

Przypadek przewlekłego wytwórczego zapalenia najądrza żubra

ELŻBIETA CZYKIER, WOJCIECH BIELECKI*, ZBIGNIEW NAMIOT**, JANUSZ DZIĘCIOŁ**

Zakład Histologii i Embriologii UM, ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok

*Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

**Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka UM, ul. Mickiewicza 2a, 15-230 Białystok

Czykier E., Bielecki W., Namiot Z., Dziecioł J.

Case of chronic progressive epididymitis in a European bison

Summary

The aim of the study was to determine whether the character of a histopathological change observed in the epididymis of a 13-year-old European bison male was neoplastic, inflammatory or proliferous. Samples from both testes and epididymes were collected. The material was fixed in Bouin's fluid; 6 mm paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin (H+E), as well as by Brachet's method. Full blood samples were collected from the femoral artery (post mortem). Immunocytochemical reactions were performed by the EnVision™ FLEX+ technique. Specific monoclonal mouse and polyclonal rabbit antibodies were used against: vimentin (No IS630); human cytokeratin (No IS053); human CD 34 (No IS632); human desmin (No IS606); human smooth muscle myosin heavy chain (No IS066); myogenin (No IS067); human muscle actin (No M0635) in a 1:50 dilution; human MyoD1 (No M3512) in a 1:50 dilution; human myeloid/histiocyte (No M0747) in a 1:100 dilution; human receptor Cd 68 (No IS609); S-100 (No IS504). Micromorphometric measurements were carried out to assess the extent of connective tissue hyperplasia in the epididymis. The histopathological change in the epididymis of the 13-year-old bull was progressive and caused by chronic inflammation, which was confirmed by the micromorphometric analysis and the evidence of plasma cells and connective tissue hyperplasia. Immunohistochemical staining carried out to find vimentine receptors showed mesenchymatic cells forming disseminated foci in the epididymis. The appearance of the cells that made up the microgranulomas indicated their epithelioid nature. These transformed macrophages were devoid of the typical receptors Cd68 and Mac 387. However, the presence of spermatozoa in the foci suggested their phagocytic properties.

Damage to the canaliculi of the epididymis and their phagocytosis could have been caused by an unknown proinflammatory factor. It is also likely that the destruction was induced by epithelioid cell proteins, which resulted in a dislocation of sperm to the epididymal stroma.

Keywords: Bison *bonasus*, male, chronic progressive inflammation

Od 1971 r. na terenie Puszczy Białowieskiej prowadzone są odstrzały żubrów *Bison bonasus* (Linnaeus, 1758) celem regulacji liczebności stada, obejmujące zarówno samce, jak i samice (8). Przyczyny eliminacji samców to: choroby, ze szczególnym uwzględnieniem nekrotycznego zapalenia napletka samców (NZN), zła kondycja, wady eksterieru, urazy różnego pochodzenia, agresja w stosunku do człowieka, starość (8, 9, 15). Wszystkie odstrzelone żubry poddawane są badaniu sekcyjnemu. Na podstawie badań patomorfologicznych makroskopowych i mikroskopowych rozpoznano w układzie płciowym męskim tych zwierząt NZN o różnym stopniu nasilenia (8, 9, 15), wnętrostwo dotyczące lewego lub prawego jądra (1, 4, 6, 7, 18) i torbiele najądrzy (12, 13, 17). Natomiast dotychczas nie stwierdzano zmian o charakterze nowotworowym, zapalnym czy rozrostowym w obrębie

jąder i najądrzy. Poniżej opisano zmiany patomorfologiczne stwierdzone w preparatach mikroskopowych najądrza 13-letniego samca żubra.

Celem badań było określenie charakteru zmian patomorfologicznych stwierdzonych w najądrzu 13-letniego samca żubra – nowotworowego, zapalnego czy rozrostowego.

Materiał i metody

18 grudnia 2002 r. w okolicy wsi Smolnice eliminowano samca żubra o numerze ewidencyjnym 1043 (pochodzącego z wolno żyjącej populacji) ze względu na wyrządzanie szkód i przejawianą agresję. Wiek żubra (ok. 13 lat) został określony przez J. Dackiewicza z Białowieskiego Parku Narodowego na podstawie wyglądu zębów oraz wielkości i kształtu rogów (10, 19). Masa ciała badanego zwierzęcia wynosiła 646 kg, masa jądra lewego 283 g, masa jądra

prawego 263,1 g. W badaniu sekcyjnym stwierdzono: ropne zapalenie płuc i płatów przeponowych, zmiany pomotylicze oraz motylicę. Nie obserwowano u tego osobnika NZN ani torbieli najądrzy (8, 9, 12, 13, 15, 17). Krew pobrano z tętnicy udowej (*post mortem*). Z obu jąder i najądrzy pobrano wycinki. Materiał utrwalano w płynie Bouina, prowadzono techniką parafinową, barwiono H+E oraz metodą Bracheta. Wykonano odczyny immunohistochemiczne metodą EnVision™ FLEX+ z użyciem następujących przeciwciał monoklonalnych mysich: przeciwko ludzkim cytokeratynom, klon AE1/AE3 (No IS053); przeciwko ludzkiemu CD 34, klon QBEnd 10, (No IS632); przeciwko ludzkiej desminie, klon D33 (No IS606); przeciwko vimentynie, klon V9 (No IS630); przeciwko ludzkiej miozynie z komórek mięśniowych gładkich, klon SMMS-1 (No IS066); przeciwko miogeninie, klon F5D (No IS067); przeciwko ludzkiej mięśniowej aktynie, klon HHF35 (No M0635) w rozcieńczeniu 1 : 50; przeciwko ludzkiej MyoD1, klon 5.8A (No M3512) w rozcieńczeniu 1 : 50; przeciwko ludzkim histiocytom, klon Mac 387 (No M0747) w rozcieńczeniu 1 : 100; przeciwko ludzkiemu receptorowi Cd 68, klon KP1 (No IS609) oraz przeciwciała poliklonalnego króliczego przeciwko S-100 (No IS504). Wszystkie wymienione przeciwciała zakupiono w firmie DAKO. Procedurę wykonano w automacie Dako (Autostainer/Autostainer Plus).

Skrawki umieszczone na sylanizowanych szkiełkach odparafinowano, uwodniono. Następnie wykonano ciepłe odmaskowanie epitopu antygeny przez 20 min. w temperaturze 97°C w wysokim pH, po czym zablokowano aktywność endogennej peroksydazy odczynnikami EnVision™ FLEX Peroxidase blocking Reagent (SM821). Skrawki z przeciwciałem pierwotnym inkubowano 20 min., po czym płukano w roztworze TRIS. Następnie zastosowano odczynnik detekcyjny Dako EnVision™ FLEX/HRP (DM802) zawierający przeciwciało wtórne i peroksydazę, przeprowadzono płukanie w roztworze TRIS. Wykonano reakcję z DAB. Podbarwiono jądra komórkowe hematoxylina, następnie odwodniono skrawki i zamknięto.

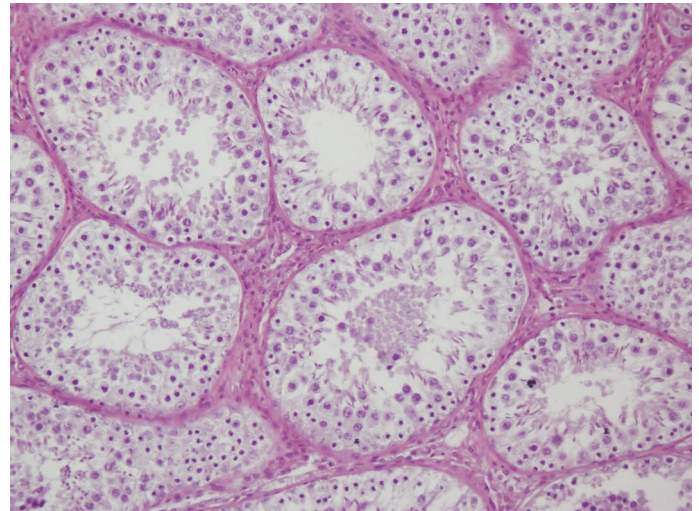
Przeprowadzono badanie mikromorfometryczne w celu oceny stopnia rozrostu tkanki łącznej zrębu najądrza. Mierzono szerokość pomiędzy przewodnikami wyprowadzającymi. W tym celu wyznaczano odcinki, których końce oparte były na błonie podstawnej sąsiadujących ze sobą przewodników. Przeprowadzono kolejnych 100 pomiarów, po czym je zsumowano, obliczono średnią szerokość pomiędzy przewodnikami i odchylenie standardowe oraz wartości minimalne i maksymalne. Dla porównania pomiarów w badanym przypadku wykonano też pomiary w dwóch preparatach najądrzy, w których badaniem przeglądowym nie stwierdzono cech zapalenia. Pomiary przeprowadzono pod powiększeniem 50 ×, używając zestawu do mikroskopowej analizy obrazu Eclipse 90i (Nikon, Japonia) wyposażonego w komputerowy program Lucia 5.16.

Metodą immunoenzymatyczną ELISA oznaczono stężenie 17β-estradolu (E2) (No RE 52041) oraz stężenie wolnego testosteronu (FT) (No RE 52171) firmy Immunobiological Laboratories (Hamburg, Niemcy).

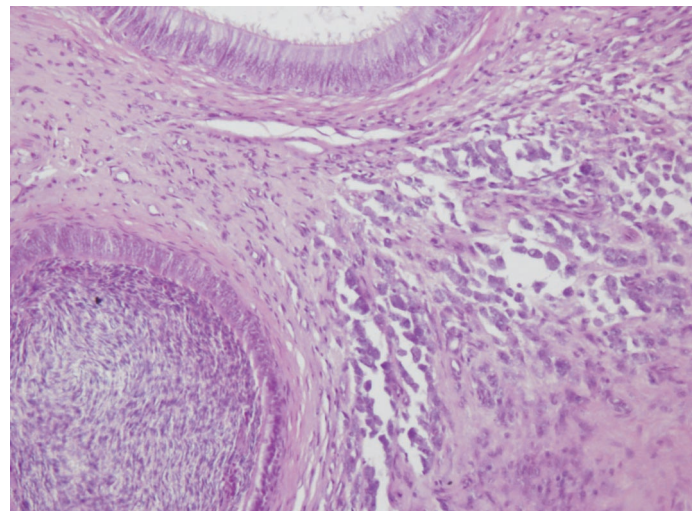
Dane dotyczące masy ciała żubra uzyskano z Białowieckiego Parku Narodowego.

Wyniki i omówienie

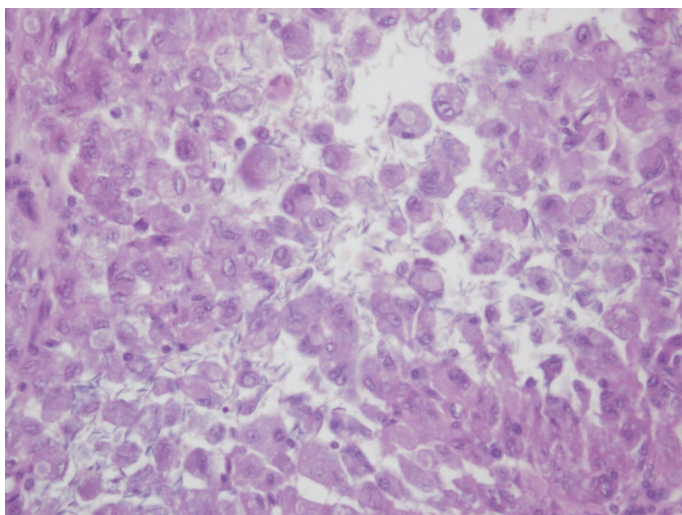
W badaniu makroskopowym nie obserwowano odchyień od stanu prawidłowego w budowie jąder i najądrzy badanego 13-letniego żubra. Badaniem mikroskopowym stwierdzono prawidłowy obraz histologiczny jądra, na przekroju poprzecznym widoczne były kanaliki kręte jąder pokryte nabłonkiem plemnikotwórczym. Między kanalikami krętymi jąder widoczna była tkanka łączna i komórki Leydiga (ryc. 1). Podczas badań mikroskopowych preparatów z najądrza barwionych H+E stwierdzono obecność komórek nietypowych dla budowy jądra i najądrza (ryc. 2, 3). Komórki miały kształt owalny, epithelioidny. Jądro komórkowe położone było ekscentrycznie, bez wyraźnego jąderka. Cytoplazma jasna, lekko kwasochłonna o charakterze piankowatym, drobnoziarnistym. Komórki nie tworzyły jednolitej, ograniczonej struktury, wchodziły jednak w otoczenie w postaci gniazd, pasm i języków, sprawiając wrażenie niszczenia podścieliska.



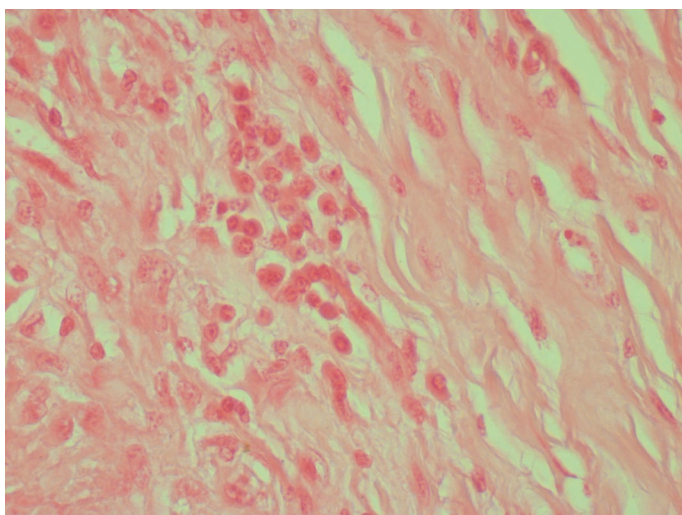
Ryc. 1. Jądro 13-letniego żubra. Na przekroju poprzecznym widoczne są kanaliki kręte jąder pokryte nabłonkiem plemnikotwórczym. Między kanalikami występuje tkanka łączna i komórki Leydiga. Barw. H i E. Pow. 200 ×



Ryc. 2. Najądrze 13-letniego żubra. Wnikanie nacieku pomiędzy kanaliki najądrza. Barw. H i E. Pow. 200 ×



Ryc. 3. Najądrze 13-letniego żubra. Plemniki pomiędzy komórkami nacieku. Barw. H i E. Pow. 400 ×



Ryc. 4. Najądrze 13-letniego żubra. Plazmocyty tworzą skupiska od 5 do 30 komórek. Zgrupowania plazmocyty nie regularnie rozrzucone w preparacie. Metoda Bracheta. Pow. 400 ×

Układ komórek w zmianie był luźny, bez cech przylegania i bez tworzenia struktur organoidnych (ryc. 2, 3). Cechy te wskazują na nienabłonkowy charakter komórek. W badanych komórkach nie znaleziono podziałów mitotycznych, co mogłoby wskazywać na niską aktywność mitotyczną lub jej brak. W okolicy grup wymienionych komórek widoczne były sporadyczne nacieki limfocytarne oraz włóknienie podścieliska z rozplemem naczyń. Miejscami komórki te wymieszane były z plemnikami (ryc. 3).

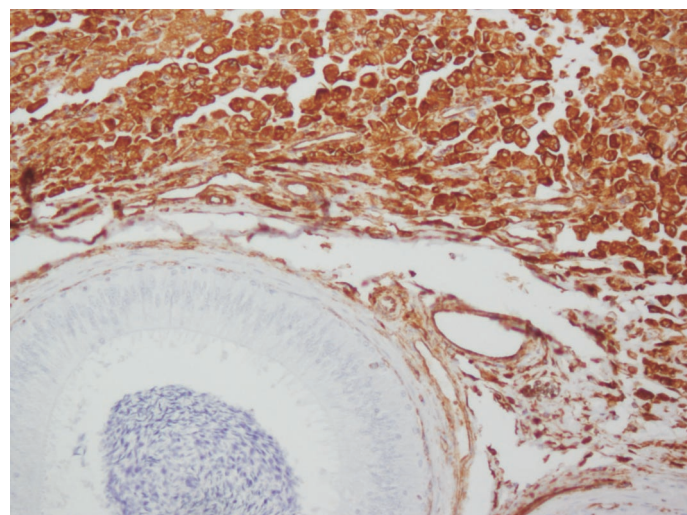
Barwienie preparatów mikroskopowych wykonanych z najądrza żubra metodą Bracheta wykazało obecność komórek plazmatycznych. Plazmocyty tworzyły skupiska od 5 do 30 komórek. Zgrupowania plazmocyty rozrzucone były w preparacie nieregularnie (ryc. 4). Pomiary mikromorfometryczne wykazały 2-3-krotny rozrost tkanki łącznej zrębu najądrza u tego żubra w porównaniu z osobnikami, u których nie obserwowano zapalenia (tab. 1). Po wykonaniu badań

immunohistochemicznych otrzymano następujące wyniki: vimentyna (+) w komórkach nacieku oraz w komórkach mięśniowych gładkich naczyń i przewodu najądrza (ryc. 5); cytokeratyny (PanCK) (-) w komórkach nacieku, (+) w nabłonku kanalików najądrza; desmina (-) w komórkach nacieku, (+) w komórkach mięśniowych gładkich naczyń krwionośnych i przewodu najądrza; aktyna (-) w komórkach nacieku, (+) w komórkach mięśniowych gładkich naczyń krwionośnych i przewodu najądrza, MyoD1 (-) w komórkach nacieku, (+) w rąbku komórek nabłonka przewodu najądrza; SMM (-) w komórkach nacieku, (+) w komórkach mięśniowych gładkich naczyń krwionośnych i przewodu najądrza; myogenina brak odczynu w preparacie; CD 34 brak odczynu w preparacie; S-100 (+/-) w komórkach nacieku, (+) w nabłonku przewodu najądrza; Mac 387 brak odczynu w preparacie; CD 68 brak odczynu w preparacie; Ki 67 brak odczynu w preparacie. Stężenie E2 w surowicy wynosiło 175 pg/ml, stężenie FT w surowicy wynosiło 85 pg/ml.

Tab. 1. Średnie wartości oceny morfometrycznej stopnia rozrostu tkanki łącznej najądrza dorosłych samców żubrów ($\bar{x} \pm SD$)

Nr żubra	Rozrost tkanki łącznej (μm)		
	$\bar{x} \pm SD$	min.	max.
Badany 1043	163,14 \pm 73,11	49,44	438,6
Kontrolny B1	70,86 \pm 27,1	19,39	115,6
Kontrolny F2	49,72 \pm 32,1	9,12	77,4

Objaśnienia: Nr 1043 – 13-letni samiec żubra z diagnozowaną zmianą w najądrzu; B1 i F2 – dwa dorosłe samce żubra z prawidłową budową najądrzy



Ryc. 5. Najądrze 13-letniego żubra. Dodatni odczyn na vimentynę w komórkach nacieku oraz w komórkach mięśniowych gładkich przewodu najądrza. W komórkach nacieku produkt reakcji o charakterze ziarnistym nierównomiernie wypełnia cytoplazmę komórki, przy czym natężenie reakcji jest różne, w jednych komórkach odczyn jest silny, w innych średni. W komórkach mięśniowych gładkich przewodu najądrza odczyn jest słaby, zlokalizowany w cytoplazmie. Pow. 200 ×

Masa ciała i masa jąder badanego żubra nie różniła się od masy innych osobników będących w tym samym wieku (powyżej 12. roku) (3, 7). Natomiast stężenie wolnego testosteronu w surowicy tego zwierzęcia osiągnęło wysoką wartość w porównaniu do innych starych żubrów (2). Być może przejawiana przez żubra agresja była następstwem wysokich stężeń FT, będącego czynną frakcją testosteronu. Natomiast stężenie 17β -estradiolu w surowicy nie odbiegało od wartości stężeń tego hormonu u innych starych zwierząt tego gatunku (dane nie publikowane).

Zmiany histopatologiczne stwierdzone w najądrzu trzynastoletniego żubra miały charakter wytwórczy, rozwijały się w procesie przewlekłego zapalenia. Świadczą o tym widoczne w preparatach komórki plazmatyczne, których obecność potwierdzono barwieniem metodą Bracheta. Rozrost tkanki łącznej zrębu najądrza również przemawiał za przewlekłym zapaleniem wytwórczym. Identyfikacja ognisk nietypowych dla struktur najądrza żubra oparta na metodach barwienia histologicznego nastęrcza trudności. Immunohistochemiczna ocena opisanych skupisk komórek w najądrzu nie dała wiążących rozstrzygnięć odnośnie do ich charakteru. Dodatni wynik barwienia w kierunku wykrycia receptorów wimentyny pozwolił jedynie na przypuszczenie, że komórki te mają pochodzenie mezenchymatyczne, jednakże wygląd struktur w postaci zespołu komórek o wyglądzie epitelioidnym wyraźnie wskazuje na mikroziarniniaki utworzone przez komórki nabłonkowe. Te przekształcone makrofagi nie zachowują markerów charakterystycznych dla osiadłych makrofagów, takich jak CD 68 czy Mac 387 (14, 16). O właściwościach żernych badanych komórek może świadczyć obecność plemników w obszarze badanych ognisk. Prawdopodobne jest, że pod wpływem nieznanego czynnika zapaleniotwórczego doszło do uszkodzenia kanalików najądrza i ich fagocytozy. Możliwe jest również niszczenie kanalików najądrza przez białka komórek nabłonkowych, na skutek czego nastąpiło przemieszczenie plemników do zrębu najądrza (11). Nieznany jest czynnik, który spowodowałby tego typu zmiany. Potencjalnym patogenem, który u przeżuwaczy wywołuje zmiany w jądrze i najądrzu, jest *Brucella abortus*. Dotychczasowe badania mające na celu wykrycie zakażenia tą bakterią wykluczają jednak jej udział w patogenezie chorób u żubrów w Polsce (5), a zatem pochodzenie zmian, które stwierdzono w najądrzu pozostanie nieznane, lecz pewny jest ich charakter wytwórczy.

Piśmiennictwo

1. Czykier E.: The case of left cryptorchid testis in the European bison – histological and morphometric description. Med. Weter. 2011, 67, 774-777.
2. Czykier E., Krasieńska M.: Stężenia wolnego testosteronu w surowicy samców żubra (*Bison bonasus*) w zależności od wieku, masy ciała i masy jąder – badanie wstępne. Parki Nar. Rez. Przyr. 2006, 25, 119-131.
3. Czykier E., Sawicki B., Krasieńska M.: Postnatal development of the European bison spermatogenesis. Acta Theriol. 1999, 44, 77-90.
4. Gill J.: Zarys fizjologii żubra. Wyd. Severus. Warszawa 1999, 42-60.

5. Kita J., Anusz K.: Serologic survey for bovine pathogens in free-ranging European bison from Poland. J. Wildl. Dis. 1991, 27, 16-20.
6. Koziorowski M., Seremak B., Giżewski Z., Gilu P., Kozioł K., Kowal E., Jagustyn B., Sulik M., Szeleszczuk O., Olech W., Söderquist L., Głogowski J.: Season controlled reproduction of undomesticated animals. Reprod. Biol. 2006, 6, 137-149.
8. Krasieńska M., Krasieński Z. A.: European bison. The Nature Monograph. Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Białowieża 2007, 1-317.
7. Krasieńska M., Giżewski Z., Czykier E., Krasieński Z. A., Matuszewska M.: Changes of weight and size of European bison testes during postnatal development. Acta Theriol. 2009, 54, 111-126.
9. Krasieńska M., Krasieński Z. A.: Przebieg i dyspersja choroby nekrotycznego zapalenia napletka samców żubra na terenie polskiej części Puszczy Białowieskiej. Parki nar. Rez. Przyr. 2010, 29, 107-128.
10. Krasieński Z. A., Cabań-Raczyńska K., Krasieńska M.: Immobilizing and marking of the European bison. Acta Theriol. 1982, 27, 181-190.
11. Madej J. A.: Zapalenie – przekroczenie kompetencji obronnych. Med. Weter. 2010, 66, 156-161.
12. Matuszewska M., Sysa P.: Epididymal cysts in European bison. J. Wildl. Dis. 2002, 38, 637-640.
13. Matuszewska M., Sysa P.: Epididymal defects in European bison. Folia Morphol. 2001, 60, Suppl. 145.
14. Pedica F., Pecori S., Vergine M., Brunelli M., Montagna L., Parolini C., Daniele L., Capelli P., Menestrina F., Chilosi M.: Cathepsin-k as a diagnostic marker in the identification of micro-granulomas in Crohn's disease. Pathologica. 2009, 101, 109-111.
15. Piusiński W., Bielecki W., Malicka E., Kita J., Dziąba K., Osińska B., Anusz K., Kowalski B., Lenartowicz-Kubrat Z.: Pathomorphology and pathogenesis of diseased genital organs (prepuce and penis) of bison in the Białowieża Forest. Med. Weter. 1997, 53, 596-600.
16. Reghelin D., Poletti V., Tomassett S., Dubini A., Cavazza A., Rossi., Lestani M., Pedron S., Daniele I., Montagna L., Murer B., Chilosi M.: Cathepsin-K is a sensitive immunohistochemical marker for detection of micro-granulomas in hypersensitivity pneumonitis. Sarcoidosis Vasc. Dif. 2010, 27, 57-63.
17. Sysa P., Matuszewska M.: Cytogenetic, ultrastructure of seminiferous tubules and epididymal cysts in European bison *Bison bonasus* (L.), [w:] Kita J., Anusz K.: Health threats for the European bison particularly in free-roaming populations in Poland. The SGGW Publishers, Warszawa 2006, 244-249.
18. Świeżyński K.: The male reproduction organs of the European bison. Acta Theriol. 1968, 13, 511-551.
19. Węgrzyn M., Serwatka S.: Teeth eruption in the European bison. Acta Theriol. 1984, 29, 111-121.

Adres autora: dr med. Elżbieta Czykier, ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok; e-mail: czykier@umwb.edu.pl