Badania histologiczne i morfometryczne macicy żubra nizinnego

KATARZYNA OLBRYCH, KAROLINA BARSZCZ, BARTŁOMIEJ BARTYZEL,
TOMASZ SZARA, MARTA KUPCZYŃSKA

Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Otrzymano 30.05.2017

Zaakceptowano 05.07.2017

Olbrich K., Barszcz K., Bartyzel B., Szara T., Kupczyńska M.

Histological and morphometric study of the uterus of the lowland bison

Summary

The European bison belongs to endangered species. Its restitution requires a complete knowledge of the structure and function of its genital organs. The aim of this study was a histological and morphometric examination of the uterus of immature and adult females. Material for the study came from 55 females living in the Białowieża Forest. According to the Polish law, the post mortem use of tissues does not require an approval from an ethics committee. The animals were divided into 2 groups: group I included 36 prepubertal females aged from 2 months to 1.5 years, while group II consisted of 19 sexually mature females aged 2 to 20 years. The samples were stained with haematoxylin and eosin (H&E). Histological and morphometric examinations included measurements of the height of the epithelium, thickness of the endometrium, thickness of the myometrium, thickness of the inner and outer muscular layers, and thickness of the perimetrium. The results were analyzed using the Statistica 12.0™ software. Statistically significant differences were found between the two groups in all morphometric parameters examined. The results revealed a high degree of similarity of the histological structure of the uterus between European bison and domestic cattle.

Keywords: European bison, reproduction, uterus, histological structure

Żubr nizinny jest gatunkiem zagrożonym w skali światowej. W Polsce zwierzęta te również uległy wyniszczeniu na początku XX w. Restytucja żubra w Puszczy Białowieskiej rozpoczęła się w 1929 r. i obecnie region ten jest największą ostoją tych zwierząt na świecie. Pochodzące z Białowieży osobniki zasiliły wszystkie ośrodki hodowlane w kraju i większość hodowli światowych, przyczyniając się do znacznego rozprzestrzenienia tego gatunku. Mimo znacznych osiągnięć w restytucji żubra i wzrostu jego liczebności, wciąż jest on gatunkiem wymagającym specjalnej ochrony ze strony człowieka (3). Daje to szansę i jednocześnie nakłada obowiązek dalszych badań. Obecnie opracowywane są liczne programy hodowlane i badawcze *in situ* oraz *ex situ*. W programie ochrony żubra wskazuje się na potrzebę badań genetycznych, a także obejmujących choroby zakaźne, inwazje pasożytnicze oraz zagadnienia ekologiczne. Celowe też jest opracowanie charakterystyki zoologicznej (11, 14, 16). Szczególne miejsce w tym obszarze zajmuje rozród, który warunkuje trwanie i rozwój populacji. Pomimo że oryginalne opracowania morfologiczne poszczególnych układów oraz narządów żubra zawarte są w ponad 100 pozycjach piśmiennictwa, to narządom

układu moczowo-płciowego poświęcono nieliczne prace (1, 6, 7, 10, 12, 15, 17-20). Na uwagę zasługuje fakt, iż morfologia narządów płciowych żeńskich wspomnianego gatunku, poza krótkimi wzmiankami, nie została szczegółowo opracowana (13). Istnieje w tym zakresie niedostatek podstawowych danych dotyczących budowy makroskopowej i mikroskopowej narządów płciowych żeńskich.

Celem badań było opisanie budowy mikroskopowej macicy samicy żubra w rozwoju pozapłodowym. Przeprowadzone badania poszerzą wiedzę z zakresu anatomii porównawczej dzikich ssaków.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły wyizolowane narządy płciowe żeńskie pozyskane od 55 samic żubra nizinnego *Bison bonasus* (Linnaeus 1758) w wieku od 2 miesięcy do 20 lat. Osobniki wyeliminowano z populacji bytującej na terenie Puszczy Białowieskiej. Na przeprowadzenie badań uzyskano zezwolenie Ministra Środowiska oraz Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska. Zgodnie z obowiązującym prawem, w Polsce wykorzystanie tkanek pozyskanych *post mortem* nie wymaga zgody Komisji Etycznej. U wszystkich osobników wykorzystanych w badaniach nie stwierdzono

zmian rozwojowych i patologicznych w obrębie narządów rozrodczych.

Do grupy I zaliczono 36 samic niedojrzałych płciowo, w wieku od 2 miesięcy do 1,5 roku, natomiast do grupy II zakwalifikowano 19 zwierząt dojrzałych płciowo, w wieku od 2 do 20 lat. Przy podziale na grupy kierowano się informacjami dotyczącymi rozwoju i wzrostu żubrów (4, 5, 7-9). Informacje o wieku zaczerpnięto z Książ Rezerwatowych Białowieży.

Do badań histologicznych pobrano wycinki ściany macicy, które utrwalono w buforowanym 5% wodnym roztworze formaldehydu. Próbkę została zatopiona w bloczki parafinowe, które następnie przy pomocy mikrotomu rotacyjnego pokrojono na poprzeczne skrawki o grubości 10 µm. Przeprowadzono barwienie przeglądowe hematoksyliną i eozyną (HE).

W kolejnym etapie wykonano badania morfometryczne następujących parametrów: wysokości nabłonka błony śluzowej, grubości: błony śluzowej, błony mięśniowej, warstwy mięśniowej wewnętrznej, warstwy mięśniowej zewnętrznej, błony surowiczej. Obserwacje przeprowadzono przy użyciu programu MultiScanBase v.8.08™, do którego wczytywano zdjęcia skalowane według instrukcji. Stosowano gotową skalę ze szkiełka mikroskopowego PP 1/100 z linijką mikrometryczną o podziałce 0,01 mm. Sporządzono dokumentację fotograficzną.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu Statistica 12.0™. Dla każdego parametru przeprowadzono testy: t-Studenta, Pearsona, Kołmogorowa-Smirnowa, Fischera. Uzyskane wyniki zebrano w formie tabelarycznej (tab. 1-6).

Tab. 1. Wymiary struktur mikroskopowych macicy (µm)

Wymiar	$\bar{x}$	SD	Min-Max
Grupa I + II (n = 55)			
Wysokość nabłonka	12,55	2,98	7,14-21,08
Grubość błony śluzowej	1320,80	345,43	595,04-1978,53
Grubość błony mięśniowej	1595,41	2013,62	409,96-15448,00
Grubość warstwy mięśniowej wew.	1232,71	1911,45	292,19-1476,60
Grubość warstwy mięśniowej zew.	362,70	251,46	97,04-1266,42
Grubość błony surowiczej	68,06	31,07	24,68-200,38
Grupa I (n = 36)			
Wysokość nabłonka	11,80	2,72	7,14-19,60
Grubość błony śluzowej	1215,63	217,92	595,04-1885,50
Grubość błony mięśniowej	1066,52	473,15	409,96-2217,34
Grubość warstwy mięśniowej wew.	816,16	370,95	292,19-1594,02
Grubość warstwy mięśniowej zew.	250,36	132,89	97,04-623,32
Grubość błony surowiczej	56,81	18,87	24,68-95,96
Grupa II (n = 19)			
Wysokość nabłonka	13,95	3,01	9,93-21,08
Grubość błony śluzowej	1520,08	312,08	1059,90-1978,53
Grubość błony mięśniowej	2597,53	3179,50	890,71-15448,00
Grubość warstwy mięśniowej wew.	2021,95	3112,69	704,46-14767,60
Grubość warstwy mięśniowej zew.	575,57	286,86	162,78-1266,42
Grubość błony surowiczej	89,37	38,35	44,94-200,38

Wyniki i omówienie

U wszystkich badanych osobników opisano budowę histologiczną błony: śluzowej, mięśniowej i surowiczej ściany macicy.

U większości samic żubra będących w fazie anestrus błona śluzowa macicy pokryta była bezzęskowym nabłonkiem jednowarstwowym walcowatym, który spoczywał na cienkiej błonie podstawnej. Komórki nabłonka najczęściej przybierały kształt walcowaty, zdecydowanie rzadziej kostkowy (ryc. 1). Na niektórych przekrojach odnotowano, że nabłonek ten był nawet wielowarstwowo walcowaty (ryc. 2). Należy przypuszczać, iż te samice znajdowały się w okresie okołorujowym. Podobne obserwacje odnotowano u bydła domowego, u którego nabłonek macicy z reguły jest jednowarstwowo walcowaty i tylko podczas rui, na skutek zmian hormonalnych, może przekształcać się w wielowarstwowo walcowaty (2). U badanych żubrów średnia wysokość nabłonka wyniosła 12,55 µm. W grupie I uzyskała wartość 11,80 µm natomiast w grupie II 13,95 µm (tab. 1). Pod błoną podstawną znajdowała się blaszka właściwa błony śluzowej. Jej zrąb tworzyła tkanka łączna siateczkowa z licznymi, mało zróżnicowanymi komórkami kontaktującymi się ze sobą za pomocą wypustek. Zawierała ona również: komórki mięśniowe gładkie, makrofagi, komórki tuczne, fibroblasty, limfocyty, granulocyty oraz liczne naczynia krwionośne.

W błonie śluzowej macicy obecne były gruczoły maciczne, których ujścia znajdowały się u podstawy brodawek macicznych. Natomiast nie stwierdzono ich na szczytach brodawek macicznych. Gruczoły te miały obszerne światło i wysłane były nabłonkiem jednowarstwowym walcowatym lub kostkowym, wydzielającym śluz. Miały one charakter cewkowy lub rozgałęziony i sięgały w głąb blaszki właściwej błony śluzowej macicy (ryc. 3). Średnia grubość błony śluzowej macicy wynosiła 1320,80 µm. W grupie samic niedojrzałych płciowo jej średnia wartość była niższa (1215,63 µm) niż samic dojrzałych płciowo (1520,08 µm) (tab. 1).

Błona mięśniowa macicy leżała pod blaszką właściwą błony śluzowej i składała się z dwóch zasadniczych warstw mięśniowych. Pierwsza z nich zbudowana była z mięśni gładkich przebiegających okrężnie, druga z układających się podłużnie. Obie warstwy rozdzielała warstwa naczyniowa zawierająca liczne, silnie poskręcane naczynia krwionośne. Warstwa wewnętrzna błony mięśniowej w porównaniu z warstwą zewnętrzną błony mięśniowej była grubsza. W obu przebadanych grupach żubrów średnia grubość warstwy wewnętrznej wynosiła 1232,71 µm, natomiast grubość warstwy zewnętrznej

Ryc. 1. Fragment ściany macicy: 1 – nabłonek jednowarstwowy walcowaty błony śluzowej macicy; 2 – blaszka właściwa błony śluzowej macicy; 3 – jama macicy (pow. obiektywu $\times 40$)

Ryc. 2. Fragment ściany macicy: 1 – nabłonek wielowarstwowy walcowaty błony śluzowej macicy; 2 – blaszka właściwa błony śluzowej macicy; 3 – jama macicy (pow. obiektywu $\times 40$)

Ryc. 3. Fragment błony śluzowej macicy: 1 – rozgałęziony gruczoł maciczny; 2 – blaszka właściwa błony śluzowej macicy; 3 – cewkowy gruczoł maciczny (pow. obiektywu $\times 80$)

Ryc. 4. Przekrój ściany macicy: 1 – błona surowicza macicy; 2 – błona mięśniowa macicy, warstwa zewnętrzna; 3 – warstwa naczyniowa; 4 – błona mięśniowa macicy, warstwa wewnętrzna; 5 – blaszka właściwa błony śluzowej macicy; 6 – brodawka maciczna; 7 – gruczoły maciczne; 8 – jama macicy (pow. obiektywu $\times 10$)

Ryc. 5. Fragment ściany szyjki macicy: 1 – światło szyjki macicy; 2 – fałd blaszki właściwej błony śluzowej szyjki macicy (pow. obiektywu $\times 10$)

362,70 μm (tab. 1). Liczne komórki mięśniowe warstwy wewnętrznej przenikały do głębiej leżącej warstwy naczyniowej. U żubra wspomniana warstwa naczyniowa wyraźnie oddzielała się od pozostałych struktur ściany macicy (ryc. 4). Pojedyncze komórki mięśniowe warstwy zewnętrznej przechodziły do błony surowiczej. Na podstawie obserwacji własnych stwierdzono, że u żubra, podobnie jak u bydła domowego stosunek grubości warstwy zewnętrznej i wewnętrznej błony mięśniowej był podobny, jednak warstwa naczyniowa u żubrów była grubsza niż u bydła (2, 10).

Błona surowicza w przeważającej mierze zbudowana była z tkanki łącznej luźnej, w której znajdowały się małe naczynia krwionośne. Od zewnątrz pokrywał ją nabłonek jednowarstwowy płaski. Średnia grubość

blony surowiczej macicy w przebadanych grupach samic wyniosła 68,06 μm . W grupie samic niedojrzałych płciowo jej średnia wartość była niższa (56,81 μm) niż samic dojrzałych płciowo (89,37 μm) (tab. 1).

Błona śluzowa szyjki macicy pokryta była nabłonkiem jednowarstwowym walcowatym, którego komórki ściśle do siebie przylegały. Dobrze rozwinięta i unaczyniona blaszka właściwa błony śluzowej tworzyła bardzo wysokie i ostro zakończone fałdy podłużne, mające liczne wtórne rozgałęzienia (ryc. 5). W części pochwowej szyjki macicy były one najlepiej wykształcone. W niektórych miejscach, na dnie omawianych rozgałęzień odnotowano gruczoły błony śluzowej szyjki macicy. Ich liczba była mniejsza niż w błonie śluzowej rogów i trzonu macicy. W części pochwowej szyjki macicy nabłonek jednowarstwowo walcowaty stopniowo przekształcał się w nabłonek

wielowarstwowy płaski. Proces ten rozpoczynał się na wierzchołkach fałdów, stopniowo obejmując ich boczne części, będące wtórnymi rozgałęzieniami. Błona mięśniowa szyjki macicy, leżąca pod blaszką właściwą była znacznie od niej grubsza. Komórki mięśniowe występowały w postaci grubych, szerokich pasm, które przebiegały w sposób nieregularny. Część z nich układała się podłużnie, część okrężnie bądź krzyżowała się ze sobą. Pomiedzy nimi położone były naczynia krwionośne o grubych ścianach oraz liczne, ułożone w pasma włókna sprężyste. Od zewnątrz błonę mięśniową pokrywała błona surowicza.

Test Kolmogorowa-Smirnowa wykazał, że tylko zmienna określająca grubość błony śluzowej macicy i grubość jej warstwy mięśniowej zewnętrznej w grupie II odbiegały od rozkładu normalnego (tab. 2), dlatego wszystkie zmienne potaktowano jak zmienne o rozkładzie normalnym, co pozwoliło w dalszej analizie na badanie testem parametrycznym t-Studenta (tab. 3). Wymieniony test umożliwił porównanie grup i wykazał, że badane grupy istotnie statystycznie różnią się wszystkimi analizowanymi cechami. Test parametryczny Pearsona umożliwił zbadanie związków między badanymi zmiennymi w obrębie poszczególnych grup. Test ten został przeprowadzony dla struktur mikroskopowych macicy, osobno w grupie samic niedojrzałych płciowo (tab. 4) oraz w grupie samic dojrzałych płciowo (tab. 5). Istotnie dodatnia korelacja oznacza, że zmienne zachowują się podobnie, czyli jeśli jedna wzrasta, to druga również. Istotnie ujemna korelacja oznacza, że zmienne zachowują się przeciwnie, czyli jedna rośnie, to druga maleje. W grupie I analiza wykazała istotnie dodatnie korelacje między grubością błony mięśniowej macicy a grubością jej warstwy wewnętrznej, jak i warstwy zewnętrznej oraz korelację między grubością warstwy wewnętrznej a grubością warstwy zewnętrznej macicy, jak i grubością błony surowiczej. Ponadto nie stwierdzono istotnie ujemnych korelacji (tab. 4). Podobnie jak w grupie II, gdzie ujawniły się istotnie dodatnie korelacje między następującymi parametrami: wysokością nabłonka a grubością błony surowiczej, grubością błony mięśniowej macicy a grubością jej

Tab. 2. Test Kolmogorowa-Smirnowa badanych parametrów dla grupy I i II

Parametr	$\bar{x}$	SD	Min	Max	Współczynnik zmienności (%)	Statystyka Z testu normalności rozkładu
Grupa I						
MC	103,33	38,58	47	190	37,3	0,749
A	11,81	2,72	7,14	19,60	23,0	0,705
B	1215,63	317,92	595,04	1885,50	26,2	0,615
C	1066,52	473,16	409,96	2217,34	44,4	0,662
D	250,36	132,89	97,04	623,32	53,1	0,906
E	816,16	370,95	292,19	1594,02	45,5	0,852
F	56,81	18,88	24,68	95,96	33,2	0,671
Grupa II						
MC	366,05	540	112,92	190	30,8	0,720
A	13,96	21,08	3,01	9,93	21,6	0,773
B	1520,08	1978,53	312,09	1059,90	20,5	0,564
C	2597,54	15448,00	3179,51	890,71	122,4	1,587*
D	575,58	1266,42	286,86	162,78	49,8	0,592
E	2021,96	14767,60	3112,69	704,46	153,9	1,876**
F	89,38	200,38	38,36	44,94	42,9	0,733

Objaśnienia: MC – masa ciała; A – wysokość nabłonka błony śluzowej; B – grubość błony śluzowej; C – grubość błony mięśniowej; D – grubość warstwy mięśniowej wewnętrznej; E – grubość warstwy mięśniowej zewnętrznej; F – grubość błony surowiczej; *istotność przy $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Tab. 3. Test t-Studenta dla grupy I i II

Parametr	Grupa I		Grupa II		Statystyka t	df	Istotność testu t
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD			
MC	103,33	38,58	366,05	112,92	-9,84	20,25	0,000***
A	11,81	2,72	13,96	3,01	-2,69	53,00	0,010**
B	1215,63	317,92	1520,08	312,09	-3,40	53,00	0,001**
C	1066,52	473,16	2597,54	3179,51	-2,09	18,42	0,05*
D	250,36	132,89	575,58	286,86	-4,68	22,16	0,001**
E	816,16	370,75	2021,96	3112,69	-1,68	18,27	0,05*
F	56,81	18,88	89,40	38,36	-3,48	22,71	0,01*

Objaśnienia: jak w tab. 2; *** istotność przy $p \leq 0,001$

Tab. 4. Współczynnik korelacji Pearsona w grupie I

	A	B	C	D	E
A	–				
B	0,075	–			
C	–0,038	0,214	–		
D	–0,227	0,043	0,826***	–	
E	0,033	0,258	0,979***	0,696***	–
F	–0,083	–0,303	0,199	0,357*	0,126

Objaśnienia: jak w tab. 3

Tab. 5. Współczynnik korelacji Pearsona w grupie II

	A	B	C	D	E
A	–				
B	0,345	–			
C	–0,226	–0,326	–		
D	0,432	0,021	0,276	–	
E	–0,270	–0,335	0,996***	0,189	–
F	0,519*	–0,087	0,131	0,669**	0,072

Objaśnienia: jak w tab. 3

Tab. 6. Test Fischera dla grupy I i II

	A	B	C	D	E
B		–			
C			–		
D	•*		○**	–	
E		○*	•*	○*	–
F	•*				

Objaśnienia: jak w tab. 2; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ○ korelacja jest istotnie wyższa w grupie I niż w grupie II; • korelacja jest istotnie wyższa w grupie II niż w grupie I

warstwy zewnętrznej oraz między grubością warstwy mięśniowej wewnętrznej a grubością błony surowiczej (tab. 5). W wyniku porównania powyższych korelacji testem Fischera stwierdzono silniejszą zależność w grupie I niż w grupie II między następującymi zmiennymi: grubością błony śluzowej macicy a grubością warstwy mięśniowej zewnętrznej, grubością błony mięśniowej macicy a grubością warstwy mięśniowej wewnętrznej oraz między grubością warstwy mięśniowej wewnętrznej macicy a grubością warstwy mięśniowej zewnętrznej. W grupie II stwierdzono silniejsze zależności między wysokością nabłonka macicy a grubością warstwy wewnętrznej błony mięśniowej i grubością błony surowiczej oraz między grubością błony mięśniowej a grubością warstwy zewnętrznej błony mięśniowej macicy (tab. 6).

Obecnie hodowla żubra i jego ochrona jest utrudniona ze względu na liczne problemy zdrowotne. U tego gatunku stwierdza się liczne nieprawidłowości i dysfunkcje w układzie rozrodczym. Szczegółowa wiedza z zakresu morfologii oraz ocena morfometryczna narządów płciowych samic żubra mają istotne znaczenie praktyczne i edukacyjne.

Piśmiennictwo

1. Barszcz K., Przespolewska H., Olbrych K., Czopowicz M., Klećkowska-Nawrot J., Goździewska-Harłajczuk K., Kupczyńska M.: The morphology of the adrenal gland in the European bison (*Bison bonasus*). BMC Vet. Res. 2016, 12, 161.
2. Bielański A., Tischner M.: Biotechnologia rozrodu zwierząt udomowionych. Wydawnictwo DRUKOL, Kraków 2000.
3. Dackiewicz J.: 80 lat restytucji żubrów w Puszczy Białowieskiej. European Bison Conservation Newsletter 2009, 2, 123-128.
4. Daleszczyk K.: Some factors influencing reproductive parameters of European bison cows. European Bison Conservation Newsletter 2011, 4, 45-54.
5. Jacewski Z.: Reproduction in European bison, *Bison bonasus* L., in reserves. Acta Theriol. 1958, 1, 333-376.
6. Kita J., Anusz K.: Heath threats for the European Bison particularly in free-roaming populations in Poland. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2006.
7. Kobryńczuk F., Kobryń H.: Growth rate of bones in the postembryonic development of the European bison. Acta Theriol. 1975, 20, 151-157.
8. Kobryńczuk F., Kobryń H.: Growth rate of selected parameter of the European bison skull. Folia Morphol. 1980, 39, 69-77.
9. Kobryńczuk F., Kobryń H.: Postembryonic growth of bones of the autopodia in the European bison. Acta Theriol. 1973, 18, 309-311.
10. Korobko Ju. A., Kurnosow K. M.: Żubr. Izdatel'stvo Nauka, Moskva 1979.
11. Krasiński Z. A., Olech W., Perzanowski K., Bielecki W., Bereszyński A.: Operat ochrony żubra *Bison bonasus* w Białowieskim Parku Narodowym. European Bison Conservation Newsletter 2011, 4, 101-116.
12. Kupczyńska M., Barszcz K., Olbrych K., Polgaj M., Wysiadecki G., Topol M., Klećkowska-Nawrot J.: Coronary arteries of the European bison (*Bison bonasus*). Acta Vet. Scand. 2015, 57, 82.
13. Olbrych K., Czerniawska-Piątkowska E., Bartyzel J. B., Max A., Szara T.: Morphometric study of the uterus of lowland European bison *Bison bonasus* (Linnaeus, 1758). Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech. 2016, 325, 65-74.
14. Olech W., Cielniak K., Korzyńska-Nowak R., Suchecka A., Fruba A.: Krajowe strategie dla chronionych gatunków zwierząt. Przegl. Hod. 2012, 10-12, 28-30.
15. Pilarski W.: Układ moczowy żubra *Bison bonasus*. Praca hab., Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, Warszawa 1967.
16. Pucek Z., Belousova I. P., Krasińska M., Krasiński Z. A., Olech W.: Status Survey and Conservation Action Plan. European Bison IUCN – The World Conservation Union 2004, s. 31-32.
17. Pytel S., Wojnowska B.: Morphology of the pancreas in the European bison. Acta Theriol. 1980, 25, 141-150.
18. Sawicki B., Siuda S., Kasacka I.: Microscopic structure of the thyroid gland in the European bison. Acta Theriol. 1992, 37, 171-179.
19. Serwatka S.: Morphology of the thyroid gland in European Bison. Folia Morphol. 2001, 60, 158.
20. Świeżyński K.: The female reproductive organs of the European bison. Acta Theriol. 1968, 32, 511-551.

Adres autora: dr Katarzyna Olbrych, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: kasiaolbrych@wp.pl