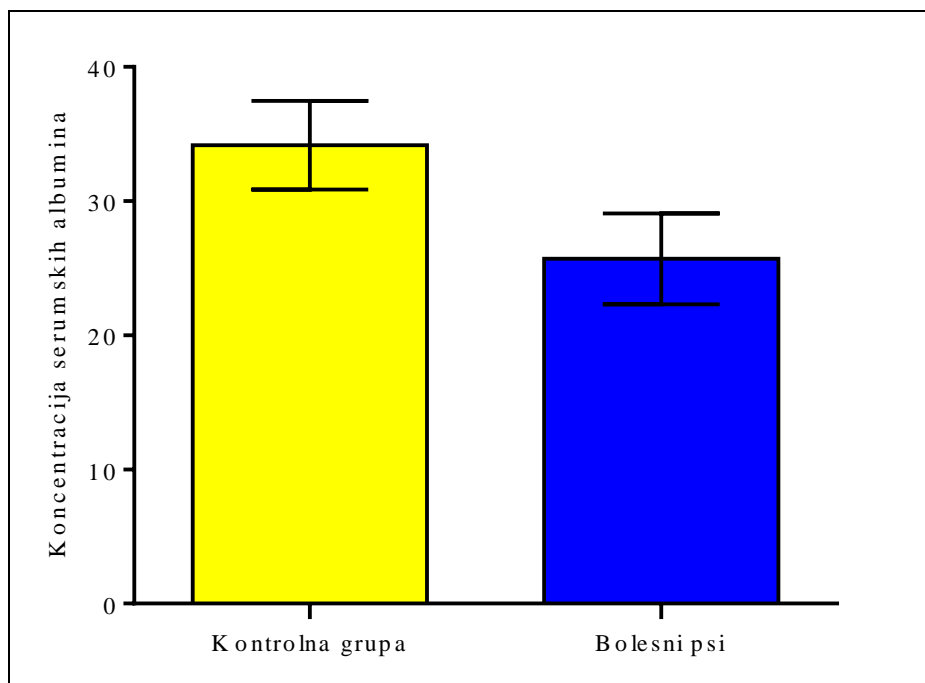
Tabela 30. Deskriptivni statistički parametri za albumine kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa

*g/L*

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Kontrola</b>	34,17 <sup>x</sup>	3,31	1,3520	30,00	38,00	9,69
<b>Bolesni</b>	25,70 <sup>x</sup>	3,40	0,4982	18,00	31,99	13,15

*Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .*

Analizirajući deskriptivne statističke parametre koji se odnose na koncentraciju serumskih albumina kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa (tabela 30), ustanovljeno je da je u kontrolnoj grupi ona iznosila prosečno ( $34,17 \pm 3,31$ ) i bila statistički signifikantno veća ( $p \leq 0,01$ ) od prosečne koncentracije albumina kod bolesnih pasa ( $25,70 \pm 3,40$ ) što je prikazano i na grafikonu 6. Izračunati koeficijenti korelacije kod obe grupe ispitivanih životinja su niski (9,69% kod kontrolne grupe i 13,15% kod bolesnih pasa) što ukazuje na homogenost ispitivanog parametra.



Grafikon 6. Prosečne vrednosti koncentracije serumskih albumina (g/L) kod pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa.

## 5.11. ODNOS POJEDINIH HEMATOLOŠKIH I BIOHEMIJSKIH PARAMETARA I TIPA INFILTRATA KOD PASA OBOLELIH OD LPD

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na broj leukocita kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu, prikazani su u tabeli 31.

Tabela 31. Deskriptivni statistički parametri broja leukocita pasa obolelih od LPD, sa dominacijom različitih vrsta ćelija u infiltratu

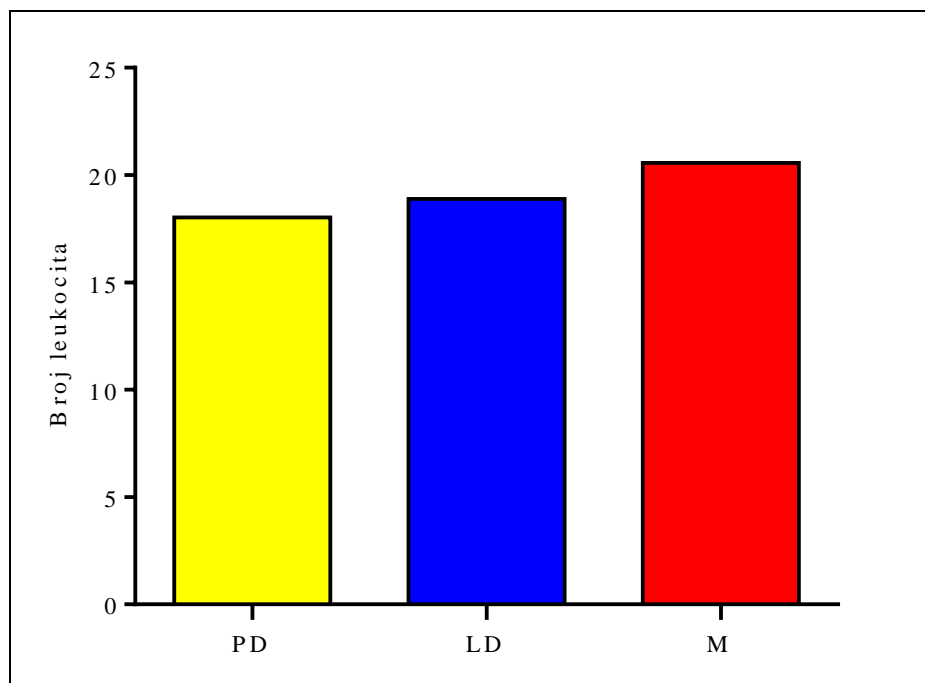
$\times 10^9/L$

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Dominantno plazmocitni infiltrat</b>	18,03 <sup>a</sup>	1,31	0,9250	17,10	18,95	7,26
<b>Dominantno limfocitni infiltrat</b>	18,88 <sup>x</sup>	0,83	0,1487	17,52	20,72	4,38
<b>Ravnomerno mešoviti infiltrat</b>	20,56 <sup>ax</sup>	1,65	0,4576	17,95	23,05	8,03

Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .

Analizom statističkih pokazatelja broja leukocita unutar grupe pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu (tabela 31), ustanovljeno je da je najveći prosečni broj leukocita bio kod pasa koji su imali mešoviti infiltrat ( $20,56 \pm 1,65$ ), a najmanji prosečni broj leukocita bio je kod pasa kod kojih je ustanovljen pretežno plazmocitni infiltrat ( $18,03 \pm 1,31$ ). Analizom varijanse ustanovljeno je da je F vrednost 11,44 što ukazuje na postojanje signifikantne razlike u broju leukocita ukupno kod pasa

obolelih od LPD ( $p \leq 0,01$ ). Pojedinačnim Tukey testom ustanovljena je signifikantna razlika ( $p \leq 0,05$ ) između prosečnog broja leukocita kod pasa sa mešovitim infiltratom ( $20,56 \pm 1,65$ ) i prosečnog broja leukocita pasa sa pretežno plazmocitnim infiltratom ( $18,03 \pm 1,31$ ). Statistički vrlo značajno ( $p \leq 0,01$ ) je veći prosečni broj leukocita kod pasa sa mešovitim infiltratom ( $20,56 \pm 1,65$ ) u odnosu na prosečni broj leukocita kod pasa sa pretežno limfocitnim infiltratom ( $18,88 \pm 0,83$ ) što je prikazano i na grafikonu 7. Izračunati koeficijenti korelacije su na niskom nivou što ukazuje na homogenost ispitivanih serija podataka.



Grafikon 7. Prosečne vrednosti broja leukocita ( $\times 10^9/L$ ) kod pasa obolelih od LPD, sa različitim tipom infiltrata (PD – pretežno plazmocitni infiltrat, LD - pretežno limfocitni infiltrat, M - ravnomerno mešoviti infiltrat)

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na broj limfocita kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu, prikazani su u tabeli 32.

Tabela 32. Deskriptivni statistički parametri broja limfocita kod pasa obolelih od LPD, sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu

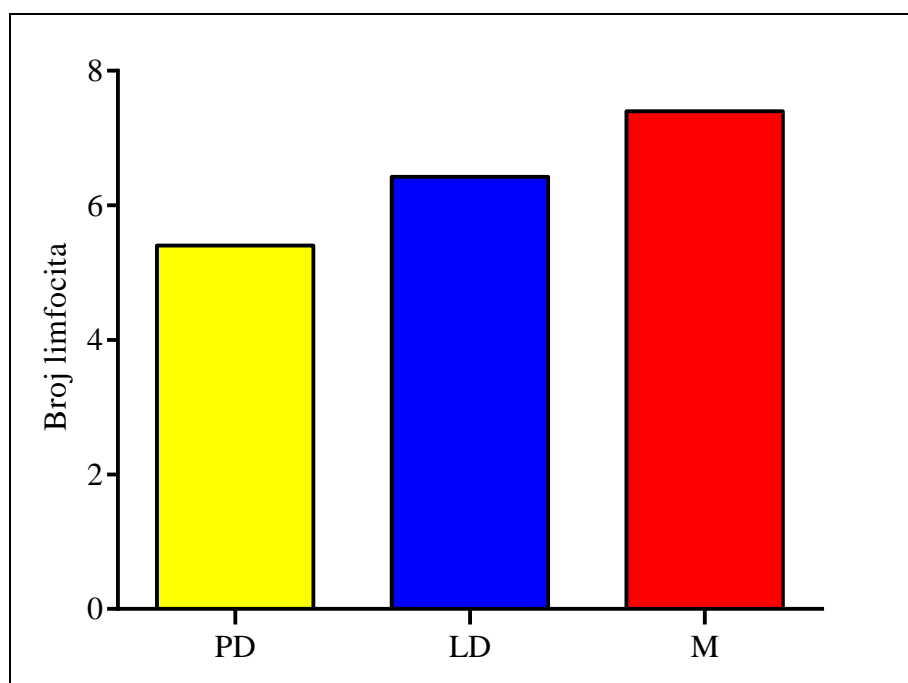
$\times 10^9/L$

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Dominantno plazmocitni infiltrat</b>	5,40 <sup>x</sup>	0,28	0,2000	5,20	5,60	5,24
<b>Dominantno limfocitni infiltrat</b>	6,42 <sup>y</sup>	0,76	0,1361	4,90	7,50	11,80
<b>Ravnomerno mešoviti infiltrat</b>	7,40 <sup>xy</sup>	0,90	0,2522	5,80	9,10	12,29

Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .

Analizom statističkih pokazatelja broja limfocita unutar grupe pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu (tabela 32), ustanovljeno je da je najveći prosečni broj limfocita bio kod pasa koji su imali mešoviti infiltrat ( $7,40 \pm 0,90$ ), a najmanji prosečni broj limfocita bio je kod pasa kod kojih je ustanovljen pretežno plazmocitni infiltrat ( $5,40 \pm 0,28$ ). Analizom varijanse ustanovljeno je da je F vrednost 9,51 što ukazuje na postojanje signifikantne razlike u broju leukocita ukupno kod pasa obolelih od LPD ( $p \leq 0,01$ ). Pojedinačnim Tukey testom ustanovljena je da je prosečni broj limfocita kod pasa sa mešovitim infiltratom ( $7,40 \pm 0,90$ ) vrlo značajno veći ( $p \leq 0,01$ ) i od prosečnog broja limfocita kod pasa sa pretežno limfocitnim infiltratom ( $6,42 \pm 0,76$ ) kao i od prosečnog

broja limfocita kod pasa sa pretežno plazmocitnim infiltratom ( $5,40 \pm 0,28$ ) što je prikazano i na grafikonu 8. Nisu ustanovljene statistički signifikantne razlike ( $p \geq 0,05$ ) između ostalih vidova promena kod pasa. Izračunati koeficijenti korelacije su na niskom nivou što ukazuje na homogenost ispitivanih serija podataka.



Grafikon 8. Prosečne vrednosti broja limfocita ( $\times 10^9/L$ ) kod pasa obolelih od LPD sa različitim tipom infiltrata (PD – pretežno plazmocitni infiltrat, LD - pretežno limfocitni infiltrat, M - ravnomerno mešoviti infiltrat)

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na koncentraciju **ukupnih proteina** kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu, prikazani su u tabeli 33.

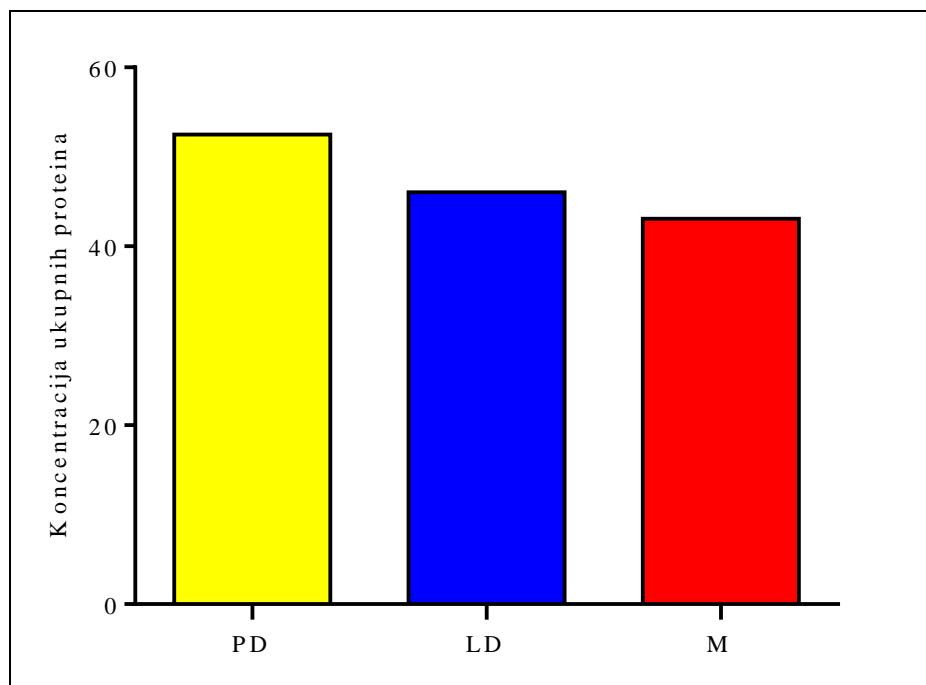
Tabela 33. Deskriptivni statistički parametri ukupnih proteina pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu

*g/L*

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Dominantno plazmocitni infiltrat</b>	52,50	0,71	0,50	52,00	53,00	1,35
<b>Dominantno limfocitni infiltrat</b>	46,30	5,19	0,9315	39,00	56,00	11,27
<b>Ravnomerno mešoviti infiltrat</b>	43,08	5,94	1,6470	37,00	54,00	13,78

Analizom statističkih pokazatelja ukupnih proteina unutar grupe pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu (tabela33), ustanovljeno je da je najveća prosečna koncentracija ukupnih proteina bila kod pasa kod kojih je ustanovljen pretežno plazmocitni infiltrat ( $52,50 \pm 0,71$ ), a najmanja prosečna koncentracija bila je kod pasa kod kojih je ustanovljen mešoviti infiltrat ( $43,08 \pm 5,94$ ), što je prikazano i na grafikonu 9. Analizom varijanse ustanovljeno je da je F vrednost 3,19 što ukazuje da nije ustanovljena signifikantna razlika u ukupnim proteinima kod pasa obolelih od LPD ( $p \geq 0,05$ ). Izračunati koeficijenti korelacije su na niskom nivou što ukazuje na homogenost ispitivanih serija podataka.





Grafikon 9. Prosečne vrednosti koncentracije ukupnih proteina (g/L) kod pasa obolelih od različitih tipova LPD (PD – pretežno plazmocitni infiltrat, LD - pretežno limfocitni infiltrat, M - ravnomerno mešoviti infiltrat)

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na koncentraciju **albumina** kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu, prikazani su u tabeli 34.

Tabela 34. Deskriptivni statistički parametri albumina pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu

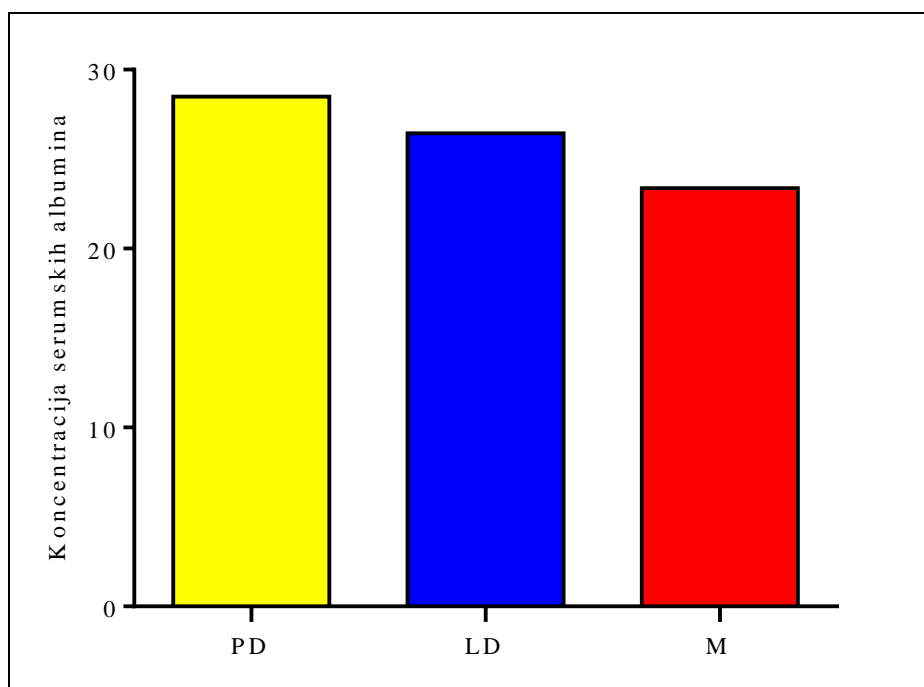
*g/L*

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Dominantno plazmocitni infiltrat</b>	28,50	0,71	0,500	28,00	29,00	2,48
<b>Dominantno limfocitni infiltrat</b>	26,45 <sup>a</sup>	2,41	0,4321	19,00	31,00	9,10
<b>Ravnomerno mešoviti infiltrat</b>	23,38 <sup>a</sup>	4,39	1,2170	18,00	29,00	18,77

*Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .*

Analizom statističkih pokazatelja albumina unutar grupe pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu (tabela 34), ustanovljeno je da je najveća prosečna koncentracija albumina bila kod pasa kod kojih je ustanovljen pretežno plazmocitni infiltrat ( $28,50 \pm 0,71$ ), a najmanja prosečna koncentracija bila je kod pasa koji su imali mešovite infiltrate ( $23,38 \pm 4,39$ ) što je prikazano i na grafikonu 10. Analizom varijanse ustanovljeno je da je F vrednost 5,46 što ukazuje na postojanje signifikantne razlike u koncentraciji

albumina ukupno kod pasa obolelih od LPD ( $p \leq 0,05$ ). Pojedinačnim Tukey testom ustanovljena je signifikantna razlika ( $p \leq 0,05$ ) između prosečne koncentracije albumina kod pasa kod kojih je ustanovljen pretežno limfocitni infiltrat ( $26,45 \pm 2,41$ ) i prosečne koncentracije albumina kod pasa sa mešovitim infiltratom ( $23,38 \pm 4,39$ ). Izračunati koeficijenti korelacije su na niskom nivou što ukazuje na homogenost ispitivanih serija podataka.



Grafikon 10. Prosečne vrednosti koncentracije serumskih albumina (g/L) kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu (PD – pretežno plazmocitni infiltrat, LD - pretežno limfocitni infiltrat, M - ravnomerno mešoviti infiltrat)

## 5.12. ODNOS INDEKSA CIBDAI I CCECAI PASA OBOLELIH OD RAZLIČITIH TIPOVA DUODENITISA: LIMFOCITNO - PLAZMOCITNOG DUODENITISA, EOZINOFILNOG DUODENITISA I KATARALNOG DUODENITISA

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na **CIBDAI** pasa obolelih od limfocitno - plazmocitnog duodenitisa, eozinofilnog duodenitisa i kataralnog duodenitisa, prikazani su u tabeli 35.

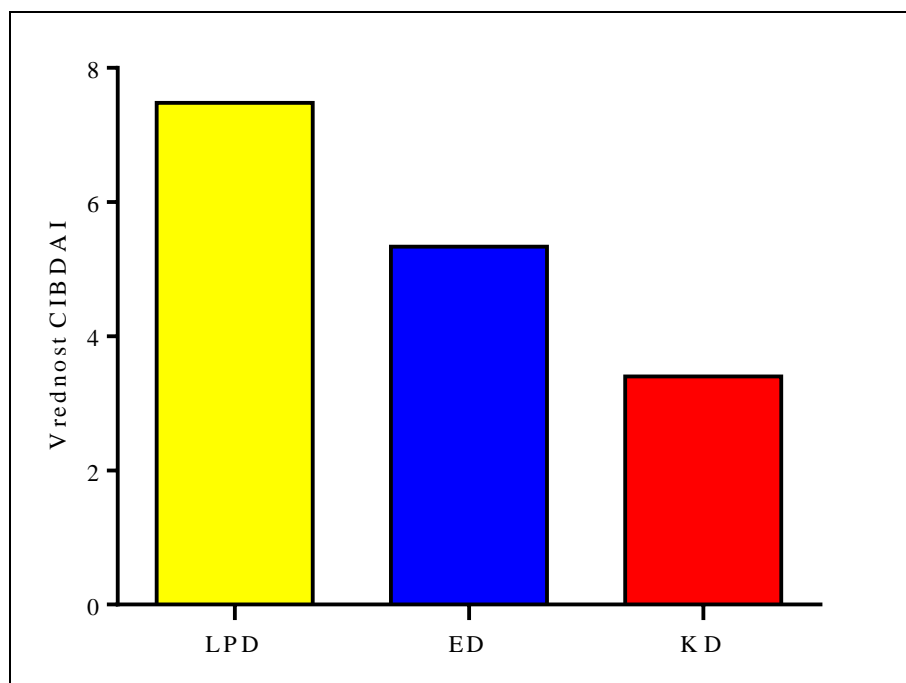
Tabela 35. Deskriptivni statistički parametri za CIBDAI kod pasa obolelih od limfocitno - plazmocitnog duodenitisa, eozinofilnog duodenitisa i kataralnog duodenitisa

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>LPD</b>	7,48 <sup>x</sup>	1,59	0,2341	5,00	11,00	21,23
<b>Eozinofilni duodenitis</b>	5,33	0,58	0,3333	5,00	6,00	10,83
<b>Kataralni duodenitis</b>	3,40 <sup>x</sup>	0,55	0,25	3,00	4,00	16,11

*Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .*

Analizom statističkih pokazatelja za CIBDAI unutar grupe pasa obolelih od LPD i pasa sa eozinofilnim duodenitisom i pasa sa kataralnim duodenitisom (tabela 35), ustanovljeno je da je najviša prosečna vrednost za CIBDAI bila kod pasa koji su imali LPD ( $7,8 \pm 1,59$ ), a najmanja prosečna vrednost za CIBDAI bila je kod pasa sa kataralnim promenama ( $3,40 \pm 0,55$ ) što je prikazano i na grafikonu 11. Analizom varijanse ustanovljeno je da je F vrednost 18,49 što ukazuje na postojanje signifikantne razlike za vrednosti CIBDAI ukupno kod pasa obolelih od različitih tipova duodenitisa ( $p \leq 0,01$ ).

Pojedinačnim Tukey testom ustanovljeno je da je statistički vrlo značajno ( $p \leq 0,01$ ) veća prosečna vrednost za CIBDAI kod pasa obolelih od LPD ( $7,8 \pm 1,59$ ) u odnosu na prosečnu vrednost za CIBDAI kod pasa sa kataralnim promenama ( $3,40 \pm 0,55$ ). Izračunati koeficijenti korelacije su na relativno niskom nivou što ukazuje na homogenost ispitivanih serija podataka.



Grafikon 11. Prosečne vrednosti CIBDAI kod bolesnih pasa (LPD – limfocitno - plazmocitni duodenitis, ED - eozinofilni duodenitis, KD - kataralni duodenitis).

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na CCECAI pasa obolelih od limfocitno - plazmocitnog duodenitisa, eozinofilnog duodenitisa i kataralnog duodenitisa, prikazani su u tabeli 36.

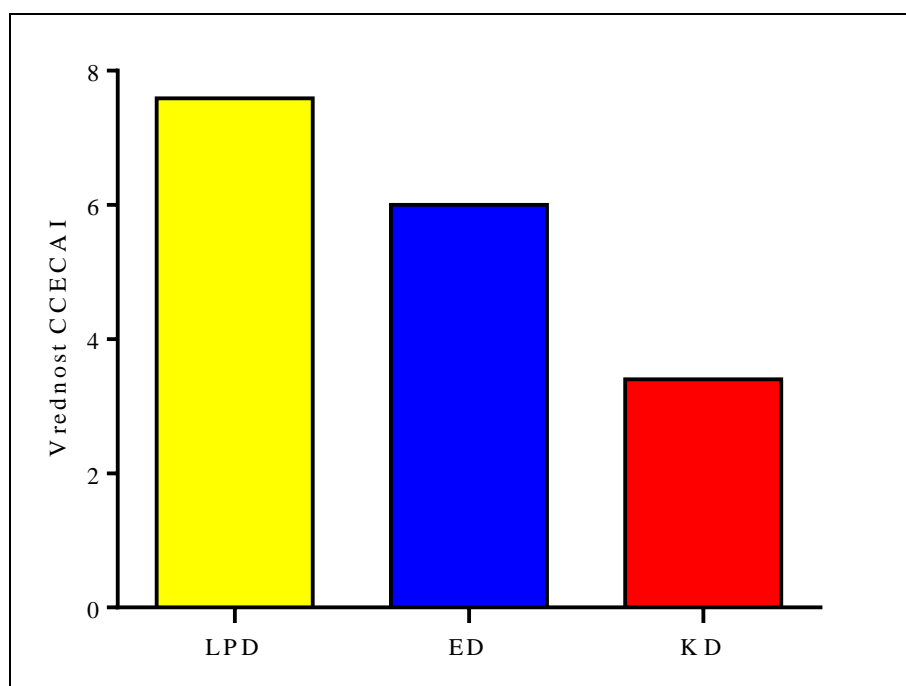
Tabela 36. Deskriptivni statistički parametri za CCECAI kod pasa obolelih od limfocitno - plazmocitnog duodenitisa, eozinofilnog duodenitisa i kataralnog duodenitisa

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>LPD</b>	7,59 <sup>x</sup>	1,80	0,2648	5,00	12,00	23,67
<b>Eozinofilni duodenitis</b>	6,00 <sup>a</sup>	1,00	0,5774	5,00	7,00	16,67
<b>Kataralni duodenitis</b>	3,40 <sup>xa</sup>	0,55	0,2449	3,00	4,00	16,11

Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .

Analizom statističkih pokazatelja za CCECAI unutar grupe pasa obolelih od limfocitno - plazmocitnog duodenitisa, eozinofilnog duodenitisa i kataralnog duodenitisa pasa (tabela 36), ustanovljeno je da je najviša prosečna vrednost za CCECAI bila kod pasa sa LPD-om ( $7,59 \pm 1,80$ ), a najmanja prosečna vrednost za CCECAI bila je kod pasa sa kataralnim promenama ( $3,40 \pm 0,55$ ) što je prikazano i na grafikonu 12. Analizom varijanse ustanovljeno je da je F vrednost 14,26 što ukazuje na postojanje signifikantne razlike za vrednosti CCECAI ukupno kod pasa obolelih od različitih tipova duodenitisa ( $p \leq 0,01$ ). Pojedinačnim Tukey testom ustanovljena je signifikantna veća prosečna vrednost ( $p \leq 0,05$ ) za CCECAI pasa sa eozinofilnim duodenitisom ( $6,00 \pm 1,00$ ) u odnosu na prosečnu vrednost za pse sa kataralnim promenama ( $3,40 \pm 0,55$ ). Statistički vrlo značajno ( $p \leq 0,01$ ) je veća prosečna vrednost za CCECAI kod pasa obolelih od LPD ( $7,59 \pm 1,80$ ) u odnosu na

prosečnu vrednos za CCECAI kod pasa sa kataralnim promenama ( $3,40 \pm 0,55$ ). Izračunati koeficijenti korelacije su na relativno niskom nivou što ukazuje na homogenost ispitivanih serija podataka.



Grafikon 12. Prosečne vrednosti CCECAI kod bolesnih pasa (LPD – limfocitno - plazmocitni duodenitis, ED - eozinofilni duodenitis, KD - kataralni duodenitis).

### 5.13. ODNOS INDEKSA CIBDAI I CCECAI I TIPA INFILTRATA PASA OBOLELIH OD LPD

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na CIBDAI kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu, prikazani su u tabeli 37.

Tabela 37. Deskriptivni statistički parametri za CIBDAI kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu

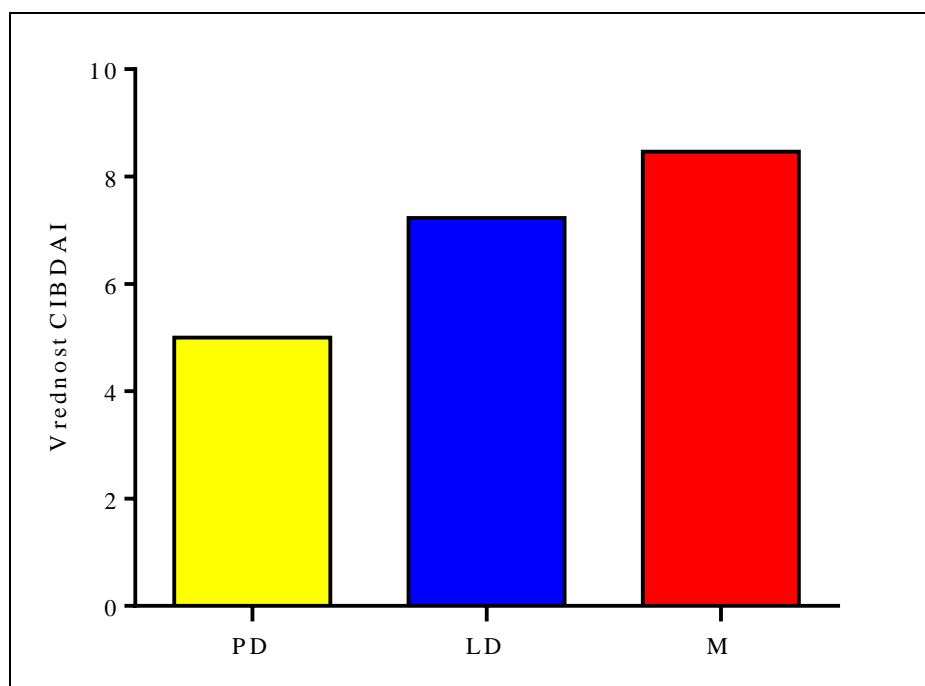
	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Dominantno plazmocitni infiltrat</b>	4,50 <sup>x</sup>	0,71	0,5000	4,00	5,00	15,71
<b>Dominantno limfocitni infiltrat</b>	7,26 <sup>a</sup>	1,33	0,2397	5,00	10,00	18,74
<b>Ravnomerno mešoviti infiltrat</b>	8,46 <sup>xa</sup>	1,66	0,4615	5,00	11,00	19,76

*Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .*

Analizom statističkih pokazatelja za CIBDAI unutar grupe pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu (tabela 37), ustanovljeno je da je najviša prosečna vrednost za CIBDAI bila kod pasa koji su imali mešoviti infiltrat ( $8,46 \pm 1,66$ ), a najmanja prosečna vrednost za CIBDAI bila je kod pasa kod kojih je ustanovljen pretežno plazmocitni infiltrat ( $4,50 \pm 0,71$ ) što je prikazano i na grafikonu 13. Analizom varijanse ustanovljeno je da je F vrednost 7,96 što ukazuje na postojanje signifikantne razlike za



vrednosti CIBDAI ukupno kod pasa obolelih od LPD ( $p \leq 0,01$ ). Pojedinačnim Tukey testom ustanovljena je signifikantna razlika ( $p \leq 0,05$ ) između prosečne vrednosti za CIBDAI kod pasa sa mešovitim infiltratom ( $8,46 \pm 1,66$ ) i prosečne vrednosti pasa sa pretežno plazmocitnim infiltratom ( $4,50 \pm 0,71$ ). Statistički vrlo značajno ( $p \leq 0,01$ ) je veća prosečna vrednost za CIBDAI kod pasa sa mešovitim infiltratom ( $8,46 \pm 1,66$ ) u odnosu na prosečnu vrednost za CIBDAI kod pasa sa pretežno limfocitnim infiltratom ( $7,26 \pm 1,33$ ). Izračunati koeficijenti korelacije su na relativno niskom nivou što ukazuje na homogenost ispitivanih serija podataka.



Grafikon 13. Prosečne vrednosti CIBDAI kod pasa obolelih od LPD sa različitim tipom infiltrata (PD – pretežno plazmocitni infiltrat, LD - pretežno limfocitni infiltrat, M - ravnomoerno mešoviti infiltrat)

Rezultati dobijeni analizom deskriptivnih statističkih parametara koji se odnose na CCECAI kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu, prikazani su u tabeli 38.

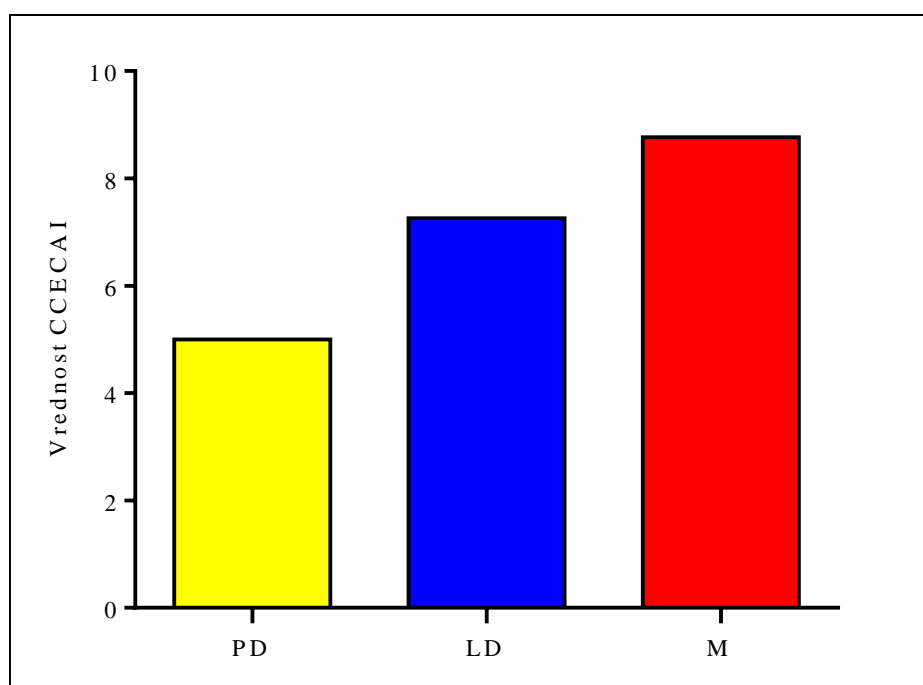
Tabela 38. Deskriptivni statistički parametri za CCECAI kod pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu

	$\bar{X}$	SD	Sx	Minimum	Maximum	CV
<b>Dominantno plazmocitni infiltrat</b>	4,50 <sup>x</sup>	0,71	0,5000	4,00	5,00	15,71
<b>Dominantno limfocitni infiltrat</b>	7,26 <sup>a</sup>	1,41	0,2539	5,00	11,00	19,47
<b>Ravnomerno mešoviti infiltrat</b>	8,77 <sup>xa</sup>	2,05	0,5679	5,00	12,00	23,35

*Ista slova označavaju statistički signifikantnu razliku. Slova a, b, c =  $p \leq 0,05$ ; x, y, z =  $p \leq 0,01$ .*

Analizom statističkih pokazatelja za CCECAI unutar grupe pasa obolelih od LPD sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu (tabela 38), ustanovljeno je da je najviša prosečna vrednost za CCECAI bila kod pasa koji su imali mešoviti infiltrat ( $8,77 \pm 2,05$ ), a najmanja prosečna vrednost za CCECAI bila je kod pasa kod kojih je ustanovljen pretežno plazmocitni infiltrat ( $4,50 \pm 0,71$ ), što je prikazano i na grafikonu 14. Analizom varijanse ustanovljeno je da je F vrednost 7,88 što ukazuje na postojanje signifikantne razlike za vrednosti CCECAI ukupno kod pasa obolelih od LPD ( $p \leq 0,01$ ). Pojedinačnim Tukey testom ustanovljena je signifikantna razlika ( $p \leq 0,05$ ) između prosečne vrednosti za

CCECAI kod pasa sa mešovitim infiltratom ( $8,77 \pm 2,05$ ) i prosečne vrednosti kod pasa sa pretežno plazmocitnim infiltratom ( $4,50 \pm 0,71$ ). Statistički vrlo značajno ( $p \leq 0,01$ ) je veća prosečna vrednost za CCECAI kod pasa sa mešovitim infiltratom ( $8,77 \pm 2,05$ ) u odnosu na prosečne vrednosti za CCECAI kod pasa sa pretežno limfocitnim infiltratom ( $7,26 \pm 1,41$ ). Izračunati koeficijenti korelacije su na relativno niskom nivou što ukazuje na homogenost ispitivanih serija podataka.



Grafikon 14. Prosečne vrednosti CCECAI kod pasa obolelih od LPD sa različitim tipom infiltrata (PD – pretežno plazmocitni infiltrat, LD – pretežno limfocitni infiltrat, M - ravnomerno mešoviti infiltrat)

## 6. DISKUSIJA

Inflamatorna bolest creva (IBC) pasa je zajednički naziv za niz hroničnih enteropatija koje se primarno odlikuju zapaljenjem sluznice gastrointestinalnog sistema i nespecifičnim simptomima. Limfocitno – plazmocitni duodenitis (LPD) pasa je oblik inflamatorne bolesti duodenuma i predstavlja enteropatiju hroničnog toka sa nespecifičnim kliničkim simptomima, od kojih su najvažniji dijareja i povraćanje. Najvažnija morfološka karakteristika imunološkog odgovora, u ovom tipu inflamatorne bolesti creva je nalaz mononuklearnog ćelijskog infiltrata u sluznici duodenuma.

Analizom rezultata dobijenih u ovom istraživanju, ustanovljeno je da oboleli psi, koji su u kliničkoj slici imali hroničnu dijareju, hronično povraćanje, izmenjeno ponašanje i promenjen apetit, boluju od sledećih enteropatija: kataralni duodenitis je utvrđen kod 5 pasa, kod 3 psa je postavljena dijagnoza eozinofilnog duodenitisa dok je kod 46 pasa dijagnostikovao limfocitno – plazmocitni duodenitis (LPD). Ispitivanja su obuhvatila pse koji su bili pacijenti ambulantne klinike Fakulteta veterinarske medicine (FVM) u Beogradu. Prema anamnestičkim podacima, svi psi su pre dolaska u ambulantu FVM bili neuspešno lečeni antibioticima i svi su bili slobodni od crevnih parazita. U ispitivanje je uključeno i 6 zdravih pasa koji su služili kao kontrolna grupa.

Na osnovu podataka iz literature, može se zaključiti da je patogeneza inflamatorne bolesti creva pasa, pa samim tim i limfocitno – plazmocitnog duodenitisa pasa, vrlo kompleksna i nedovoljno razjašnjena (Whitley i sar., 2010; Allenspach i sar., 2003). Iako uzrok nastanka IBC kod životinja i ljudi nije jasan, i histološki i klinički podaci ukazuju na imunološku podlogu razvoja bolesti (German i sar., 2008). Glavni događaj u patogenezi IBC je gubitak imunološke tolerancije na normalnu bakterijsku floru i antigene hrane, što prouzrokuje poremećaj imunološkog odgovora (Cerquetella, 2010). Pretpostavlja se da patogeneza IBC uključuje aktivaciju subseta CD4+ T ćelija koje stvaraju inflamatorne citokine, sa istovremenim gubitkom subseta T ćelija i citokina koji koče imunološki odgovor te tako štite tkivo creva od oštećenja (Washabau, 2010). Patofiziološki, LPD se

definiše kao niz promena vezanih za transport, protok krvi i motilitet creva, dok je histološki kriterijum za definisanje LPD postojanje limfocitno – plazmocitnog infiltrata u sluznici duodenuma. Klinički simptomi pasa sa LPD se pripisuju ćelijskom infiltratu, medijatorima inflamacije, disfunkciji enterocita vezanoj za inflamaciju i promeni motiliteta creva (Washabau i sar., 2010).

Grupa od 46 pasa obolelih od LPD je brojala 15 ženskih i 31 mušku životinju, uzrasta od 5 meseci do 14 godina. Deset pasa je bilo mešane rase, a 36 pasa je bilo u čistoj rasi. Po podacima iz literature, ni rasna, ni starosna niti polna predispozicija za nastanak ove bolesti se ne može ustanoviti (van der Gaag i sar., 1990), a što je u saglasnosti sa našim nalazima. Postoje podaci da određene rase, kao što je nemački ovčar, imaju sklonost ka razvoju IBC (Washabau i sar., 2010; Allenspach, 2009; Fogle, 2007). U našem ispitivanju 5 od 46 (10,87%) pasa obolelih od LPD bili su nemački ovčari, što ide u prilog hipotezi o rasnoj predispoziciji.

Od kliničkih simptoma, dijareja je bila prisutna kod svih ispitivanih pasa, s obzirom da je bila jedan od preduslova za njihov izbor. Povraćanje se u našem uzorku od 46 pasa javlja sa učestalošću od 76,09% (35/46). U literaturi se mogu naći potvrde da su hronična dijareja i povraćanje najčešći simptomi IBC (Gaschen i sar., 2011; Marks i sar., 2011; Kobayashi i sar., 2007; Lecoindre, 2006; Jergens, 2004; Cowel, 2004; Jergens, 1992). Pojedini autori iznose podatke da je dijareja jedan od najčešćih simptoma IBC sa učestalošću od 91% (Lecoindre i sar., 2010). Drugi autori su ustanovili da postoji pozitivna korelacija između stepena oštećenja tkiva kod IBC i gubitka telesne mase (Jergens i sar., 1992). U našem istraživanju se gubitak telesne mase javlja u 95,65% slučajeva (44/46). Broj pasa sa izmenjenim temperamentom je 93,48% (43/46). Do sličnih rezultata došli su i drugi autori (Lecoindre i sar., 2010): gubitak telesne mase u 74% dok su anoreksija i letargija izražene u 56%, odnosno u 51% slučajeva. Kod ispitivanih pasa nismo uočili ascites dok drugi autori ukazuju na njegovu učestalost od 18% (Lecoindre i sar., 2010). U literaturi se mogu naći podaci o psima obolelim od IBC, a bez drugih kliničkih simptoma osim povremenog povraćanja (McTavish, 2002) kao i o psima bez proliva, a sa izraženim povraćanjem (Rousseau, 2005).

Hematološkim analizama utvrđena je statistički značajna razlika za vrednosti broja leukocita i limfocita između obolelih pasa i kontrolne grupe pasa ( $p \leq 0,01$ ) što je prikazano i u tabeli 26 i tabeli 27. Srednja vrednost leukocita iznosila je  $19,32 \times 10^9/l$ , dok je procentualna zastupljenost broja limfocita iznosila 69,48%. Rezultati ispitivanja hematoloških parametara kod ispitivanih pasa kao i referentne vrednosti za zdrave pse prikazani su u tabeli 12. U literaturi se mogu naći tvrdnje pojedinih autora da je limfopenija jedna od promena hematoloških parametara (Jacobs i sar., 1990). Pojedini autori su zapazili da broj leukocita može biti i smanjen i uvećan kod pasa obolelih od LPD, te se ne može tvrditi da je za ovu bolest karakteristična promena broja leukocita samo u jednom pravcu (Craven i sar., 2004). Isti autor navodi da se povećan broj eozinofilnih granulocita može naći i u biopsijskom uzorku zida creva životinje koja je obolela od LPD, a ne isključivo od eozinofilnog enteritisa. Periferna eozinofilija nije karakteristična za pse obolele od limfocitno – plazmocitnog duodenitisa pasa, ali može biti prisutna kod pasa obolelih od eozinofilnog duodenitisa. Takav je slučaj kod 3 psa iz našeg istraživanja za koje je utvrđeno da boluju od ove bolesti, a isto potvrđuju i drugi autori (Fonseca-Alves i sar., 2012; Fogle, 2007; Rousseau, 2005; McTavish, 2002). Pojedini autori navode nalaz eozinopenije kod pasa obolelih od limfocitno – plazmocitnog duodenitisa pasa (Jacobs i sar., 1990). U našem istraživanju nije utvrđena statistički signifikantna razlika za vrednosti broja eozinofila (u procentima) između obolelih pasa i kontrolne grupe što je prikazano na grafikonu 3. U našem istraživanju nije utvrđena ni statistički značajna razlika za vrednosti broja eritrocita obolelih pasa i kontrolne grupe pasa (tabela 28), dok se u literaturi mogu naći podaci koji ukazuju na umerenu anemiju pasa obolelih od IBC (Fonseca-Alves i sar., 2012; Marchetti i sar., 2010; Rousseau, 2005).

Biohemijski parametri su bili u granicama normale izuzev vrednosti ukupnih proteina i serumskih albumina koje su kod pojedinih životinja bile ispod normalnih vrednosti. Smanjena koncentracija proteina ( $<50 \text{ g/l}$ ) je nađena kod 63,04% pasa (29/46). Srednja koncentracija proteina iznosila je  $45,48 \text{ g/l}$  (tabela 29). Smanjena koncentracija serumskih albumina je ustanovljena kod 71,74% pasa (33/46). Srednja koncentracija serumskih albumina je  $25,70 \text{ g/l}$  (tabela 30). Rezultati ispitivanja biohemijskih parametara krvi pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa prikazani su u tabeli 14. Dobijeni rezultati

su u saglasnosti sa nalazima drugih autora (Fonseca-Alves i sar., 2012; Lecoindre i sar., 2010; Craven i sar., 2004; Rousseau, 2005; McTavish, 2002; Jacobs i sar., 1990). Pojedini autori navode da je hipoalbuminemija čest nalaz kod pasa obolelih od LPD, ali je prognostički loš znak (Gaschen i sar., 2011; Allenspach\*, 2009; Craven i sar., 2004) i da, ukoliko se ustanovi, svrstava LPD u grupu enteropatija sa gubitkom proteina (engl. protein - losing enteropathies – PLE). Ovakva situacija nije karakteristična samo za LPD već se sreće i kod drugih enteropatija.

Pošto su pažljivo sistematizovani podaci o ponašanju, apetitu, povraćanju, gubitku telesne mase, kvalitetu i kvantitetu stolice, koncentraciji serumskih albumina, prisustvu ascitesa i pruritusa, a prema preporukama WSAVA (Washabau i sar., 2010), na osnovu nabrojanih rezultata izračunati su klinički indeksi CIBDAI (engl. canine inflammatory bowel disease activity index) i CCECAI (engl. canine chronic enteropathy clinical activity index). Ukupna srednja vrednost CIBDAI kod pasa obolelih od LPD je 7,48. Vrednost CCECAI se poklapa sa vrednošću CIBDAI, osim kod 5 pasa, kod kojih je koncentracija serumskih albumina između 15 i 19,9 g/l. što dovodi do uvećanja njihovog CCECAI za 1 poen. Ukupna srednja vrednost CCECAI kod pasa obolelih od LPD je 7,59. Dobijeni rezultati su u skladu sa nalazima drugih autora koji su pratili parametre potrebne za izučavanje indeksa CIBDAI i CCECAI (Garcia-Sancho et al. 2010, Allenspach 2009, Jergens 2008, Garcia-Sancho et al. 2007, Kobayashi et al. 2007, Lecoindre 2007). Na osnovu vrednosti CIBDAI dobili smo 3 grupe pacijenata: prva grupa sa blagim oblikom LPD broji 7 pasa (CIBDAI  $\leq 5$ ), druga grupa od 28 pasa ima LPD srednjeg intenziteta ( $6 \leq \text{CIBDAI} \leq 8$ ) i treća grupa sa intenzivnim LPD broji 11 pasa (CIBDAI  $\geq 9$ ). U našim morfološkim nalazima, s druge strane, izdvojile su se takođe 3 grupe pasa: kod 31 psa dominantnu ćelijsku populaciju čine T limfociti, u 2 slučaja dominiraju plazma ćelije dok je kod 13 pasa ustanovljen ravnomerno mešoviti infiltrat limfocita i plazma ćelija. U grupi blagih LPD su 2 psa sa dominantno plazmocitnim infiltratom, 4 psa sa dominantno limfocitnim infiltratom i 1 pas sa limfocitno - plazmocitnim infiltratom. U grupi srednje jakih LPD su 23 psa sa dominantno limfocitnim infiltratom i 5 pasa sa limfocitno - plazmocitnim infiltratom. U grupi značajnih LPD su 4 psa sa dominantno limfocitnim infiltratom i 7 pasa sa limfocitno - plazmocitnim infiltratom. Vrednost CCECAI se poklapa sa vrednošću CIBDAI, osim kod 1

psa iz II grupe i 4 psa iz III grupe, kod kojih je koncentracija serumskih albumina između 15 i 19,9 g/l. Takav rezultat kod ovih pasa dovodi do uvećanja njihovog CCECAI za 1 poen. Na osnovu vrednosti indeksa CCECAI, koji govori o jačini enteropatija, mogli smo svrstati pacijente na sledeći način: blagu enteropatiju ima 7 pasa (CCECAI  $\leq$ 5), enteropatiju srednjeg intenziteta ima 28 pasa ( $6 \leq$  CCECAI  $\leq$ 8), od intenzivne enteropatije boluje 10 pasa ( $9 \leq$  CCECAI  $\leq$  11) dok od vrlo intenzivne enteropatije boluje 1 pas (CCECAI  $\geq$ 12). U prve tri grupe poklapaju se pacijenti sa podelom na osnovu vrednosti CIBDAI, dok je u grupi vrlo intenzivnih enteropatija pas kod koga dominira mešoviti limfocitno - plazmocitni infiltrat.

Ultrazvučni pregled nam je ukazao na promene koje nisu specifične za LPD već se javljaju kod većine duodenopatija. Zapažen je valovit izgled zida duodenuma, zadebljala i hipoehogena mukoza (debljina zida je oko 6 mm). U literaturi se mogu naći slični podaci (Fonseca-Alves i sar., 2012; Rousseau, 2005; Spohr i sar., 1995). Pojedini autori navode da se zadebljanje zida creva može uočiti u 71% slučajeva (Lecoindre i sar., 2010).

Radiološkim ispitivanjem, na nativnim snimcima se najčešće ne zapažaju specifične promene. Uz upotrebu kontrastnog sredstva uočava se neujednačenost lumena creva i spastičnost, dok je reljef sluzokože narezuckan, diskontinuiran i magličast, što se slaže sa tvrdnjama drugih autora (Fonseca-Alves i sar., 2012; McTavish, 2002).

Potreba za endoskopskim ispitivanjem radi postavljanja dijagnoze LPD je zajednička svim istraživačima (Lecoindre i sar., 2010; Tischendorf i sar., 2008; Rychlik i sar., 2007; Serra i sar., 2006). U našem ispitivanju, kod obolelih pasa je zapažena hiperemičnost i edem sluznice duodenuma. Sluznica je izgledala somotasto i lako je krvarila. Kod 3 psa su se mogla uočiti na površini sluznice sitno zrnasta polja bele boje, posuta po sluznici, veličine zrna pirinča. Ovaj nalaz je interesantan pošto se do skora smatralo da su ovakve promene karakteristične samo za limfangiektaziju (Jergens, 2008). Međutim, grupa autora (Garcia-Sancho i sar., 2010) ispitujući pse obolele od limfocitno – plazmocitnog enteritisa, dobila je rezultate slične našima. Naime, njihova studija je obuhvatala 50 pasa obolelih od limfocitno – plazmocitnog enteritisa, a kod 22 psa, tokom endoskopije su na površini sluznice uočena sitno zrnasta polja bele boje, veličine zrna pirinča. Ova grupa autora je pokazala da ovakav nalaz nije specifičan samo za



limfangiektaziju. Dalje studije bi trebalo da pokažu značaj ovakvog nalaza kod pasa obolelih od LPD, posebno u prognostičkom smislu.

U izvedenim ispitivanjima, histološkim pregledom zida duodenuma zdravih pasa uočavaju se uniformne crevne resice, sa očuvanim crevnim epitelom. U lamini propriji se zapaža mali broj pojedinačnih limfocita, plazma ćelija i po koji eozinofilni granulocit. Kripte su razdvojene sa 1-2 limfocita ili plazma ćelije. U epitelnom sloju se mogu naći pojedinačni intraepitelni limfociti. Histopatološkim pregledom tkivnih uzoraka sluznice duodenuma svih obolelih pasa, izdvojile su se tri grupe uzoraka: prva grupa uzoraka su uzorci u kojima postoji infiltrat u krznu sluznice duodenuma u kome dominiraju limfociti i plazma ćelije (kod 46 slučajeva); u drugoj grupi uzoraka, takođe postoji infiltrat, ali sastavljen pretežno od eozinofilnih granulocita (3 slučaja), dok u trećoj grupi uzoraka nema ćelijskog infiltrata u sluznici duodenuma (5 slučajeva).

Detaljnim opisom morfoloških promena na biopsijskim uzorcima sluznice duodenuma pasa obolelih od LPD (promene na crevnim resicama, stepen oštećenja crevnog epitela, postojanje proširenja kripte, prisustvo dilatiranih limfnih sudova i fibroze) kao i praćenjem zastupljenosti intraepitelnih limfocita (IEL), limfocita, plazma ćelija, eozinofilnih granulocita i neutrofilnih granulocita u infiltratu sluznice, formirane su različite morfološke grupe. Poznato je da limfociti nastanjuju efektorski odeljak intestinalne mukoze. Laminu epitelijalis mukoze nastanjuju intraepitelni limfociti označeni kao IEL, dok laminu propriju mukoze nastanjuju *lamina propria* limfociti označeni kao LPL (Guy-Grand i sar., 2005). LPL su predstavljeni T limfocima (CD4+ i CD8+ T limfociti) i B limfocitima. T limfociti predstavljaju finalno diferencirane efektorske T ćelije čiji su putevi stimulacije različiti od onih za T limfocite periferne krvi. Sekretuju velike količine citokina kao što je IFN $\gamma$ , IL4, IL5. To su najvećim delom CD4+ T limfociti. B limfociti su aktivirane B ćelije i plazma ćelije koje sekretuju najvećim delom IgA. Intraepitelni limfociti su takođe jedinstvena populacija limfocita različita od LPL. U grupi uzoraka u kojoj dominiraju limfociti i plazma ćelije, uočeno je skraćenje crevnih resica na 75-50% normalne dužine, a same promene su okarakterisane kao blage do umerene. Crevne resice su zadebljale, a neke su fuzionisane. Na epitelnim ćelijama zapažaju se degenerativne promene, kao i deskvamacija epitelnih ćelija. Zapaženo je blago do umereno proširenje

kripti (10 - 25% kripte je prošireno). *Lamina propria* je edematozna zbog prisustva obilnog ćelijskog infiltrata velikim brojem mononuklearnih ćelija, među kojima dominiraju limfociti i plazma ćelije. Plazma ćelije, sa ekscentrično postavljenim jedrima, obično u grupama ispunjavaju laminu propriju crevnih resica. Kripte su razdvojene sa 10 – 20 limfocita i plazma ćelija. Pojedinačni limfociti, smešteni intaepitelno (intraepitelni limfociti – IEL), zapažaju se na epitelu crevnih resica, i to kao individualne ćelije, a retko u grupama (grozdovima). IEL su predstavljeni T limfocitima sa značajnom citolitičkom i imunoregulatornom aktivnošću. (Abbas i sar., 2006). Rezultati dosadašnjih izučavanja imunološkog sistema ukazuju da intraepitelni limfociti čine jedinstvenu populaciju limfocita predstavljenju T limfocitima sa značajnom citolitičkom i imunoregulatornom aktivnošću. T - ćelijski receptor (TCR)<sub>2</sub> prepoznaje peptidne antigene prezentovane u sklopu MHC molekula i predstavlja heterodimer koji se sastoji od  $\alpha$  i  $\beta$  lanaca, dok manji procenat T ćelija u organizmu eksprimira receptore sastavljene od  $\gamma$  i  $\delta$  lanaca. (Abbas i sar., 2006). Prema nekim autorima (Untersmayr i sar., 2006), čak 50% IEL u crevima su  $\gamma\delta$ T limfociti.  $\gamma\delta$ T limfociti su slabo definisanog porekla i uloge. Nekada se smatralo da su IEL zaduženi za prvi kontakt sa antigenom (Ferguson 1977). Danas se zna da je to zadatak M ćelija. IEL luče u velikoj količini IFN $\gamma$  i IL5. Moguća funkcija je imunološki nadzor nad mutiranim ili virusom inficiranim ćelijama (Roitt i sar. 2001). IEL su izvor citokina Th2 tipa - IL13, koji podržava produkciju IgE i alergijsku reakciju.  $\gamma\delta$ TCR molekuli prepoznaju proteinske i neproteinske antigene koje uglavnom ne prezentuju klasični MHC molekuli (Untersmayr i sar., 2006; Allison i sar., 2001), što ukazuje da prepoznaju konformaciju, a to je tipična odlika alergena hrane, te je moguće da učestvuju u odgovoru na alergene hrane.

Iz rezultata drugih istraživača koji su se bavili ispitivanjem imunofenotipskih karakteristika ćelija u uzorcima sluznice duodenuma zdravih pasa, poznato je da na CD3 antitelo pozitivno reaguju pojedinačni limfociti u lamini propriji mukoze i u lamini epitelijalis mukoze. Istovremeno je ustanovljeno da na CD79 antitelo pozitivno reaguju pojedinačni limfociti u lamini propriji mukoze (Day i sar., 2008).

Imunohistohemijskim ispitivanjem uzoraka sluznice duodenuma obolelih pasa u našem materijalu, uočena je ekspresija CD3<sup>+</sup> (T limfocita) i CD79<sup>+</sup> (B limfocita). Kod ispitanih uzoraka, kod 31 psa u inflamatornom infiltratu dominiraju ćelije CD3<sup>+</sup>

imunofenotipa. Pozitivna imunohemijska reakcija je ispoljena nalazom precipitata tamnosmeđe boje u predelu ćelijske membrane T limfocita, tako da je prisutan tzv. membranski precipitat. Reakcija ređe zastupljenih B limfocita, više je difuznog karaktera. B limfociti dominiraju u 2 slučaja. U 13 slučaja postoji ravnomerno mešoviti limfocitno - plazmocitni infiltrat.

U literaturi se može naći mnoštvo podataka o psima obolelim od limfocitno – plazmocitnog duodenitisa. Međutim, o psima kod kojih se u biopsijskom uzorku duodenuma uočava dominacija plazmocita, dominacija limfocita ili mešoviti infiltrat plazmocita i limfocita, podaci su veoma oskudni. U našem istraživanju smo upoređivali broj leukocita, limfocita, koncentraciju ukupnih proteina, koncentraciju serumskih albumina kao i vrednosti indeksa CIBDAI i CCECAI kod pasa obolelih od LPD, ali sa dominacijom različitih ćelija u infiltratu (tabela 32, tabela 33, tabela 34, tabela 35, tabela 38 i tabela 39). Psi sa ravnomerno mešovitim infiltratom su pokazali najveće srednje vrednosti za broj leukocita i limfocita, kao i najniže srednje vrednosti za koncentraciju ukupnih proteina i koncentraciju serumskih albumina. Kod ovih pasa ustanovljene su najveće srednje vrednosti kliničkih indeksa CIBDAI i CCECAI. Promene uočene patohistološkim ispitivanjem su okarakterisane kao blage do umerene. Međutim, kod pasa sa dominacijom plazmocita u infiltratu, koji su imali najniže srednje vrednosti broja leukocita i limfocita, najveće srednje vrednosti koncentracije ukupnih proteina i serumskih albumina kao i najniže srednje vrednosti kliničkih indeksa CIBDAI i CCECAI, patohistološke promene na biopsijskim uzorcima okarakterisane su kao umerene. Iz navedenog se može zaključiti da klinička manifestacija LPD ne odražava uvek patohistološku sliku. Ukoliko određenom psu na osnovu kliničkih ispitivanja budu izračunati indeksi CIBDAI i CCECAI koji bi ga svrstali u grupu pasa obolelih od blagih enteropatija, to ne mora da podrazumeva blage promene u patohistološkom nalazu, ili pak ukoliko određenom psu na osnovu kliničkih ispitivanja budu izračunati indeksi CIBDAI i CCECAI koji bi ga svrstali u grupu pasa obolelih od srednjih ili intenzivnih enteropatija, to ne mora da podrazumeva uvek intenzivne promene u patohistološkom nalazu, već promene mogu biti i blage ili umerene. Do sličnih rezultata došli su i Allenspach\* i saradnici (2009) koji navode da u svojim istraživanjima nisu mogli da uspostave korelaciju kliničke aktivnosti (kliničkih indeksa) sa

patohistološkim nalazom. Ovi autori sugerišu da su pri oceni intenziteta bolesti promene u mikroarhitekturi crevnih resica od većeg značaja nego sam ćelijski infiltrat. Na ovaj način bi se možda moglo objasniti zašto neki psi oboleli od LPD, u našem istraživanju, imaju visoke indekse CIBDAI i CCECAI, a blage patohistološke promene na biopsijskim uzorcima, dok pojedini psi imaju niske kliničke indekse, a promene na biopsijskim uzorcima su okarakterisane kao umerene ili značajne.

Na osnovu do sada iznetih rezultata je očigledno da se na osnovu kliničke dijagnostike, ultrazvučnog, rendgenskog i endoskopskog nalaza ne može sa sigurnošću tvrditi o kom tipu zapaljenja creva se radi. Ne postoje jasne razlike u rezultatima kliničkih ispitivanja kod pasa obolelih od različitih vrsta enteropatija. Jedino se patohistološkom analizom uz opis pratećih morfoloških promena i opis ćelija koje se nalaze u infiltratu može postaviti definitivna dijagnoza. Ipak, naši rezultati, kao i podaci iz literature, ukazuju da postoji potreba za daljim istraživanjima u smeru utvrđivanja u kojoj meri promene mikroarhitekture crevnih resica, a u kojoj meri sam ćelijski infiltrat utiču na kliničku manifestaciju limfocitno - plazmocitnog duodenitisa pasa..

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih istraživanja, doneti su sledeći zaključci:

1. Vrednost kliničkih indeksa CIBDAI i CCECAI kod obolelih pasa, koji se izračunavaju na osnovu podataka dobijenih kliničkim pregledom, ukazuju na intenzitet kliničke manifestacije duodenitisa. Kliničke manifestacije limfocitno – plazmocitnog duodenitisa (LPD) mogu da variraju od blage do vrlo intenzivne, što nije određeno tipom infiltrata.

2. Utvrđena je statistički značajna razlika za vrednosti broja leukocita i limfocita između pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa ( $p \leq 0,01$ ). Nije utvrđena statistička značajnost razlike za vrednosti eozinofilnih granulocita i eritrocita.

3. Utvrđena je statistički značajna razlika za vrednosti koncentracije ukupnih proteina i koncentracije serumskih albumina između pasa obolelih od LPD i kontrolne grupe pasa ( $p \leq 0,01$ ). Nije utvrđena statistička značajnost razlike za vrednosti ALT, AST i AP.

4. Ultrazvučnom, radiološkom i endoskopskom dijagnostikom nije moguće napraviti razliku između različitih tipova inflamatorne bolesti creva.

5. Patohistološkom analizom biopsijskih uzoraka duodenuma pasa obolelih od LPD, kod 46 pasa je utvrđen limfocitno - plazmocitni infiltrat u sluznici creva.

6. Imunohistohemijskom analizom 46 biopsijskih uzoraka duodenuma, kod kojih je patohistološkom analizom uočen limfocitno - plazmocitni infiltrat u sluznici creva, ustanovljeno je da u 2 uzorka postoji dominacija plazma ćelija, u 31 uzorku dominiraju

CD3+ T limfociti, dok je u 13 uzoraka ustanovljen ravnomerno mešoviti infiltrat limfocita i plazma ćelija.

7. Analizom statističkih pokazatelja za CIBDAI i CCECAI unutar grupe pasa obolelih od limfocitno - plazmocitnog duodenitisa, eozinofilnog duodenitisa i kataralnog duodenitisa pasa, ustanovljeno je da su najviše prosečne vrednosti za CIBDAI i za CCECAI bile kod pasa sa LPD, a najmanje prosečne vrednosti za CIBDAI i CCECAI su bile kod pasa sa kataralnim duodenitisom. Analizom statističkih pokazatelja za CIBDAI i CCECAI unutar grupe pasa obolelih od LPD, ustanovljena je signifikantna razlika ( $p \leq 0,05$ ) između prosečne vrednosti za CIBDAI i CCECAI kod pasa sa mešovitim infiltratom i prosečne vrednosti pasa sa pretežno plazmocitnim infiltratom. Statistički vrlo značajno ( $p \leq 0,01$ ) je veća prosečna vrednost za CIBDAI i CCECAI kod pasa sa mešovitim infiltratom u odnosu na prosečnu vrednost za CIBDAI i CCECAI kod pasa sa pretežno limfocitnim infiltratom.

## 8. LITERATURA

1. Abbas A.K., Andrew A.H., Basic immunology., 2006-2007, 2<sup>nd</sup> edition; Elsevier Inc, New York, USA
2. Allenspach K., 2011, Clinical immunology and immunopathology of the canine and feline intestine, *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 41(2): 345-60
3. Allenspach K\*, 2009, IBD nel cane:nuove possibilita diagnostiche, 62° Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Rimini, Italy, Proceedings of the Internacional SCIVAC Congress, pp: 25-26
4. Allenspach K., 2009, Patogenesi dell'IBD nel cane, 62° Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Rimini, Italy, Proceedings of the Internacional SCIVAC Congress, pp: 21-22
5. Allenspach K., Wieland B., Grone A., Gaschen F., 2007, Chronic enteropathies in dogs:evaluation of risk factors for negative outcome, *J. Vet. Intern. Med.*, 21(4): 700-708
6. Allenspach K.,Gaschen F., 2003, Chronic intestinal diseases in the dog: a review, *Schweiz. Arch. Tierheilkd*, 145(5): 209-219, 221-222
7. Allison T.J., Winter C.C., Fournie J.J., Bonneville M., Garboczi D.N., 2001, Structure of human gammadelta T cell antigen receptor, *Nature.*, 411: 820-824
8. Baez J.L., Hendrick M.J., Walker L.M., Washabau R.J., 1999, Radiographic, ultrasonographic, and endoscopic findings in cats with inflammatory bowel disease of the stomach and small intestine: 33 cases (1990–1997), *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 215: 349–354

9. Banks W. J., 1986, Applied veterinary histology, 1<sup>st</sup> edition, Williams and Wilkins, Baltimore
10. Baum B., Meneses F., Kleinschmidt S., Nolte I., Hewicker-Trautwein M., 2007, Age-related histomorphologic changes in the canine gastrointestinal tract: A histologic and immunohistologic study, *World J. Gastro.*, 13: 152–157
11. Biller B.J., Elmslie R.E., Burnett R.C., Avery A.C., Dow S.W., 2007, Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer, *Vet. Immunology and Immunopathology*, 116: 69-78
12. Brandtzaeg P., Johansen F-E., 2005, Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties, *Immunol. Rev.*, 206: 32-63
13. Brandtzaeg P., Kiyono H., Pabst R., Russell M.W., 2008, Terminology: Nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue, *Mucos. Immunol.* 1: 31–37
14. Breitschwerdt E.B., Halliwell W.H., Foley C.W., Stark D.R., Corwin L.A., 1980, A hereditary diarrhetic syndrome in the Basenji characterized by malabsorption protein losing enteropathy and hypergammaglobulinemia, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 16: 551-560
15. Budras K. D., M<sup>c</sup>Carthy P. H., Fricke W., Richter R., 2002, Anatomy of the dog, 4<sup>th</sup> edition, Schlutersche GmbH&Co. KG, Verlag und Druckerei
16. Cave N.J., 2003, Chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract of companion animals, *N. Z.Vet.J.*, 51(6): 262-274
17. Cerquetella M., Spaterna A., Laus F., Tesei B., Rossi G., Antonelli E., Villanacci V., Bassotti G., 2010, Inflammatory bowel disease in the dog: Differences and similarities with humans, *World J. Gastroenterol.*, 16(9): 1050-1056



18. Chehade M., Mayer L., 2005, Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115: 3-12
19. Chichlowski M., Hale L.P., 2008, Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 295(6): G1139–G1149
20. Craven M., Simpson J.W., Ridyard A.E., Chandler M.L., 2004, Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases ( 1995-2002), *The Journal of Small Animal Practice*, 45: 336-342
21. Cunningham-Rundles C., 2001, Physiology of IgA and IgA deficiency, *J. Clin. Immunol.*, 21: 303-309
22. Day M.J., Bilzer T., Mansell J., Wilcock B., Hall E.J., Jergens A., Minami T., Willard M., Washabau R., 2008, Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: A report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group, *J. Comp. Path.*, 137: S1–S43
23. Delves P.J., Roitt I.M.: 2000. The immune system: First of two parts; Review article, *Advances in Immunol.*, 343(1): 37-49
24. Desnoyers M., 2004, *Gastrointestinal tract and pancreas in Cowell R.L.: Veterinary clinical pathology secrets*, first edition, Elsevier Inc. Mosby, USA
25. Eldredge D.M., Carlson L.D., Carlson D.G., Giffin J.M., Adelman B., 2007, *Dog owner's home veterinary handbook*, 4<sup>th</sup> edition, Wiley publishing, Howell Book House, New Jersey; pp: 283-284

26. Ellenberger Y., Baum H., 1977, Handbuch der vergleichenden anatomie der haustiere, 18. auflage, Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, New York
27. Evans H. E., 1993, Miller's anatomy of the dog, 3<sup>rd</sup> edition, Saunders, An Imprint of Elsevier, Philadelphia
28. Ferguson A., 1977, Intraepithelial lymphocytes of the small intestine, Gut, 18: 921-937
29. Fogle J.E., Bissett S.A., 2007, Mucosal immunity and chronic idiopathic enteropathies in dogs, Compendium Vet.com., pp: 290-302
30. Foneseca-Alves C.E., Correa A.G., Elias F., 2012, Eosinophilic gastroenteritis in basset hound dog, J. Anim. Sci., 2(2): 110-112
31. Garcia-Sancho M., Rodriguez-Franco F., Sainz A., Mancho C., Rodriguez A., 2007, Evaluation of clinical, macroscopic, and histopathologic response to treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic - plasmacytic enteritis, J. Vet. Intern. Med., 21(1): 11-17
32. Garcia-Sancho M., Sainz A., Villaescusa A., Rodriguez A., Rodriguez-Franco F., 2011, White spots on the mucosal surface of the duodenum in dogs with lymphocytic plasmacytic enteritis, J. Vet. Sci., 12(2): 165-169
33. Gaschen F.P., Martin M.L., 2011, Clinical phenotype of chronic enteropathies in the dog, "Nestle Purina Nutrition Symposium: Gastrointestinal Immunopathology", Lausanne. Switzerland, pp: 15-24
34. German A.J., Hall E.J., Day M.J., 1999, Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine, J. Comp. Path., 120: 129-145

35. German A.J., Hall E.J., Day M.J., 2000, Relative deficiency in IgA production by duodenal explants from German shepherd dogs with small intestinal disease, *Vet. Immunol. Immunopathol*, 76: 25-43
36. German A.J., Hall E.J., Day M.J., 2001, Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies, *J. Vet. Intern. Med*, 15(1): 14-25
37. German A.J., Hall E.J., Day M.J., 2003, Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs, *J. Vet. Intern. Med.*, 17: 8-20
38. German A.J., Hall E.J., Moore P.F., Ringler D.J., Newman J., Day M.J., 1999, The distribution of lymphocytes expressing alphabeta and gammadelta T-cell receptors, and the expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 in the canine intestine, *J. Comp. Pathol.*, 121(3): 249-63
39. Gomez J.A., Russell S.W., Trowbridge J.O., Lee J., 1977, Canine histiocytic ulcerative colitis. An ultrastructural study of the early mucosal lesion, *Dig. Dis. Sci.*, 22(6): 485-496
40. Guy-Grand D., Griscelli C., Vassali P., 1974, The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells, *European J. Immunol.*, [2005, [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830040610](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830040610)] 4(6): 435-443
41. Guy-Grand D., Vassalli P., 2002, Gut intraepithelial lymphocyte development, *Curr. Opin. Immunol.*, 14(2): 255-9
42. Hall E.J., Rutgers H.C., Scholes S.F.E., Middleton D. J., Tennant B.J., King N.M., Kelly D.F., 1994, Histiocytic ulcerative colitis in boxer dogs in the UK, *J. Small. Anim. Pract.*, 35(10): 509-515

43. Hart J.R., Shaker E., Patnaik A.K., Garvey M.S., 1994, Lymphocytic - plasmacytic enterocolitis in cats: 60 cases (1988–1990), *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 30: 505–514
44. Harvey R.F., Bradshaw J.M., 1980, A simple index of Crohn's-disease activity, *Lancet*, 315(8167): 1-514
45. Hendrickson B.A., Gokhale R., Cho J.H., 2002, Clinical aspect and patophysiology of inflammatory bowel disease, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(1): 79-94
46. Hershberg R.M., Mayer L.F., 2000, Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity, *Immunol. Today*, 21(3): 123-128
47. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Treg.html>
48. <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/cell-type/t-regulatory-cells>
49. Jacobs G., Collins-Kelly L., Lappin M., Tyler D., 1990, Lymphocytic - plasmacytic enteritis in 24 dogs, *J. Vet. Intern. Med.*, 4(2): 45-53
50. 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(1-2): 178–193
51. Janković Ž., Stanojević D., Miladinović Ž., 1991, Anatomija domaćih životinja sisara – Angiologija, 1. izdanje, Veterinarski fakultet u Beogradu, Savez veterinara i veterinarskih tehničara Jugoslavije, Odbor za izdavačku delatnost, Beograd

52. Jergens A.E., Crandell J., Morrison J.A., Deitz K., Pressel M., Ackermann M., Suchodolski J.S., Steiner J.M., Evans R., 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(2): 269-277
53. 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. An immunohistochemical and morphometric study, *Am. J. Vet. Res.*, 60(4): 515-520
54. Jergens A.E., Moore F.M., Heynes J.S., Miles K.G., 1992, Idiopathic inflammatory bowel disease in dogs and cats. 84 cases (1987-1990), *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 201(10): 1603-1608
55. 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, *Am. J. Vet. Res.*, 57(5): 697-704
56. Jergens A.E., Moore F.M., March P., Miles K.G., 1992, Idiopathic inflammatory bowel disease associated with gastroduodenal ulceration-erosion: a report of nine cases in the dog and cat, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 28(1): 21-26
57. Jergens A.E., Schreiner C.A., Frank D.E., Niyo Y., Ahrens F.E., Eckersall P.D., Benson T.J., 2003, A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease, *J. Vet. Intern. Med.*, 17(3): 291-297
58. Jergens A.E., 2004, Clinical assessment of disease activity for canine inflammatory bowel disease, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 40(6): 437-445

59. Jergens A.E., 2008, Inflammatory bowel disease in the dog (IBD). Dog Health by Lowchens Australia.com; <http://www.lowchenaustralia.com/health/boweldisease.htm>
60. Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley O. R., 1995, Basic histology, 8<sup>th</sup> edition, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brasil
61. Kleinschmidt S., Meneses F., Nolte I., Hewicker-Trautwein M., 2008, Distribution of mast cell subtypes and immune cell populations in canine intestines: evidence for age-related decline in T cells and macrophages and increase of IgA-positive plasma cells, Res. Vet. Sci., 84(1): 41-48
62. Kobayashi S., Ohno K., Uetsuka K., Nakashima K., Setoguchi A., Fujino Y., Tsujimoto H., 2007, Measurement of intestinal mucosal permeability in dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis, J. Vet. Med. Sci., 69(7): 745-749
63. König H. E., Liebich H. G., 2009, Veterinary anatomy of domestic mammals, Textbook and colour atlas, 4<sup>th</sup> edition, Schattauer GmbH Stuttgart
64. Korzenik J.R., 2005, Past and current theories of etiology of IBD. - Toothpaste, worms and refrigerators, J. Clin. Gastroenterol., 39(2): 59-65
65. Krstić N., Krstić V., 2007, Rendgenološka i endoskopska dijagnostika oboljenja digestivnog i respiratornog sistema pasa i mačaka, 1. izdanje, Fakultet veterinarske medicine u Beogradu, Naučna KMD
66. Kull P.A., Hess R.S., Craig L.E., Saunders H.M., Washabau R.J., 2001, Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic characteristics of intestinal lymphangiectasia in dogs: 17 cases (1996–1998), J. Am. Vet. Med. Assoc., 219(2): 197–202

67. Lecoindre P., Chevallier M., Guerret S., 2010, Les entereropathies exsudatives d'origine non neoplastique du chien: etude retrospective de 34 cas, Schweizer Archiv fuer Tierheilkunde, 152(3): 141-146
68. Lecoindre P., 2006, Chronic inflammatory bowel diseases, etiopathogeny, diagnosis, Bull. Acad. Vet. France, Tome 159(N°4): 333-342
69. Luckschander N., Allenspach K., Hall J., Seibold F., Grone A., Doherr M.G., 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(2): 221-227
70. Macpherson A.J., Hunziker L., McCoy K., Lamarre A., 2001, IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms, Microbes Infection., 3: 1021-1035
71. Malewska K., Rychlik A., Nieradka R., Kander M., 2011, Treatment of inflammatory bowel disease (IBD) in dogs and cats, Pol. J. Vet. Sci., 14(1): 165-171
72. Marchetti V., Lubas G., Lombardo A., Corazza M., Guidi G., Cardini G., 2010, Evaluation of erythrocytes, platelets, and serum iron profile in dogs with chronic enteropathy, Vet. Med. Int., pp: 1-8 (PubMed – published online 2010 july)
73. Marks S.L., Cave N., 2011, Dietary modulation of intestinal mucosa integrity, "Nestle Purina Nutrition Symposium: Gastrointestinal Immunopathology", Lausanne. Switzerland, pp: 7-14
74. Mayer L., 1998, Current concepts in mucosal immunity. I. Antigen presentation in the intestine: new rules and regulations, Am. J. Physiol., 274(1): G7-9

75. Mayer L., 2000, Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 30(1): S4-12
76. Mayer L., 2003, Mucosal immunity, *Pediatrics*, 111(6): 1595-1600
77. McTavish S., 2002, Eosinophilic gastroenteritis in a dog, *Can. Vet. J.*, 43: 463-465
78. Miller M. E., Christensen J.C., Evans H.E., 1964, *Anatomy of the dog*, 1<sup>st</sup> edition, W. B. Saunders Company Philadelphia - London
79. Münster M., Hörauf A., Bilzer T., 2006, Assessment of disease severity and outcome of dietary, antibiotic, and immunosuppressive interventions by use of the canine IBD activity index in 21 dogs with inflammatory bowel disease, *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 119(11-12): 493–505
80. Munster M., Suchodolski J.S., Bilzer T., Bilzer T., Horauf A., Steiner J.M., 2010, Influence of physiological disturbances on treatment success of dietary therapy in dogs with chronic enteropathies, *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr*, 123(1-2): 74-82
81. Nagler-Anderson C., 2001, Strategic defences in the intestinal mucosa, *Nat. Rev. Immunol*, 1(1): 59-67
82. Nandakumar S., Miller C.W.T., Kumarguru U., 2009, T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome, *Clinical Molecular Allergy*, 7: 5-13
83. Nelson R.W., Cuoto C.G., 2003, Disorders of the intestinal tract in Small animal internal medicine, 3<sup>rd</sup> edition Mosby, Inc Elsevier, S<sup>th</sup> Louis, Missouri, pp: 431-463



84. Neutra M.R., Mantis N.J., Kraehenbuhl J.P., 2001, Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues, *Nat. Immunol.*, 2: 1004-1009
85. Nicoletti C., 2000, Unsolved mysteries of intestinal M cells, *Gut*, 47: 735-739
86. *Nomina anatomica veterinaria*, 2005, 5<sup>th</sup> edition, Editorial Committee, Hannover, Columbia, Gent, Sapporo
87. O'Garra A., Vieira P., 2004, Regulatory T cells and mechanisms of immune system control, *Nature Medicine*, 10(8): 801-805
88. Pantić V., 1987, *Histologija*, 2. izdanje, IRO „Naučna knjiga“, Beograd
89. Paulsen D.B., Buddington K.K., Buddington R.K., 2003, Dimensions and histologic characteristics of the small intestine of dogs during postnatal development, *Am. J. Vet. Res.*, 64(5): 618–626
90. Roitt I., Brostoff J., Male D., 2001, *Immunology*, 6<sup>th</sup> edition, Mosby, Harcourt Publishers Limited
91. Roth L., Walton A.M., Leib M.S., Burrows C.F., 1990, A grading system for lymphocytic plasmacytic colitis in dogs, *J. Vet. Diagn. Investig.*, 2(4): 257–262
92. Rouse B.T., 2007, Regulatory T cells in health and disease, *J. Int. Med.*, 262: 78-95
93. Rousseau M., 2005, Severe lymphocytic - plasmacytic and atrophic gastritis, as well as, predominantly eosinophilic severe enteritis, in a 19-month-old Labrador retriever, *Can. Vet. J.*, 46(3): 264-267

94. Rutgers H.C., Batt R.M., Kelly D.F., 1988, Lymphocytic - plasmacytic enteritis associated with bacterial overgrowth in a dog, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 192(12): 1739-1742
95. Rychlik A., Nieradka R., Kander M., Depta A., Nowicki M., Sarti K., 2007, Usefulness of endoscopic examination for the diagnosis of inflammatory bowel disease in the dog, 10(2): 113-118
96. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Masahiro O., 2008, Regulatory T cells and immune tolerance, *Cell*. 133(5): 775-787
97. Sartor R.B., 2006, Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis, *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 3(7): 390–407
89. Serra S., Jani P.A., 2006, An approach to duodenal biopsies, *J. Clin. Pathol.*, 59(11): 1133-1150
99. Simić V., Janković Ž., 1997, Anatomija domaćih životinja – Splanchnologija, 4. izdanje, Veterinarski fakultet u Beogradu, Veterinarska komora Srbije, Beograd
100. Sisson S., 1953, Anatomija domaćih životinja, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb
101. Simpson K.W., Jergens A.E., 2011, Pitfalls and progress in the diagnosis and management of canine inflammatory bowel disease, *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*, 41(2): 381-398
102. Simpson K.W., 2011, The relationship between mucosal bacteria and IBD in dogs and cats, “Nestle Purina Nutrition Symposium: Gastrointestinal Immunopathology“, Lausanne, Switzerland, pp: 25-30

103. Simpson K.W., 1994, Small intestinal bacterial overgrowth, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 205(3): 405-407
104. Snook J., 1990, Are the inflammatory bowel diseases autoimmune disorders? *Gut*, 31: 961-963
105. Spinato M.T., Barker I.K., Houston D.M., 1990, A morphometric study of the canine colon: comparison of control dogs and cases of colonic disease, *Can. J. Vet. Res.*, 54(4): 477-486
106. Spohr A., Koch J., Jensen A.L., 1995, Ultrasonographic findings in a basenji with immunoproliferative enteropathy, *J. Small Anim. Pract.*, 36(2): 79-82
107. Stevanović J., 2004, Fiziologija organa za varenje kod domaćih životinja, 1. izdanje, Fakultet veterinarske medicine u Beogradu, Mladost biro šped, Beograd
108. Stojić V., 1996, Veterinarska fiziologija, IP „Naučna knjiga“, Beograd
109. Stonehewer J., Simpson J.W., Else R.W., Macintyre N., 1998, Evaluation of B and T lymphocytes and plasma cells in colonic mucosa from healthy dogs and from dogs with inflammatory bowel disease, *Res. Vet. Sci.*, 65(1): 59–63
110. Strombeck D.R., Guilford W.G., 1996, Idiopathic inflammatory bowel disease, *Small Anim Gastroenterology*, 3<sup>th</sup> edition, Saunders; pp: 451-486
111. Tams T. R., 2003, Handbook of small animal gastroenterology, 2<sup>nd</sup> edition, Saunders, Elsevier Science, USA

112. Tischendorf J.J., Wopp K., Streetz K.L., Bach J., Meyer M., Tischendorf S., Gassier N., Wasmuth H.E., Trautwein C., Winograd R., 2008, The value of duodenal biopsy within routine endoscopy: a prospective study in 1000 patients, *Z. Gastroenterol.*, 46(8): 771-775
113. Trpinac D., 1994., *Histologija za studente farmacije*, 2. izdanje, Ecolibri, Beograd
114. Untersmayr E., Jensen-Jarolim E., 2006, Mechanisms of type I food allergy, *Pharmacology & Therapeutics*, 112: 787-798
115. van der Gaag I., Happe R.P., 1990, The histological appearance of peroral small intestinal biopsies in clinically healthy dogs and dogs with chronic diarrhea, *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 37(6): 401-416
116. Waly N., Gruffydd-Jones T.J., Stokes C.R., Day M.J., 2001, The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats, *J. Comp. Pathol.*, 124(2-3): 172–182
117. Waly N.E., Stokes C.R., Gruffydd-Jones T.J., Day M.J., 2004, Immune cell populations in the duodenal mucosa of cats with inflammatory bowel disease, *J. Vet. Intern. Med.*, 18(6): 816–825
118. Washabau R.J., Day M.J., Willard M.D., Hall E.J., Jergens A.E., Mansell J., Minami T., Bilzer T.W., 2010, Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals, *J. Vet. Intern. Med.*, 24: 10–26
119. Washabay R.J., 2010, Canine inflammatory bowel disease: diagnosis and therapy, „110<sup>th</sup> Pen Annual Conference“. *Companion Animal – Gastrointestinal issues*. pp: 98-105

120. Whitley N.T., Day M.J., 2011, Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease, *J. Small Anim. Pract.*, 52: 70-85
121. Willard M.D., Jergens A.E., Duncan R.B., Leib M.S., McCracken M.D., DeNovo R.C., Helman R.G., Slater R.G., Harbison J.L., 2002, Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 220(8): 1177–1182
122. Yamasaki K., Suematsu H., Takahashi T., 1996, Comparison of gastric and duodenal lesions in dogs and cats with and without lymphocytic - plasmacytic enteritis, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 209(1): 95–97
123. York I.A., Goldberg A.L., Mo X.Y., Rock K.L., 1999, Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation, *Immunol. Rev.*, 172: 49-66
124. Zentek J., Hall E.J., German A.J., Haverson K., Bailey M., Rolfe V., Butterwick R., Day M.J., 2002, Morphology and immunopathology of the small and large intestine in dogs with nonspecific dietary sensitivity, *J. Nutr.*, 132(6 Suppl 2): 1652S–1654S

## BIOGRAFIJA

Milena M. Đorđević, po zanimanju diplomirani veterinar i molekularni biolog, rođena je 19.03.1972. u Beogradu. 1990. je upisala Biološki fakultet na PMF-u Beogradu, - studijska grupa: Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 1998. sa srednjom ocenom 9,56. Godine 1999. upisala se na Fakultet veterinarske medicine u Beogradu, a diplomirala je 2005. sa srednjom ocenom 9,05. Tokom studiranja ova dva fakulteta bila je stipendista Republike Srbije, i Biološkog fakulteta (1992.), a i Fakulteta veterinarske medicine (2001.). 1993. boravila je tri meseca u dve istraživačke laboratorije za genetiku – u Rimu i u Pizi. Boravila je 2005. tri meseca u Veterinarskoj klinici za lečenje malih životinja u Parizu kao i mesec dana (2008.) na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Bolonji. Volonterski je radila u privatnoj veterinarskoj ambulanti u Beogradu (2003. – 2008.). Doktorske akademske studije upisala je školske 2006./07. iz oblasti „Klinička patologija i terapija životinja“ na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu, te položila sve ispite predviđene planom i programom nastave. Učestvovala je 2007. i 2012. na Seminaru za inovacije znanja veterinarara (FVM Beograd). Tokom 2008. učestvovala je na edukaciji iz anesteziologije i reanimacije pasa i mačaka (FVM, Beograd), zatim u WSAVA Continuing Education Course: Feline medicine. (Beograd), a i na praktičnoj obuci iz ultrazvučne dijagnostike u veterini (Niš). Od 01.11.2010. je zaposlena na Fakultetu veterinarske medicine, a u svojstvu asistenta za predmet Anatomija. U okviru svog istraživačkog rada objavila je 11 naučnih i stručnih radova. 2011. i 2012. održala je predavanja na sajmu konjarstva „Horseville“ u Novom Sadu. Aktivno se bavi konjičkim sportom. Osnivač je i predsednik KK „Favorit“ a predsednik je i Konjičkog saveza Beograda.

## Prilog 1.

### Izjava o autorstvu

Potpisana \_\_\_\_\_

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija po naslovom

Morfološke, imunofenotipske i kliničke karakteristike limfocitno - plazmocitnog duodenitisa  
pasa

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

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

**Potpis doktoranda**

\_\_\_\_\_

## Prilog 2.

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Milena Đorđević

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: Morfološke, imunofenotipske i kliničke karakteristike limfocitno - plazmocitnog duodenitisa pasa

Mentor: Prof. Dr Vanja Krstić

Potpisana Milena Đorđević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

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

**Potpis doktoranda**

\_\_\_\_\_



### **Prilog 3.**

#### **Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Morfološke, imunofenotipske i kliničke karakteristike limfocitno - plazmocitnog duodenitisa pasa

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista)

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

**Potpis doktoranda**

\_\_\_\_\_