

Ekspresja białka Ki-67, PCNA i indeksu apoptotycznego w przebiegu nieswoistego zapalenia jelit u psów z oceną ich wartości diagnostycznej

ANDRZEJ RYCHLIK, MARCIN NOWICKI, MARTA SZWEDA, EWA KACZMAR

Katedra Diagnostyki Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 14, 10-719 Olsztyn

Otrzymano 31.03.2017

Zaakceptowano 05.06.2017

Rychlik A., Nowicki M., Szweda M., Kaczmar E.

Expression of Ki-67, PCNA markers and the apoptotic index in the inflammatory bowel disease in dogs and its diagnostic values

Summary

The aim of this study was to determine the expression of Ki-67 and PCNA proliferative antigens and the apoptotic index in dogs with various degrees of severity of inflammatory bowel disease (IBD), and to evaluate the applicability of these markers in diagnosing the disease. The study was performed on 28 dogs of different breeds, both sexes, with body weights of 10 to 20 kg, aged 2 to 10 years. The animals diagnosed with IBD were divided into four groups of 7 dogs each, including three groups characterized by various degrees of severity of IBD and a control group. The expression of Ki-67 and PCNA antigens was determined immunohistochemically, and the apoptotic index was expressed as the number of TUNEL-positive lamina propria cells in the duodenum, jejunum and the colon. Regardless of its form, IBD affected the expression of the analyzed proliferation markers and apoptosis in duodenal, jejunal and colonic mucosa, but most of the analyzed parameters were not correlated with the severity of the disease. The severity of IBD was correlated only with the expression of Ki-67 in duodenal villi. The results of the study point to the limited applicability PCNA and the apoptotic index in differentiating and evaluating the progression of IBD in dogs. The estimation of Ki-67 expression may be useful in the evaluation of the severity of IBD in dogs.

Keywords: dogs, IBD, Ki-67, PCNA, apoptotic index

Badania oparte na markerach proliferacji uzupełniają obecnie ocenę histopatologiczną biopatów w medycynie ludzkiej. Indeks Ki-67, jak i antygen proliferacji jądra (PCNA), znajdują zastosowanie w ocenie klinicznej pacjenta z chorobami zapalnymi i nowotworowymi przewodu pokarmowego (14). Nabłonek jelita podlega regeneracji ze względu na proliferację komórek na dnie krypt jelitowych oraz apoptozę na szczycie krypt. Równowaga pomiędzy proliferacją a apoptozą komórek umożliwia prawidłową odnowę epitelium jelit. W stanach patologicznych (stan zapalny, nowotworzenie) homeostaza komórek jest zaburzona, a proliferacja znacznie zwiększona. W medycynie ludzkiej, u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (CLC) i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG), notuje się wzrost ekspresji antygeny Ki-67 w komórkach epitelium krypt jelitowych (10). Dodatkowo Ki-67 koreluje z dysplazją epitelium u pacjentów z WZJG. U osób z CLC wzrost proliferacji może predisponować śluzówkę do mutacji, zwiększając ryzyko

nowotworzenia (23). Jinno i wsp. (17) w swoich badaniach zauważyli, że indeks Ki-67 wśród plazmocytów CD19+ jest skorelowany z kliniczną aktywnością i specyficzny dla aktywnej formy WZJG odpornej na leczenie glikokortykoidami. Uzyskane przez niego dane sugerują, że badania immunohistochemiczne z zastosowaniem Ki-67 mogą być praktyczną metodą oceny aktywności proliferacyjnej komórek nabłonka jelitowego u pacjentów z NZJ.

Oznaczanie PCNA znalazło zastosowanie w wykrywaniu ognisk dysplazji w WZJG (20, 21). Przeprowadzone badania wykazały statystycznie istotne różnice między najniższym stopniem dysplazji a niezmienną zapalnie błoną śluzową. U psów takich badań jeszcze dotychczas nie przeprowadzono. Oznaczanie markerów proliferacji (Ki-67 oraz PCNA) znalazło także zastosowanie w różnicowaniu stopnia dysplazji w nieswoistych zapaleniach jelit (NZJ) u ludzi (19). U psów z nieswoistym zapaleniem jelit jeszcze nie przeprowadzono badań nad przydatnością

oznaczania parametrów proliferacji w zależności od natężenia procesu zapalnego. Parametry proliferacji są wykorzystywane do różnicowania chłoniaka jelit od NZJ u psów(3).

Apoptoza jest podstawowym fizjologicznym procesem, który odgrywa kluczową rolę w rozwoju i utrzymaniu homeostazy tkanek, narządów i całego organizmu. Występuje także w wielu procesach patologicznych (8). Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że zaburzenia w przebiegu tego procesu obserwowane są w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego u ludzi (7, 25). Sipos i wsp. (25) uważają, że kluczową rolę w przewlekłych nawracających stanach NZJ odgrywa brak równowagi pomiędzy apoptozą a proliferacją komórek. NZJ w aktywnej formie cechuje się wzrostem apoptozy i proliferacji komórek. Yukawa i wsp. (27) w swoich badaniach wykazali wzrost ilości komórek apoptycznych w aktywnej formie WZJG. U pacjentów CLC niska ekspresja Bax (białko proapoptyczne) oraz wysoki stosunek Bcl-x(L)/Bax (Bcl-x(L) jest białkiem antyapoptycznym) wskazuje na oporność na apoptozę i może przyczyniać się do przewlekłości choroby (15). W nielicznych badaniach, jakie przeprowadzono u psów z NZJ, Dandrieux i wsp. (5) stwierdzili spadek apoptozy limfocytów w błonie śluzowej. Oceniano dwa markery proapoptotyczne (Casp3 i PARP) oraz jeden antyapoptotyczny – Bcl2.

W piśmiennictwie brakuje natomiast wyników badań oceniających ekspresję antygenów proliferacyjnych Ki-67 i PCNA oraz indeksu apoptotycznego w ocenie natężenia NZJ u psów i dlatego celem badań własnych była ocena tych parametrów w przebiegu NZJ, jak również ocena przydatności określania tych markerów w diagnostyce tego schorzenia.

Materiał i metody

Badania wykonano u 28 psów obu płci, o wadze od 10 do 20 kg, różnych ras, w wieku od 2 do 10 lat. Zwierzęta były pacjentami Polikliniki Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Kwalifikacja pacjentów odbyła się na podstawie wyników wywiadu, badania klinicznego, laboratoryjnego, endoskopowego oraz histopatologicznego wycinków błony śluzowej dwunastnicy, jelita czczego oraz okrężnicy.

U wszystkich zwierząt z podejrzeniem NZJ wykonano badania biochemiczne, obrazowe, parazytologiczne, bakteriologiczne i mykologiczne kału oraz wykonano pokarmowy test prowokacyjny w celu wykluczenia innych schorzeń przebiegających z przewlekłą biegunką. Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie pozytywnie zaopiniowała przeprowadzenie badań.

Zwierzęta z rozpoznanym NZJ podzielone zostały na grupy w zależności od natężenia NZJ, zgodnie z kryteriami Jergensa (16):

- grupa pierwsza (badawcza I – lekkie natężenie NZJ, wskaźnik CIBDAI 4-5 punktów, skala oceny histopatologicznej „+”, 7 psów),

- w grupie drugiej (badawcza II – umiarkowane natężenie NZJ, wskaźnik CIBDAI 6-8 punktów, skala oceny histopatologicznej „++”, 7 psów),

- grupa trzecia (badawcza III – ciężkie natężenie NZJ, wskaźnik CIBDAI 10-16 punktów, skala oceny histopatologicznej „+++”, 7 psów).

Grupa kontrolna obejmowała siedem psów zdrowych.

Biopsjaty błony śluzowej dwunastnicy, jelita czczego i okrężnicy do badań immunohistochemicznych (IHC) i oznaczania apoptozy były uzyskiwane podczas badania panendoskopowego i kolonoskopowego przy użyciu kleszczyków biopsyjnych FB-24U-1 o średnicy 2,5 mm oraz kleszczyków biopsyjnych FB-50U-1 o średnicy 3,7 mm firmy Olympus.

Ekspresję Ki-67 i PCNA oznaczano w kosmkach i gruczołach błony śluzowej dwunastnicy i jelita czczego oraz gruczołach okrężnicy, zgodnie z powszechnie przyjętymi technikami badań IHC. W badaniach zastosowano monoklonalne przeciwciała pierwotne mysie (klony MIB-1 i PC10) w rozcieńczeniach, odpowiednio, 1 : 75 i 1 : 200. W sporządzonych preparatach oznaczano odsetek komórek z pozytywną reakcją barwną.

Oznaczanie apoptozy przeprowadzano metodą TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) (12). Zastosowano zestaw do wykrywania apoptozy (TACS 2TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit) (Trevigen, USA). Określano odsetek komórek zabarwionych na brązowo, które uznawano za dodatnie.

Analizę statystyczną w celu określenia istotności różnic pomiędzy grupami zwierząt o różnym natężeniu procesu chorobowego przeprowadzono testem Duncana typu *post hoc* przy $p \leq 0,05$, wykorzystując program komputerowy Statistica 10 (StatSoft Inc.).

Wyniki i omówienie

W przeprowadzonych badaniach własnych stwierdzono, że NZJ u psów, niezależnie od postaci (lekka, umiarkowana, ciężka), wpływa na ekspresję Ki-67, PCNA oraz apoptozę w obrębie błony śluzowej różnych odcinków przewodu pokarmowego – dwunastnicy, jelita czczego oraz okrężnicy. Analiza statystyczna wykazała obecność różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupami NZJ a grupą kontrolną we wszystkich zestawieniach oraz w większości analiz pomiędzy grupami z NZJ (tab. 1, 2, 3). Zmiany ekspresji były zróżnicowane i wyrażały się podwyższeniem lub obniżeniem indeksów komórek Ki-67 dodatnich i PCNA dodatnich oraz indeksów apoptotycznych w grupach pacjentów o lekkim, umiarkowanym i ciężkim natężeniu NZJ w porównaniu z grupą kontrolną. Tendencję wzrostową ekspresji Ki-67 w poszczególnych grupach zanotowano jedynie w kosmkach dwunastnicy (ryc. 1). W jelicie czczym, zarówno w gruczołach, jak i w kosmkach, rozkład okazał się symetryczny, a w gruczołach dwunastnicy i okrężnicy – wielomodalny. W badaniach ekspresji PCNA nie zanotowano żadnych wyraźnych tendencji wzrostowych lub spadkowych pomiędzy poszczególnymi grupami (ryc. 2). Rozkład ekspresji PCNA w dwunastnicy (kosmki i gruczoły)

Tab. 1. Analiza statystyczna ekspresji białka Ki-67 pomiędzy grupami o różnym natężeniu NZJ

Odcinek przewodu pokarmowego		Grupa kontrolna		Grupa o lekkim natężeniu NZJ		Grupa o umiarkowanym natężeniu NZJ		Grupa o ciężkim natężeniu NZJ	
		$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Dwunastnica	gruczoły	10,45714	4,29684	2,98571****	3,84596	15,30000††**	4,81940	6,29714††**	3,53056
	kosmek	1,00714	1,12414	2,38571****	1,50047	2,94285††**	1,11483	8,78142††**	10,62624
Jelito czcze	gruczoły	6,96571	0,33535	10,19286****	15,95432	28,15714††**	9,27934	8,50571††**	10,01270
	kosmek	1,76285	1,56919	2,77857**	2,63894	2,88571†*	3,60343	2,33571†*	1,43431
Okrężnica	gruczoły	2,50000	3,37466	1,00000****	1,41155	6,96714††**	3,02694	1,87142††**	1,74925

Objaśnienia: † – $p \leq 0,05$ – istotnie różni się od grupy o lekkim natężeniu; †† – $p \leq 0,01$ – wysoce istotnie różni się od grupy o lekkim natężeniu; * – $p \leq 0,05$ – istotnie różni się od grupy o umiarkowanym natężeniu; ** – $p \leq 0,01$ – wysoce istotnie różni się od grupy o umiarkowanym natężeniu; ■ – $p \leq 0,05$ – istotnie różni się od grupy o ciężkim natężeniu; ■■ – $p \leq 0,01$ – wysoce istotnie różni się od grupy o ciężkim natężeniu

Tab. 2. Analiza statystyczna ekspresji białka PCNA pomiędzy grupami o różnym natężeniu NZJ

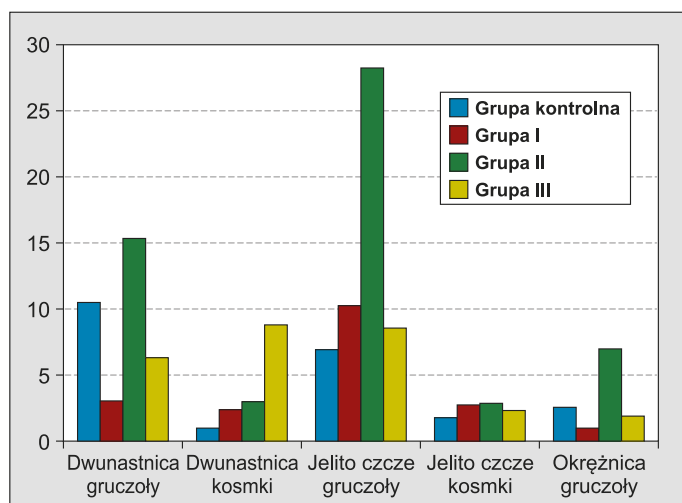
Odcinek przewodu pokarmowego		Grupa kontrolna		Grupa o lekkim natężeniu NZJ		Grupa o umiarkowanym natężeniu NZJ		Grupa o ciężkim natężeniu NZJ	
		$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Dwunastnica	gruczoły	4,25000	4,80147	13,62857****	10,27906	43,25714††**	22,60817	15,87143††**	12,01897
	kosmek	3,70000	2,81128	21,64571****	16,78328	48,12857††**	16,12593	19,21343††**	16,57643
Jelito czcze	gruczoły	7,95714	0,66547	4,54285****	5,25130	21,97143††**	10,01294	18,22857††**	11,68796
	kosmek	32,66286	26,15176	43,26429****	22,34556	25,50714††**	14,08890	23,57143††**	12,04225
Okrężnica	gruczoły	6,56571	5,31016	5,10000****	2,63264	6,49857††**	4,04469	14,67000††**	9,26224

Objaśnienia jak w tab. 1

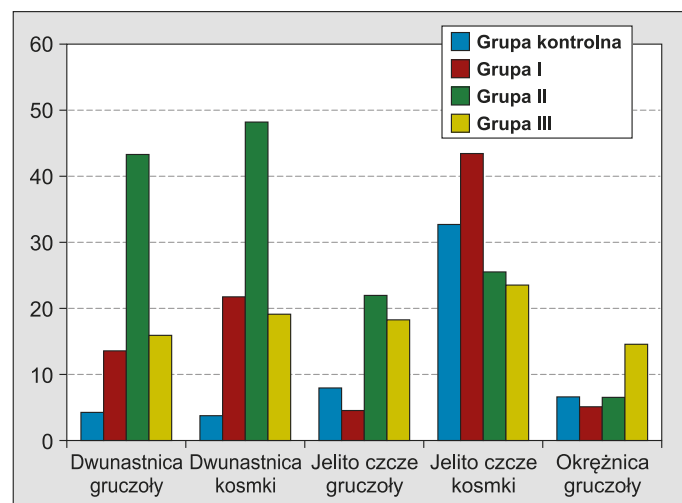
Tab. 3. Analiza statystyczna indeksu apoptotycznego pomiędzy grupami o różnym natężeniu NZJ

Odcinek przewodu pokarmowego		Grupa kontrolna		Grupa o lekkim natężeniu NZJ		Grupa o umiarkowanym natężeniu NZJ		Grupa o ciężkim natężeniu NZJ	
		$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Dwunastnica	gruczoły	11,30000	2,79940	11,20000****	8,13367	22,54286††**	18,96258	18,90000††**	20,73984
	kosmek	17,02143	5,07968	8,26428****	6,29826	11,41714††**	20,30583	17,11143††**	19,22428
Jelito czcze	gruczoły	11,31429	1,03831	14,97143****	16,63878	7,83571††**	17,55313	16,21429††**	18,57619
	kosmek	14,51857	1,07575	23,62143***	15,55543	22,32143††**	15,52927	11,98857††**	14,84444
Okrężnica	gruczoły	19,03571	30,89984	10,59571****	15,51699	12,10000††	18,08198	12,02000††	15,15762

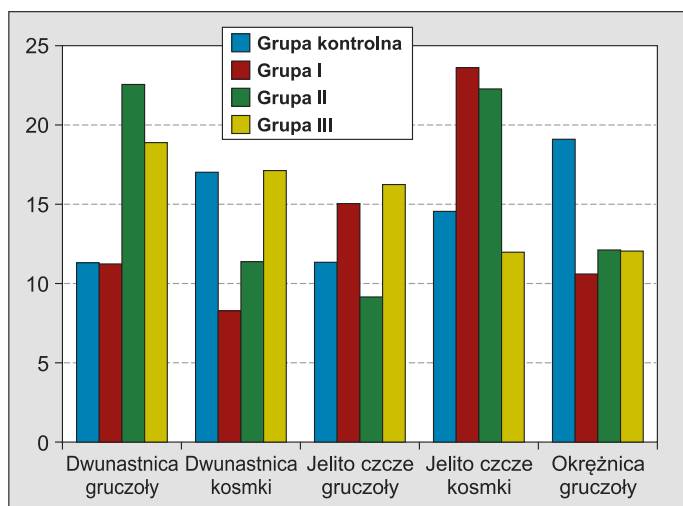
Objaśnienia jak w tab. 1



Ryc. 1. Analiza graficzna indeksu Ki-67 u psów wszystkich grup



Ryc. 2. Analiza graficzna indeksu PCNA u psów wszystkich grup



Ryc. 3. Analiza graficzna indeksu apoptotycznego u psów wszystkich grup

oraz w jelicie czczym (kosmki) był symetryczny. W gruczołach jelita czczego rozkład ekspresji PCNA był wielomodalny, a w gruczołach okrężnicy siodłowy. Analizując wartości indeksu apoptotycznego, podobnie jak w przypadku PCNA, nie zauważono żadnych wyraźnych tendencji wzrostowych lub spadkowych w badanych odcinkach przewodu pokarmowego poszczególnych grup (ryc. 3). Rozkład symetryczny odnotowano w gruczołach dwunastnicy oraz kosmkach jelita czczego. Rozkład wielomodalny występował w gruczołach jelita czczego oraz okrężnicy, a siodłowy w kosmkach dwunastnicy.

W przeprowadzonych badaniach własnych stwierdzono znaczne różnice w ekspresji antygenów Ki-67, PCNA oraz indeksu apoptotycznego w obrębie różnych odcinków przewodu pokarmowego u psów ze zróżnicowanym stopniem natężenia NZJ w porównaniu z kontrolną grupą psów zdrowych. Wykazano statystycznie wysoce istotny wzrost indeksu komórek Ki-67 dodatnich w kosmkach jelitowych w obrębie błony śluzowej jelita cienkiego w grupach o lekkim, umiarkowanym i ciężkim natężeniu NZJ w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono jednocześnie statystycznie wysoce istotny wzrost lub spadek indeksu komórek Ki-67 dodatnich w gruczołach na terenie błony śluzowej jelita cienkiego we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. W badaniach dotyczących WZJG u ludzi oceniono przydatność oznaczania Ki-67 oraz PCNA w ogniskach dysplazji i w błonie śluzowej poza nimi. Ponadto wykazano różnice w nasileniu immunoreaktywności w poszczególnych stopniach dysplazji. Uzyskano statystycznie istotne różnice między najniższym stopniem dysplazji a niezmienioną błoną śluzową (19). W badaniach tych dokonano również porównania zastosowanych markerów pod względem ich przydatności, uznając antygen Ki-67 za najbardziej miarodajny marker proliferacyjny. W pracy Noffsinger i wsp. (23), dotyczącej WZJG o różnym stopniu natężenia, przebadano wycinki błony śluzowej jelita grubego,

używając Ki-67 jako markera proliferacji i uzyskano bardzo dobre wyniki w różnicowaniu ognisk dysplazji z regenerującą błoną śluzową. W badaniach tych stwierdzono znaczne różnice w immunoreaktywności Ki-67 w poszczególnych kryptach jelit w ogniskach dysplazji i w obrębie nacieku zapalnego oraz w błonie śluzowej podlegającej regeneracji. W podobnych badaniach dotyczących WZJG u ludzi wykazano statystycznie wysoce istotne różnice w odsetku komórek Ki-67 dodatnich w zmianach dysplastycznych w stosunku do obszarów błony śluzowej podlegających regeneracji (12). Wyniki badań własnych nie potwierdziły tego spostrzeżenia. W odróżnieniu od badań przeprowadzonych w przebiegu NZJ u ludzi, w pracy dotyczącej *colitis* indukowanego siarczanem sodowym dekstranu (DSS) u myszy stwierdzono spadek ekspresji Ki-67 w komórkach nabłonka okrężnicy (1). W badaniach własnych nie zaobserwowano jednolitych tendencji wzrostowych lub spadkowych pomiędzy grupą kontrolną a poszczególnymi grupami doświadczalnymi zwierząt (ryc. 1). Przyczyną odmiennych wyników mogą być różnice w etiopatogenezie NZJ u ludzi i psów (4). W chorobie Leśniowskiego-Crohna u ludzi zapalenie obejmuje wszystkie warstwy jelita. U psów proces chorobowy dotyczy najczęściej tylko błony śluzowej jelita cienkiego i grubego, z wyjątkiem wrzodziejącego histiocytarnego zapalenia okrężnicy u bokserów (13), dlatego może to mieć istotny wpływ na objawy kliniczne, zmiany makroskopowe, histopatologiczne oraz immunohistochemiczne.

W badaniach własnych wykazano statystycznie wysoce istotny wzrost lub spadek indeksu komórek PCNA dodatnich w kosmkach jelitowych i gruczołach na terenie błony śluzowej jelita cienkiego oraz grubego w grupach o lekkim, umiarkowanym i ciężkim natężeniu NZJ w porównaniu do grupy kontrolnej. W badaniach dotyczących oceny zmian proliferacyjnych w komórkach nabłonka jelitowego okrężnicy u ludzi z WZJG wykazano wzrost ekspresji komórek PCNA dodatnich w grupach o lekkim, umiarkowanym i ciężkim natężeniu procesu chorobowego w porównaniu do grupy kontrolnej (25). W innych badaniach zaobserwowano wzrost indeksu komórek PCNA dodatnich w nieaktywnej formie WZJG u ludzi (2). W badaniach własnych nie zaobserwowano, niestety, jednolitych tendencji wzrostowych lub spadkowych dotyczących PCNA pomiędzy grupą kontrolną a poszczególnymi grupami doświadczalnymi zwierząt (ryc. 2). Podobnie w badaniach dotyczących różnicowania rodzajów NZJ u ludzi wykazano, że analiza ekspresji antygeny proliferacyjnego PCNA nie pozwala na różnicowanie WZJG i choroby Leśniowskiego-Crohna (18).

W badaniach własnych nad indeksem apoptozy stwierdzono różnice wysoce istotne statystycznie w dominującej większości badanych struktur pomiędzy poszczególnymi grupami. Niestety, podobnie jak w przypadku markerów proliferacji komórki, indeks apoptotyczny nie wykazywał tendencji wzrostowych

czy spadkowych skorelowanych z natężeniem NZJ (ryc. 3). W badaniach przeprowadzonych u ludzi z WZJG wykazano statystycznie istotny wzrost apoptozy w grupach o umiarkowanym i ciężkim natężeniu NZJ w porównaniu do grupy kontrolnej (25). Podobnie wzrost indeksu apoptotycznego w komórkach nabłonka okrężnicy u myszy stwierdzono w badaniach dotyczących *colitis* indukowanego DSS (1). Wykazano, że wzrost apoptozy w enterocytach u ludzi z chorobą Leśniowskiego-Crohna jest wyższy w obszarach jelit objętych stanem zapalnym w porównaniu do obszarów niezmiennych. Wzrost indeksu apoptotycznego w enterocytach wskazuje na uszkodzenie bariery jelitowej, co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności jelit (7). Podobny wpływ apoptozy na barierę jelitową odnotowano u szczurów ze stanem zapalnym jelit indukowanym podaniem doksorubicyny (26). Zwiększona apoptoza enterocytów wywołuje przyspieszenie tempa podziałów komórkowych, co sprzyja mutacjom i procesom nowotworzenia. Wykazano, że pacjenci z NZJ częściej zapadają na nowotwory (6). Dotychczas w literaturze opisano jedynie spadek apoptozy limfocytów w NZJ u psów (4), ale bez analizy powiązań z natężeniem procesu chorobowego. Biorąc pod uwagę dotychczasową wiedzę dotyczącą apoptozy w NZJ i własne wyniki, dalsze badania na większej liczbie zwierząt wydają się wskazane.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały w większości analiz brak pozytywnej bądź negatywnej zależności badanych parametrów od natężenia NZJ, pomimo stwierdzenia różnic istotnie statystycznych. To znacznie ogranicza zastosowanie tych badań jako analiz uzupełniających ocenę kliniczną i histopatologiczną (24). Spośród badanych parametrów jedynie indeks Ki-67 w kosmkach dwunastnicy wykazywał wzrost zgodny z natężeniem NZJ u psów. Przyczyną odmiennych wyników uzyskanych w NZJ u ludzi od wyników badań własnych mogą być różnice w patogenie NZJ u ludzi i psów. Warto podkreślić, że w chorobie Leśniowskiego-Crohna również nie opisano do tej pory korelacji Ki-67 z natężeniem procesu chorobowego ani użyteczności w diagnostyce różnicowej CLC.

Uzyskane wyniki badań oznaczania ekspresji białka PCNA oraz indeksu apoptycznego u psów o różnym natężeniu procesu chorobowego wskazują na niewielką przydatność tego typu analiz w diagnostyce NZJ tych zwierząt. W przyszłości, po dalszych badaniach i stwierdzeniu powyższej zależności w większej grupie pacjentów, oznaczanie indeksu Ki-67 może pełnić rolę wspomagającą w ocenie stopnia natężenia NZJ u psów.

Piśmiennictwo

- Araki Y., Mukaisyo K., Sugihara H., Fujiyama Y., Hattori T.: Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Oncol. Rep.* 2010, 24, 869-874.
- Bell K., Bronner M. P., Pasha T., Furth E. E.: Expression of proliferating cell nuclear antigen in gastrointestinal tract lesion and its relationship to bcl-2 expression. *Pathobiology* 1996, 64, 91-98.
- Carrasco V., Rodriguez-Bertos A., Rodriguez-Franco F., Wise A. G., Maes R., Mullaney T., Kiupel M.: Distinguishing intestinal lymphoma from inflamma-

- tory bowel disease in canine duodenal endoscopy biopsy samples. *Veterinary Pathology* 2014, 52, 668-675.
- Cerquetella M., Spaterna A., Laus F., Tesi B., Rossi G., Antonelli E., Villanacci V., Bassotti G.: Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans. *World J. Gastroenterol.* 2010, 16, 1050-1056.
- Dandrieux J. R., Bornand V. F., Doherr M. G., Kano R., Zurbriggen A., Burgener I. A.: Evaluation of lymphocyte apoptosis in dogs with inflammatory bowel disease. *Am. J. Vet. Res.* 2008, 69, 1279-1285.
- Danese S.: Inflammatory bowel disease and inflammation-associated colon cancer: partners in crime. *Curr. Drug. Targets* 2008, 9, 360.
- Di Sabatino A., Ciccocioppo R., Luinetti O., Ricevuti L., Morera R., Cifone M. G., Solcia E., Corazza G. R.: Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis. Colon Rectum* 2003, 46, 1498-1507.
- Elmore S.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007, 35, 495-516.
- Fiocchi C.: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998, 115, 182-205.
- Franklin W. A., McDonald G. B., Stein H. O., Gatter K. C., Jewell D. P., Clarke L. C., Mason D. Y.: Immunohistologic demonstration of abnormal crypt cell kinetics in ulcerative colitis. *Hum. Pathol.* 1985, 16, 1129-1132.
- Fratila O. C., Ilias T. I.: COX-2 and Ki-67 immunohistochemical markers in the assessment of long-standing ulcerative colitis associated dysplasia. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2013, 54, 143-149.
- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 1992, 119, 493-501.
- German A. J., Hall E. J., Kelly D. F., Watson A. D., Day M. J.: An immunohistochemical study of histiocytic ulcerative colitis in boxer dogs. *J. Comp. Pathol.* 2000, 122, 163-175.
- Hofstädter F., Knüchel R., Rüschoff J.: Cell proliferation assessment in oncology. *Virchows Arch.* 1995, 427, 323-341.
- Itoh J., de La Motte C., Strong S. A., Levine A. D., Fiocchi C.: Decreased expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 2001, 49, 35-41.
- Jergens A. E., Schreiner C. A., Frank D. E., Niyo Y., Ahrens F. E., Eckersall P. D., Benson T. J., Evans R.: A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J. Vet. Intern. Med.* 2003, 17, 291-297.
- Jinno Y., Ohtani H., Nakamura S., Oki M., Maeda K., Fukushima K., Nagura H., Oshitani N., Matsumoto T., Arakawa T.: Infiltration of CD19+ plasma cells with frequent labeling of Ki-67 in corticosteroid-resistant active ulcerative colitis. *Virchows Arch.* 2006, 448, 412-421.
- Keller K., Koch H. K.: The use of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression and intraepithelial lymphocyte count in the differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *Ital. J. Gastroenterol.* 1994, 26, 233-237.
- Kullmann F., Fadaie M., Gross V., Knüchel R., Bocker T., Steinbach P., Schölmerich J., Rüschoff J.: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in dysplasia in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1996, 8, 371-379.
- Markova A. A., Kashkina E. I., Maslyakova G. N.: New opportunities in the diagnosis of ulcerative colitis. *Eksp. Klin. Gastroenterol.* 2015, 2, 35-39.
- Netia S., Nehru B., Sanyal S. N.: Celecoxib prevents colitis associated colon carcinogenesis: an upregulation of apoptosis. *Pharmacol. Rep.* 2014, 66, 1089-1091.
- Noffsinger A. E., Miller M. A., Cusi M. V., Fenoglio-Preiser C. M.: The pattern of cell proliferation in neoplastic and nonneoplastic lesions of ulcerative colitis. *Cancer* 1996, 78, 2307-2312.
- Noffsinger A., Unger B., Fenoglio-Preiser C. M.: Increased cell proliferation characterizes Crohn's disease. *Mod. Pathol.* 1998, 11, 1198-1203.
- Rychlik A., Nieradka R., Kander M., Nowicki M., Wdowiak M., Kolodziejska-Sawerska A.: A correlation between the Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index score and the histopathological evaluation of the small intestinal mucosa in canine inflammatory bowel disease. *Pol. J. Vet. Sci.* 2012, 15, 315-321.
- Sipos F., Zágoni T., Molnár B., Tulassay Z.: Changes in the proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in correlation with histologic activity of ulcerative colitis. *Orv. Hetil.* 2002, 143, 2485-2488.
- Sun Z., Wang X., Wallen R., Deng X., Du X., Hallberg E., Andersson R.: The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 1998, 33, 415-422.
- Yukawa M., Iizuka M., Horie Y., Yoneyama K., Shirasaka T., Ito H., Komatsu M., Fukushima T., Watanabe S.: Systemic and local evidence of increased Fas-mediated apoptosis in ulcerative colitis. *Int. J. Colorectal. Dis.* 2002, 17, 70-76.