



Latvijas Lauksaimniecības Universitāte
Veterinārmedicīnas fakultāte
Preklīniskais institūts

Latvia University of Agriculture
Faculty of Veterinary Medicine
Preclinical institute

Doktorante Dace Bērziņa

**HELIKOBAKTĒRIJAS SUŅU KUŅĀ GĻOTĀDĀ UN KUŅĀ
MORFOLOĢISKAIS STĀVOKLIS**

**HELICOBACTERIA AND MORPHOLOGICAL STATUS OF THE
GASTRIC MUCOSA IN DOGS**

Promocijas darba
KOPSAVILKUMS
Dr.med.vet. zinātniskā grāda iegūšanai
Veterinārmedicīnas nozarē

SUMMARY
of doctoral thesis
for scientific degree Dr.med.vet.

Jelgava 2010

**PĒTĪJUMS VEIKTS AR ESF NACIONĀLĀS PROGRAMMAS „ATBALSTS LLU
DOKTORA STUDIJU ĪSTENOŠANAI”, LĪGUMS NR. 04.4-08/EF2.D3.14`ATBALSTU**

Promocijas darbs izstrādāts:

- Latvijas Lauksaimniecības Universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskajā institūtā;
- Čonbukas Nacionālās Universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Patoloģijas laboratorijā, Čonbukas Provincē, Dienvidkorejā.

Research has been carried out at the:

- Preclinical institute of the Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Agriculture;
- Pathology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonbuk Province, South Korea.

Promocijas darba zinātniskā vadītāja:

Dr.habil.biol., profesore, LZA korespondētājlocekle

Edīte Birģele

Scientific supervisor:

Dr.habil.biol., professor, the Corresponding member of Latvia Academy of Sciences

Edīte Birģele

Oficiālie recenzenti:**Official reviewers:**

Dr.habil.agr., Dr.med.vet., profesors, LZA īstenais loceklis

Aleksandrs Jemeljanovs

Dr.habil.med., profesors

Anatolijs Danilāns

Dr.med.vet., asociētā profesore

Anda Valdovska

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2010. gada 20. decembrī plkst. 13:00
LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā, Helmaņa ielā 8, pirmajā auditorijā.

The defence of thesis will take place at the LUA Faculty of Veterinary Medicine, first auditorium, on the December 20, 2010 at 13:00 o'clock.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības Universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielajā ielā 2 un <http://llufb.llu.lv/llu-theses.htm>.

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Lielā street 2, Jelgava and <http://llufb.llu.lv/llu-theses.htm>.

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS	5
Darba aktualitāte	5
Darba uzdevumi	6
Darba zinātniskā novitāte.....	6
Pētījumu rezultātu aprobācija	6
MATERIĀLS UN METODES	7
Pētījumu shēma.....	7
Ureāzes tests	8
Kuņģa gļotādas virsmas noburzumu citoloģija	9
Histoloģiskā izmeklēšana	9
Datu statistiskā apstrāde.....	10
PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA.....	11
Helikobaktērijas jenotsuņu kuņģa gļotādā, nosakot tās ar dažādām diagnostikas metodēm.....	11
Helikobaktērijas mājas suņu kuņģa gļotādā, nosakot tās ar dažādām diagnostikas metodēm.....	13
Helikobaktērijas un mājas suņu kuņģa gļotādas makroskopiskās izmaiņas	14
Helikobaktēriju lokalizācija un daudzums mājas suņu kuņģa gļotādā	16
Mukoīdo epiteliocītu un klājšunu skaits mājas suņu kuņģa gļotādā saistībā ar helikobaktēriju daudzumu tajā.....	19
Limfocītu un plazmocītu daudzums mājas suņu kuņģa gļotādā un to saistība ar helikobaktēriju daudzumu tajā.....	23
SECINĀJUMI	28
IETEIKUMI PRAKSEI	29
ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES	30

CONTENTS

INTRODUCTION	31
Topicality of the research	31
Objectives of the research.....	32
Scientific novelty of the research.....	32
Approbation of the results of research	32
MATERIAL AND METHODS	33
Research scheme.....	33
Urease test.....	34
Brush cytology of gastric mucosa.....	34
Histological examination	34
Statistical processing of data.....	35
RESULTS AND DISCUSSION	36
Helicobacteria in the gastric mucosa of racoon dogs, detected by different diagnostic methods.....	36
Helicobacteria in the gastric mucosa of domestic dogs, detected by different diagnostic methods.....	37
Helicobacteria and marcoscopic changes of domestic dogs gastric mucosa	38
Location and amount of helicobacteria in the gastric mucosa of domestic dogs	40
Number of muroid epitheliocytes and parietal cells in the gastric musosa of domestic dogs, related with amount of helicobacteria	41
Amount of lymphocytes and plasmocytes in the gastric mucosa of domestic dogs and their relation with amount of helicobacteria	43
CONCLUSIONS	46
RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE	47
SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESIS.....	48

IEVADS

Darba aktualitāte

Helikobaktērijas konstatētas gan cilvēku, gan dzīvnieku kuņģa–zarnu traktā. Daudzas no tām tiek uzskatītas par patogēnām, kas var izraisīt dažādas kuņģa, zarnu un aknu patoloģijas, – visbiežāk kuņģa čūlas, gastroenterītu, hepatītu un pat audzējus. Savukārt citas *Helicobacter spp.* baktērijas tiek uzskatītas kā normāla zarnu mikroflora (Otto et al., 1994; Eaton et al., 1996).

Kopš pirmo reizi patogēno *Helicobacter pylori* izolēja 1984. gadā cilvēkiem, kas slimoja ar kuņģa čūlu un gastrītu (Marshall, Warren, 1984), jautājums par helikobaktērijām cilvēkiem un dzīvniekiem joprojām ir aktuāls, tas tiek plaši pētīts – īpaši tāpēc, ka pierādījusies to saistība ar dažādām gremošanas aparāta orgānu patoloģijām. Turklāt, jāņem arī vērā helikobaktēriju plašā izplatība un iespēja cilvēkiem inficēties no dzīvniekiem, t.sk. no saviem mīldzīvniekiem.

Izrādās, ka suņiem helikobaktērijas kuņģī ir ļoti bieži sastopamas. Literatūras dati par helikobaktēriju lomu dzīvnieku kuņģa patoloģiju ģenēzē ir visai pretrunīga. Daži autori uzskata, ka tādas kuņģa gļotādas patoloģiskās izmaiņas kā gastrīts, erozijas vai čūlas nav saistītas ar helikobaktēriju klātbūtni kuņģa gļotādā (Happonen et al., 1998; Hwang et al., 2002), savukārt citi novērojuši izteiktāku neitrofilo leukocītu, limfocītu un plazmocītu infiltrāciju kuņģa gļotādā, kā arī citas izmaiņas kuņģa gļotādā, ja tajā konstatētas helikobaktērijas (Eaton et al., 1996; Yamasaki et al., 1998).

Lai pētītu helikobaktēriju klātbūtni gremošanas traktā izmanto dažādas diagnostikas metodes. Izmanto t.s. invazīvās metodes, pie kurām pieder ātrais ureāzes tests, gļotādas virsmas nobērsumu citoloģija, histoloģiskā izmeklēšana, elektronmikroskopija, helikobaktēriju kultivēšana uz speciālām barotnēm, DNS izolēšana no gļotādas parauga un tālāku to noteikšanu ar polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR). Izmanto arī t.s. neinvazīvās metodes – seroloģiju, urīnvielas elpas testu un *Helicobacter pylori* antigēna noteikšanu fekāliju paraugos (Happonen et al., 1996; Neiger, Simpson, 2000; Granstrom et al., 2008). Svarīgi ir noskaidrot un precizēt, kuras no metodēm ir jutīgākas un piemērotākas *Helicobacter spp.* baktēriju diagnosticēšanai suņiem un kuras būtu iesakāmas izmantot veterinārmedicīnas praksē.

Kas attiecas uz pētījumiem par helikobaktēriju izplatību suņu kuņģa gļotādā, to daudzumu atsevišķajās kuņģa gļotādas dziedzeru zonās, helikobaktēriju ietekmi uz kuņģa gļotādas dziedzerēpitēlijsūnām – tādu veikti maz. Latvijā šāda veida pētījumi dzīvniekiem līdz šim vispār nav bijuši. Tomēr veterinārmedicīnā jautājums par helikobaktēriju saistību ar suņu kuņģa gļotādas morfofunkcionālajām izmaiņām ir aktuāls.

Tādēļ mūsu **darba mērķis** bija izpētīt helikobaktēriju izplatību mājas suņu un jēnotsuņu kuņģa gļotādā un noteikt to saistību ar kuņģa gļotādas morfoloģisko stāvokli.

Darba uzdevumi

1. Noteikt helikobaktērijas kuņģa kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonas gļotādā ar dažādām diagnostikas metodēm un salīdzināt šo metožu jutību un iespējamību izmatot veterinārmedicīnā;
2. Novērtēt kuņģa gļotādas makroskopiskās izmaiņas kuņģa dažādās dziedzeru zonās *Helicobacter spp.* pozitīvajos un negatīvajos paraugos;
3. Izpētīt helikobaktēriju daudzumu kuņģa gļotādas virsmas epitēlijā, kuņģa bedrītēs, kā arī kuņģa dziedzerēpitēlijā dažādās dziedzeru zonās;
4. Novērtēt gļotādas mukoīdo epiteliocītu, klājšūnu, limfocītu un plazmocītu daudzumu saistībā ar helikobaktēriju lokalizāciju un to daudzumu kuņģa gļotādā.

Darba zinātniskā novitāte

1. Pirmo reizi Latvijā pētītas helikobaktērijas mājas suņu kuņģa gļotādā un to saistība ar kuņģa gļotādas morfoloģisko stāvokli.
2. Iegūti jauni dati par helikobaktēriju lokalizāciju un to daudzumu suņu kuņģa kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonas gļotādā un helikobaktēriju saistību ar gļotādas morfoloģiskām izmaiņām.

Pētījumu rezultātu aprobācija

Pētījumu rezultāti aprobēti sekojošās starptautiskās zinātniskās konferencēs:

1. 28th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists. Serbia, Belgrade, 8-11 September 2010. *Gastric helicobacters and mucosal histology of the pyloric gland region in domestic dogs.*
2. 15th International Scientific conference "Research for rural development". Latvia, Jelgava, 20-22 May 2009. *Helicobacters and morphological changes in the gastric mucosa of domestic dogs.*
3. LLU VMF Starptautiskā Zinātniskā konference "Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna". Latvija, Jelgava, 2008. gada 14. novembris. *Helikobaktērijas mājas suņu (Canis familiaris) kuņģu gļotādā.*
4. 14th International Scientific conference "Research for rural development". Latvia, Jelgava, Jelgava, 21-23 May 2008. *Location of helicobacters in the gastric mucosa of domestic dogs (Canis familiaris).*
5. LLU VMF Starptautiskā Zinātniskā konference "Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna". Latvija, Jelgava, 2006. gada 10. novembris. *Kuņģa Helicobacter spp. izplatība jenotsuņiem Korejas Republikas Čonbukas Provincē.*

6. The 2nd Asian Society of Veterinary Pathology Symposium & 2005 Annular Meeting of the Korean Society of Veterinary Pathology. South Korea, Seoul, 3-4 November 2005. *Detection of gastric Helicobacter organisms in feral raccoons (Nyctereutes Procyonoides)*.

Darba apjoms: promocijas darbs noformēts 137 lappusēs un sastāv no: anotācijas, ievada, literatūras apskata, darba metodikas, pētījumu rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, ieteikumiem praksei, izmantotās literatūras saraksta un pielikuma.

MATERIĀLS UN METODES

Promocijas darbs veikts divos etapos. Pirmais darba etaps veikts Čonbukas Nacionālās Universitātes, Veterinārmedicīnas fakultātes Patoloģijas laboratorijā, Čonbukas Provincē, Dienvidkorejā laika periodā no 2005. gada septembra līdz 2006. gada jūnijam, bet otrais – no 2006. gada septembra līdz 2009. gada decembrim Latvijas Lauksaimniecības Universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskā institūta Morfofunkcionālajā laboratorijā.

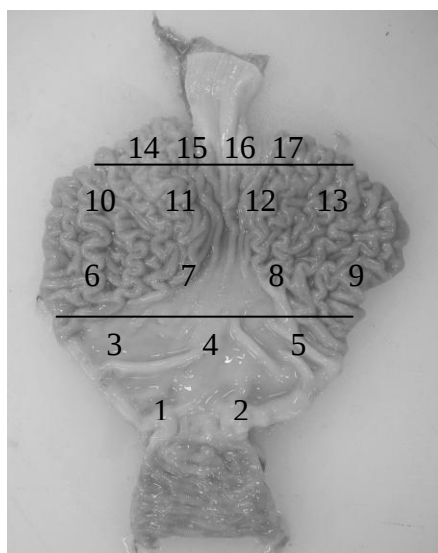
Pētījumu shēma

Pirmajā pētniecības etapā, sadarbībā ar Korejas Savvaļas Dzīvnieku Centru, izmeklējamais materiāls atbilstoši pētījuma uzdevumam ņemts no astoņiem dažāda vecuma un dzimuma jenotsuņu kuņģiem. Dzīvnieku biežākais nāves cēlonis bija dažādas traumas.

Ģlotādas paraugus visos gadījumos ņēma no stingri noteiktām kuņģa daļām: četrām vietām kardiālo dziedzeru zonā, astoņām vietām fundālo dziedzeru zonā un piecām vietām pilorisko dziedzeru zonā, kā arī vienu paraugu no barības vada pie tā ieejas kuņģī un vienu paraugu – no divpadsmitpirkstu zarnas pie *pylorus* sfinktera. Tādējādi pirmajā pētnieciskā darba etapā no katra jenotsuņa ieguvām un izmeklējām 19 paraugus, kopumā izanalizējot 152 ģlotādas paraugus. Jenotsuņu kuņģa ģlotādas paraugu analīžu rezultātus izmantojām galvenokārt dažādu helikobaktēriju noteikšanas metožu salīdzināšanai.

Otrajā pētnieciskā darba etapā materiālu ieguvām LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Mazo dzīvnieku klīnikā no 30 dažāda vecuma, dzimuma un šķirņu mājas suņiem uzreiz pēc to eitanāzijas (saskaņā ar saimnieku vēlēšanos).

Ģlotādas paraugi, līdzīgi kā no jenotsuņu kuņģa ģlotādas, tika paņemti no stingri noteiktām vietām: četrām vietām kuņģa kardiālo dziedzeru zonā, astoņām vietām fundālo dziedzeru zonā un piecām vietām pilorisko dziedzeru zonā (1. attēls).



1. att. Mājas suņu kuņģu gļotādas paraugu noņemšanas vietas
Fig. 1. Sample sites of the domestic dogs gastric mucosa

- 1 ... 5 – pilorisko dziedzeru zona/ *pyloric gland region*;
 6 ... 13 – fundālo dziedzeru zona/ *fundic gland region*;
 14 ... 17 – kardiālo dziedzeru zona/ *cardiac gland region*.

Tādējādi otrajā pētnieciskā darba etapā no katra dzīvnieka tika iegūti 17 paraugi, kopumā izanalizējot 510 gļotādas paraugus. Mājas suņiem neizmeklējām barības vada un divpadsmitpirkstu zarnas gļotādas paraugus, jo mūsu darba uzdevums bija novērtēt gļotādas morfoloģisko stāvokli tikai kuņģa kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā *Helicobacter spp.* pozitīvajos un negatīvajos paraugos. Suņu kuņģa gļotādas paraugu histoloģiskās izmeklēšanas rezultātus pamatā izmantojām helikobaktēriju lokalizācijas un to daudzuma izvērtēšanai, kā arī kuņģa gļotādas morfoloģiskā stāvokļa noteikšanai.

Pirmkārt visiem dzīvnieku kuņģiem noteicām gļotādas makromorfoloģisko stāvokli kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā. Makromorfoloģiskās izmaiņas nosacīti iedalījām četrās grupās: 1) kuņģa gļotāda bez makromorfoloģiskām izmaiņām; 2) hiperemēta kuņģa gļotāda; 3) kuņģa gļotāda ar makroskopiski redzamām erozijām; 4) kuņģa gļotāda ar polipiem.

Helikobaktēriju noteikšanai jēnotsuņu kuņģa gļotādā izmantojām trīs diagnostikas metodes: ureāzes testu, gļotādas virsmas nobērsumu citoloģisko izmeklēšanu (*brush cytology*) un gļotādas histoloģisko izmeklēšanu, un salīdzinājām to rezultātus. Turpmākajā darbā, pētot mājas suņu kuņģa gļotādas paraugus, diagnostikas metožu salīdzināšanai un helikobaktēriju noteikšanai izmantojām tās pašas metodes, kā arī noteicām suņu kuņģa gļotādas makromorfoloģisko un mikromorfoloģisko stāvokli, t.i. mukoīdo epitēlijšūnu, klājšūnu skaitu, limfocītu un plazmocītu daudzumu.

Ureāzes tests

Ureāzes tests vienmēr tika veikts ne vēlāk kā divas stundas pēc dzīvnieka nāves. Lai veiktu testu, gļotādas paraugus noņēmām ar grieznēm, tos nekavējoties ievietoājām speciālās platēs, ar mikropipeti pievienojām 1ml 10% urīnvielas šķīdumu destilētā ūdenī

kopā ar fenolsarkanā indikatoru (pH 6.3). Rezultātus nolasījām 10, 30 un 60 minūtes pēc reaģentu pievienošanas. Krāsas maiņa no dzeltenas uz sarkanu norāda, ka attiecīgais paraugs bijis *Helicobacter spp.* pozitīvs.

Kuņģa gļotādas virsmas noburzumu citoloģija

Gļotādas virsmas noburzumus citoloģiskajai izmeklēšanai ņēmām ar steriliem vates kociņiem, tos paberzējot pa gļotādas virsmu. Iegūto saturu iztriepām uz priekšmetstikliņiem, gaisā nožāvējām un krāsojām ar t.s. *Diff-Quik* krāsošanas metodi. Iegūtos preparātus mikroskopējām gaismas mikroskopā eļļas imersijā 1000 reižu lielā palielinājumā.

Histoloģiskā izmeklēšana

Histoloģiskajai izmeklēšanai noņemtos paraugus ierīkš sagatavojām pēc vispārpieņemtās metodikas (Pearse, 1960; Carson, 1997). Pirmajā pētnieciskā darba etapā jenotsuņu kuņģa gļotādas histoloģisko preparātu atūdeņošanai un parafīna bloku sagatavošanai tika izmantots ASV ražotais *Shandon* firmas audu autoprocetors *Citadel 69810040*. Otrajā pētnieciskā darba etapā mājas suņu kuņģa gļotādas paraugus sagatavoja ar Nīderlandē ražoto audu autoprocetoru *Tissue-Tek II*. Tālāk preparātus *SLEE Mainz Cut* mikrotomā sagriezām 4 µm biezus griezumus. Helikobaktēriju noteikšanai izmantojām *Diff-Quik* krāsošanas metodi helikobaktēriju noteikšanai, bet kuņģa gļotādas morfoloģiskā stāvokļa novērtēšanai izmantojām hematoksilīna un eozīna krāsošanas metodi. Histoloģiskos preparātus dažādos palielinājumos izvērtējām gaismas mikroskopā (*Leica DM5000B*).

Histoloģiskajā kuņģa gļotādas preparātā katrā paraugā 10 mikroskopa redzes laukos noteicām helikobaktēriju lokalizāciju – novērtējām to daudzumu pie virsmas epitēlija, kuņģa bedrītēs, kā arī dziļāk pie dziedzerepitēlija (Hermanns et al., 1995; Happonen et al., 1996; Vorobjova et al., 2005). Histoloģiskajos preparātos helikobaktēriju daudzumu kuņģa kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā nosacīti iedalījām četrās grupās (Happonen et al., 1998; Neiger et al., 1998):

- helikobaktēriju vienā mikroskopa redzes laukā nav – negatīvs;
- 1-10 helikobaktērijas vienā redzes laukā – maz helikobaktēriju;
- 10-50 helikobaktērijas vienā redzes laukā – vidēji daudz helikobaktēriju;
- vairāk kā 50 helikobaktērijas vienā mikroskopa redzes laukā – ļoti daudz helikobaktēriju.

Kuņģa gļotādas morfoloģiskā stāvokļa izvērtēšanai noteicām mukoīdo epitēlijšūnu, klājšūnu, limfocītu un plazmocītu daudzumu kuņģa gļotādas augšējā un dziļākajā daļā vienā mikroskopa redzes laukā, kas sastādīja 215000 µm² jeb attiecīgi 0.215 mm². Kopumā vienā paraugā gļotādas „augšējā daļā” – virsmas-bedrīšu epitēlijā, kā arī dziļāk dziedzerepitēlijā, attiecīgi katrā analizējam 10 mikroskopa redzes laukus. Tādējādi kopumā mājas suņiem kuņģa kardiālo dziedzeru zonā 120 paraugiem izanalizēti 1200 mikroskopa redzes lauki, fundālo dziedzeru zonā 240 paraugiem izanalizēti 2400 mikroskopa redzes lauki. Un pilorisko dziedzeru zonā 150 paraugiem izanalizēti 1500 mikroskopa redzes lauki.

Kuņģa gļotādas dziļumu un redzes lauka lielumu noteicām ar mikroskopisko attēlu iegūšanas, analīzes un mērīšanas programmu *Image-Pro Plus*. Gļotādas dziļumu

mērījām tikai griezumos, kuros kuņģa gļotāda redzama visā dziļumā – no virsmas epitēlija līdz *lamina muscularis mucosae*.

Mukoīdo epitēlijšūnu daudzumu analizējām, nosakot vidējo šūnu skaitu $\pm$ standartnovirze, gļotādas virsmas–bedrīšu epitēlijā, t.i. gļotādas „augšējā daļā” līdz 550 μm dziļumam kardiālo un pilorisko dziedzeru zonā, kā arī dziļāk dziedzerēpitēlijā – līdz 1000 μm dziļumam. Klājšūnu daudzumu novērtējām, nosakot šūnu vidējo skaitu $\pm$ standartnovirze kardiālo un fundālo dziedzeru „augšējā daļā” līdz 450 μm dziļumam un dziļāk dziedzeru daļā līdz 850 μm dziļumam (Shao et al., 2000; Fukui et al., 2003; Takehasi et al., 2007).

Plazmocītu daudzumu gļotādas saistaudos un intraepitēliālo limfocītu skaitu novērtējām, nosakot vidējo šūnu skaitu $\pm$ standartnovirze vienā mikroskopa redzes laukā. Atbilstoši literatūras datiem (Neiger et al., 1998; Ferrero et al., 2008), limfocītu daudzumu, pēc to skaita vienā mikroskopa redzes laukā gļotādas saistaudos „augšējā daļā” un starp dziedzeriem, nosacīti iedalījām:

- limfocītu nav – negatīvs;
- 1-15 limfocītu vienā redzes laukā – mazs limfocītu daudzums;
- 15-50 limfocītu vienā redzes laukā – vidēji daudz limfocītu;
- vairāk kā 50 limfocītu vienā redzes laukā – daudz limfocītu.

Datu statistiskā apstrāde

Pētījumā izmatoto helikobaktēriju noteikšanas metožu rezultātu salīdzināšanai izmantojām Kohrana Q testu, ko pielieto vairāku saistītu paraugkopu salīdzināšanai un dihotomiskās skalas datu apstrādei. Pētījumu rezultāts ir kvalitatīva pazīme, ko var apzīmēt tikai ar divām vērtībām – izmeklējamā gļotāda (paraugs) *Helicobacter spp.* pozitīvs vai *Helicobacter spp.* negatīvs, tāpēc šī pazīme ir pieskaitāma pie dihotomiskās skalas (Arhipova, Bāliņa, 2003).

Helikobaktēriju izplatību dažādās kuņģa gļotādas vietās kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā analizējām ar χ^2 kritēriju kā statistiskās neatkarības testu vairāku paraugkopu salīdzināšanai. Parādīts, ka χ^2 kritēriju kā statistiskās neatkarības testu var izmantot, lai noteiktu faktora iedarbības būtiskumu uz kvalitatīvas pazīmes izmaiņām (Arhipova, Bāliņa, 2003). Šajā gadījumā faktors ir attiecīgā kuņģa gļotādas dziedzeru zona, bet kvalitatīvā pazīme – vai tā ir helikobaktēriju pozitīva vai negatīva vērtības. Testa rezultāti ļāva secināt, vai pastāv sakarība starp attiecīgo kuņģa dziedzeru zonu un helikobaktēriju izplatību. Līdzīgi varējām noteikt atšķirību būtiskumu starp helikobaktēriju pozitīvajiem vai negatīvajiem rezultātiem un kuņģa gļotādas makroskopiskām izmaiņām (Arhipova, Bāliņa, 2003).

Helikobaktēriju lokalizācijas un daudzuma analizēšana dažādās kuņģa gļotādas vietās kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā un tā saistība ar morfoloģiskajām pārmaiņām histoloģiskajos preparātos tika noteikta ar Mann-Vitneja U testu (*Mann-Whitney U test*) divu nesaistītu paraugkopu salīdzināšanai un ordinālās skalas datu apstrādei (Paura, Arhipova, 2002).

Mukoīdo epiteliocītu un klājšūnu skaita atšķirības gļotādā analizējām ar Stjudenta t testu divu paraugkopu salīdzināšanai (Paura, Arhipova, 2002). Savukārt pēc limfocītu daudzuma vienā mikroskopa redzes laukā, atšķirīgo paraugu grupu

salīdzināšanai, līdzīgi kā helikobaktēriju daudzuma novērtēšanai, izmantojām Mann-Vitneja U testu.

Datu matemātiskā apstrāde un attēlu izveide veikta ar MS Excel un SPSS 11.5 programmu (Arhipova, Bāliņa, 2003).

PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Mūsu pētījumā vispirms svarīgi bija noteikt helikobaktērijas jenotsuņu un mājas suņu kuņģa gļotādā ar dažādām diagnostikas metodēm, lai salīdzinātu to jutību un noskaidrotu precīzākās un ērtākās šo baktēriju noteikšanas metodes. Helikobaktēriju noteikšanai sava darba pirmajā un otrajā etapā gan jenotsuņiem (*Nyctereutes procyonoides*), gan mājas suņiem (*Canis familiaris*) izmantojām urēzes testu, gļotādas virsmas noburzumu citoloģiju un histoloģisko izmeklēšanu.

Helikobaktērijas jenotsuņu kuņģa gļotādā, nosakot tās ar dažādām diagnostikas metodēm

Visiem mūsu izmeklētajiem jenotsuņiem kuņģa, barības vada un divpadsmitpirkstu zarnas gļotādā identificējām helikobaktērijas. Izrādījās, ka visjutīgākā metode helikobaktēriju noteikšanai bija gļotādas virsmas noburzumu citoloģija, ar kuru *Helicobacter spp.* pozitīvus rezultātus ieguvām 96.7% gadījumos no visiem izmeklētajiem jenotsuņu kuņģa, barības vada un divpadsmitpirkstu zarnas gļotādas paraugiem. Gļotādas histoloģiskajā izmeklēšanā helikobaktērijas konstatējām 82.9% gadījumos no visiem izmeklētajiem gļotādas paraugiem, bet urēzes tests pēc 60 minūtēm bija pozitīvs tikai 73.0% gadījumos. Uzskatām, ka gļotādas virsmas noburzumu citoloģijas metode ir ne tikai precīza, bet arī viegla, ātra un lēta diagnostikas metode, kam nav nepieciešams speciāls aprīkojums. Turklāt ar šo metodi gļotādas mukoīdajā sekrētā var konstatēt helikobaktērijas pat tad, ja tās ir nelielā daudzumā. Arī citi autori akcentējuši, ka gļotādas virsmas noburzumu citoloģijas metodi var uzskatīt kā praktiski izdevīgu metodi (Happonen et al., 1996; Libera et al., 1996; Leib, Duncan, 2005). Jāuzsver, ka noburzumus no gļotādas virsmas ņemām stingri ievērojot prasību izmantot sterilus vates kociņus, lai izvairīto no kļūdaini pozitīviem rezultātiem.

Kas attiecas uz gļotādas histoloģisko izmeklēšanu helikobaktēriju noteikšanai, jāuzsver, ka mūsu pētījums pierādīja, ka tā ir ne tikai pietiekami jutīga metode, bet ar tās palīdzību varējām noteikt arī helikobaktēriju lokalizāciju gļotādā. Tā kā krāsojot histoloģiskos preparātus ar hematoksilīnu un eozīnu, helikobaktērijas kuņģa gļotādā var nekonstatēt, ja to daudzums ir neliels, izmantojām vienu no daudzu autoru ieteiktajām krāsošanas metodēm – modificēto Gimza jeb *Diff Quik* metodi (Potvin, 1994; Happonen et al., 1996; Megroud, 1996a; El-Zimaity et al., 1998).

Mūsu pētījums parādīja, ka salīdzinoši viegla, ātra un lēta helikobaktēriju noteikšanas metode ir arī urēzes tests. Tomēr jāņem vērā, ka šīs metodes rezultāti var būt kļūdaini negatīvi, ja helikobaktēriju daudzums kuņģa gļotādā ir neliels vai kuņģa gļotādā ir patoloģiskas izmaiņas (Happonen et al., 1998; Granstrom et al., 2008). Turklāt izmantojot urēzes testu praksē, mēs, tāpat kā citi autori (Happonen et al., 1998; Leib, Duncan, 2005), iesakām izmeklēt vairākus kuņģa gļotādas paraugus, lai izvairītos no kļūdainiem *Helicobacter spp.* negatīviem rezultātiem, jo helikobaktērijas kuņģa gļotādā ir izplatītas nevienmērīgi. Jāuzsver, ka, lai izvairītos no kļūdaini pozitīviem

ureāzes testa rezultātiem, gļotādas paraugus izmeklējām uzreiz pēc dzīvnieka nāves, kad gļotādā vēl nav paspējušas savairoties citas fermentu ureāzi producējošas baktērijas, kā *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* u.c. (Laine et al., 1996; Happonen et al., 1998; Leib, Duncan, 2005).

Ureāzes testa *Helicobacter spp.* pozitīvo rezultātu skaitu atkarība no reakcijas nolasīšanas laika atspoguļota pirmajā tabulā.

1. tabula/ Table 1

Ureāzes testa rezultāti jenotsuņu kuņģa gļotādā, izmantojot dažādus reakcijas nolasīšanas laikus

Results of urease test in the gastric mucosa of raccoon dogs, controled after different time

Paraugu daudzums/ <i>Amount of samples</i>	Ureāzes testa nolasīšanas laiks/ <i>Control time of uresase test results</i>		
	10 min.	30 min.	60 min.
<i>Helicobacter spp.</i> pozitīvo paraugu kopskaits/ <i>Total number of Helicobacter spp. positive samples</i>	49*	92*	111*
Izmeklēto paraugu kopskaits/ <i>Total number of samples</i>	152	152	152
<i>Helicobacter spp.</i> pozitīvo paraugu procentuālais daudzums/ <i>Procentual amount of Helicobacter spp. positive samples</i>	32.2%*	60.5%*	70.3%*

*- atšķirība ir būtiska ($p < 0.01$), salīdzinot rezultātus pēc 10 min., 30 min. un 60 min./
changes are statistically significant ($p < 0.01$) after 10, 30 and 60 min.

Redzam, ka mūsu pētījumā *Helicobacter spp.* pozitīvo rezultātu daudzums jenotsuņu kuņģa gļotādas paraugiem palielinājās līdz ar testa nolasīšanas laika pagarināšanu no 10 līdz 60 minūtēm. *Helicobacter spp.* pozitīvi ureāzes testa rezultāti pēc 10 minūtēm bija tikai 32.2% gadījumos, pēc 30 minūtēm – jau 60.5% gadījumos, bet pēc 60 minūtēm – 70.3% gadījumos. Tāpēc, izmeklējot gļotādas paraugus ar ureāzes testu, iesakām rezultātus nolasīt ne ātrāk kā pēc 60 minūtēm. Runājot par ureāzes testa rezultātu nolasīšanas laiku, jāuzsver, ka šī testa reakcijas ātrums ir atkarīgs no helikobaktēriju daudzuma kuņģa gļotādā. Ja kuņģa gļotādā ir maz helikobaktēriju, pozitīvi ureāzes testa rezultāti parādās vēlāk nekā, ja helikobaktēriju ir daudz (Hazell et al., 1987).

Attiecībā uz helikobaktēriju izplatību jenotsuņu kuņģa kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā, barības vada un divpadsmitpirkstu zarnas gļotādā, izrādījās, ka pēc gļotādas virsmas nobērsumu citoloģijas un histoloģiskās izmeklēšanas rezultātiem

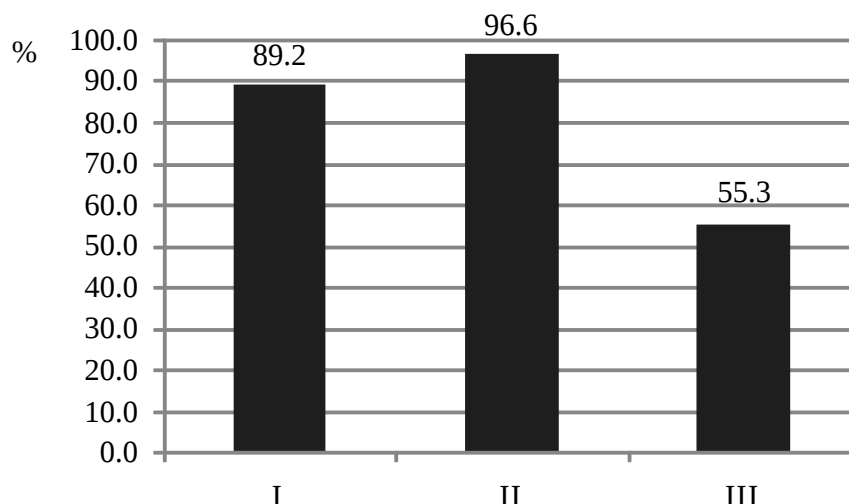
jenotsuņiem helikobaktērijas bija izplatītas visai līdzīgi gandrīz visos gļotādas paraugos. Ar gļotādas virsmas noburzumu citoloģiju, kā jutīgāko pētījumā izmantoto metodi, konstatējām, ka jenotsuņu kuņģa gļotādā helikobaktērijas bija 100.0% gadījumos kardiālo dziedzeru zonā, 98.4% gadījumos fundālo dziedzeru zonā un 92.5% gadījumos pilorisko dziedzeru zonā, bet barības vadā un divpadsmitpirkstu zarnā *Helicobacter spp.* pozitīvi rezultāti attiecīgi bija 87.5% un 75.0% gadījumos. Līdzīgus rezultātus ieguvām arī nosakot helikobaktērijas jenotsuņiem ar histoloģisko izmeklēšanu, tikai tad nedaudz mazāk helikobaktēriju konstatējām kuņģa piloriskajā dziedzeru zonas gļotādā – 75.5% gadījumos. Savukārt *Helicobacter spp.* pozitīvi ureāzes testa rezultāti pat pēc 60 minūtēm bija gandrīz uz pusi mazāk (40% gadījumos), salīdzinot ar gļotādas virsmas noburzumu citoloģijas metodes un histoloģiskās izmeklēšanas rezultātiem. Acīmredzot ureāzes tests šajos gadījumos nebija pietiekami jutīgs. Jau minējām, ka, ja helikobaktēriju daudzums paraugā ir neliels vai, ja kuņģa gļotādā ir patoloģiskas izmaiņas, ureāzes testa rezultāti var būt negatīvi (Happonen et al., 1998; Granstrom et al., 2008).

Helikobaktērijas mājas suņu kuņģa gļotādā, nosakot tās ar dažādām diagnostikas metodēm

Līdzīgi kā to konstatējām izmeklējot jenotsuņu gļotādas paraugus, mūsu pētījums par mājas suņiem arī parādīja, ka jutīga, ātra un viegla helikobaktēriju noteikšanas metode ir gļotādas virsmas noburzumu citoloģija. Ar *Diff Quik* metodi nokrāsotajā kuņģa gļotādas mukoīdajā sekrētā redzējām zilas, spirālveida baktērijas. Suņu kuņģa gļotādas paraugos ar gļotādas virsmas noburzumu citoloģijas metodi *Helicobacter spp.* pozitīvus rezultātus ieguvām 82.7% gadījumos. Tikai nedaudz mazāk helikobaktērijas kuņģa gļotādas paraugos konstatējām ar ureāzes testu – 80.8% gadījumos, bet ar histoloģisko izmeklēšanu – 81.4% gadījumos ($p < 0.05$).

Attiecībā uz ureāzes testa rezultātu nolasīšanas laiku, līdzīgi kā izmeklējot jenotsuņu kuņģa gļotādas paraugus, arī suņiem ureāzes testā, pagarinot ekspozīcijas laiku no 10 minūtēm līdz 30 un 60 minūtēm, attiecīgi paaugstinājās arī pozitīvo gadījumu skaits. Izrādījās, ka pēc 60 minūšu ekspozīcijas laika ar ureāzes testu visaugstākais *Helicobacter spp.* pozitīvo paraugu skaits bija kuņģa fundālo dziedzeru zonas gļotādā. Tur helikobaktērijas konstatējām 95.8% gadījumos, t.i. 230 paraugos no 240 izmeklētajiem. Kuņģa kardiālo dziedzeru zonas gļotādā pēc 60 minūtēm ureāzes testā *Helicobacter spp.* pozitīvi paraugi bija 85.0% gadījumos, t.i. 102 no 120 izmeklētajiem, bet kuņģa pilorisko dziedzeru zonā – attiecīgi 53.3% gadījumos, t.i. 80 paraugi no 150 izmeklētajiem. Jāuzsver, ka ureāzes testa rezultāti mājas suņu kuņģa gļotādas paraugos tikai nedaudz atšķīrās no gļotādas virsmas noburzumu citoloģijas un histoloģiskās izmeklēšanas rezultātiem, tāpēc secinājām, ka suņiem arī šo metodi var izmantot, lai noteiktu helikobaktēriju klātbūtni kuņģa gļotādā, turklāt tā ir salīdzinoši vienkārša un rezultātus iegūst ātri.

Analizējot helikobaktēriju izplatību mājas suņu kuņģa gļotādas atsevišķajās dziedzeru zonās, jāuzsver, ka iegūtie rezultāti zināmā mērā atšķīrās no tiem, kādus konstatējām jenotsuņiem. Mūsu pētījumā visu izmantoto metožu rezultāti liecināja, ka mājas suņiem helikobaktērijas lokalizējās gandrīz visos kardiālo un fundālo dziedzeru zonas gļotādas paraugos, bet pilorisko dziedzeru zonā tās bija gandrīz uz pusi mazāk izplatītas. Piemēram atspoguļojam gļotādas virsmas noburzumu citoloģijas izmeklēšanas rezultātus (2. attēls).



2. att. *Helicobacter spp.* pozitīvo rezultātu daudzums (%) dažādajās suņu kuņģa dziedzeru zonās, izmantojot gļotādas virsmas nobērsumu citoloģijas metodi

Fig. 2. Amount of *Helicobacter spp.* positive samples (%) in the different gland regions of dogs gastric mucosa detected by brush cytology

- I** – kardiālo dziedzeru zona/ *cardiac gland region*;
II – fundālo dziedzeru zona/ *fundic gland region*;
III – pilorisko dziedzeru zona/ *pyloric gland region*.

Izrādījās, ka kardiālo dziedzeru zonā *Helicobacter spp.* pozitīvi kuņģa gļotādas paraugi bija 89.2% gadījumos, fundālo dziedzeru zonā – 96.6% gadījumos, bet pilorisko dziedzeru zonā – tikai 55.3% gadījumos. Līdzīgu ainu atzīmējuši arī citi autori, kuri parādījuši, ka helikobaktērijas mājas suņiem vairāk atrodas fundālo dziedzeru nekā pilorisko dziedzeru zonā (Diker et al., 2002).

Jāuzsver, ka neskatoties uz to, ka histoloģiskā izmeklēšana ir salīdzinoši dārgāka un sarežģītāka metode par ureāzes testu un gļotādas virsmas nobērsumu citoloģisko izmeklēšanu, tā ir ļoti svarīga, lai suņiem varētu noteikt helikobaktērijas kuņģa gļotādas biopsiju paraugos un izvērtētu kuņģa gļotādas morfoloģisko stāvokli.

Helikobaktērijas un mājas suņu kuņģa gļotādas makroskopiskās izmaiņas

Tā kā helikobaktērijas mājas suņu kuņģa gļotādā var būt kā normāla gremošanas trakta mikroflora, kas ne vienmēr rada tajā patoloģiskas izmaiņas, mūsu pētījuma viens no uzdevumiem bija novērtēt kuņģa gļotādas morfoloģisko stāvokli saistībā ar helikobaktēriju izplatību tajā. Vispirms novērtējām mājas suņu kuņģa gļotādas makroskopisko stāvokli kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā. Pētījumā iekļautajiem suņiem kuņģa gļotāda bija vai nu neizmainīta (normāla), vai nu tajā novēroja hiperēmiju, erozijas un pat polipus.

Analizējot mūsu izmeklētajiem suņiem kuņģa gļotādas makroskopisko stāvokli atsevišķajās dziedzeru zonās, izrādījās, ka kuņģa **kardiālo dziedzeru zonā** gan *Helicobacter spp.* pozitīvajos, gan *Helicobacter spp.* negatīvajos paraugos pārsvarā kuņģa gļotāda bija neizmainīta. Kuņģa gļotādas hiperēmiju konstatējām tikai 10.4%

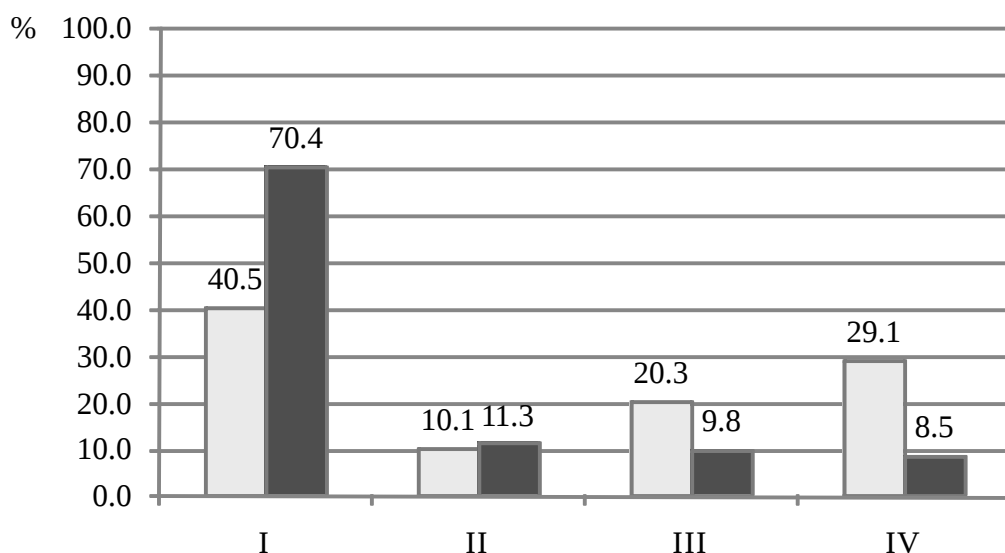
gadījumos paraugos ar helikobaktērijām un 14.3% gadījumos *Helicobacter spp.* negatīvajos paraugos, bet kuņģa gļotādas erozijas bija 3.8% gadījumos tikai *Helicobacter spp.* pozitīvajos gļotādas paraugos. Gļotādas polipi kuņģa kardiālo dziedzeru zonā nebija vispār.

Tā kā gļotādas makroskopiskais stāvoklis kuņģa kardiālo dziedzeru zonā mūsu pētījumā iekļautajiem mājās suņiem bija visai līdzīgs *Helicobacter spp.* pozitīvajos un negatīvajos paraugos, varam secināt, ka kardiālo dziedzeru zonā novērotā gļotādas hiperēmija suņiem nebija saistīta ar tur esošajām helikobaktērijām. Tomēr kardiālo dziedzeru zonā novērotās gļotādas erozijas šiem dzīvniekiem, lai gan tikai 3.8% *Helicobacter spp.* pozitīvajos paraugos, iespējams varētu būt helikobaktēriju izraisītas, jo kardiālo dziedzeru zonas gļotādas *Helicobacter spp.* negatīvajos paraugos eroziju nebija.

Kas attiecas uz mājās suņu kuņģa **fundālo dziedzeru zonas** gļotādas makroskopisko stāvokli, tad, līdzīgi kā kardiālo dziedzeru zonā, tas būtībā neatšķīrās paraugos ar helikobaktērijām un bez tām. Kuņģa gļotāda neizmainīta bija 65.7% gadījumos paraugos ar helikobaktērijām un 70.0% gadījumos – bez tām. Jāuzsver, ka kuņģa gļotādas paraugi ar makroskopiskām izmaiņām bija nedaudz vairāk nekā to konstatējām kardiālo dziedzeru zonā. Kuņģa gļotādas hiperēmiju gan *Helicobacter spp.* pozitīvajos, gan negatīvajos paraugos konstatējām 20.0% gadījumos, bet erozijas attiecīgi – 11.3% un 10.0% gadījumos. Turklāt fundālo dziedzeru zonas septiņos kuņģa gļotādas paraugos no 230 *Helicobacter spp.* pozitīvajiem paraugiem, t.i. 3.0% gadījumos, konstatējām polipus, kuru *Helicobacter spp.* negatīvajos paraugos nebija vispār. Tas, ka suņiem kuņģa fundālo dziedzeru zonā tika konstatēts vairāk makroskopiski izmainītu gļotādas paraugu nekā to bija kardiālo dziedzeru zonā, saistīts ar fundālo dziedzeru specifisko funkciju – sālsskābes un kuņģa proteāžu producēšanu, kas zināmos apstākļos, ja traucēti gļotādas aizsargmehānismi, var darboties kā agresīvi faktori, izraisot tādus vai citādus gļotādas bojājumus (Hermanns et al., 1995; Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1998; Yamasaki et al., 1998; Shirin et al., 2008).

Kopumā mūsu pētījumi liecina, ka mājās suņiem konstatētās kuņģa fundālo dziedzeru zonas gļotādas makroskopiskās izmaiņas nevar saistīt ar helikobaktēriju klātbūtni tajā.

Analizējot mājās suņu kuņģa **piloriskās dziedzeru zonas** makroskopisko stāvokli, vispirms jāuzsver, ka paraugos ar helikobaktērijām makroskopiskās izmaiņas bija vairāk izteiktas nekā *Helicobacter spp.* negatīvajos paraugos. Normāla kuņģa gļotāda bija tikai 32 no 79 *Helicobacter spp.* pozitīvajiem paraugiem, t.i. 40.5% gadījumos, bet *Helicobacter spp.* negatīvajos paraugos pārsvarā – 70.4% gadījumos, t.i. 50 paraugos no 71 izmeklētā parauga kuņģa gļotāda bija makroskopiski neizmainīta. *Helicobacter spp.* pozitīvo un negatīvo pilorisko dziedzeru zonas gļotādas paraugu makroskopiskās izmaiņas atspoguļotas trešajā attēlā.



3. att. Kuņģa pilorisko dziedzeru zonas *Helicobacter* spp. pozitīvo un negatīvo paraugu makroskopiskā stāvokļa izvērtējums

Fig. 3. Macroscopic status of pyloric gland region in the *Helicobacter* spp. positive and negative samples

□ *Helicobacter* spp. pozitīvie paraugi/
positive samples ■ *Helicobacter* spp. negatīvie paraugi/
negative samples

- I** – normāla kuņģa gļotāda/ normal gastric mucosa;
II – kuņģa gļotādas hiperēmija/ hyperemia of gastric mucosa;
III – kuņģa gļotāda ar erozijām/ erosions of gastric mucosa;
IV – kuņģa gļotāda ar polipiem/ polyps of gastric mucosa.

Konstatējām, ka pilorisko dziedzeru zonā *Helicobacter* spp. pozitīvajos paraugos daudz vairāk izplatītas ir gļotādas erozijas un polipi, – attiecīgi 20.3% un 29.1% gadījumos. Savukārt *Helicobacter* spp. negatīvajos paraugos kuņģa gļotādas erozijas bija tikai 9.8% gadījumos, bet gļotādas polipi – 8.5% gadījumos. Gļotādas hiperēmija *Helicobacter* spp. pozitīvajos un negatīvajos pilorisko dziedzeru zonas paraugos izplatīta salīdzinoši vienādi. Pieļaujam, ka mūsu pētījumā iekļautajiem suņiem makroskopiski konstatētās gļotādas erozijas un polipi zināmā mērā varētu būt helikobaktēriju izraisīti – pirmkārt tāpēc, ka šāda veida izmaiņas kuņģa pilorisko dziedzeru zonā mēs būtiski vairāk novērojam tieši *Helicobacter* spp. pozitīvajos paraugos. Otrkārt tāpēc, ka pēc literatūras datiem bīgliem gļotādas erozijas pilorisko dziedzeru zonā novērotas, eksperimentāli suņus inficējot ar *Helicobacter pylori* (Ross et al., 1999). Protams, šis ir jautājums, kas prasa turpmākus pētījumus, tāpat kā helikobaktēriju saistību ar polipu veidošanos kuņģa gļotādā.

Helikobaktēriju lokalizācija un daudzums mājas suņu kuņģa gļotādā

Helikobaktēriju lokalizāciju un daudzumu noteicām kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā pie kuņģa virsmas epitēlija, kuņģa bedrītēs un dziļāk gļotādas dziedzeros. Atgādināsim, ka atkarībā no helikobaktēriju skaita vienā mikroskopa redzes

laukā, to daudzumu nosacīti iedalījām četrās grupās: helikobaktēriju nav, vai to ir maz, vidēji daudz, vai arī ļoti daudz.

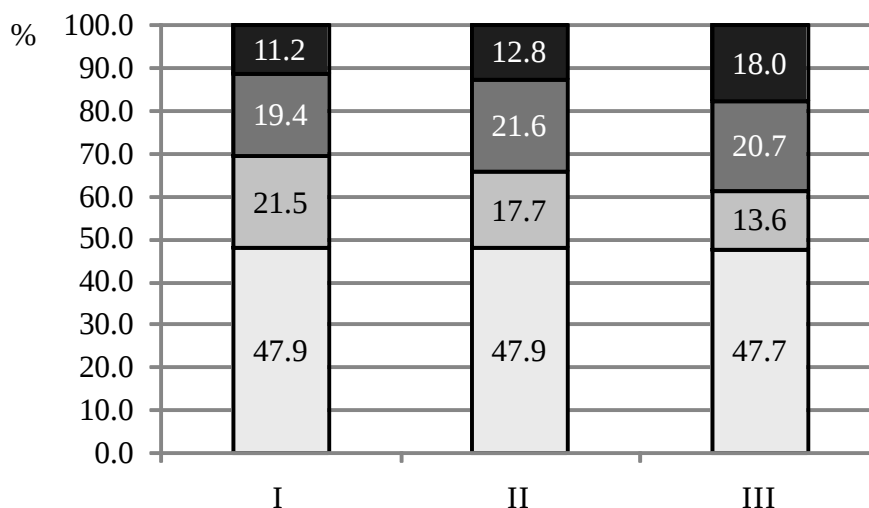
Kuņģa **kardiālo dziedzeru zonas** gļotādā izmeklētajos paraugos helikobaktērijas konstatējām kuņģa bedrītēs līdz 170 µm dziļumam, un dziedzerepitēlijā – līdz pat 350 µm dziļumam. Kardiālo dziedzeru zonā helikobaktērijas 64.7% un 65.5% gadījumos bija mazā daudzumā, t.i. no vienas līdz 10 helikobaktērijām vienā mikroskopa redzes laukā, attiecīgi pie virsmas epitēlija un kuņģa bedrītēs. Tomēr, neskatoties uz to, ka vairumā gadījumu pie virsmas–bedrīšu epitēlija helikobaktēriju bija maz, tās konstatējām arī vidēji lielā un pat ļoti lielā daudzumā.

Gļotādā dziļāk kardiālajos dziedzeros helikobaktērijas pārsvarā, t.i. 82.7% gadījumos netika konstatētas, un pavisam nedaudzos kardiālo dziedzeru mikroskopa redzes laukos helikobaktērijas bija maz, vidēji daudz un ļoti daudz. Tātad mūs pētījumi liecina, ka suņiem kuņģa kardiālo dziedzeru zonas gļotādā helikobaktēriju daudzums visumā ir neliels un tās pārsvarā lokalizējās pie kuņģa virsmas–bedrīšu mukoīdā epitēlija vai tā sekrētā, bet stipri retāk helikobaktērijas atradās dziļāk gļotādā pie kardiālajām dziedzerepitēlija šūnām vai kardiālo dziedzeru lūmenā. To, ka helikobaktērijas vairāk koncentrētas kardiālo dziedzeru zonā gļotādā pie virsmas–bedrīšu epitēlija atzīmējuši arī citi autori (Geyer et al., 1993; Yamasaki et al., 1998; Hwang et al., 2002).

Fundālo dziedzeru zonas gļotādā izmeklētajos suņu gļotādas paraugos tāpat kā kardiālo dziedzeru zonā helikobaktērijas konstatējām kuņģa bedrītēs līdz 170 µm dziļumam, bet dziļāk esošajā fundālo dziedzeru epitēlijā – līdz 350 µm dziļumam. Fundālo dziedzeru zonas gļotādā, līdzīgi kā mājas suņu kardiālo dziedzeru zonā, helikobaktērijas galvenokārt lokalizējās pie virsmas epitēlija un kuņģa bedrītēs, bet to daudzums šeit bija lielāks nekā kardiālo dziedzeru zonā. Fundālo dziedzeru zonā vidēji daudz, t.i. 10-50 helikobaktērijas vienā mikroskopa redzes laukā, bija 69.0% gadījumos pie virsmas epitēlija, bet 77.5% gadījumos – kuņģa bedrītēs. Dziļāk gļotādā fundālajos dziedzeros 80.0% gadījumos helikobaktēriju mikroskopa redzes laukos nebija. Tomēr pārējos 20% redzes laukos helikobaktērijas fundālajos dziedzeros bija mazā, vidēji lielā un pat ļoti lielā daudzumā.

Tātad mājas suņu kuņģa gļotādas fundālajā dziedzeru zonā 69.0-77.5% gadījumos helikobaktērijas vidējā daudzumā (10-15 baktēriju vienā mikroskopa redzes laukā) lokalizējās galvenokārt pie kuņģa virsmas–bedrīšu epitēlija, un apmēram 20.0% gadījumos tās dažādā daudzumā bija arī dziļāk fundālajos dziedzeros. Jāatgādina, ka patogēnās helikobaktēriju sugas var lokalizēties pat klājšūnu intracelulārajos kanāliņos, izraisot to bojājumus un kuņģa gļotādas iekaisumu (Geyer et al., 1993; Happonen et al., 1998; Yamasaki et al., 1998; Diker et al., 2002; Hwang et al., 2002; Joo et al., 2007; Robic et al., 2007).

Kas attiecas uz kuņģa **pilorisko dziedzeru zonas gļotādu**, helikobaktērijas varēja konstatēt salīdzinoši dziļāk nekā tās bija kardiālo un fundālo dziedzeru zonā – kuņģa bedrītēs helikobaktērijas konstatējām līdz 350 µm dziļumam, bet dziļāk esošajā dziedzerepitēlijā – līdz pat 760 µm dziļumam. Helikobaktēriju daudzuma atšķirības kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotādā suņiem parādītas ceturtajā attēlā.



4. att. Helikobaktēriju daudzums kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotādā

Fig. 4. Amount of helicobacteria in the gastric mucosa of pyloric gland region

□ Nav □ Maz □ Vidēji daudz ■ Ļoti daudz
 Absent Mild Moderate Severe

I – virsmas epitēlijs/ *superficial epithelium*;

II – kuņģa bedrītes/ *gastric pits*;

III – pilorisko dziedzeru epitēlijs/ *pyloric gland epithelium*.

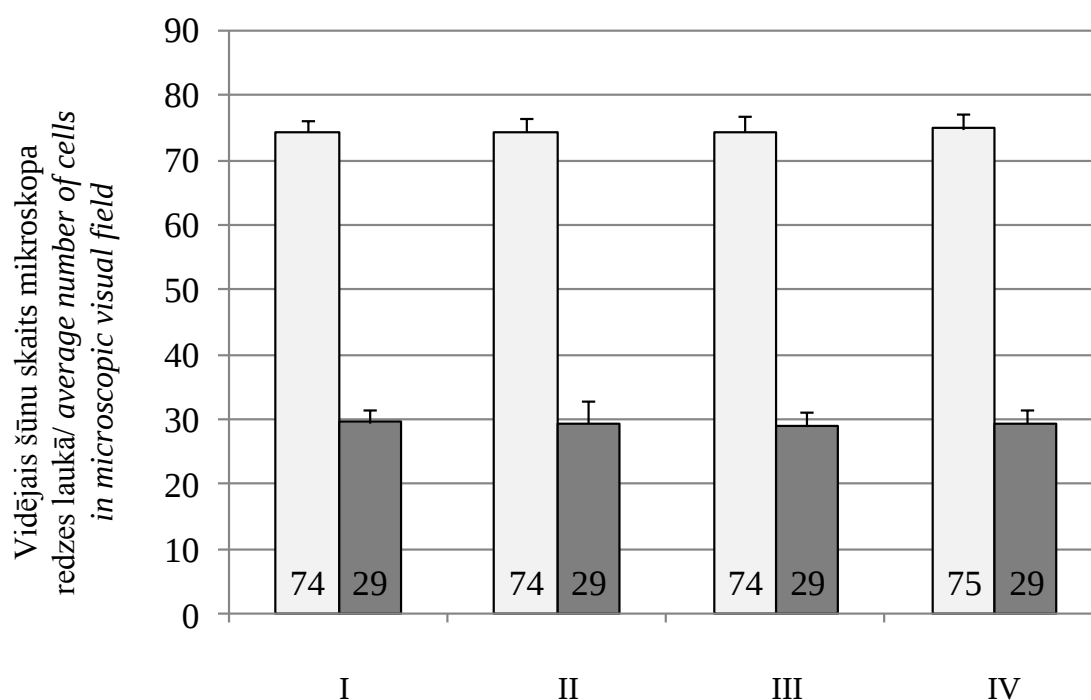
Mūsu pētījumā iekļautajiem mājas suņiem kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotādā gandrīz 50% gadījumos no visiem izmeklētajiem mikroskopa redzes laukiem helikobaktēriju nebija. Kas attiecas uz helikobaktēriju lokalizāciju pilorisko dziedzeru zonas gļotādas dažādajās struktūrās, mūsu pētījums parādīja, ka helikobaktērijas dziļāk gļotādā, t.i. pašos piloriskajos dziedzeros bija sastopamas daudz biežāk nekā kardiālo un fundālo dziedzeru zonas dziedzeros, kur helikobaktērijas vairumā gadījumu lokalizējās pie gļotādas virsmas epitēlija un kuņģa bedrītēs. Piloriskajos dziedzeros helikobaktērijas mazā, vidēji lielā un ļoti lielā daudzumā attiecīgi bija 13.6%, 20.7% un 18.0% gadījumos. Jāatzīmē arī, ka suņu pilorisko dziedzeru zonas dziedzeros, kā arī kuņģa bedrītēs helikobaktērijas vidējā un ļoti lielā daudzumā varēja konstatēt pat nelielu biežāk nekā šādā daudzumā tās lokalizējās pie virsmas epitēlija. Tas liecina, ka kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotādas dziļākajās daļās suņiem helikobaktēriju izplatība ir lielāka nekā tā bija kardiālo un fundālo dziedzeru zonā.

Kopumā secinājam, ka kardiālo un fundālo dziedzeru zonā pie gļotādas virsmas epitēlija un kuņģa bedrītēs helikobaktērijas lokalizējās biežāk un to daudzums ir lielāks nekā šajās gļotādas struktūrās pilorisko dziedzeru zonā. Savukārt dziļāk gļotādā pilorisko dziedzeru lūmenā helikobaktēriju bija daudz vairāk nekā kardiālajos un fundālajos dziedzeros.

Mukoīdo epiteliocītu un klājšūnu skaits mājas suņu kuņģa gļotādā saistībā ar helikobaktēriju daudzumu tajā

Lai atbildētu uz jautājumu, kādas ir (un vai ir) gļotādas mukoīdo epiteliocītu – kā galveno gļotādas aizsargmehānisma nodrošinātājs, un klājšūnu – kā augsti specializētu sālsskābes producētājs, atbildes reakcijas uz helikobaktērijām kuņģa gļotādā, mēs pētījām gļotādas mukoīdo epiteliocītu un klājšūnu skaitu dažādās kuņģa dziedzeru zonās saistībā ar dažādu helikobaktēriju daudzumu tajā.

Izrādījās, ka suņu kuņģa **kardiālo dziedzeru zonas** gļotādas virsmas–bedrīšu epitēlijā mukoīdo epiteliocītu skaits praktiski neatšķīrās vietās, kurās helikobaktēriju nebija un vietās ar maz, vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām (5. attēls).



5. att. Mukoīdo epiteliocītu un klājšūnu skaits suņu kuņģa gļotādas kardiālo dziedzeru „augšējā daļā”

Fig. 5. Number of mucoïd epitheliocytes and parietal cells in the dogs upper part of cardiac gland region

□ mukoīdie epiteliocīti/
mucoïd epitheliocytes ■ klājšūnas/
parietal cells

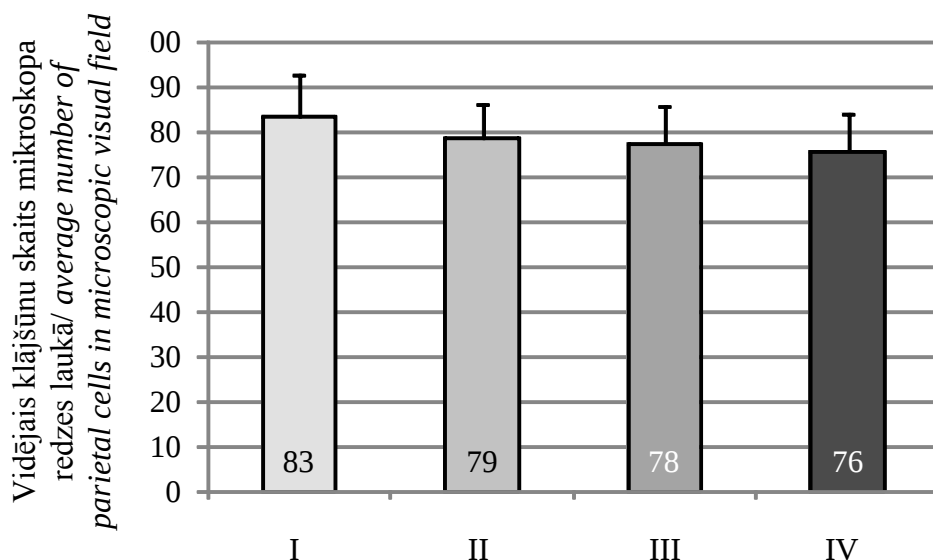
- I – nav (helikobaktēriju nebija)/ *absent*;
 II – maz (1-10 helikobaktērijas)/ *mild*;
 III – vidēji daudz (10-50 helikobaktērijas)/ *moderate*;
 IV – ļoti daudz (vairāk nekā 50 helikobaktērijas)/ *severe*.

Tāpat visai līdzīgs bija arī kardiālo dziedzeru mukoīdo epiteliocītu un klājšūnu skaits mikroskopa redzes laukos gļotādas vietās ar un bez helikobaktērijām.

Tātad mūsu pētījums parādīja, ka mājas suņiem kuņģa kardiālo dziedzeru zonā helikobaktērijas neatkarīgi no to daudzuma praktiski neradīja mukoīdo epiteliocītu un klājšūnu skaita samazināšanos, kas liecinātu par to bojājumiem. Tāpat šajā gļotādas vietā helikobaktērijas neizraisīja tādu kuņģa gļotādas aizsargmehānismu pastiprināšanos kā virsmas–bedrīšu epitēlija proliferāciju un mukoīdā sekrēta pastiprinātu izdalīšanos, uz kādu norādījuši citi autori (Vorobjova et al., 2005; Haesebrouck et al., 2009).

Arī kuņģa **fundālo dziedzeru zonas** gļotādā līdzīgi kā kardiālo dziedzeru zonā, virsmas–bedrīšu mukoīdo epiteliocītu skaits ir gandrīz vienāds vietās ar dažādu helikobaktēriju daudzumu. Līdz ar to secinājām, ka mājas suņu fundālo dziedzeru zonas gļotādā pat vidēji liels un ļoti liels helikobaktēriju daudzums pie virsmas–bedrīšu epitēlija praktiski neietekmē mukoīdo epiteliocītu un tā producētā mukoīdā sekrēta daudzumu.

Attiecībā uz klājšūnu skaitu fundālajos dziedzeros, konstatējām, ka arī to skaits praktiski nemainās saistībā ar helikobaktēriju daudzumu (6. attēls).



6. att. Klājšūnu skaits suņu kuņģa gļotādas fundālo dziedzeru „augšējā daļā”

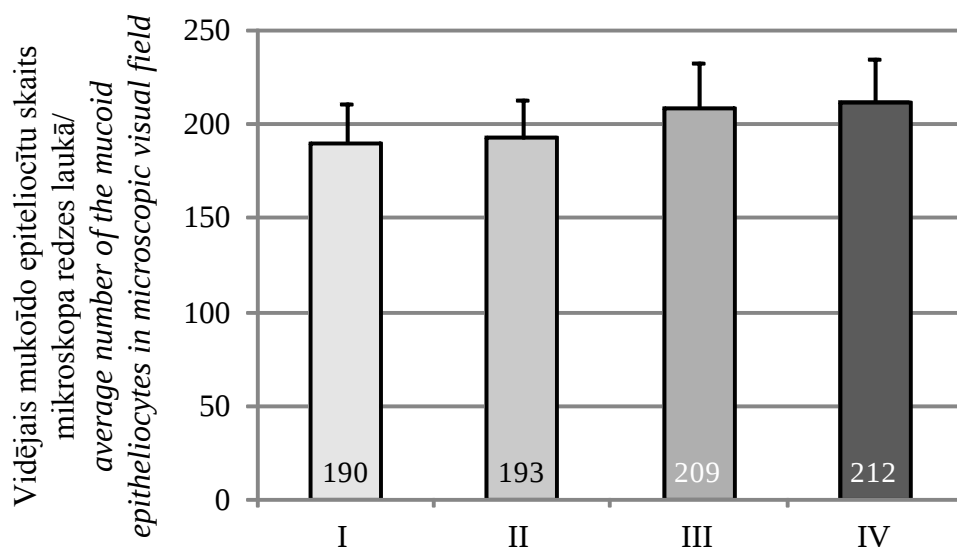
Fig. 6. Number of parietal cells in the dogs „upper part” of fundic gland region

- I** – nav (helikobaktēriju nebija)/ *absent*;
- II** – maz (1-10 helikobaktērijas)/ *mild*;
- III** – vidēji daudz (10-50 helikobaktērijas)/ *moderate*;
- IV** – ļoti daudz (vairāk nekā 50 helikobaktērijas)/ *severe*.

Lai gan klājšūnu skaitam fundālajos dziedzeros ir tendence samazināties gļotādas vietās ar helikobaktērijām nekā vietās bez tām, šo šūnu skaita atšķirības ir nebūtiskas: vietās bez helikobaktērijām klājšūnas vidēji bija 83 ± 9 vienā redzes laukā, bet vietās ar maz, vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktēriju, tās attiecīgi bija 79 ± 8 , 78 ± 8 un 76 ± 8 .

Jāuzsver, ka klājšūnu skaita samazināšanās novērota patogēno helikobaktēriju infekciju gadījumā, kā piemēram *Helicobacter pylori* infekcijas gadījumā cilvēkiem (Joo et al., 2007 Haesebrouck et al., 2009.). Mūsu pētījuma rezultāti par klājšūnu skaitu fundālajos dziedzeros saistībā ar helikobaktēriju klātbūtni gļotādā zināmā mērā sakrīt ar vairāku autoru datiem, kas atzīmējuši, ka helikobaktērijas suņiem fundālajos dziedzeros neizmaina klājšūnu daudzumu, kā arī neizmaina sāļsskābes producēšanu (Simpson et al., 1999; Neiger, Simpson, 2000).

Pilorisko dziedzeru zonas gļotādas reakcija uz helikobaktērijām mājas suņiem bija savādāka nekā kardiālo un fundālo dziedzeru zonas gļotādā. Pilorisko dziedzeru zonas gļotādas virsmas epitēlija un kuņģa bedrīšu mukoīdo epiteliocītu skaits attēlots septītajā attēlā.



7. att. Mukoīdo epiteliocītu skaits suņu kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotādas virsmas–bedrīšu epitēlijā

Fig. 7. Number of mucoid epitheliocytes in the superficial-pit epithelium of the dogs stomach's pyloric gland region

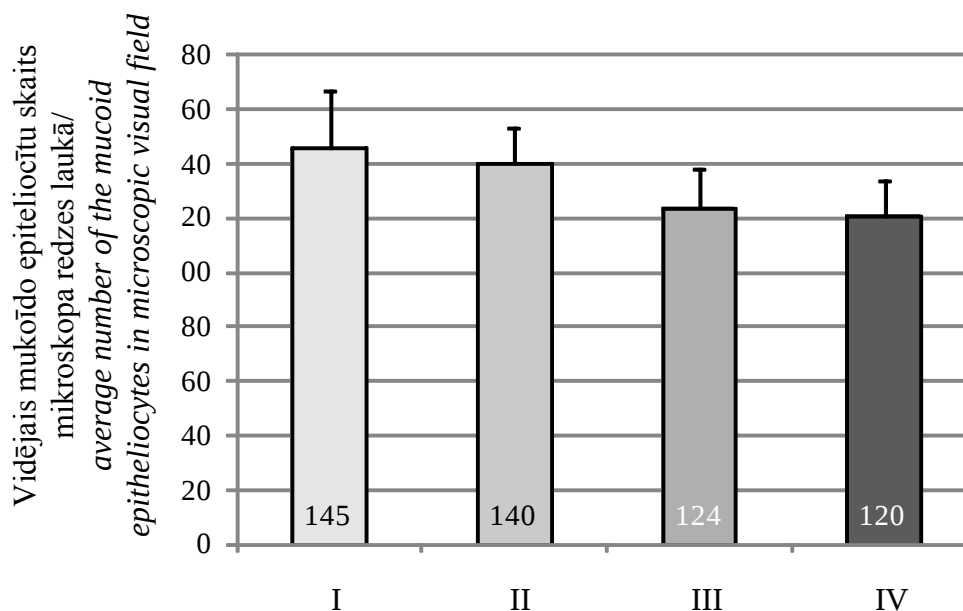
- I** – nav (helikobaktēriju nebija)/ *absent*;
II – maz (1-10 helikobaktērijas)/ *mild*;
III – vidēji daudz (10-50 helikobaktērijas)/ *moderate*;
IV – ļoti daudz (vairāk nekā 50 helikobaktērijas)/ *severe*.

Konstatējām, ka virsmas–bedrīšu mukoīdo epiteliocītu skaits būtiski palielinājās gļotādas vietās ar vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām. Paraugos, kuros helikobaktēriju nebija, mukoīdo epiteliocītu vidējais skaits bija 190 ± 21 šūnas vienā mikroskopa redzes laukā, bet vietās ar vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām tas attiecīgi bija 209 ± 24 un 212 ± 23 šūnas vienā redzes laukā. Jāuzsver, ka histoloģiskajos preparātos bija redzams arī liels mukoīdo epiteliocītu izdalītā mukoīdā sekrēta daudzums.

Tātad varam secināt, ka pilorisko dziedzeru zonā vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijas izraisa virsmas–bedrīšu mukoīdo epiteliocītu proliferāciju un mukoīdā sekrēta pastiprinātu producēšanu, kas liecina par gļotādas aizsargreakciju. Tāda tā

novērota arī kuņģa pilorisko dziedzeru zonā patogēno helikobaktēriju *Helicibacter pylori* infekcijas gadījumā cilvēkiem un eksperimentāli inficētiem laboratorijas dzīvniekiem (Petersen et al, 2001; Vorobjova et al., 2005; Haesebrouck et al., 2009).

Pilorisko dziedzeršūnu daudzums pilorisko dziedzeru „aušējā daļā” gļotādā ar dažādu helikobaktēriju daudzumu atspoguļots astotajā attēlā.



8. att. Mukoīdo pilorisko dziedzeršūnu skaits suņu kuņģa gļotādas pilorisko dziedzeru „augšējā daļā”

Fig. 8. Number of mucoid pyloric glandulocytes in the upper part of the dogs stomach's pyloric glands

- I** – nav (helikobaktēriju nebija)/ *absent*;
- II** – maz (1-10 helikobaktērijas)/ *mild*;
- III** – vidēji daudz (10-50 helikobaktērijas)/ *moderate*;
- IV** – ļoti daudz (vairāk nekā 50 helikobaktērijas)/ *severe*.

Mūsu pētījums parādīja, ka, palielinoties helikobaktēriju daudzumam gļotādā līdz vidēji daudz un ļoti daudz, mukoīdo epiteliocītu daudzums piloriskajos dziedzeros samazinājās. Vietās, kur nebija helikobaktēriju, vidējais pilorisko dziedzeru mukoīdo epiteliocītu skaits bija 145 ± 21 šūnas vienā mikroskopa redzes laukā, vietās ar maz helikobaktērijām tas bija 140 ± 13 šūnas, bet vietās ar vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām pilorisko dziedzeršūnu skaits samazinājās līdz 124 ± 14 un 120 ± 13 šūnām vienā mikroskopa redzes laukā. Tas varētu būt saistīts ar to, ka helikobaktēriju ietekmē rodas pilorisko dziedzeru šūnu bojājumi, piemēram, deģenerācija, līdz pat gļotādas atrofijai (Hermanns et al., 1994; Neiger, Simpson, 2000).

Kopumā secinājām, ka helikobaktērijas pilorisko dziedzeru zonā būtiski izmaina mukoīdo epiteliocītu skaitu virsmas-bedrīšu epitēlijā un piloriskajos dziedzeros. Turklāt pilorisko dziedzeru zonas gļotādas vietās ar vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām mukoīdo epiteliocītu skaita izmaiņām bija novērojama zināma

apgriezta proporcionalitāte – virsmas–bedrīšu epiteliocītu skaits pieauga, bet pilorisko dziedzeršūnu skaits tieši pretēji – samazinājās.

Limfocītu un plazmocītu daudzums mājas suņu kuņģa gļotādā un to saistība ar helikobaktēriju daudzumu

Lai analizētu kuņģa gļotādas reakciju uz tur esošajām helikobaktērijām, novērtējām limfocītu un plazmocītu daudzumu kardiālo, fundālo un pilorisko dziedzeru zonā paraugos bez helikobaktērijām un *Helicobacter spp.* pozitīvajos paraugos. Līdzīgi kā novērtējot helikobaktēriju daudzumu kuņģa gļotādā, arī limfocītu skaitu vienā mikroskopa redzes laukā, iedalījām četrās grupās: limfocītu nav, vai to bija maz, vidēji daudz un daudz.

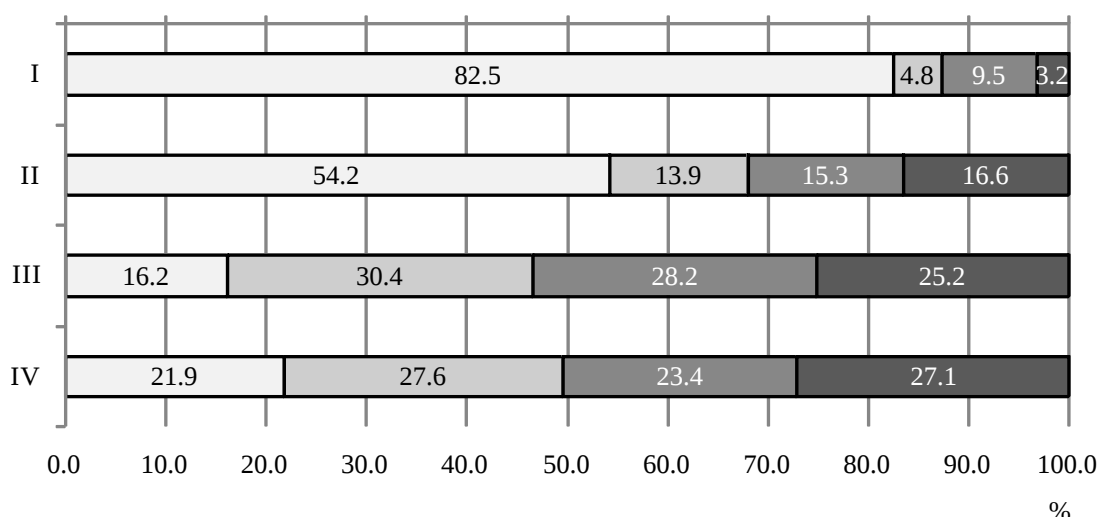
Izrādījās, ka mūsu pētījumā iekļautajiem suņiem kuņģa **kardiālo dziedzeru zonā** gan gļotādas saistaudos zem virsmas epitēlija un starp kuņģa bedrītēm, gan dziļāk starp dziedzeriem vietās ar helikobaktērijām un vietās bez tām pārsvarā limfocītus nekonstatējām. Limfocītu daudzums palielinājās tikai vietās ar vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām, ja salīdzina to ar gļotādas vietām, kur helikobaktēriju nebija vispār vai to bija maz. Vietās, kurās bija vidēji daudz vai ļoti daudz helikobaktērijas, limfocītu daudzums visbiežāk tomēr bija neliels – 1-15 limfocītu vienā mikroskopa redzes laukā.

Secinājām, ka mājas suņu kuņģa kardiālo dziedzeru zonas gļotādā mazs helikobaktēriju daudzums neizraisa būtisku limfocītu daudzuma palielināšanos gļotādas saistaudos, bet helikobaktērijas vidēji lielā vai lielā daudzumā pārsvarā rada nelielu limfocītu infiltrāciju.

Suņu kuņģa **fundālo dziedzeru zonā** gļotādas „augšējā daļā” un dziļāk saistaudos starp fundālajiem dziedzeriem, mikroskopā redzes lauku daudzums ar limfocītiem bija vairāk nekā to konstatējām kardiālo dziedzeru zonā. Gļotādas saistaudos zem virsmas epitēlija un starp kuņģa bedrītēm paraugos ar maz, vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām limfocītu skaitam bija tendence palielināties no maz līdz vidēji daudz un daudz. Bet gļotādas dziļākajā daļā saistaudos starp fundālajiem dziedzeriem limfocītu daudzuma sadalījuma atšķirības kuņģa gļotādas *Helicobacter spp.* pozitīvajos un negatīvajos paraugos nebija būtiskas.

Kopumā konstatējām, ka helikobaktēriju klātbūtne fundālo dziedzeru zonas gļotādā palielina limfocītu infiltrāciju gļotādas „augšējās daļas” saistaudos, t.i. zem virsmas epitēlija un starp kuņģa bedrītēm, kas liecina par zināmu gļotādas aizsargreakciju. Attiecība uz gļotādas dziļāko daļu – saistaudos starp dziedzeriem, mūsu pētījuma rezultāti neliecināja par izteiktāku limfocītu infiltrāciju kā atbildes reakciju uz helikobaktēriju klātbūtni. Tomēr, ņemot vērā, ka fundālajos dziedzeros klājšūnu skaitam bija neliela tendence samazināties vietās ar lielāku helikobaktēriju daudzumu, tas varētu liecināt, ka fundālajos dziedzeros esošām helikobaktērijām ir tendence radīt dziedzeru klājšūnu skaita izmaiņas bez izteiktas limfocītu infiltrācijas saistaudos starp dziedzeriem. Šādu fundālo dziedzeru zonas gļotādas reakciju uz helikobaktērijām atzīmējuši arī citi autori (Happonen et al., 1998; Kanou et al., 2005; De Bock et al., 2006).

Limfocītu daudzumu suņu kuņģa gļotādas **pilorisko dziedzeru zonas** saistaudos zem virsmas–bedrīšu epitēlija *Helicobacter spp.* negatīvajos un pozitīvajos paraugos ar dažādu helikobaktēriju daudzumu atspoguļots devītajā attēlā.



9. att. Redzes lauki (%) ar dažādu limfocītu daudzumu pilorisko dziedzeru zonas gļotādas „augšējās daļas” saistaudos

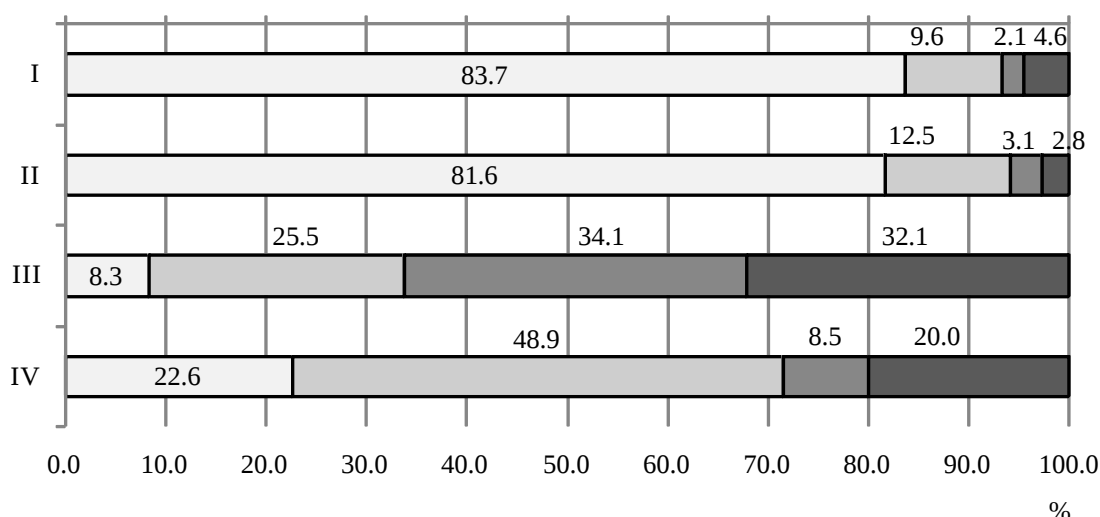
Fig. 9. Visual fields (%) with different amount of lymphocytes in connective tissue of the „upper part” of the pyloric gland region

□ Nav limfocītu □ Maz limfocītu □ Vidēji daudz limfocītu □ Daudz limfocītu
 Absent Mild Moderate Severe

- I** – vietās bez helikobaktērijām/*no helicobacteria*;
II – vietās ar maz (1-10) helikobaktērijām/*mild amount of helicobacteria*;
III – vietās ar vidēji daudz (10-50) helikobaktērijām/*moderate amount of helicobacteria*;
IV – vietās ar ļoti daudz (> 50) helikobaktērijām/*severe amount of helicobacteria*.

Redzam, ka limfocītu daudzums pilorisko dziedzeru zonas gļotādas saistaudos „augšējā daļā” vietās bez helikobaktērijām bija izteikti mazāks, salīdzinot ar gļotādas vietām, kur helikobaktēriju bija maz, vidēji daudz un ļoti daudz. Izrādījās, ka palielinoties helikobaktēriju daudzumam pilorisko dziedzeru zonas gļotādā, palielinājās arī limfocītu infiltrācija no maz līdz vidēji daudz un pat daudz limfocītu. Pilorisko dziedzeru zonas gļotādas augšējās daļas saistaudos mikroskopa redzes lauki, kuros nebija limfocīti, visvairāk konstatēti paraugos bez helikobaktērijām – 82.5% gadījumos. Savukārt gļotādas vietās ar mazu, vidēji lielu un ļoti lielu helikobaktēriju daudzumu, redzes lauki bez limfocītiem bija būtiski mazāk – attiecīgi 54.2% gadījumos ar maz helikobaktērijām – 16.2% gadījumos ar vidēji daudz helikobaktērijām un 21.9% gadījumos ar ļoti daudz helikobaktērijām ($p < 0.05$).

Kas attiecas uz limfocītu daudzumu pilorisko dziedzeru zonas gļotādas dziļākajā daļā – saistaudos starp piloriskajiem dziedzeriem gļotādas vietās bez helikobaktērijām un vietās ar maz, vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām, tas atspoguļots 10. attēlā.



10. att. Redzes lauki (%) ar dažādu limfocītu daudzumu pilorisko dziedzeru zonas gļotādas saistaudos starp dziedzeriem

Fig. 10. Visual fields (%) with different amount of lymphocytes in connective tissue of the „upper part” of the pyloric gland region

□ Nav limfocītu □ Maz limfocītu □ Vidēji daudz limfocītu □ Daudz limfocītu
 Absent Mild Moderate Severe

- I** – vietās bez helikobaktērijām/*no helicobacteria*;
II – vietās ar maz (1-10) helikobaktērijām/*mild amount of helicobacteria*;
III – vietās ar vidēji daudz (10-50) helikobaktērijām/*moderate amount of helicobacteria*;
IV – vietās ar ļoti daudz (> 50) helikobaktērijām/*severe amount of helicobacteria*.

Redzam, ka pilorisko dziedzeru zonas gļotādas dziļākajā daļā saistaudos starp piloriskajiem dziedzeriem vietās bez helikobaktērijām, kā arī vietās, kur helikobaktēriju bija maz, limfocītu daudzums bija būtiski mazāks nekā tas bija gļotādā ar vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām. Pilorisko dziedzeru zonas gļotādas dziļākās daļas saistaudos starp dziedzeriem vietās bez helikobaktērijām un vietās ar mazu helikobaktēriju daudzumu pārsvarā – attiecīgi 83.7% un 81.6% gadījumos limfocīti netika konstatēti. Savukārt gļotādas paraugos ar vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām limfocītus nekonstatēja tikai attiecīgi 8.3% un 22.6% gadījumos.

Tātad pilorisko dziedzeru zonas gļotādā mēs konstatējām zināmu likumsakarību – palielinoties helikobaktēriju daudzumam, gļotādā izteikti palielinās limfocītu infiltrācija saistaudos zem virsmas–bedrīšu epitēlija un starp dziedzeriem. Turklāt, palielinoties helikobaktēriju daudzumam piloriskajos dziedzeros līdz vidēji daudz un ļoti daudz, samazinājās dziedzeru mukoīdo epiteliocītu skaits. Tātad, jo vairāk helikobaktēriju, jo izteiktāks pilorisko dziedzeru šūnu zudums ar palielinātu limfocītu infiltrāciju. Daudzi autori akcentējuši, ka vairākas helikobaktēriju sugas, piemēram, *Helicobacter heilmannii* suņiem, līdzīgi kā *Helicobacter pylori* cilvēkiem, galvenokārt lokalizējas kuņģa pilorisko dziedzeru zonā gan pie virsmas–bedrīšu epitēlija, gan dziļāk dziedzeros un rada tur tādas morfoloģiskas pārmaiņas kā gļotādas dziedzerēpitēlijšūnu deģenerāciju, dziedzeru atrofiju un iekaisuma šūnu infiltrāciju (Hermanns et al., 1995; Happonen et al., 1998; Peterson et al., 2001; Sapierzynski et al., 2003; Haesebrouck et al., 2009).

Analizējot limfocītu daudzuma atšķirības *Helicobacter spp.* pozitīvajos un negatīvajos suņu kuņģa gļotādas paraugos, jautājums radās par intraepiteliālo limfocītu un par plazmocītu daudzuma izmaiņām saistībā ar helikobaktērijām kuņģa gļotādā. Intraepiteliālo limfocītu un plazmocītu skaits suņu kuņģa gļotādas paraugos ar atšķirīgu helikobaktēriju daudzumu parādīts otrajā tabulā.

2. tabula/ Table 2

Intraepiteliālo limfocītu un plazmocītu skaits kuņģa gļotādā ar dažādu helikobaktēriju daudzumu

Number of the intraepithelial lymphocytes and plasmocytes of the gastric mucosa with different amount of helicobacteria

Kuņģa gļotādas dziedzeru zona/ <i>Gastric gland region</i>	Helikobaktēriju daudzums/ <i>amount of helicobacteria</i>	Intraepiteliālo limfocītu vidējais skaits redzes laukā ± standartnovirze/ <i>average number of lymphocytes in visual field ± SD</i>	Plazmocītu vidējais skaits redzes laukā ± standar/ <i>average number of plasmocytes in visual field ± SD</i>
Kardiālo dziedzeru zona/ <i>Cardiac gland region</i>	Nav/ <i>absent</i>	13 ± 8	8 ± 6
	Maz/ <i>mild</i>	12 ± 9	7 ± 5
	Vidēji daudz/ <i>moderate</i>	14 ± 6	9 ± 5
	Ļoti daudz/ <i>severe</i>	14 ± 9	10 ± 5
Fundālo dziedzeru zona/ <i>Fundic gland region</i>	Nav/ <i>absent</i>	14 ± 7	8 ± 5
	Maz/ <i>mild</i>	12 ± 9	6 ± 5
	Vidēji daudz/ <i>moderate</i>	14 ± 6	6 ± 7
	Ļoti daudz/ <i>severe</i>	15 ± 9	8 ± 5
Pīlorisko dziedzeru zona/ <i>Pyloric gland region</i>	Nav/ <i>absent</i>	8 ± 6	8 ± 5
	Maz/ <i>mild</i>	17 ± 7*	7 ± 2*
	Vidēji daudz/ <i>moderate</i>	23 ± 7*	9 ± 4*
	Ļoti daudz/ <i>severe</i>	27 ± 5*	17 ± 5*

*- atšķirība ir būtiska ($p < 0.05$), salīdzinot ar rezultātiem vietās bez helikobaktērijām/
changes are statistically significant ($p < 0.05$) compare to helicobacteria absent places.

Kardiālo dziedzeru zonā gan intraepiteliālo limfocītu, gan plazmocītu skaitam bija tendence nedaudz palielināties pie lielāka helicobaktēriju daudzuma gļotādā, tomēr šī palielināšanās nebija statistiski būtiska ($p > 0.05$).

Fundālo dziedzeru zonā intraepiteliālo limfocītu un plazmocītu skaits arī būtiski neatšķīrās paraugos ar helicobaktērijām un gļotādas paraugos bez tām ($p > 0.05$).

Izteiktākas atšķirības intraepiteliālo limfocītu un plazmocītu daudzumā gļotādā ar dažādu helicobaktēriju daudzumu konstatējām kuņģa pilorisko dziedzeru zonā (sk. 2. tabulu): gļotādā bez helicobaktērijām bija 8 ± 6 intraepiteliālo limfocītu un 8 ± 5 plazmocītu vienā mikroskopa redzes laukā, bet paraugos ar mazu, vidēji lielu un ļoti lielu helicobaktēriju daudzumu šo šūnu skaits būtiski palielinās ($p < 0.05$). Intraepiteliālo limfocītu skaits gļotādā ar maz, vidēji daudz un ļoti daudz helicobaktērijām attiecīgi palielinājās līdz 17 ± 7 , 23 ± 7 un 27 ± 5 šūnām vienā redzes laukā, bet plazmocītu daudzums paraugos ar maz, vidēji daudz un ļoti daudz helicobaktēriju palielinājās attiecīgi līdz 7 ± 2 , 9 ± 4 un 17 ± 5 šūnām vienā redzes laukā.

Tātad, līdzīgi kā limfocītu daudzums pilorisko dziedzeru zonas gļotādas „augšējās” un „dziļākās daļas” saistaudos arī intraepiteliālo limfocītu skaits un plazmocītu skaits šeit palielinājās līdz ar lielāku helicobaktēriju daudzumu gļotādā. Tas liecina par pilorisko dziedzeru zonas reakciju uz helicobaktēriju klātbūtni.

Kopumā varam secināt, ka pilorisko dziedzeru zonas gļotāda uz helicobaktērijām reaģējusi ar zināmu imunoloģisku atbildes reakciju, kurā iesaistīti limfocīti un plazmocīti. Turklāt lielāks helicobaktēriju daudzums pilorisko dziedzeru zonas gļotādā saistīts ar mukoīdo epiteliocītu skaita palielināšanos virsmas–bedrīšu epitēlijā, kas arī liecina par gļotādas zināmu aizsargreakciju. Savukārt mūsu novērotā pilorisko dziedzeru mukoīdo epiteliocītu skaita samazināšanās helicobaktēriju klātbūtnē var būt saistīta ar dziedzerpitēlijšūnu bojājumiem un palielinātu limfocītu infiltrāciju saistaudos starp dziedzeriem (Happonen et al., 1998; Rossi et al., 1999; Peterson et al., 2001; Sapierzynski et al., 2003; Haesebrouck et al., 2009).

Nobeigumā jāuzsver, ka helicobaktērijas mājas suņiem lokalizējas gan kuņģa kardiālo un fundālo dziedzeru zonā, gan arī pilorisko dziedzeru zonā. Ja kardiālo un fundālo dziedzeru zonā mūsu pētījumā izmantotajiem mājas suņiem helicobaktērijas visumā neizraisīja kādas raksturīgas un būtiskas gļotādas morfoloģiskās izmaiņas, tad kuņģa pilorisko dziedzeru zonā aina bija citāda.

Neskatoties uz to, ka suņu kuņģa pilorisko dziedzeru zonā helicobaktērijas bija izplatītas gandrīz uz pusi mazāk nekā kardiālo un fundālo dziedzeru zonā, to izraisītās gļotādas morfoloģiskās izmaiņas bija būtiskas – gan makroskopiskās, gan mikroskopiskās. Helicobaktēriju izraisītās gļotādas izmaiņas piloriskajā dziedzeru zonā zināmā mērā bija saistītas ar helicobaktēriju daudzumu un lokalizāciju gļotādā. Lielāks helicobaktēriju daudzums pie virsmas–bedrīšu epitēlija un dziļāk gļotādā piloriskajos dziedzeros izraisīja zināmu mukoīdo epiteliocītu proliferāciju un mukoīdā sekrēta pastiprinātu producēšanu, kā arī palielinātu limfocītu un plazmocītu daudzumu gļotādas saistaudos, kas liecina par gļotādas aizsargreakciju.

Jautājums par helicobaktērijām suņiem, to dažādu sugu izplatību dzīvniekiem Latvijā un to saistību ar kuņģa patoloģijām paliek aktuāls un prasa turpmākus pētījumus.

SECINĀJUMI

1. Jenotsuņiem un mājas suņiem kuņģa gļotādas virsmas noburzumu citoloģija ir jutīgāka kuņģa *Helicobacter spp.* noteikšanas metode, salīdzinot ar ureāzes testu un gļotādas histoloģisko izmeklēšanu.
2. Helikobaktēriju izplatība kuņģa kardiālo un fundālo dziedzeru zonā mājas suņiem ir būtiski lielāka nekā tā ir pilorisko dziedzeru zonas gļotādā, bet jenotsuņiem helikobaktēriju izplatība kuņģa dažādajās dziedzeru zonās būtiski neatšķirās.
3. Suņiem kardiālo un fundālo dziedzeru zonā pārsvarā raksturīgs mazs un vidējs helikobaktēriju daudzums, kas lokalizējās galvenokārt pie virsmas–bedrīšu mukoīdā epitēlija, bet pilorisko dziedzeru zonā ievērojams helikobaktēriju daudzums konstatēts arī dziļāk piloriskajos dziedzeros, tāpat kā šajā dziedzeru zonā makroskopiski būtiski vairāk konstatētas kuņģa gļotādas erozijas un polipi.
4. Suņu kuņģa pilorisko dziedzeru zonas gļotādā ar vidēji un ļoti daudz helikobaktērijām virsmas–bedrīšu epitēlijā mukoīdo epiteliocītu skaits un to sekrēcija būtiski palielinās, vienlaicīgi samazinoties mukoīdo epiteliocītu skaitam piloriskajos dziedzeros.
5. Kardiālo un fundālo dziedzeru zonā mukoīdo epiteliocītu skaits paraugos ar dažādu helikobaktēriju daudzumu neatšķirās, tāpat kā klājšūnu skaits fundālajos dziedzeros, bet vietās, kur helikobaktēriju ir vairāk, klājšūnu skaitam ir tendence samazināties.
6. Kuņģa kardiālo un fundālo dziedzeru zonā gļotādas saistaudos zem virsmas epitēlija un starp kuņģa bedrītēm, kā arī saistaudos starp dziedzeriem limfocītu skaitam ir tendence palielināties, pieaugot helikobaktēriju daudzumam.
7. Pilorisko dziedzeru zonā gļotādā ar vidēji daudz un ļoti daudz helikobaktērijām limfocītu daudzums saistaudos ir būtiski lielāks nekā gļotādā bez helikobaktērijām.

IETEIKUMI PRAKSEI

1. Helikobaktēriju noteikšanai veterinārmedicinā iesakāma kuņģa gļotādas biopsiju paraugu histoloģiskā izmeklēšana, jo tā ir pietiekami precīza un ar tās palīdzību var novērtēt arī gļotās morfoloģiskās izmaiņas.
2. Ja nepieciešams novērtēt tikai helikobaktēriju klātbūtni kuņģa gļotādā, piemēram, lai kontrolētu izmantoto medikamentu iedarbību, kā ātru un vienkāršu helikobaktēriju diagnosticēšanas metodi var lietot ureāzes testu.
3. Suņiem ar gremošanas aparāta slimību klīniskām pazīmēm iesakāms noteikt helikobaktēriju klātbūtni un lokalizāciju kuņģa gļotādas biopsiju paraugos, kā arī novērtēt gļotādas morfoloģiskās izmaiņas gļotādas histoloģiskajos preparātos.

ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

Par promocijas darba tēmu:

1. Bērziņa D., Birģele E. (2010) Gastric helicobacters and mucosal histology of the pyloric gland region in domestic dogs. *Proceedings of 28th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists*. Belgrade, Serbia, 8-11 September, p. 136.
2. Bērziņa D., Birģele E. (2009) Helicobacters and morphological changes in the gastric mucosa of domestic dogs (*Canis familiaris*). *Proceedings of 15th International Scientific conference "Research for rural development 2009"*. Jelgava, 20-22 May, pp. 174-179.
3. Bērziņa D., Birģele E. (2008) Helikobaktērijas mājas suņu (*Canis familiaris*) kuņģu gļotādā. *LLU VMF Starptautiskās Zinātniskās konferences "Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna" raksti*. Jelgava, 2008. gada 14. novembris, 18.-23. lpp.
4. Bērziņa D., Birģele E. (2008) Location of helicobacters in the gastric mucosa of domestic dogs (*Canis familiaris*). *Proceedings of 14th International Scientific conference "Research for rural development 2008"*. Jelgava, 21-23 May, pp. 278-285.
5. Bērziņa D., Birģele E. (2008) Detection of gastric helicobacter-like microorganisms in feral raccoon dogs (*Nyctereutes Procyonoides*) and domestic dogs (*Canis Familiaris*). *LLU Raksti*. Jelgava, 21 (315), 79.-85. lpp.
6. Bērziņa D., Birģele E. (2006) Kuņģa *Helicobacter spp.* izplatība jenotsuņiem Korejas Republikas Čonbukas Provincē. *LLU VMF Starptautiskās Zinātniskās konferences "Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna" raksti*. Jelgava, 2006. gada 10. novembris, 36.-42. lpp.
7. Park H.J., Bērziņa D., Lim Ch.W. (2005) Detection of gastric helicobacter organisms in feral raccoons (*Nyctereutes Procyonoides*). *Proceedings of The 2nd Asian Society of Veterinary Pathology Symposium (Vol.2) & 2005 Annular Meeting of The Korean Society of Veterinary Pathology (Vol.9)*. Seoul, South Korea, 3-4 November, p. 85.

Citas:

1. Bērziņa D., Muhammad Z., Chekarova I., Park H.J., Yoon H.S., Lee S.Y., Oh M.H., Kim B.S., Lim Ch.W. (2006) Accidental case of large colon impaction in a horse. *Korean Journal of Veterinary Service*, 29(1), pp. 79-82.
2. Ejaz S., Chekarova I., Yoon H.S., Lee S.Y., Oh M.H., Bērziņa D., Kwon H.N., Kim B.S., Lim Ch.W. (2005) Comparative efficacy of anticoccidial drugs in coccidiosis of broiler chicks. *Korean Journal of Veterinary Service*, 28(4), pp. 367-373.
3. Muhammad Z., Ejaz S., Lee J.Y., Bērziņa D., Park H.J., Lim Ch.W. (2005) Pulmonary acariasis caused by *Sternostoma Tracheacolum* in caged canary. *Proceedings of The 2nd Asian Society of Veterinary Pathology Symposium (Vol.2) & 2005 Annular Meeting of The Korean Society of Veterinary Pathology (Vol.9)*. Seoul, South Korea, 3-4 November, p.83.

INTRODUCTION

Topicality of the research

Helicobacteria are present in both human and animal gastrointestinal tract. Many of them are considered pathogenic what can induce different pathologies of the stomach, intestines and liver, the most common are gastric ulcer, gastroenteritis, hepatitis and even tumors. However other *Helicobacter spp.* bacteria are considered as normal microflora of the intestines (Otto et al., 1994; Eaton et al., 1996).

Since *Helicobacter pylori* was isolated for the first time in 1984 from humans who have been suffering from gastric ulcer and gastritis (Marshall, Warren, 1984), question about human and animal helicobacteria is still actual, it has been widely researched, especially because it has been proved that helicobacteria are related with different pathologies of the digestive apparatus. Furthermore it has to be taken into consideration that helicobacteria are widely spread and that people could potentially get infected from animals, int.al. from their pets.

It has been proved that helicobacteria in the stomach of dogs are present very often. Literature data about role of helicobacteria in the genesis of animal gastric pathologies is quite contradictory. Some authors consider that such gastric mucosal pathological changes as gastritis, erosions or ulcers are not related with presence of helicobacteria in the mucosa of stomach (Happonen et al., 1998; Hwang et al., 2002), however others observed marked infiltration of the neutrophils, lymphocytes and plasmocytes in the gastric mucosa as well as other changes in the gastric mucosa if there are helicobacteria (Eaton et al., 1996; Yamasaki et al., 1998).

Various diagnostic methods are used to detect helicobacteria in the digestive tract. Invasive methods are urease test, brush cytology, histological examination, electronmicroscopy, cultivation of helicobacteria on the special culture medium, DNA isolation from the gastric samples and further their detection with the polymerase chain reaction (PCR). Noninvasive methods are serology, urease breath test and detection of the *Helicobacteria pylori* antigen in the fecal samples (Happonen et al., 1996; Neiger, Simpson, 2000; Granstrom et al., 2008). It is important to determine which of the diagnostic methods are most sensitive and useful for detection of the *Helicobacter spp.* bacteria in dogs and which would be recommended in veterinary practice.

There are many investigations about prevalence of helicobacteria in the gastric mucosa of dogs, their amount in the different gastric gland regions and influence of the helicobacteria to glandular epithelium of gastric mucosa. In Latvia such research has not been done yet. However in the veterinary medicine question about helicobacteria effect on the morphofunctional changes in the dog gastric mucosa is actual.

Therefore **the aim of the research** was to investigate helicobacteria in the gastric mucosa of racoon dogs and domestic dogs and to establish morphological status of gastric mucosa related to the helicobacteria.

Objectives of the research

1. Detect helicobacteria in the cardiac, fundic and pyloric gland region of gastric mucosa with different diagnostic methods and compare their sensitivity and advantages in the veterinary practice.
2. Evaluate macroscopic changes in the different gland regions of gastric mucosa in the helicobacteria positive and negative samples.
3. Find out amount of helicobacteria in the superficial epithelium, gastric pits and gastric glands of gastric mucosa.
4. Evaluate amount of mucoid epitheliocytes, parietal cells, lymphocytes and plasmocytes of the gastric mucosa related to the location and amount of the helicobacteria in the gastric mucosa.

Scientific novelty of the research

1. For the first time in Latvia helicobacteria are investigated in the gastric mucosa of the domestic dogs related with morphological status of the gastric mucosa.
2. There are obtained new data about location of helicobacteria and their amount in the cardiac, fundic and pyloric gland region of the gastric mucosa of domestic dogs and effect of helicobacteria on the morphological changes of mucosa.

Approbation of the results of research

Research results were approved at the following international scientific conferences:

1. 28th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists. Serbia, Belgrade, 8-11 September 2010. *Gastric helicobacters and mucosal histology of the pyloric gland region in domestic dogs.*
2. 15th International Scientific conference "Research for rural development". Latvia, Jelgava, 20-22 May 2009. *Helicobacters and morphological changes in the gastric mucosa of domestic dogs.*
3. LUA FVM International Scientific conference "Animals. Health. Food hygiene". Latvia, Jelgava, 14 November 2008. *Helicobacteria in the gastric mucosa of domestic dogs (Canis familiaris).*
4. 14th International Scientific conference "Research for rural development". Latvia, Jelgava, Jelgava, 21-23 May 2008. *Location of helicobacters in the gastric mucosa of domestic dogs (Canis familiaris).*
5. LUA FVM International Scientific conference "Animals. Health. Food hygiene". Latvia, Jelgava, 10 November 2006. *Prevalence of gastric Helicobacter spp. in the feral raccoon dogs in Republic of Korea, Chonbuk province.*
6. The 2nd Asian Society of Veterinary Pathology Symposium & 2005 Annual Meeting of the Korean Society of Veterinary Pathology. South Korea, Seoul, 3-4 November 2005. *Detection of gastric Helicobacter organisms in feral raccoons (Nyctereutes Procyonoides).*

Volume of the work: the doctoral thesis consists of: 137 pages, annotation, an introduction, review of literature, methodology, research results, discussion, conclusions, recommendations for practice, literature references and supplement.

MATERIALS AND METHODS

The doctoral thesis was carried out in two stages. The first stage was completed at the Pathology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, South Korea from September 2005 to June 2006, but the second stage – at the Preclinical institute of the Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Agriculture from September 2006 to December 2009.

Research scheme

In the first stage of research at the Faculty of Veterinary Medicine at the Chonbuk National University in Chonbuk Province in South Korea the research material was taken from eight raccoon dogs of different age and sex. The cause of death of these animals was mainly trauma.

Mucosal samples in all cases were taken strictly from different parts of the stomach: four from the cardiac gland region, eight from the fundic gland region, five from pyloric gland region as well as one sample from the esophagus at entrance into the stomach and one sample from the duodenum at the pyloric sphincter. Thus in the first part of research there were obtained 19 samples from each raccoon dog summing up to 152 samples of the analyzed mucosa. The results of the analysis were generally used to compare different diagnostic methods for helicobacteria.

In the second stage of research material was obtained at the Faculty of Veterinary Medicine, at the Latvian University of Agriculture. Samples were collected from 30 domestic dogs of different age and sex right away after euthanasia (with a permission of the owner).

Similar as in the raccoon dogs samples were collected from four strict regions of the stomach: four from the cardiac gland region, eight from the fundic gland region and five from the pyloric gland region (Fig.1).

Thus in the second stage of research 17 samples were taken from each animal, totaling to 510 samples of the mucosa. In domestic dogs samples from the the esophagus at entrance into stomach and from the duodenum at the pyloric sphincter were not taken because the goal of the research was to evaluate the morphological status of only the three gastric regions in both *Helicobacter spp.* positive and negative samples. The results from histology were used to determine the location, amount of bacteria as well as the morphological state of the gastric mucosa.

Firstly, the macromorphological state of all the regions of the stomach was evaluated. Macromorphological changes were formed into four distinct groups: 1) gastric mucosa without macromorphological changes; 2) gastric mucosa with signs of hyperemia; 3) gastric mucosa with erosions that are noticeable macroscopically; 4) gastric mucosa with polyps.

For detection of raccoon dog's gastric mucosal helicobacteria three diagnostic methods were used: urease test, brush cytology and histological examination and the results were compared. Same diagnostic methods were used also for detection of helicobacteria in domestic dogs to compare their sensitivity at the same time also

evaluating the macromorphological and micromorphological state that is count of the muroid epitheliocytes, parietal cells, lymphocytes and plasmocytes.

Urease test

The urease test was always performed no later than 2 hours after the animal's death. To perform this test the mucosa samples were taken by using scissors, samples were then put into special containers to which 1ml of 10% distilled urea solution containing a fenolred indicator were added (pH 6.3) with a microdropper. If there was a change in color from yellow to red the sample was considered *Helicobacter spp.* positive.

Brush cytology of gastric mucosa

Brush cytology of gastric mucosa was taken with sterile cotton tips by simply swabbing the surface of the mucosa. The obtained substance was smeared onto a glass slide, fixated, and then stained using a so called *Diff-Quik* staining method. The sample was then viewed under a microscope at 1000x magnification in oil immersion.

Histological examination

For the histological examination collected samples were primed for analysis using the classical preparation methods (Pearse, 1960; Carson, 1997). In the first stage of research for dehydration and embedding of the raccoon dogs gastric mucosal samples there was used autoprocessor *Shandon* (USA) *Citadel 69810040 tissue*. In the second stage of research gastric mucosal samples of domestic dogs were prepared by autoprocessor *Tissue-Tek II* (NL). Then for sectioning paraffin blocks into 4 µm slides there was used microtome *SLEE Mainz Cut*. The *Diff-Quik* staining method was used to detect helicobacteria, but for evaluation of the morphological state of the gastric mucosa staining was done with hematoxylin and eosine (H&E). Then histological samples were viewed under different magnification using an optical microscope (*Leica DM5000B*).

In each histological sample 10 visual fields were evaluated for helicobacteria location – their amount in the surface epithelium, in gastric pits as well as deeper into the mucosa at glandulocytes (Hermanns et al., 1995; Happonen et al., 1996; Vorobjova et al., 2005). In each mucosal histological sample of the gastric cardiac, fundic and pyloric gland region amount of helicobacteria were formed into four groups (Happonen et al., 1998; Neiger et al., 1998):

- no helicobacteria in a visual field– absent;
- 1-10 helicobacteria in one visual field – mild;
- 10-50 helicobacteria in one visual field – modetare;
- more then 50 helicobacteria in one microscope visual field – severe.

To evaluate the morphological state of the surface and inner gastric mucosa the amount of muroid epitheliocytes, parietal cells, lymphocytes and plasmocytes were assessed in one microscope visual field, that is 215000 µm² (0.215 mm²). Overall in one sample there were summing up to 10 microscope visual fiels of the “surface part” of the mucosa – gastric superficial–pit epithelium as well as in the inner glandular epithelium. Hence in domestic dogs there were analysed 120 samples of the gastric cardiac gland region and their 1200 microscope visual fields, 240 samples of the fundic region and

their 2400 microscope visual fields and 150 samples of the pyloric gland region and their 1500 microscope visual fields.

The depth of the gastric mucosa as well as the size of the visual fields was determined using a measuring-analytic programme *Image-Pro Plus*. The depth of the mucosa was measured only in slides, in which the gastric mucosa was complete that is from surface epithelium to *lamina muscularis mucosae*.

The amount of mucoid epitheliocytes was analysed by calculating an average number $\pm$ standard deviation of these cells in gastric pits that is in the “surface part” until 550 μm in depth in the mucosa of the cardiac and the pyloric region as well as in the glandular epithelium until 1000 μm in depth. Parietal cell quantity was also determined by calculating an average number $\pm$ standard deviation of these cells in the “surface part” of the cardiac and fundic region until 450 μm in depth in the mucosa and deeper in the glandular part until 850 μm in depth (Shao et al., 2000; Fukui et al., 2003; Takehara et al., 2007).

Plasmacyte and intraepithelial lymphocyte quantity was evaluated by calculating the average number of cells $\pm$ standard deviation in one visual field. According to literature data (Neiger et al., 1998; Ferrero et al., 2008), lymphocyte count in one microscope visual field in the “surface part” of the gastric mucosa and in between glandulocytes the following groups were developed:

- no lymphocytes – absent;
- 1-15 lymphocytes in one visual field – mild;
- 15-50 lymphocytes in one visual field – moderate;
- more than 50 lymphocytes in one visual field – severe.

Statistical processing of data

Cochran's Q test which is usually applied for comparing various sample groups and the processing of dichotomic scale data was used to compare the results of various methods that were utilised for detection of helicobacteria. The result of research is a quantitative indication which can be identified as – the tested mucosa (sample) is *Helicobacter spp.* positive or *Helicobacter spp.* negative, and that is why this can be connected to the dichotomic scale (Arhipova, Bălița, 2003).

The spread of helicobacteria in the different parts of the gastric mucosa: cardiac, fundic and pyloric gland region was analyzed by applying the χ^2 criteria as a statistic independency test to compare the different sample groups. It is shown that the χ^2 criteria as an independency test can be utilised to determine the significance of effect of a factor's quantitative changes (Arhipova, Bălița, 2003). In this case the factor is a specific glandular region of the gastric mucosa and the quantitative indicator is – if helicobacteria is present (positive) or not (negative). The results of the test made it possible to say if there is a relation between a certain glandular region and the amount of helicobacteria in it. Following it also allowed comparing and contrasting between positive and negative samples and linking those with the macroscopic changes in the gastric mucosa (Arhipova, Bălița, 2003).

The *Mann-Whitney U test* was used for the analysis of two non connected sample group comparisons as also for the ordinal scale data formation that is for the analysis of location and amount of helicobacteria in the different regions of the stomach

(cardiac, fundic and pyloric gland regions) and the connection with the morphological changes in the gastric mucosa that are seen in histological samples (Paura, Arhipova, 2002).

The mucoid epitheliocyte and parietal cell quantity in the mucosa was analyzed using Student t-test for the comparison of 2 sample groups (Paura, Arhipova, 2002). Depending on the number of lymphocytes in one visual field to compare the two different sample groups (similarly as for the evaluation of the number of helicobacteria) the *Mann-Whitney U test* was used.

The mathematical analysis of data and the formation of diagrams were produced using MS Excel and SPSS 11.5 program (Arhipova, Bălița, 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

In this research the first and foremost was to detect helicobacteria in the gastric mucosa of raccoon and domestic dogs using different diagnostic methods to compare their sensitivity and to determine which of these methods is most precise and convenient. Urease test, brush cytology and histological examination was applied in both the first stage with raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and the second stage of research with domestic dogs (*Canis familiaris*) to identify helicobacteria.

Helicobacteria in the gastric mucosa of raccoon dogs detected by different diagnostic methods

In raccoon dogs helicobacteria were present in the gastric mucosal samples, mucosal samples of the esophagus and duodenum. All in all the most sensitive and precise method for detection of helicobacteria was brush cytology with the help of which the *Helicobacter spp.* positive results were in 96.7% of all mucosal samples from the esophagus, stomach and the duodenum. When tested histologically helicobacteria was identified in 82.9% of samples, but the urease test after 60 minutes showed positive only as 73.0% of samples. In conclusion surface brush cytology is best suited for identification of helicobacteria, it's easy to do, it is cheap, and this method does not need any special equipment. Another benefit of this type of testing is that helicobacteria can be identified even when they are only few. Other authors have also stated that surface brush cytology is the most versatile method (Happonen et al., 1996; Libera et al., 1996, Leib, Duncan, 2005). It has to be taken in consideration when using this method those samples must be collected using sterile cotton tips to avoid any contamination and falsely positive results.

As for histological examination for helicobacteria it proved to be sensitive enough as well as it provides the knowledge of exact location of helicobacteria in the gastric mucosa. If stained with haematoxylin and eosin helicobacteria can be missed while examining a sample, so if there are few helicobacteria its best to use the *Diff-Quik* staining method as suggested by many authors (Potvin, 1994; Happonen et al., 1996; Megroud, 1996a; El-Zimaity et al., 1998).

Over the course of research the urease test proved to be a fast and easy method to identify helicobacteria. But the downside of this test is that it can produce false results if helicobacteria are in small concentration or if there are pathologies in the mucosa (Happonen et al., 1998; Granstrom et al., 2008). That is why as the other

authors (Happonen et al., 1998; Leib, Duncan, 2005) we suggest to take many samples of the gastric mucosa because helicobacteria does not spread evenly to prevent falsely negative results for *Helicobacter spp.* It also has to be taken into consideration that in order to exclude falsely positive urease test results samples have to be collected right after animals death when other urease enzyme forming bacteria in the mucosa has not developed for instance *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and other (Laine et al., 1996; Happonen et al., 1998; Leib, Duncan, 2005).

The results and quantity of urease positive *Helicobacter spp* samples after different exposure time are displayed in Table 1.

After looking at Table 1 it is clear that urease test results for *Helicobacter spp.* correlate with exposure time which in our case was from 10 to 60 minutes. The urease test after 10 minutes was positive in only 32.2% of cases, after 30 minutes in 60.5% of cases, but after 60 minutes percentage inclined to 70.3% of positive cases. So it is suggested that results are drawn no earlier then 60 minutes after exposure. The rapidness with which the test reacts depends on the quantity of helicobacteria in the gastric mucosa. If there is very few helicobacteria the result is going to take longer to process (Hazell et al., 1987).

According to the results of brush cytology the most precise method in raccoon dogs helicobacteria were spread similarly in all samples from the mucosa of the esophagus, the stomach and the duodenum. In the gastric mucosa helicobacteria were in 100.0% of cases in the cardiac gland region, 98.4% of cases in the fundic gland region and 92.5% of cases in the pyloric gland region, as well as 87.5% of cases in the esophagus and 75.0% of cases in the duodenum. Similar results were performed with helicobacteria detection by histological examination, only helicobacteria positive results decreased a little in the pyloric gland region – 75.5% of cases. However usease test *Helicobacter spp.* positive results decreased almost half (40% of cases) even when exposure time was 60 minutes in comparison with brush cytology and histological examination. The urease test in this case was not sensitive enough. As already mentioned the urease test can come up as negative if the concentration of helicobacteria in a sample is in low concentration (Happonen et al., 1998; Granstrom et al., 2008).

Helicobacteria in the gastric mucosa of domestic dogs detected by different diagnostic methods

Similarly as in raccoon dog's research that has been done with the samples that were obtained from domestic dogs allowed concluding that the most suitable diagnostic method for identification of helicobacteria is brush cytology. When stained with *Diff Quik* method in the stained mucoid secretion it was easy to see blue spiral shaped bacteria. Using brush cytology for testing of the gastric mucosa, results were *Helicobacter spp.* positive 82.7% of cases. Going on results after histology were 81.4% positive ($p<0.05$), and 80.8% positive after the urease test.

The urease test was done in the same manner as in the first stage with the gastric mucosa samples from raccoon dogs. For domestic dog's exposition time of 10, 30 or 60 minutes played a role when it came to reading the results the longer was the exposition time the higher the percentage. After 60 minutes of exposure the highest percentage of *Helicobacter spp.* positive samples were in the fundic gland region of the stomach. Helicobacteria were detected in 95.8% of cases that is in 230 out of 240 examined samples. In the cardiac gland region the result for *Helicobacter spp.* positive samples

after 60 minutes of exposure was 85.0% of cases that is in 102 out of 120 samples, but in the pyloric region only – 53.3% of cases, 80 out of 150 analyzed samples.

Moving on the results of the urease test have turned out to be very similar to those of surface brush cytology when diagnosing helicobacteria in domestic dogs that is why it is very sufficient to use the urease test for diagnosis for domestic dogs, it is fast and easy, as also the results are adequate.

After analyzing helicobacteria in the mucosa of the different gastric gland regions of the stomach a conclusion can be drawn that the concentration and spread of helicobacteria in the gastric mucosa in domestic dogs differ from results that were obtained after analyzing the samples from raccoon dogs. In this research the results of all utilized methods confirm that in domestic dogs helicobacteria is present in all regions of the gastric mucosa: cardiac, fundic, and the pyloric, although in this region the amount of these bacteria was half of the amount. Figure 2 illustrates the amount of *Helicobacter spp.* positive samples (%) in the different gland regions of dogs' gastric mucosa detected by brush cytology.

Results were as follows: in the cardiac gland region *Helicobacter spp.* was positive in 89.2% of samples, in the fundic region – 96.6%, and in the pyloric gland region – only in 55.3% of samples. That is similar to the information of different researchers who have concluded that in domestic dogs there is twice as more helicobacteria present in the fundic gland region of the stomach then in the pyloric (Diker et al., 2002).

It has to be considered that even though histological examination is an expensive and more complex method of examination then surface brush cytology and the urease test, it is a very significant method because it provides with the information of helicobacteria presence as well as paints a precise picture about the morphological state of the gastric mucosa in the obtained samples.

Helicobacteria and macroscopic changes of domestic dog's gastric mucosa

Because helicobacteria in the gastric mucosa can be a part of normal microflora, and not a vector for the formation of gastric pathologies, one of the goals of research was to evaluate the morphological state of the gastric mucosa when helicobacteria are present, as well as the location of helicobacteria. In the beginning the macroscopic state of the cardiac, fundic and the pyloric gland region were examined. Further on there were samples in which the mucosa was normal (no changes), hyperemated, with erosions and with polyps.

After analyzing the macroscopic state of the different regions of the gastric mucosa it became clear that in the **cardiac gland region** no matter whether it was positive for *Helicobacter spp.* or negative, there usually would be no changes in the mucosa. The gastric mucosa was hyperemated only 10.4% of all *Helicobacter spp.* positive samples and 14.3% of all *Helicobacter spp.* negative samples, but erosions of the mucosa was present only 3.8% of the cases only in *Helicobacter spp.* positive samples. There were no polyps present in the cardiac gland region.

According to the obtained data on the macroscopic state of the gastric mucosa of the cardiac gland region it can be concluded that hyperemia and mucosal erosions are not caused by helicobacteria, because in both helicobacteria positive and negative

samples, the macroscopic changes occurred with even frequency. However erosions of the gastric mucosa in the cardiac gland region were present in 3.8% of the cases only in *Helicobacter spp.* positive samples, so potentially helicobacteria could have been the cause of erosions.

As far as the **fundic gland region** and its macroscopic state the results are similar to those of the cardiac gland region, the morphology is similar for both helicobacteria positive and negative samples. The gastric mucosa was without any changes in 65.7% of cases in samples that were helicobacteria positive and 70.0% of cases in helicobacteria negative samples. But the number of pathological samples was higher then in the cardiac gland region. The hyperemia of the gastric mucosa was registered in both positive and negative samples 20.0% of cases, but erosions accordingly 11.3% and 10.0% of cases. In addition out of 230 *Helicobacter spp.* positive samples in seven samples that is in 3.0% of cases there were polyps, but in *Helicobacter spp.* negative samples there were no polyps. The reason for the increased number of pathologies in the fundic gland region in comparison with the cardiac gland region is connected with the specific functions of the fundic gland region – the production of hydrochloric acid (HCl) and protease synthesis which if there is a malfunction of a defence mechanism of the gastric mucosa can become an aggressive factor and cause hyperemia, erosions and other defects (Hermanns et al., 1995; Eaton et al., 1996; Happonen et al., 1998; Yamasaki et al., 1998; Shirin et al., 2008).

According to the obtained information on the macroscopic state of the gastric mucosa of the fundic gland region in domestic dogs it can be concluded that *Helicobacter spp.* has no direct relation with the pathologies that occur in this region of the mucosa.

After analyzing the macroscopical state of the **pyloric gland region** in samples taken from domestic dogs it appeared that the macroscopic changes were more prevalent in *Helicobacter spp.* positive samples. The gastric mucosa was in normal state only in 32 out of 79 *Helicobacter spp.* positive samples that is in 40.5% of cases, but 70.4% of cases in helicobacteria negative samples, that means that out of 71 examined samples 50 did not have any macroscopical changes. Figure 3 displays a macroscopic status of the pyloric gland region in the *Helicobacter spp.* positive and negative samples.

The conclusion is that in the pyloric gland region of the gastric mucosa *Helicobacter spp.* positive samples pathologies such as erosions – 20.3% of cases and polyps – 29.1% of cases are more prevalent. Mucosal erosions in *Helicobacter spp.* negative samples were present only 9.8% of cases and polyps – 8.5% of cases. Hyperemia was present fairly evenly in both *Helicobacter spp.* positive and negative samples. Taking into account this research it is fair to say that the formation of erosions and polyps can be influenced and caused by helicobacteria. Firstly because the pathological changes were present mostly only in *Helicobacter spp.* positive samples. Secondly this is backed up by an experiment in which beagles were infected with *Helicobacter pylori* and there were mucosal erosions of the pyloric gland region of these dogs (Ross et al., 1999). More research is needed to explain the formation of polyps in the gastric mucosa.

Location and amount of helicobacteria in the gastric mucosa of domestic dogs

The location of helicobacteria was determined in the cardiac, fundic and the pyloric gland region of the stomach in superficial epithelium, gastric pits and deeper into mucosa in gastric glands. Depending on the amount of helicobacteria in one microscope visual field four groups were formed: absent, mild, several, severe.

In the **cardiac gland region** of the mucosa gastric pits were examined until 170 μm in depth, glandular epithelium – until 350 μm deep into the mucosa. In the cardiac gland region helicobacteria was in mild amounts 64.7% and 65.5% of cases, that is the quantity of helicobacteria in one visual field did not exceed 10 bacterias in the gastric pits and the glandular epithelium. But in some cases amounts of helicobacteria would reach moderate and even severe amount.

Deeper in the cardiac glands helicobacteria was mainly absent, that is 82.7% of cases there were no bacteria present. There were very few samples in which helicobacteria quantity reached moderate and severe amount. According to the obtained results helicobacteria is not very prevalent in the cardiac gland region, and its location is mainly concentrated in the superficial epithelium and in the gastric pits and is rarely present deep in the glandular epithelium and in cardiac glands. The fact that helicobacteria in the cardiac gland region is present mostly in gastric pits and the superficial epithelium was also described by other authors (Geyer et al., 1993; Yamasaki et al., 1998; Hwang et al., 2002).

In the **fundic gland region** similarly as in the mucosal samples of the cardiac gland region the presence and amount of helicobacteria was evaluated in gastric pits until 170 μm in depth and until 350 μm deep into the fundic glandular epithelium. In the fundic region the location of helicobacteria was concentrated in the superficial epithelium and in gastric pits, but the amount of *Helicobacter spp.* was greater than in the cardiac gland region of the gastric mucosa. In the fundic region in 69.0% of cases helicobacteria were 10-50 in one visual field (moderate) in the superficial epithelium and 77.5% of cases – in gastric pits. Deeper in fundic glands 80.0% of cases helicobacteria were absent, and 20% of cases in different amounts that is mild, moderate and severe.

So in samples from the fundic gland region that were taken from domestic dogs 69.0-77.5% of cases helicobacteria were in moderate amount (10-50 helicobacteria in one visual field), localized mainly in the superficial epithelium and in gastric pits and around 20% of cases in different amount deeper into the fundic glands. It is known that pathogenic helicobacteria species can infect even the parietal cell intracellular canals causing cell damage and inflammation of the gastric mucosa (Geyer et al., 1993; Happonen et al., 1998; Yamasaki et al., 1998; Diker et al., 2002; Hwang et al., 2002; Joo et al., 2007; Robic et al., 2007).

As far as the **pyloric gland region** of the gastric mucosa helicobacteria was found deeper in the mucosa unlike in the cardiac and fundic gland region – in gastric pits helicobacteria was present until 350 μm deep and in the glandular epithelium even until 760 μm in depth. Figure 4 displays the amount of helicobacteria in different parts of the pyloric gland region.

In this research out of all samples of the pyloric gland region of the gastric mucosa that were taken from domestic dogs in almost 50% of cases helicobacteria was

absent. As far as the location of helicobacteria in the pyloric gland region it tends to proliferate mostly deeper in the mucosa, that is in the pyloric glands unlike in cardiac and fundic gland region where helicobacteria was mostly found in the superficial epithelium and in gastric pits. In the pyloric glands helicobacteria was in mild, moderate and severe amount, that is in 13.6%, 20.7% and 18.0% of cases.

In the pyloric glands in the gastric pyloric region as well as in gastric pits of the gastric mucosa in domestic dogs helicobacteria in moderate and severe quantities was detected more frequently then on the superficial epithelium. That means that in the “deeper” parts of the mucosa in the pyloric gland region in dogs the spread of helicobacteria was more progressive then in the cardiac and fundic gland region.

All things considered in the cardiac and fundic gland regions in the superficial epithelium and gastric pits helicobacteria were present more frequently and in larger amounts then in the same sites in the pyloric gland region. However deeper in the mucosa of the pyloric gland region in the lumen of the pyloric glands helicobacteria were very proliferative.

Number of mucoid epitheliocytes and parietal cells in the gastric musosa of domestic dogs related with the amount of helicobacteria

To answer the question what reaction (if there is one) mucoid epitheliocytes – as the main defence mechanism providers and parietal cells – as a highly specialized hydrochlorid acid producers have on the presence of helicobacteria in the gastric mucosa mucoid epitheliocytes and parietal cells in different gland regions were counted in samples with different amounts of helicobacteria.

It turned out that in the **cardiac gland region** in the superficial-gastric pit epithelium the number of mucoid epitheliocytes was no different in sites where helicobacteria were absent from where it was in mild, moderate and severe quantities (Fig. 5.).

Very similar were quantities of mucoid epitheliocytes and parietal cells in visual fields with and without helicobacteria.

So this research has shown that in the cardiac gland region of the gastric mucosa in domestic dogs no matter the amount of helicobacteria there is no decrease in the number of mucoid epitheliocytes and parietal cells which would indicate a formation of changes. Also in this region of the mucosa helicobacteria does not cause a formation of a defence mechanism as it does in other sites of the mucosa – the proliferation of the superficial-gastric pit epithelium, increased production of mucosal secretion which was noted by other authors (Vorobjova et al., 2005; Haesebrouck et al., 2009).

In the mucosa of the **fundic gland region** similarly as in the cardiac gland region the amount of superficial-gastric pit epitheliocytes is almost the same in sites with different quantities of helicobacteria. Thus in the fundic gland regions of the mucosa with moderate and even severe amounts of helicobacteria in the superficial-gastric pit epithelium helicobacteria practically does not infuse an increase of mucoid epitheliocytes and its secretions.

As far as for the amount of parietal cells in the fundic glands it is determined that the number of helicobacteria does not correlate with the amount of parietal cells (Fig. 6.).

Even though, parietal cells in the fundic glands do have a tendency to decrease in places where helicobacteria are present the differences in quantities of these cells are not significant: in sites without helicobacteria parietal cells in average were 83 ± 9 in one visual field, but in sites with mild, moderate and severe amounts of helicobacteria respectively 79 ± 8 , 78 ± 8 and 76 ± 8 .

To be taken into consideration is that there is a significant decrease in parietal cells in case of an infection in humans with pathogenic helicobacteria for example *Helicobacter pylori* (Joo et al., 2007; Haesebrouck et al., 2009.). The results of this research agree with those of other authors who have concluded that in the fundic gland region helicobacteria does not cause a decrease of parietal cells and hypersecretion of hydrochloric acid (Simpson et al., 1999; Neiger, Simpson, 2000).

In the **pyloric gland region** the reaction of the mucosa to helicobacteria in domestic dogs was different from the reaction in the cardiac and fundic gland region of the mucosa. Numbers of mucoid epitheliocytes in the superficial-gastric pit epithelium in the pyloric region of dog stomach is displayed in figure 7.

It is determined that the superficial-gastric pit mucoid epitheliocyte quantity significantly increases in sites where helicobacteria are at a moderate, and severe level. In samples in which helicobacteria was absent the average number of mucoid epitheliocytes was 190 ± 21 cells in one microscope visual field, but in regions with moderate and severe amount of helicobacteria respectively 209 ± 24 and 212 ± 23 cells in one visual field. To be noted in histological samples a large amount of epithelial mucoid secretion was also present.

So it can be concluded that in the pyloric gland region areas with moderate and severe amount of helicobacteria cause a proliferation of superficial-gastric pit epitheliocytes and an increase in production of mucoid secretion which means that there is a formation of a defence reaction in the mucosa. The same was seen in the pyloric gland region of the mucosa in humans and laboratory animals that were infected with pathogenic *Helicobacter pylori* (Peteroson et al., 2001; Vorobjova et al., 2005; Haesebrouck et al., 2009).

The number of mucoid pyloric glandulocytes in the “upper part” of the dogs stomachs pyloric glands is displayed in figure 8.

This research has shown that when there was an increase of helicobacteria in the mucosa to moderate and severe categories the number of mucoid epitheliocytes decreased. In sites where helicobacteria were absent the average pyloric gland mucoid epitheliocyte count was 145 ± 21 cells in one microscope visual field, at sites with mild amount of helicobacteria – 140 ± 13 cells, and in places with moderate and severe amount – 120 ± 13 cells in one visual field. That can be connected with the effects that helicobacteria produces upon the pyloric gland region – pyloric cell damage, for example cell degeneration leading to atrophy of the mucosa (Hermanns et al., 1994; Neiger, Simpson, 2000).

All in all helicobacteria in the pyloric gland region changes the number of mucoid epitheliocytes in the superficial gastric-pit epithelium and in pyloric glands. Besides in the pyloric gland region in sites with moderate and severe amounts of helicobacteria, there was a so called inverse proportion – the superficial-gastric pit

epitheliocytes increased in numbers, but there was a decrease in pyloric glandulocyte quantity.

Amount of lymphocytes and plasmocytes in the gastric mucosa of domestic dogs and their relation to the amount of helicobacteria

To examine the reaction of the gastric mucosa on helicobacteria presence lymphocyte and plasmocyte quantities were evaluated in the cardiac, fundic and pyloric gland region in samples positive and negative for *Helicobacter spp.* Similar as for the evaluation of helicobacteria, depending on the amount of lymphocytes four groups were formed: absent, mild, moderate, severe.

Over the course of research it was determined that in domestic dogs in the gastric **cardiac gland region** in connective tissue under superficial epithelium, in between gastric pits, as well as deeper in between glands lymphocytes were for the most part absent, no matter if helicobacteria was present. There was an increase in lymphocytes only if there was a very significant amount – moderate and severe of helicobacteria in comparison to sites where helicobacteria was either absent or in mild amounts. In areas where there were moderate and severe levels of helicobacteria, lymphocyte count was mild – 1-15 lymphocytes in one visual field.

In conclusion in the cardiac gland region of the gastric mucosa in domestic dogs mild helicobacteria quantities do not initialize a significant increase of lymphocytes in the mucosal connective tissues, but when helicobacteria are in moderate and severe amounts, that gives a mild increase of lymphocyte infiltration.

In the “upper” and “deeper” connective tissue as well as in between glands in the **fundic gland region**, lymphocytes were found in more viewing fields than in the cardiac gland region. In connective tissue under the superficial epithelium and in between gastric pits with mild, moderate and severe amounts of helicobacteria, lymphocytes had a tendency to increase to mild, moderate and severe categories. But deeper into the connective tissue and in between fundic glands there was no difference in the amount of lymphocytes no matter if the sample was positive or negative for *Helicobacter spp.*

All things considered if helicobacteria is present in the “upper” parts, that is under superficial epithelium and in between gastric pits that influences an increase of lymphocytes infiltration therefore triggers a defence reaction in the mucosa. As far as for the “deeper” parts – connective tissue in between fundic glands the number of lymphocytes were not influenced by helicobacteria, so there was no reaction. Taking into account that in fundic glands there was a tendency for parietal cells to decrease in places where helicobacteria were present in significant amounts it can be concluded that helicobacteria influences changes in the amount of parietal cells in fundic glands, without influencing an increase of lymphocyte infiltration in between glands. This view is shared by other authors (Happonen et al., 1998; Kanou et al., 2005; De Bock et al., 2006).

The amount of lymphocytes in the pyloric gland region of the gastric mucosa, in tissues under the superficial-pit epithelium in *Helicobacter spp.* positive and negative samples with different quantities of helicobacteris is displayed in figure 9.

It can be seen that the number of lymphocytes in the pyloric gland region in the “upper part” of the mucosa in places where there was mild amount of helicobacteria was less than in comparison with other sites in the mucosa where the amount of helicobacteria was mild, moderate and severe. It turns out that if there is an increase in quantity of helicobacteria in the mucosa of the pyloric gland region from mild to moderate and even severe amount of helicobacteria it will lead to an increase of lymphocytes. In microscopic visual fields of the „upper part” of the mucosa in the pyloric gland region lymphocytes were absent in samples where helicobacteria were not present – 82.5% of cases. But in the mucosa with mild, moderate and severe amount of helicobacteria visual fields that did not contain lymphocytes were significantly less – 54.2% of cases where there were mild amounts of helicobacteria – 16.2% of cases when helicobacteria were at a moderate level and 21.9% of cases when helicobacteria were at severe quantitative category ($p < 0.05$).

As far as, the amount of lymphocytes in the deep mucosa of the pyloric gland region – in connective tissue in between the pyloric glands at sites with absent, mild, moderate and severe amounts of helicobacteria, that is demonstrated in figure 10.

It can be seen that in the deeper sites of the pyloric gland region mucosa in tissues in between pyloric gland in sites without helicobacteria as well as in places with mild amount, the quantity of lymphocytes was much less than in sites where helicobacteria reached the mild and severe category. In the pyloric gland region deep in the mucosa in between glands in places without helicobacteria and with mild amounts – respectively 83.7% and 81.6% of cases lymphocytes were not found. But in mucosa samples where there were moderate and severe levels of helicobacteria the percentages were accordingly 8.3% and 22.6% of cases.

Consequently a certain pattern became visible that there was a correlation – if quantities of helicobacteria increased so did the infiltration of lymphocytes in the mucosa in the superficial-gastric pit epithelium and in between glands. Moving on when the numbers of helicobacteria climbed to moderate and severe amounts there was a decrease in mucoid epitheliocytes. So with more helicobacteria there was more obvious the loss of gland cells and an increase of lymphocytes. Many authors have accentuated that several helicobacteria species, for example *Helicobacter heilmannii* in dogs similar as *Helicobacter pylori* in humans mainly localize in the pyloric gland region, both in the superficial-gastric pit epithelium and deep into the mucosa and produce morphological changes such as granulocyte degeneration, gland atrophy as well as infiltration of inflammatory cells (Hermanns et al., 1995; Happonen et al., 1998; Peterson et al., 2001; Sapierzynski et al., 2003; Haesebrouck et al., 2009).

While analyzing the differences in quantity of lymphocytes in *Helicobacter spp.* positive and negative samples, a question came to mind about the effects that helicobacteria has on intraepithelial cells and plasmocytes of the gastric mucosa. The numbers of intraepithelial lymphocytes and plasmocytes of the gastric mucosa with different amount of helicobacteria are displayed in Table 2.

In the cardiac gland region there was a tendency for intraepithelial lymphocytes and plasmocytes to increase in quantity when there was an increase in the number of helicobacteria in the mucosa, but this increase was not statistically significant ($p > 0.05$).

In the fundic gland region intraepithelial lymphocyte and plasmocyte count was very similar in samples which contained helicobacteria and which did not ($p > 0.05$).

Considerable differences in the amount of intraepithelial lymphocytes and plasmocytes were detected in the pyloric gland region of the mucosa (Table 2). In gastric mucosa without helicobacteria there were 8 ± 6 intraepithelial lymphocytes and 8 ± 5 plasmocytes in one microscope visual field, in samples with mild, moderate, and severe quantities of helicobacteria, the quantity of these cells increased significantly ($p < 0.05$). Intraepithelial cell count in mucosa under mild, moderate and severe categories increased to 17 ± 7 , 23 ± 7 and 27 ± 5 in one viewing field, and plasmocyte quantity similarly to 17 ± 7 , 23 ± 7 and 27 ± 5 .

An increase in numbers of intraepithelial lymphocytes and plasmocytes happened in both “upper” and “deeper” pyloric gland region in the mucosa. That means that in the pyloric gland region there is a reaction to an increase and presence of helicobacteria.

In conclusion, the mucosa of the pyloric gland region produced an immune reaction which was carried out by lymphocytes and plasmocytes. Also an increase of helicobacteria in the pyloric gland region is related to the increase of epitheliocytes in the superficial-gastric pit epithelium which means that resistance mechanisms were triggered. Moving on the decrease in the quantity of mucoid epitheliocytes in the pyloric gland region of the mucosa could be connected to the damages in the glandular epithelium and to the increase of lymphocyte infiltration in tissues between glands (Happonen et al., 1998; Rossi et al., 1999; Peterson et al., 2001; Sapierzynski et al., 2003; Haesebrouck et al., 2009).

Summing up helicobacteria in the gastric mucosa of domestic dogs is found in cardiac, fundic and the pyloric gland region. In cardiac and fundic gland regions helicobacteria does not cause any particular morphological alterations, however in the pyloric gland region the situation is different.

Helicobacteria in the pyloric gland region were present half less than in the cardiac and fundic gland region, but significant morphological changes both macroscopic and microscopic were present. The severity of pathology in the mucosa caused by helicobacteria in the pyloric gland region depended on the quantity and location of helicobacteria. The largest amount of helicobacteria was present in the superficial-gastric pit epithelium and deeper into the mucosa in the pyloric glands which has caused the increase in proliferation of mucoid epitheliocytes, mucoid secretion as well as an increase of lymphocytes and plasmocytes in mucosal tissues. All of this resembles a mucosal resistance mechanism.

The topic of helicobacteria in dogs and its relevance in different species of animals as well as relation to pathologies in the gastric mucosa remains actual and needs further research.

CONCLUSIONS

1. Brush cytology is the most sensitive method for detecting *Helicobacter spp.* in the gastric mucosa of raccoon and domestic dogs if compared to the urease test and a histological examination.
2. In the gastric mucosa of domestic dogs the spread of helicobacteria is considerably greater in the cardiac and fundic gland regions than in the mucosa of the pyloric gland region, but in raccoon dogs helicobacteria spread similarly in all regions.
3. In dogs cardiac and fundic gland region helicobacteria are present mostly in small and moderate amount localizing mainly in superficial-gastric pit mucoid epithelium, but in the pyloric region a significant amount of helicobacteria is found also deeper in the pyloric glands, and in this region examining macroscopically there are more mucosal erosions and polyps.
4. In dogs pyloric gland region of the mucosa that has a large amount of helicobacteria the quantity and secretion of superficial-gastric pit mucoid epithelium cells considerably increases while the number of mucoid epitheliocytes in pyloric glands decreases.
5. In cardiac and fundic gland regions the amount of mucoid epitheliocytes in different samples with different quantity of helicobacteria does not change, same goes for the number of parietal cells in fundic glands, however if there is a significant increase of helicobacteria, parietal cell count does have a tendency to decrease.
6. In cardiac and fundic gland region in mucosa connective tissues under the superficial epithelium and in between gastric pits as well as in tissues around glands there is a tendency for an increase in quantity of lymphocytes if there is an increase in amount of helicobacteria.
7. In the mucosa of pyloric gland region where helicobacteria are present in moderate and severe amounts the number of lymphocytes in tissues is considerably higher than in mucosa where helicobacteria are absent.

RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE

1. For helicobacteria detection in veterinary medicine it is suggested to perform a histological examination after taking gastric biopsy, because this method is precise and with its help it is possible to also evaluate morphological changes.
2. If it is needed to only detect the presence of helicobacteria in the gastric mucosa, for example, to control the effect of used medication, the fast and easy diagnostic method is the urease test.
3. If dogs display clinical signs of digestive tract disease it is recommended to perform gastric biopsy of three different gland regions and determine if helicobacteria is present and its location as well as evaluate the morphological changes of the mucosa in histological samples.

SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESIS

Related to the topic of doctoral thesis:

1. Bērziņa D., Birģele E. (2010) Gastric helicobacters and mucosal histology of the pyloric gland region in domestic dogs. *Proceedings of 28th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinary Pathologists*. Belgrade, Serbia, 8-11 September, p. 136.
2. Bērziņa D., Birģele E. (2009) Helicobacters and morphological changes in the gastric mucosa of domestic dogs (*Canis familiaris*). *Proceedings of 15th International Scientific conference "Research for rural development 2009"*. Jelgava, 20-22 May, pp. 174-179.
3. Bērziņa D., Birģele E. (2008) Helikobaktērijas mājas suņu (*Canis familiaris*) kuņģu gļotādā (Helicobacteria in the gastric mucosa of domestic dogs (*Canis familiaris*)). *Proceedings of LUA FVM International Scientific conference "Animals. Health. Food hygiene"*, Jelgava, 14 November, pp. 18.-23.
4. Bērziņa D., Birģele E. (2008) Location of helicobacters in the gastric mucosa of domestic dogs (*Canis familiaris*). *Proceedings of 14th International Scientific conference "Research for rural development 2008"*. Jelgava, 21-23 May, pp. 278-285.
5. Bērziņa D., Birģele E. (2008) Detection of gastric helicobacter-like microorganisms in feral raccoon dogs (*Nyctereutes Procyonoides*) and domestic dogs (*Canis Familiaris*). *LLU Raksti*. Jelgava, 21 (315), 79.-85. lpp.
6. Bērziņa D., Birģele E. (2006) Kuņģa *Helicobacter spp.* izplatība jenotsuņiem Korejas Republikas Čonbukas Provincē (*Prevalence of gastric Helicobacter spp. in the feral raccoon dogs in Republic of Korea, Chonbuk province*). *Proceedings of LUA FVM International Scientific conference "Animals. Health. Food hygiene"*. Jelgava, 10 November, pp. 36.-42.
7. Park H.J., Bērziņa D., Lim Ch.W. (2005) Detection of gastric helicobacter organisms in feral raccoons (*Nyctereutes Procyonoides*). *Proceedings of The 2nd Asian Society of Veterinary Pathology Symposium (Vol.2) & 2005 Annular Meeting of The Korean Society of Veterinary Pathology (Vol.9)*. Seoul, South Korea, 3-4 November, p. 85.

Other:

1. Bērziņa D., Muhammad Z., Chekarova I., Park H.J., Yoon H.S., Lee S.Y., Oh M.H., Kim B.S., Lim Ch.W. (2006) Accidental case of large colon impaction in a horse. *Korean Journal of Veterinary Service*, 29(1), pp. 79-82.
2. Ejaz S., Chekarova I., Yoon H.S., Lee S.Y., Oh M.H., Bērziņa D., Kwon H.N., Kim B.S., Lim Ch.W. (2005) Comparative efficacy of anticoccidial drugs in coccidiosis of broiler chicks. *Korean Journal of Veterinary Service*, 28(4), pp. 367-373.

3. Muhammad Z., Ejaz S., Lee J.Y., Bērziņa D., Park H.J., Lim Ch.W. (2005) Pulmonary acariasis caused by *Sternostoma Tracheacolum* in caged canary. *Proceedings of The 2nd Asian Society of Veterinary Pathology Symposium (Vol.2) & 2005 Annular Meeting of The Korean Society of Veterinary Pathology (Vol.9)*. Seoul, South Korea, 3-4 November, p.83.