



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Mgr Barbara Kruszyńska

**Analiza mikrostrukturalna brodawek smakowych u wybranych
gatunków przeżuwaczy (*Ruminantia*), zajęczaków (*Lagomorpha*)
i zwierząt drapieżnych (*Carnivora*)**

The microstructural analysis of gustatory papillae in selected species
of ruminants (*Ruminantia*), lagomorphs (*Lagomorpha*)
and carnivores (*Carnivora*)

Część I

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie Nauki biologiczne
Doctoral dissertation in the field of biology
in the discipline of Biological Sciences

Promotor:

Prof. dr hab. Hanna Jackowiak
Pracownia Histologii i Embriologii Zwierząt
Katedra Fizjologii Biochemii i Biostruktury
Zwierząt

Promotor pomocniczy:

Dr hab. Kinga Skiersz-Szewczyk
Pracownia Histologii i Embriologii Zwierząt
Katedra Fizjologii Biochemii i Biostruktury
Zwierząt

Poznań, 2024

*Chciałabym złożyć najserdeczniejsze podziękowania
Pani Promotor prof. dr hab. Hannie Jackowiak
za pomoc na każdym etapie studiów doktoranckich,
za wsparcie, zaangażowanie, cierpliwość, wyrozumiałość
i cenne, merytoryczne uwagi w trakcie powstawania niniejszej pracy i całych studiów.*

*Serdecznie dziękuję za pomoc promotorowi pomocniczemu
dr hab. Kindze Skieresz-Szewczyk
za wsparcie na każdym etapie kształtowania się niniejszej pracy,
za cenne rady i dobre słowo w trudniejszych chwilach.*

*Podziękowania kieruję również do pozostałych członków zespołu
Pracowni Histologii i Embriologii Zwierząt:
dr Eweliny Basińskiej oraz Pani Katarzyny Jackowiak
za ciepłe słowa wsparcia i gotowość do pomocy na każdym etapie badań.*

*Dziękuję moim rodzicom, teściom, rodzeństwu oraz mężowi
za pomoc w codziennych trudnościach,
wyrozumiałość, cierpliwość oraz niegasnącą wiarę we mnie.*

Dla męża i córki

Spis treści

Wykaz skrótów używanych w tabelach i rycinach.....	1
Streszczenie w języku polskim	3
Streszczenie w języku angielskim	4
1. Wstęp.....	5
2. Hipoteza badawcza i cele pracy	14
3. Materiały i metody	15
3.1. Materiał badawczy.....	15
3.2. Metody badawcze	16
3.2.1. Utrwalenie materiału, obserwacje makroskopowe oraz przygotowanie prób badawczych do dalszych procedur badań mikroskopowych	16
3.2.2. Przygotowanie preparatów histologicznych do obserwacji w mikroskopie świetlnym.....	17
3.2.3. Przygotowanie modeli trójwymiarowych brodawek smakowych i znakowanie ich trzonów łącznotkankowych oraz kubków smakowych.....	18
3.2.4. Analiza morfometryczna brodawek smakowych badanych gatunków ssaków.....	20
3.2.5. Przygotowanie prób tkankowych do obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym	21
3.2.6. Przygotowanie prób tkankowych do obserwacji trzonów łącznotkankowych brodawek smakowych w skaningowym mikroskopie elektronowym	21
4. Wyniki	23
4.1. Obserwacje makroskopowe języka bydła, żubra europejskiego i żubronia	24
4.2. Obserwacje mikroskopowe brodawek grzybowatych bydła, żubra europejskiego i żubronia.....	24
4.2.1. Powierzchnia grzbietowa wierzchołka języka	24
4.2.2. Powierzchnia brzuszna wierzchołka języka.....	26
4.2.3. Powierzchnia grzbietowa trzonu języka	27

4.2.4. Powierzchnia grzbietowa środkowej części wału języka	29
4.2.5. Powierzchnia grzbietowa tylnej części wału języka	30
4.2.6. Powierzchnie boczne wału języka	32
4.3. Obserwacje makroskopowe języka królika europejskiego, królika domowego i zająca szaraka	33
4.4. Obserwacje mikroskopowe brodawek grzybowatych na języku królika europejskiego, królika domowego i zająca szaraka	33
4.4.1. Powierzchnia grzbietowa wierzchołka języka	33
4.4.2. Powierzchnia brzuszna wierzchołka języka	35
4.4.3. Powierzchnia grzbietowa trzonu języka	37
4.4.4. Powierzchnie boczne wyniosłości językowej	38
4.5. Obserwacje mikroskopowe brodawek okolonych na języku królika europejskiego, królika domowego oraz zająca szaraka	40
4.6. Obserwacje mikroskopowe brodawek liściastych królika europejskiego, królika domowego oraz zająca szaraka	43
4.7. Obserwacje makroskopowe języka kota domowego	45
4.8. Obserwacje mikroskopowe brodawek grzybowatych kota domowego	45
4.8.1. Krawędź wierzchołka języka oraz powierzchnia grzbietowa wierzchołka języka	45
4.8.2. Przednio-boczna część trzonu języka	47
4.8.3. Tylne części trzonu języka	48
4.9. Obserwacje mikroskopowe brodawek okolonych na języku kota domowego	50
4.10. Obserwacje makroskopowe języka psa domowego	51
4.11. Obserwacje mikroskopowe brodawek grzybowatych na języku psa domowego	52
4.11.1. Krawędź języka oraz powierzchnia grzbietowa wierzchołka języka	52
4.11.2. Przednia część trzonu języka	53
4.11.3. Tylne części trzonu języka	54

4.12. Obserwacje mikroskopowe brodawek okolonych na języku psa domowego ...	56
4.13. Obserwacje mikroskopowe brodawek liściastych na języku psa domowego ...	57
5. Dyskusja	59
5.1. Omówienie wyników badań grzybowatych brodawek językowych trzech gatunków przeżuwaczy, tj. bydła, żubra europejskiego i żubronia	59
5.2. Omówienie wyników badań mikrostruktury smakowych brodawek językowych trzech gatunków zajęczaków, tj. królika europejskiego, królika domowego i zająca szaraka ...	68
5.3. Omówienie wyników badań smakowych brodawek językowych kota domowego	79
5.4. Omówienie wyników badań smakowych brodawek językowych psa domowego	85
6. Wnioski	94
7. Literatura	97
8. Spis załączników	109

Wykaz skrótów używanych w tabelach i rycinach

Ap	- wierzchołek języka
ApD	- grzbietowa powierzchnia wierzchołka języka
Al	- powierzchnia przednio-boczna trzonu języka kota
ApV	- powierzchnia brzuszna wierzchołka języka
B	- trzon języka
Ba	- CTC typ balonowaty
Co	- brodawki stożkowe
CTC	- trzon łącznotkankowy
D	- przewód limfatyczny
Ep	- nabłonek wielowarstwowy płaski
EpR	- wał nabłonkowy
Exd	- przewody wyprowadzające gruczołów języka
F	- bruzda brodawkowa w brodawkach okolonych i liściastych
Fi	- brodawki nitkowate
Fl	- fałd błony śluzowej brodawki liściastej
Fo	- brodawki liściaste
Fu	- brodawki grzybowate
G	- CTC typ grzybowaty
gFi	- brodawki nitkowate większe, zęby rogowe języka kota domowego
IE	- nabłonek międzybrodawkowy
K	- CTC typ kolumnowy
L	- blaszki boczne trzonów łącznotkankowych brodawek liściastych
LM	- mikroskopia świetlna
Lp	- wał języka przeżuwaczy, wyniosłość języka zajęczaków
Lym	- limfocyty
M	- blaszka środkowa trzonu łącznotkankowego brodawek liściastych
Ma	- CTC typ maczugowaty
Ms	- bruzda pośrodkowa
Op	- otwory przewodów wyprowadzających gruczołów surowiczych
P	- CTC typ pąkowaty
Pb	- trzon brodawki okolonej
Pl	- powierzchnia tylna-boczna trzonu języka
Plc	- CTC typ palczasty

- Pm** - powierzchnia tylna-pośrodkowa trzonu języka
- Pr** - wał brodawki okolonej
- R** - korzeń języka
- S** - CTC typ stożkowaty
- T** - krawędź wierzchołka języka
- SEM** - skaningowa mikroskopia elektronowa
- sFi** - brodawki nitkowate mniejsze kota domowego
- Sg** - gruczoły surowicze
- Tb** - kubki smakowe
- Vp** - brodawki okolone

Streszczenie

Tematem niniejszej pracy była analiza mikrostrukturalna brodawek smakowych u wybranych gatunków przeżuwaczy, zajączaków i zwierząt drapieżnych. Na próbkach pobranych z poszczególnych części języków ośmiu gatunków ssaków, tj. bydła, żubra europejskiego, żubronia, królika europejskiego i domowego, zająca szaraka oraz psa i kota domowego wykonano analizy w zakresie mikroskopii świetlnej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej, w tym zastosowano metodę maceracji chemicznej do wizualizacji trzonów łącznotkankowych brodawek. W pracy wykorzystano po raz pierwszy u ssaków komputerową metodę tworzenia modeli 3D poszczególnych brodawek smakowych z przestrzennym obrazowaniem trzonów łącznotkankowych i kubków smakowych.

Wyniki badań jakościowych i ilościowych rozmieszczenia i budowy makro- i mikroskopowej brodawek smakowych badanych gatunków wskazały zróżnicowanie mikrostruktury brodawek smakowych i ich kubków smakowych w grupach pokarmowych ssaków. Charakterystyka rozmieszczenia brodawek smakowych wykazała różnice między grupą zwierząt roślinożernych i mięsożernych, przy specyfice gatunkowej dotyczącej poszczególnych części języka. Analiza modeli 3D trzonów łącznotkankowych brodawek smakowych wykazała zmienność rodzajów, przy czym w brodawkach grzybowatych wyznaczono aż siedem morfologicznie różnych rodzajów trzonów łącznotkankowych, występujących w zmiennej konfiguracji w poszczególnych częściach języka. Modelowanie 3D dało sposobność porównania rozmieszczenia kubków smakowych w brodawkach smakowych, które były równomiernie rozproszone, ułożone w pasma, rzędy i/lub skupione w grupy. Możliwość ustalenia liczby kubków smakowych w pojedynczej brodawce w poszczególnych częściach języka pokazała zróżnicowanie zakresu całkowitej liczebności kubków w badanych grupach pokarmowych, a także u gatunków dziko żyjących wobec udomowionych. Charakterystyka rozmieszczenia oraz cech jakościowych i ilościowych mikrostruktury brodawek smakowych badanych zwierząt pozwoliła na wyróżnienie dwóch obszarów języków o zwiększonej percepcji smaku, tj. obszaru preselekcji pokarmu na wierzchołku języka i obszaru analizy chemicznej rozdrobnionego pokarmu w tylnej części trzonu języka.

Wyniki potwierdziły efektywność zastosowanej techniki modelowania 3D w badaniach mikrostrukturalnych brodawek smakowych ssaków, która może być przydatna w dalszych badaniach narządu smaku ssaków w warunkach normy i patologii badanych zwierząt.

Abstract

The subject of this work was the microstructural analysis of taste buds in selected species of ruminants, lagomorphs and carnivores. On samples taken from individual parts of tongues of eight species of mammals, i.e. cattle, European bison, *Bison bonasus* hybrid, European and domestic rabbit, hare as well domestic cat and dog, analyses were performed in the light microscopy and scanning electron microscopy, including the use of chemical maceration method for visualization of connective tissue cores of the papillae. In this work, for the first time in mammals, a computer-aided method was used to create 3D models of individual gustatory papillae with spatial imaging of connective tissue cores and taste buds.

The results of qualitative and quantitative studies of the distribution and macro- and microscopic structure of gustatory papillae of the studied species indicated the diversity of the microstructure of the papillae and their taste buds in the feeding groups of mammals. The characteristics of the distribution of gustatory papillae showed differences between herbivores and carnivores, with species specificity concerning individual parts of the tongue. The analysis of 3D models of connective tissue cores of gustatory papillae showed the variability of types, with as many as seven morphologically different types of connective tissue cores in fungiform papillae, occurring in a variable configuration in individual tongue parts. The 3D modeling provided an opportunity to compare the distribution of taste buds in gustatory papillae that were evenly dispersed, arranged in bands, rows and/or clustered in groups. The possibility of determining the number of taste buds in a single papilla in individual parts of the tongue showed the differentiation of the range of the total number of taste buds in the studied feeding groups, as well as in wild species versus domesticated ones. The characteristics of the distribution and qualitative and quantitative features of the microstructure of gustatory papillae in the studied animals allowed to distinguish two areas of tongues with increased taste perception, i.e. the food preselection area at the lingual apex and the area of chemical analysis of crushed food in the posterior part of the lingual body.

The results confirmed the effectiveness of the 3D modeling technique used in microstructural studies of mammalian gustatory papillae, which may be useful in further studies of the mammalian taste system in normal and pathological conditions of the studied animals.

1. Wstęp

Język ssaków jest ważnym narządem jamy ustnej, który funkcjonalnie jest związany z procesami pobierania pokarmu, jego obróbki mechanicznej i analizy sensorycznej. Ocena chemiczna przyjmowanego pokarmu ssaków odbywa się na języku w wyspecjalizowanych brodawkach smakowych, które są zbudowane z trzonu łącznotkankowego blaszki właściwej błony śluzowej, zawierającego rozbudowane sieci naczyń włosowatych i włókien nerwowych oraz śródnabłonkowych kubków smakowych z licznymi komórkami receptorowymi. Liczne badania anatomiczne i mikroskopowe języka, prowadzone u gatunków należących do wielu rzędów ssaków, wskazują, że morfologia języka oraz rozmieszczenie i mikrostruktura mechanicznych i smakowych brodawek językowych kształtowały się w zależności od rodzaju diety, mechanizmów przyjmowania pokarmu oraz warunków środowiskowych (Dasgupta i in. 1993, Pastor i in. 1993, Kobayashi i in. 2003, Jackowiak i in. 2004b, Kobayashi i in. 2004, Kumar i Bate 2004, Jackowiak i Godynicki 2005, Jackowiak 2006, Kurtul i Atalgin 2008, Nonaka i in. 2008, Jackowiak i in. 2009a, Jackowiak i in. 2009b, Yoshimura i in. 2009a, Sari i in. 2010, Mahabady i in. 2010, Shao i in. 2010, Emura i in. 2012, Emura i El-Bakary 2014, Ding i in. 2016, El-Bakary i Abumandour 2017, Jackowiak i in. 2017b, Emura 2018a i b).

Języki ssaków są wydłużonym narządem o płaskiej powierzchni z zaokrąglonym lub spiczastym wierzchołku języka, który w ok. 1/3 długości jest przytwierdzony do dna jamy ustnej za pomocą wędzidełka języka (Jackowiak i in. 2004b, Dyce i in. 2010, Toprak i Ulusoy 2011, Jackowiak i in. 2017b, Wannaprasert i in. 2020). Cechą charakterystyczną języka zwierząt roślinożernych jest wyniesienie mięśniowe tylnej części trzonu języka zwane wałem języka lub wyniosłością językową, służące funkcjonalnie, wraz z uzębieniem, do rozcierania przyjmowanego pokarmu lub jak u przeżuwaczy także podczas ponownego rozcierania pokarmu, który jest odłykany z żwacza (Dyce i in. 2010). Na powierzchni grzbietowej języka ssaków roślinożernych i niektórych gatunków ssaków mięsożernych występuje bruzda pośrodkowa języka, biegnąca przez całą długość języka, lub widoczna tylko na wierzchołku i trzonie języka (Iwasaki i Sakata 1985, Jackowiak i Godynicki 2005, Toprak i Ulusoy 2011, Jackowiak i in. 2017b, Mahdy i in. 2020). W błonie śluzowej brzusznej powierzchni języka zwierząt mięsożernych występuje, ułożona pośrodkowo, wrzecionowata struktura, która jest zbudowana z tkanki włóknistej, mięśniowej i tłuszczowej i nazywana lyssą (Ellenport 1975; Besoluk i in. 2006). U gatunków należących do rodziny kotowatych, w przedniej części trzonu języka

znajduje się charakterystyczne podłużne pasmo silnie zrogowaciałych brodawek nitkowatych większych, nazwanych potocznie „zębami rogowymi”, które służą do wyczesywania sierści (Crouch 1969; Kobayashi i in. 1988; Dyce i in. 2010; Emura i in. 2004; Toprak i Ulusoy 2011; Emura i in. 2014; Emura 2018a; Emura 2018b; Freire i in. 2019).

Na powierzchni błony śluzowej języka większości ssaków tj. torbaczy, gryzoni drapieżnych, świniowatych, koniowatych i naczelnych, wyróżnia się trzy typy smakowych brodawek językowych, czyli brodawki grzybowate, brodawki okolone i brodawki liściaste, którym na wierzchołku i trzonie języka towarzyszą mechaniczne brodawki nitkowate, a w pozostałej tylnej części języka są otoczone przez brodawki stożkowate (Kobayashi i in. 2003, Kobayashi i in. 2004, Kumar i Bate 2004, Jackowiak i Godynicki 2005, Nonaka i in. 2008, Jackowiak i in. 2009a, Yoshimura i in. 2009a, Dyce i in. 2010, Jackowiak i in. 2017a).

U nietoperzy, zwierząt owadożernych niektórych gatunków zwierząt drapieżnych i przeżuwaczy na języku występują jedynie brodawki grzybowate i okolone (Dasgupta i in. 1990, Pastor i in. 1993, Jackowiak 2006, Kurtul i Atalgin 2008, Jackowiak i in. 2009b, Sari i in. 2010, Mahabady i in. 2010, Shao i in. 2010, Emura i in. 2012, Emura i El-Bakary 2014, Ding i in. 2016, El-Bakary i Abumandour 2017, Jackowiak i in. 2017b, Emura 2018a i b). Z kolei u hipopotama nilowego Yoshimura i in. (2009b) stwierdzili brak brodawek okolonych. Występowanie brodawek liściastych na języku ssaków, w tym szczególnie zwierząt drapieżnych, jest nadal przedmiotem kontrowersji z uwagi na ich niewielkie rozmiary i okoliczne pofałdowania błony śluzowej. Generalnie uważa się, że brodawki liściaste nie występują na języku zwierząt należących do rodziny kotowatych, z kolei są obecne u psowatych. Niektóre badania przeprowadzone u kotów domowych, panter mglistych i manuli stepowych wykazują obecność tych brodawek, przy czym te ogólne badania dotyczyły pojedynczych okazów zwierząt (Haddad i in. 2019, Goździewska-Harłajczuk i in. 2023, Ibrahim i in. 2024). Z kolei niektóre doniesienia naukowe o języku psa domowego i innych gatunków psowatych nie odnotowują obecności brodawek liściastych (Holliday 1940, Iwasaki i Sakata 1985, Yoshimura i in. 2009a, Emura i Sugiyama 2014, El-Bakary i Emura 2016).

Brodawki grzybowate, jako najliczniejsze brodawki smakowe są rozmieszczone na grzbietowej powierzchni wierzchołka i trzonu języka, aż do obszaru brodawek okolonych. Najczęściej opisuje się ich równomierne rozproszenie wśród brodawek nitkowatych, ale miejscowo np. na wierzchołku języka wykazują gatunkowo specyficzne

skupienia (Chamorro i in. 1994, Jackowiak i in. 2004a i b, Zheng i Kobayashi 2006, Jackowiak i in. 2009a, Harem i in. 2011, Erdogan i Perez 2014, Jackowiak i in. 2017b, Plewa i Jackowiak 2020). U zwierząt roślinożernych brodawki grzybowate obserwowano również na powierzchni wału języka (Chamorro i in. 1994, Pfeiffer i in. 2000, Jackowiak i Godynicki 2004b, Emura i in. 2004, Emura i in. 2006, Jabbar 2014, Shao i in. 2010, Ciena i in. 2019, Jackowiak i in. 2017b, Haligur i in. 2019, Goździewska-Harłajczuk i in. 2023).

Rozmieszczenie i liczba brodawek okolonych ssaków są gatunkowo specyficzne. Przeżuwacze posiadają największą liczbę tych brodawek wśród badanych dotąd ssaków, dochodzącą nawet do kilkudziesięciu. Brodawki okolone znajdują się po prawej i lewej stronie tylnej części wału języka i są ułożone w 2-3 rzędy. Z kolei u pozostałych zwierząt roślinożernych czyli m.in. u gryzoni, zajęczaków, koniowatych, jedna do trzech brodawek okolonych są zlokalizowane liniowo i pośrodkowo na granicy między tylną powierzchnią wału języka i korzeniem języka (Kobayashi i in. 1983, Pfeiffer i in. 2000, Jackowiak i Godynicki 2005, Nonaka i in. 2008, Abumandour i El-Bakary 2013, Menezes i in. 2013, Reginato i in., 2014, Shao i in. 2010, Al-Mahmodi 2016, Jackowiak i in. 2017b, Wannaprasert 2018, Wannaprasert i in. 2020, Mahdy i in. 2020). Z kolei liczba brodawek okolonych zwierząt mięsożernych waha się od 4 do 9, a uwagę zwraca ich symetryczne rozmieszczenie na planie odwróconej litery V (Crouch 1969; Jackowiak i Godynicki 2004a; Guimaraes et al. 2007; Jackowiak et al. 2009a; Yoshimura et al. 2009a, Goździewska-Harłajczuk i in. 2023). Brodawki liściaste występują pojedynczo po prawej i lewej stronie tylnobocznej powierzchni języka ssaków (Liu i Lee 1982, Kobayashi i in. 1983, Silva i in. 2002, Jackowiak i Godynicki 2004a, Jackowiak i Godynicki 2005, Kulawik i Godynicki 2006, Shindo i in. 2006, Nonaka i in. 2008, Abumandour i El-Bakary 2013, Reginato i in. 2014, Al-Mahmodi 2016, Ciena i in. 2019).

Badania nad mikrostrukturą brodawek smakowych ssaków opierają się głównie na obserwacjach przekrojów histologicznych w mikroskopie świetlnym (LM) oraz analizach obrazu reliefu powierzchniowego brodawek lub wewnętrznych struktur łącznotkankowych (ang. *connective tissue cores* - CTC) w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM). Brodawki grzybowate opisuje się jako owalne lub okrągłe w zarysie struktury o wypukłej lub płaskiej powierzchni grzbietowej. Brodawki te mogą być wyniesione ponad błonę śluzową języka, czy też wyrostki brodawek mechanicznych lub zagłębione w międzybrodawkowym nabłonku wielowarstwowym płaskim, jak np. na wale języka przeżuwaczy (Kobayashi i in. 2003, Zheng i Kobayashi 2006, Kurtul

i Atalgin 2008, Jackowiak i in. 2009a, Yoshimura i in. 2009a, Ding i in. 2016, Haligur i in. 2018, Plewa i Jackowiak 2020). Brodawki grzybowate zbudowane są z pojedynczego trzonu łącznotkankowego blaszki właściwej błony śluzowej, który pokrywa nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący, zawierający kubki smakowe rozmieszczone na powierzchni brodawek (Ross i in. 1995, Samuelson 2007, Dyce i in. 2010). Struktura trzonu łącznotkankowego brodawek ujawniona w badaniach mikroskopowych po procesie maceracji chemicznej elementów komórkowych jest zmienna, a jego kształty są opisywane u ssaków jako palczasty (ang. *finger-like*), balonowaty (ang. *balloon-like*), kolumnowy (ang. *columnar-like*), pąkowaty (ang. *bud-like*), stożkowaty (ang. *cone-like*), maczugowaty (ang. *club-like*) lub grzybowaty (ang. *mushroom-like*), w kształcie kwiatu (ang. *flower-like*), kalafiora (ang. *cauliflower-like*), lub szyszki sosnowej (ang. *pine-cone-like*) (Kobayashi 1997, Kobayashi i in. 2003, Kobayashi i in. 2004, Kobayashi i in. 2005, Zheng i Kobayashi 2006, Nonaka i in. 2008, Yoshimura i in. 2009a, Yoshimura i in. 2009b).

Brodawki okolone są zbudowane z trzonu brodawki oraz wału brodawki, oddzielonych bruzdą brodawki. Okrągły lub owalny w zarysie trzon brodawki charakteryzuje się płaską lub pofałdowaną powierzchnią, natomiast zwykle szeroki i masywny łącznotkankowy wał jest ciągły lub zbudowany z brodawek mechanicznych stożkowatych (Chibuzo 1979, Pfeiffer i in. 2000, Emura i in. 2006, Shindo i in. 2006, El-Sharaby i in. 2014, Shao i in. 2010, Mahdy i in. 2020). Śródnabłonkowo położone kubki smakowe występują w nabłonku bocznych powierzchni trzonu i/lub powierzchni wału brodawek okolonych. U niektórych badanych gatunków kubki smakowe mogą występować poza obszarem bruzdy brodawki, także na powierzchni trzonu (El-Sharaby i in. 2014).

Brodawki liściaste ssaków zbudowane są ze zmiennej liczby, najczęściej równolegle ułożonych fałdów błony śluzowej brodawki, co często stanowi specyfikę gatunkową (Jackowiak i Godynicki 2005, Emura i in. 2006, Shindo i in. 2006, Emura i in. 2007, Jackowiak i in. 2009a, Haligur i in. 2019). Pojedynczy fałd brodawki, zwany liściem, jest zbudowany z trzonu łącznotkankowego, który na swoim przebiegu od podstawy dzieli się na 2-3 podłużne blaszki kolagenowe pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim, którego rogowacenie jest cechą zmienną. Liczne kubki smakowe najczęściej występują na obu bocznych powierzchniach każdego fałdu brodawki, jednakże sposób ich rozmieszczenia, podobnie jak w przypadku brodawek okolonych, nie był dotąd przedmiotem badań (Liu i Lee 1982, Kobayashi i in. 1983, Silva

i in. 2002, Jackowiak i Godynicki 2005, Kulawik i Godynicki 2006, Shindo i in. 2006, Nonaka i in. 2008, Abumandour i El-Bakary 2013, Reginato i in. 2014, Al-Mahmodi 2016, Ciena i in. 2019).

Cechą charakterystyczną brodawek smakowych ssaków jest posiadanie skupionych kubków smakowych, czyli struktur wyspecjalizowanych w odbiorze bodźców smakowych. Kubki smakowe ssaków stanowią skupienia od 50 do 150 komórek, wśród których wyróżnia się cztery podstawowe typy: komórki typu I, II, III oraz IV (Farbman i in. 1985, Barlow 2015, Roper i Chaudhari 2017). Komórki typu I, z uwagi na posiadane wypustki cytoplazmatyczne w części przynadstawnej, otaczające komórki typu II oraz III są nazywane komórkami glejopodobnymi lub podporowymi i charakteryzują się aktywnością fagocytarną oraz wydzielniczą. Komórki typu II należą do wyspecjalizowanych komórek receptorowych kubków smakowych, które posiadają receptory błonowe dla odbioru smaku słodkiego, gorzkiego oraz umami. Komórki te są ułożone na peryferyjnych częściach kubka smakowego. Komórki typu III są określane jako komórki presynaptyczne ze względu na ich połączenie z śródbłonkowym włóknem nerwowym, a ich cechą jest posiadanie kanałów błonowych dla percepcji smaku kwaśnego i/lub słonego. Ostatni, IV typ komórek w kubkach smakowych stanowią komórki macierzyste, które występują w bazalnej części kubka smakowego.

Jak wskazują badania, pojedynczy kubek smakowy odbiera więcej niż jeden bodziec smakowy, ponieważ w swojej strukturze zawiera komórki receptorowe o zróżnicowanej specyfice, koniecznej do kompleksowej analizy sensorycznej pobieranego pokarmu, ale co ważne ostrzegania przed ewentualnym spożyciem substancji toksycznych (Chandrashekar i in. 2006, Reed i Knaapila 2010).

Podstawowe smaki, odbierane w komórkach receptorowych określa się jako smak słodki, słony, kwaśny, gorzki oraz umami. Jak dotąd najwięcej badań molekularnych i genetycznych dotyczy receptorów smaku słodkiego oraz gorzkiego (Adler i in. 2000, Nelson i in. 2001, Tabata i in. 2003, Li i in. 2005, Li i in. 2006, Reed i Knaapila 2010, Ferreira i in. 2016, Lossow i in. 2016). W ostatnich latach określa się dwie nowe kategorie smaków o nazwie kokumi oraz fat taste, gdzie smak kokumi określa wzmacnianie odczuć podczas spożywania posiłku i jest związany z substancjami będącymi pochodnymi kwasu glutaminowego, natomiast fat taste wiąże się reakcją osobnych receptorów podczas kontaktu z kwasami tłuszczowymi (Dransfield 2008, Laffitte i in. 2021). Generalnie przyjmuje się, że ssaki odczuwają każdy z wymienionych powyżej podstawowych smaków. Jedynie u kotów w konsekwencji mutacji genu *Tas1R2*, będącego pseudogenem,

następuje utrata zdolności odczuwania smaku słodkiego. Najnowsze badania zmysłu smaku kotów wykazały możliwość odczuwania smaku umami i kokumi, które odgrywają ważną rolę w atrakcyjności związków pochodzenia mięsnego dla kotów z uwagi na obecność nukleotydów, aminokwasów i peptydów (Li i in. 2005, Laffitte i in. 2021; McGrane i in. 2023).

Badania behawioralne, ale również genetyczne i molekularne przeprowadzone w ostatnich latach u ssaków dostarczają interesujących informacji o różnicach w sposobie odbioru i intensywności odbieranych wrażeń smakowych zwierząt. Ginane i in. (2011) wskazała, że bydło posiada mniej genów kodujących smak gorzki, w porównaniu z innymi ssakami, co sprawia, że są bardziej tolerancyjne względem niego. Ponadto wykazano, że przeżuwacze najchętniej reagują na bodźce smakowe związane ze smakiem umami. Reakcje na smak słodki u bydła i kóz są pozytywne, ale negatywne u owiec, które okazały się być z kolei bardzo wrażliwe na smak gorzki. Neurofizjologiczne badania przeprowadzone przez Anderssona i in. (1950) analizujące reakcje nerwu językowego psów, zwłaszcza w kontekście odbioru smaku słodkiego, po stymulacji nerwu roztworami związków słodkich o różnych stężeniach, wskazały, że kubki smakowe na wierzchołku języka były najbardziej wrażliwe na smak słony, a percepcja słodczy była typowa dla kubków smakowych trzonu języka, z kolei reakcja na smak kwaśny była obserwowana równomiernie na całej powierzchni języka. Kurihara (2020) opisał u psa, że percepcja smaku umami jest podobna jak u ludzi, co może być cechą adaptacyjną w procesie udomowienia.

Obiektem badań mikroskopowych brodawek smakowych w niniejszej pracy było osiem gatunków zwierząt o zróżnicowanej przynależności taksonomicznej, które charakteryzują różne typy diety i warunków środowiskowych.

Pierwszą grupę badanych zwierząt stanowiły trzy gatunki zwierząt roślinożernych przeżuwających, czyli dziko żyjący żubr europejski (*Bison bonasus*), udomowione bydło (*Bos taurus*), oraz ich hybryda - żubroń (*Bison bonasus* hybrid). Badane gatunki przeżuwaczy należą do zwierząt trawożernych, jednakże w przypadku żubra europejskiego, skład diety jest uzależniony od pór roku, i tak w okresie letnim w diecie przeważają soczyste trawy, a w sezonie zimowym trawa zastępowana jest sianem oraz bardziej zdrewniałymi częściami roślin. Z uwagi na fakt, że bydło jest zwierzęciem intensywnie wykorzystywanym gospodarczo, jego dieta bazuje głównie na prawidłowo skomponowanych porcjach pasz treściwych, w skład których wchodzi kiszonki, słoma, siano, zielonka, ziarna zbóż, nasiona roślin strączkowych, które mogą być uzupełniane

śrutami zbożowymi i otrębami pszennymi (Gębczyńska i in. 1991, Pucek 2004, Włodarczyk i Budvytis 2011).

Żubronie (*Bison bonasus* hybrid), jako hybrydy bydła domowego i żubra europejskiego, powstały w odpowiedzi na pomysł hodowców, aby stworzyć takie formy przeżuwaczy, które charakteryzują się niezbyt wysoką wybrednością na pokarm dostępny podczas całorocznego wypasu w zmiennych warunkach pogodowych, jednakże w warunkach hodowlanych dieta tych zwierząt przypomina dietę bydła domowego (Kraśńska 1988).

Kolejną grupę badawczą tworzą dwa gatunki dziko żyjące, tj. zając szarak (*Lepus europaeus*) i królik europejski (*Oryctolagus cuniculus*) wraz z jego udomowioną formą, czyli królikiem domowym (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*), należące do dwóch gatunków w rzędzie *Lagomorpha* i określane jako zwierzęta roślinożerne monogastryczne. Dieta zajęczaków, jako roślinożerców i także cekotrofów jest zmienna sezonowo. Do składników diety osobników dziko żyjących zalicza się rośliny trawiaste i zboża, owoce, grzyby, orzechy, nasiona oraz korę i gałązki krzewów, przy czym zimą w ich diecie wzrasta udział zdrewniałych części roślin i korzeni (Chapuis 1990, Reichlin i in. 2006, Smith 2021). Dieta królików domowych jest bardziej stała zawiera głównie siano, trawy, rośliny strączkowe, świeże zielone liście, warzywa przy czym dostępne są również gotowe karmy komercyjne (Brown 2024).

Zaznaczyć należy, że badane dziko żyjące zajęczaki są ujęte na Czerwonej Liście Gatunków Zagrożonych IUCN z powodu zmian liczebności ich populacji na terenie Europy. Królik europejski został opisany, jako „zwierzęta bliskie zagrożenia”, a status zająca szaraka świadczy o jego stabilnej populacji (<https://www.iucnredlist.org>, dostęp: 20.12.2024 r.).

Trzecią grupę badawczą stanowią kot i pies domowy, które należą do dwóch odrębnych rodzin rzędu drapieżnych (Carnivora) i określane są jako zwierzęta mięsożerne. Kot domowy reprezentujący rodzinę kotowatych (*Felidae*) i pies, który należy do rodziny psowatych (*Canidae*), jako zwierzęta udomowione są popularnymi zwierzętami towarzyszącymi człowiekowi. Wybrane do badań gatunki drapieżnych różnią się sposobem pobierania pokarmu i rodzajem spożywanego pokarmu. Koty pobierając pokarm mięsny rozrywają go i szybko połykają. Podczas spożywania mokrej karmy ich język działa jak łyżka a wspomniane wcześniej zęby rogowe na powierzchni przedniej części trzonu języka zapewniają jego znaczącą adhezję. Gdy koty pobierają suchą karmę to wykorzystują trzy sposoby: (1) chwytają ją wargami,

(2) pobierają wykorzystując grzbietową powierzchnię języka, lub (3) chwytają jedzenie za pomocą dolnej powierzchni języka (Horwitz i in. 2008).

U psa obserwuje się nawyk szybkiego połykania dużych kawałków pokarmu, co według Bradshawa (2006) jest pozostałością po rywalizacji o pokarm u wilków, które są bezpośrednim przodkiem wszystkich ras psów. Nadmienić należy, że kluczową rolę w preferencjach żywieniowych psów obok smaku, odgrywa zmysł węchu (Haupt i in. 1978).

Koty są obligatoryjnymi mięsożercami, co oznacza, że spożywają jedynie mięso lub pokarmy pochodzenia zwierzęcego w postaci suchej i/lub mokrej karmy. Dla prawidłowego wzrostu i rozwoju, wybierają składniki wysokobiałkowe wobec niskobiałkowych (Naik 2005, Horwitz i in. 2008, Eizirik i Murphy 2009, Li i Wu 2024). Receptory smakowe występujące w kubkach smakowych u kotów definiują ich wybory pokarmowe i wpływają na specjalne zachowania żywieniowe (Horwitz i in. 2008). Z kolei dotąd opisane rasy psów są fakultatywnymi mięsożercami, co oznacza, że spożywają głównie mięso, ale ich dieta jest uzupełniana pokarmem roślinnym (Bosch i in. 2014). Psy przystosowały się do diety wysokoskrobiowej, dlatego niektórzy autorzy zaliczają je do zwierząt wszystkożernych (Bosch i in. 2014, Wu 2024). Dieta psa domowego opiera się najczęściej na komercyjnie dostępnych karmach suchych, mokrych lub półwilgotnych, których składniki odżywcze dostarczają wszystkich niezbędnych substancji, choć chętnie spożywają pokarmy bezpieczne dla ludzi, lecz dla nich nawet toksyczne (Feuer 2006, Cortinovis i Caloni 2016).

Dotychczasowe badania brodawek smakowych ssaków wskazują na znaczącą zmienność cech strukturalnych. W tym względzie pojawia się konieczność nowego podejścia badawczego, czy w zasadzie zmiany paradygmatu dotyczącego mikrostruktury brodawek smakowych, które zdaniem Mistretta i Bradley (2021) powinny być uważane za narządy somatosensoryczne. Badając brodawki smakowe, jako polimodalne struktury czuciowe, powinno poświęcić się większą uwagę obserwacjom kubków smakowych i otaczających je struktur, gdyż mogą odpowiadać, nie tylko na bodźce smakowe, ale również bodźce dotykowe lub termiczne. Propozycja zmiany oraz uzupełnienia klasycznej charakterystyki cech brodawek smakowych otwiera nowe perspektywy dla przyszłych porównawczych badań, które wymagają obecnie opracowania szczegółowych danych przedstawiających charakterystykę przestrzenną cech brodawek smakowych w kontekście planowanych badań rozbudowanych sieci naczyniowych i nerwowych oraz analiz molekularnych.

Stąd, w niniejszej pracy podjęto się przeprowadzenia kompleksowych badań w zakresie mikroskopii świetlnej, skaningowej mikroskopii elektronowej i histomorfometrii nad rozmieszczeniem i mikromorfologią smakowych brodawek językowych zwierząt roślinożernych i mięsożernych. Badając mikrostrukturę brodawek smakowych, po raz pierwszy wykonano trójwymiarową rekonstrukcję brodawek smakowych, wykorzystując metody komputerowej analizy dwuwymiarowych seryjnych przekrojów histologicznych, które obrazują rodzaje budowy trzonów łącznotkankowych w brodawkach grzybowatych, brodawkach okolonych i brodawkach liściastych, a na nich sposoby rozmieszczenia i liczby kubków smakowych.

2. Hipoteza badawcza i cele pracy:

Hipoteza badawcza:

Mikrostruktura poszczególnych typów smakowych brodawek językowych wybranych gatunków przeżuwaczy, zajączaków i zwierząt drapieżnych jest podobna, przy czym charakterystyka rozmieszczenia i liczebności kubków smakowych jest gatunkowo specyficzna.

Cele pracy:

1. Ocena rozmieszczenia brodawek językowych i ich morfologii w poszczególnych częściach języka wybranych gatunków przeżuwaczy, zajączaków i zwierząt mięsożernych z zastosowaniem mikroskopii świetlnej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej.
2. Analiza mikrostrukturalna brodawek grzybowatych, okolonych i liściastych badanych ssaków z wykorzystaniem metody trójwymiarowej rekonstrukcji obrazu w celu scharakteryzowania budowy szkieletu łącznotkankowego brodawek (CTC), jak również ustalenia sposobu rozmieszczenia i liczebności kubków smakowych.
3. Analiza porównawcza mikrostruktury smakowych brodawek językowych ssaków należących do odrębnych grup żywieniowych, tj. zwierząt roślinożernych i mięsożernych z uwzględnieniem zwierząt dziko żyjących oraz udomowionych.
4. Ocena efektywności trójwymiarowej rekonstrukcji obrazu w badaniach mikrostrukturalnych smakowych brodawek językowych ssaków.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał badawczy

Materiałem badawczym do przeprowadzenia obserwacji makro- i mikroskopowych jak i analiz trójwymiarowych były języki dorosłych ssaków należących do zwierząt roślinożernych i mięsożernych. W grupie zwierząt roślinożernych przeżuwiających badania wykonano na językach należących do trzech gatunków: bydła (*Bos taurus*), dziko żyjącego żubra europejskiego (*Bison bonasus*) oraz ich hybrydy żubronia (*Bison bonasus* hybrid).

Język samicy bydła pobrano podczas uboju w rzeźni, język samca żubra europejskiego przekazano posekcyjnie z Ogrodu Zoologicznego w Poznaniu, natomiast język samicy żubronia pozyskano poubojowo z gospodarstwa rolnego w Karolewie.

Wśród zwierząt roślinożernych nieprzeżuwiających czyli w obrębie zajęczaków (Lagomorpha) badania przeprowadzono na 5 językach gatunków dziko żyjących, tj. królika europejskiego (*Oryctolagus cuniculus*) i zająca szaraka (*Lepus europeaeus*), a także 3 językach królika domowego (*Oryctolagus cuniculus* f. *domesticus*). Waga osobników użytych w badaniach wynosiła ok. 1,5 – 2,5 kg. Języki gatunków dziko żyjących pobrano bezpośrednio po zakończeniu sezonowych polowań, z kolei języki królika domowego otrzymano poubojowo z domowych hodowli.

Badania języków zwierząt drapieżnych (Carnivora) przeprowadzono u psa i kota domowego, czyli przedstawicieli rodzin kotowatych (*Felidae*) i psowatych (*Canidae*). Języki 5 kotów domowych krótkowłosych o masie ciała 4-5 kg (*Felis catus* f. *domestica*) i 5 psów domowych (*Canis lupus familiaris*) rasy mieszanej, o średniej wadze ciała 8 - 10 kg, pozyskano bezpośrednio po zabiegu ich eutanazji w klinikach weterynaryjnych w Poznaniu, które odbyły się z przyczyn nie związanych z chorobami przewlekłymi, czy chorobami układu pokarmowego. Zwierzęta użyte do badań nie wykazywały dymorfizmu płciowego.

3.2. Metody badawcze

3.2.1. Utrwalenie materiału, obserwacje makroskopowe oraz przygotowanie prób badawczych do dalszych procedur badań mikroskopowych

Bezpośrednio po śmierci zwierząt i dysekcji języka oczyszczono powierzchnie języków z resztek pokarmowych i mieszaniny śliny ze śluzem w wodzie bieżącej oraz umieszczono w roztworze 10% formaldehydu na co najmniej 48 godzin. Kolejno języki mierzono suwmiarką elektroniczną z dokładnością do 0.1cm i dokumentowano fotograficznie z uwzględnieniem różnych powiększeń poszczególnych części języka, czyli wierzchołka języka, trzonu języka i korzenia języka za pomocą mikroskopu cyfrowego ZIP FHD (TAGARNO, wersja 1.1.3.1).

Po zakończeniu obserwacji makroskopowych przygotowano odpowiednie próby tkankowe błony śluzowej języka do każdej z wykorzystanych technik badawczych o wielkości około 1 cm². Z każdej części języka badanych gatunków wypreparowano 3 próby tkankowe.

Na językach przeżuwaczy oraz zajęczaków, próby tkankowe do badań struktury brodawek grzybowatych zostały wycięte z grzbietowej i brzusznej powierzchni wierzchołka języka, trzonu języka oraz z trzech obszarów wału języka, tj. z powierzchni grzbietowej, powierzchni tylnej oraz z dwóch powierzchni bocznych. U zajęczaków osobne próbki z brodawkami okolonymi i liściastymi pobrano z tylnobocznej części wału języka.

Próby tkankowe języków kota domowego z brodawkami grzybowatymi wycięto z powierzchni grzbietowej i brzusznej wierzchołka języka, z uwzględnieniem krawędzi wierzchołka języka, obu przednio-bocznych powierzchni trzonu języka, oraz z powierzchni tylnobocznych i tylnopośrodkowych trzonu języka, za pasmem brodawek nitkowatych większych czyli tzw. zębów rogowych. Osobne próbki zawierające brodawki okolone pobrano z tylnej części trzonu języka.

Na języku psa domowego, próbki brodawek grzybowatych wycięto z grzbietowej i brzusznej powierzchni wierzchołka języka, razem z krawędzią języka, przedniej i tylnej części trzonu języka, oraz z obszaru brodawek okolonych. Próby tkankowe z brodawkami okolonymi i liściastymi pobrano z tylnobocznych powierzchni trzonu języka.

3.2.2. Przygotowanie preparatów histologicznych do obserwacji w mikroskopie świetlnym

Z pobranych próbek wykonano seryjne preparaty histologiczne, które kolejno stanowiły podstawę do przygotowania komputerowych analiz trójwymiarowych brodawek smakowych i pomiarów morfometrycznych.

Pobrane próbki, po dokładnym wypłukaniu tkanek w trzech zmianach wody destylowanej przez 15 minut, zostały odwodnione przy użyciu alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (od 70% do 96%). W przypadku prób przygotowywanych u przeżuwaczy czas odwadniania w pojedynczym alkoholu wynosił 35 minut, z kolei u zajęczaków i mięsożerców czas ten został obniżony do 25 minut. Kolejno odwodnione próby zostały przełożone do dwóch zmian benzoesu metylu po ok. 1 godzinę w celu przejaśnienia tkanek, co oceniano po ich opadnięciu na dno naczynia lub, w przypadku prób z silnie zrogowaciałymi nabłonkami, pozostawiały w pierwszej zmianie benzoesu metylu przez noc. Kolejno tkanki umieszczano w cieplarkach w temperaturze 60⁰C, w trzech zmianach płynnej parafiny Blue ribbon®, od 30 do 40 minut w zależności od ich wielkości. Formowanie bloczków parafinowych następowało w ceramicznych lub silikonowych formach umieszczanych w celu równomiernego stężenia parafiny w ziemnej kąpieli wodnej. Następnym etapem było seryjne skrawanie prób tkankowych w bloczkach na mikrotomie rotacyjnym (Leica RM 2055) na grubość 8 µm w przypadku przeżuwaczy oraz 5 µm u zajęczaków i zwierząt mięsożernych. Podczas seryjnego skrawania prowadzono adnotacje dotyczące liczby prawidłowych skrawków i ich jakości. Skrawki parafinowe nakładano na szkiełka podstawowe pokryte mieszaniną filtrowanego białka kurzego i gliceryny i suszono w cieplarni w temperaturze 40⁰C przez co najmniej 8 godzin.

Uzyskane preparaty wybarwiono metodą topograficzną Masson-Goldner (Romeis 1989). Barwienie rozpoczęto od odparafinowania preparatów w trzech zmianach ksylenu (po 5 minut w każdym) i uwodnienia ich w kilku zmianach alkoholu etylowego o malejącym stężeniu (96%-70%, 3 minuty w każdym). Następnie preparaty przełożono do wody destylowanej na 5 minut, po czym trafiły do pierwszego barwnika – hematoksyliny Mayera. Po 15 minutach preparaty przeniesiono do wody bieżącej, wody destylowanej oraz fuksyny kwaśnej na odpowiednio 15 minut, 10 minut i 10 minut. Po szybkim opłukaniu preparatów w wodzie destylowanej, umieszczono je w roztworze kwasu fosfomolibdenowego na 3 minuty, błękitu anilinowego na 10 minut i ponownie kwasie fosfomolibdenowym na 3 minuty. Po płukaniu w wodzie destylowanej

i 1% roztworze kwasu octowego, preparaty odwodniono w pięciu zmianach alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (70%-96%, na czas 10s – 70%, 30s – 80% i 5 min – 90%-2x96%) i trzech zmianach toluenu, po 5 minut w każdym. Wybarwione preparaty zamknięto szkiełkiem nakrywkowym przy użyciu żywicy syntetycznej DePeX.

Tak przygotowane preparaty histologiczne obserwowano w mikroskopie świetlnym Axioskop 2 plus (ZEISS), a seryjną dokumentację fotograficzną każdego skrawka wykonano przy pomocy kamery cyfrowej Gryphax. W zależności od wielkości fotografowanej brodawki smakowej, seryjne zdjęcia były wykonywane przy użyciu obiektywu 1,25x lub 5x.

3.2.3. Przygotowanie modeli trójwymiarowych brodawek smakowych i znakowanie ich trzonów łącznotkankowych oraz kubków smakowych

Procedurę przygotowania seryjnych skrawków histologicznych będących podstawą modeli trójwymiarowych, opisano w sekcji „*Przygotowanie preparatów histologicznych do obserwacji w mikroskopie świetlnym*”. Dokumentacji fotograficznej podlegały wszystkie skrawki histologiczne z pominięciem tych, które posiadały poważne artefakty, tj. pęknięcia, zagięcia, rozerwania.

Komputerowo przeprowadzone modelowanie 3D było czynnością czasochłonną z uwagi na dużą liczbę skrawków potrzebną do stworzenia pojedynczego modelu 3D, a także konieczność manualnego zaznaczania na obrazach komputerowych rekonstruowanych struktur na każdym skrawku histologicznym. Formowanie modeli 3D brodawek grzybowatych przeżuwaczy przeprowadzono na 76-261 seryjnych skrawkach histologicznych. U trzech gatunków zajęczaków liczba użytych skrawków histologicznych wynosiła 29-105 w brodawkach grzybowatych, 104-244 w brodawkach okolonych oraz 198-491 w brodawkach liściastych. Modele 3D brodawek grzybowatych oraz okolonych kota domowego przygotowano z odpowiednio 41-131 i 209-287 seryjnych skrawków histologicznych. Podczas modelowania 3D brodawek smakowych psa domowego wykorzystano 32-125 seryjne skrawki histologiczne w brodawkach grzybowatych, 307-328 w brodawkach okolonych oraz 323-505 w brodawkach liściastych.

Dla każdej brodawki smakowej, sfotografowanej seryjnie stworzono osobny folder, zawierający wszystkie zdjęcia. Proces tworzenia modelu 3D rozpoczynał się zawsze od utworzenia pliku tekstowego, w którym zawierano informację o wielkości piksela, nazwie zdjęcia i odległością każdego skrawka od pierwszego. Pliki tekstowe

stworzono z uwzględnieniem skrawków, które zostały utracone podczas krojenia lub zostały odrzucone podczas wykonywania dokumentacji fotograficznej. Tak stworzony plik umożliwiał wgranie seryjnych obrazów określonej brodawki do specjalistycznego oprogramowania o nazwie Amira (Thermo ScientificTM, wersja 2020) w celu wygenerowania jej modelu 3D.

Po załadowaniu seryjnych plików do oprogramowania wyrównano każdy skrawek względem poprzedniego tak, aby uzyskać jakość na poziomie przynajmniej 95%.

W kolejnym etapie, wielokolorowe skrawki histologiczne przekształcono na czarno-białe obrazy, używając funkcji Amiry o nazwie Convert Image Type, która wykorzystuje jeden z kanałów w paletcie kolorów RGBA (czerwony, zielony, niebieski, alpha) do uzyskania obrazów czarno-białych.

Przed przystąpieniem do procesu zaznaczania konkretnych struktur na preparatach histologicznych, dokonano przeliczenia wszystkich skrawków, łącznie z tymi, które zostały utracone w procesie krojenia i/lub fotografowania, wykorzystując informacje o wielkości obrazu oraz jego grubości. Dzięki temu automatycznie wypełniono luki w seryjnym zestawie obrazów, w miejscu pominiętych/nieprawidłowych/ utraconych w toku przygotowań skrawków.

Kolejnym etapem było nadanie „etykiety” każdej zaznaczonej strukturze, a więc koloru jakim będzie zwizualizowana na modelu 3D. W obecnych badaniach nabłonek brodawki był zaznaczony czarnym kolorem, w celu uzyskania transparentnego zarysu brodawki, trzon łącznotkankowy był zaznaczany na kolor żółty, a kubki smakowe, w zależności od gatunku zwierzęcia, zaznaczono na kolor niebieski, zielony, czerwony lub różowy. Z uwagi na dużą zmienność kształtu zaznaczanych struktur, każdy skrawek został oznaczony ręcznie.

Przedostatnim krokiem było wygenerowanie obrazu trójwymiarowego każdej zaznaczonej struktury brodawki przy użyciu funkcji, która zakłada, że każda powierzchnia jest utworzona z trójkątów, których krawędzie mają długość 0,5 raza wielkości woksela. Ostatnim etapem było połączenie ze sobą wszystkich bloków i utworzenie pełnego modelu 3D brodawki smakowej, trzonów łącznotkankowych oraz kubków smakowych.

3.2.4. Analiza morfometryczna brodawek smakowych badanych gatunków ssaków

Na podstawie zdjęć makroskopowych obliczono liczbę i gęstość brodawek grzybowatych na poszczególnych częściach języków badanych ssaków. Ponadto na modelach 3D brodawek smakowych określono liczbę kubków smakowych w pojedynczej brodawce.

Pomiary morfometryczne wykonano na środowych przekrojach brodawek, na których zmierzono: wysokość i średnicę brodawki, jej trzonów łącznotkankowych, wysokość nabłonka pokrywającego brodawki i średnice kubków smakowych. W brodawkach okolonych i liściastych zmierzono również szerokość bruzdy brodawki na różnych wysokościach, natomiast brodawkach liściastych wysokość i szerokość fałdów błony śluzowej brodawki. Na każdym preparacie wykonano około pięciu pomiarów każdej z wymienionych struktur. Charakterystyka metryczna obejmuje wyznaczenie średniej wartości pomiarów, a także wartości minimalnych i maksymalnych.

U przeżuwaczy analizę morfometryczną przeprowadzono na 2–3 brodawkach grzybowatych z poszczególnych części języków. W zależności od wielkości brodawki wybrano 8–10 przekrojów poprzecznych z części środkowej brodawki, na których wykonano od 3 do 5 pomiarów.

U żąćczaków, w zależności od wielkości brodawek smakowych, do analizy morfometrycznej wybrano od 3 do 5 przekrojów poprzecznych brodawek grzybowatych, od 5 do 15 przekrojów brodawek okolonych i od 10 do 20 przekrojów brodawek liściastych.

U kota i psa w zależności od średnicy brodawek smakowych pomiary przeprowadzono na 5–20 przekrojach poprzecznych brodawek grzybowatych i okolonych u kota oraz brodawek grzybowatych, okolonych i liściastych u psa, w ich środkowych częściach

Do analizy morfometrycznej wykorzystano komputerowy system MultiScan v.18.03 (CSS, Warszawa, Polska) oraz oprogramowanie Microsoft Excel (2010).

3.2.5. Przygotowanie prób tkankowych do obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym

Procedura ta została wykorzystana do obserwacji brodawek smakowych zajęczaków oraz badanych zwierząt mięsożernych. Przygotowanie prób rozpoczęto od ich płukania w trzech zmianach wody bieżącej przez około 10 minut. Następnie próby były odwadniane w szeregu alkoholi etylowych o wzrastającym stężeniu od 70% do 96%. W zależności od gatunku zwierzęcia oraz typu i wielkości brodawki, próby badawcze były zanurzone w każdym roztworze alkoholu przez 10-15 minut. Końcowe odwadnianie próbek następowało w roztworze 1:1 etanolu 96% i acetonu 100% przez 5 minut i 100% acetonu również przez 5 minut. Kolejnym etapem było suszenie prób tkankowych w aparacie do suszenia w punkcie krytycznym z użyciem ciekłego CO₂ (Critical Point Dryer K850, Leica, Wetzlar, Niemcy). Każdorazowo wykonano 8 zmian dwutlenku węgla, a punkt krytyczny został osiągnięty przy temperaturze 35-36°C. Wysuszone próbki zamontowano na aluminiowych stolikach za pomocą taśm węglowych lub pasty srebrowej, po czym każdą próbę napyłono warstwą złota o grubości 10-12 nm w urządzeniu Sputter Coater S150B (Edwards). Obserwacje i dokumentację fotograficzną przygotowanych prób tkankowych przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego LEO 435 VP lub EVO 10 (ZEISS, Niemcy), przy napięciu przyspieszającym 15kV.

3.2.6. Przygotowanie prób tkankowych do obserwacji trzonów łącznotkankowych brodawek smakowych w skaningowym mikroskopie elektronowym

Technika maceracji prób tkankowych brodawek języka w 10% wodnym roztworze NaOH polega na powolnym usuwaniu nabłonka błony śluzowej wraz z komórkami tkanki łącznej w celu wizualizacji łącznotkankowego szkieletu tkanki, w tym sieci włókien kolagenowych. Technika została zastosowana w badaniach brodawek smakowych zajęczaków i zwierząt mięsożernych.

Procedurę rozpoczęto od płukania prób tkankowych trzykrotnie w wodzie bieżącej przez około 15 minut, a następnie przełożono je do 10% roztworu NaOH na około 7 dni u zajęczaków, 10-12 dni u kota oraz 8-10 dni u psa. W tym czasie roztwór NaOH był zmieniany 3-5 razy. Ostatecznie próby płukano w wodzie destylowanej, stosując około 6 zmian wody po 5 minut każda, po czym odwodniano je w szeregu alkoholi etylowych o wzrastającym stężeniu (70%-96%) przez 5 minut w każdym. Następnie tkanki przełożono na 5 minut do roztworu alkoholu etylowego 96% i acetonu

100% w stosunku 1:1, a później na kolejne 5 minut do acetonu 100%. Sposób suszenia próbek, napyłania złotem i obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym odbywał się podobnie jak powyżej opisano w sekcji „*Przygotowanie prób tkankowych do obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym*”

W prezentowanym manuskrypcie zastosowano nomenklaturę naukową zgodną z Nomina Anatomica Veterinaria (2017) oraz Nomina Histologica Veterinaria (2017).

Zgodnie z polskim prawem oraz dyrektywą UE (nr 2010/63/EU) badania przeprowadzone w ramach tej pracy badawczej nie wymagają zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu.

Badania prowadzone u kota i psa domowego były finansowane w ramach projektu dla Młodych Naukowców w roku 2021 o numerze 506-539-04-00.

Badania prowadzone na trzech gatunkach zajęczaków były finansowane w ramach projektu dla Młodych Naukowców w roku 2022 o numerze 506-539-04-00.

4. Wyniki

Wyniki niniejszej pracy powstały w oparciu o oryginalne badania naukowe przygotowane, jako cztery manuskrypty do publikacji w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

- **Plewa Barbara**, Skieresz-Szewczyk Kinga, Jackowiak Hanna (2022) Three-dimensional characteristic of fungiform papillae and its taste buds in European bison (*Bison bonasus*), cattle (*Bos taurus*), and *Bison bonasus* hybrid. BMC Veterinary Research. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03111-5> (IF = 2.3, 5-letni IF = 2.6, MNiSW = 140 pkt). (Plik PDF dołączony do niniejszej pracy); Procentowy udział głównego autora w przygotowaniu pracy wynosi **65%**
- **Plewa Barbara**, Jackowiak Hanna (2024) The three-dimensional analysis of gustatory papillae and its taste buds on the tongue of the wild-living hare (*Lepus europaeus*), European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*). Annals of Anatomy. Manuskrypt jest obecnie w trakcie recenzji (IF = 2.0, MNiSW = 100 pkt); Procentowy udział głównego autora w przygotowaniu pracy wynosi **80%**
- **Plewa Barbara**, Jackowiak Hanna (2024) The three-dimensional reconstruction of lingual gustatory papillae and their taste buds in short-hair cats (*Felis catus f. domestica*, Felidae, Carnivora). Veterinary Research Communication. Manuskrypt jest obecnie w trakcie recenzji (IF = 1.8, 5-letni IF = 1.9, MNiSW = 140 pkt); Procentowy udział głównego autora w przygotowaniu pracy wynosi **80%**
- **Plewa Barbara**, Skieresz-Szewczyk Kinga, Jackowiak Hanna (2024) New inside in microstructure of taste system of gustatory papillae in the dog (*Canis lupus familiaris*, Canidae, Carnivora); 3D, LM, and SEM study. The Veterinary Journal. Manuskrypt jest obecnie w trakcie recenzji (IF = 2.3, MNiSW = 140 pkt); Procentowy udział głównego autora w przygotowaniu pracy wynosi **65%**

4.1. Obserwacje makroskopowe języka bydła, żubra europejskiego i żubronia

Na podstawie obserwacji makroskopowych języka przeżuwaczy wyróżniono wierzchołek języka, trzon języka z obecnym w tylnej części waleń języka i korzeń języka (Ryc. 1a-c). Języki badanych gatunków przeżuwaczy charakteryzowały się wydłużonym kształtem, zaokrąglonym wierzchołkiem języka oraz trójkątnym w zarysie waleń języka (Ryc. 1a-c).

Całkowita długość języka u bydła, żubra i żubronia wynosiła kolejno 45,2 cm, 35,5 cm i 44,1 cm. Długości poszczególnych części języka osiągały u bydła 7,5 cm na wierzchołku języka, 15,8 cm na trzonie języka, 15,7 cm na waleń języka oraz 6,2 cm na korzeniu języka. U żubra europejskiego długość wierzchołka języka, trzonu języka, waleń języka oraz korzenia języka wynosiły odpowiednio 6,1 cm, 10,2 cm, 13,5 cm oraz 5,7 cm. U żubronia te same części języka miały odpowiednio: 5,2 cm, 20,6 cm, 12,7 cm i 5,6 cm długości.

4.2. Obserwacje mikroskopowe brodawek grzybowatych bydła, żubra europejskiego i żubronia

4.2.1. Powierzchnia grzbietowa wierzchołka języka

Na powierzchni grzbietowej wierzchołka języka **bydła** zaobserwowano 13 brodawek grzybowatych, których gęstość wynosiła 0,5 brodawki/1cm² (Tab. 1). Brodawki grzybowate były okrągłe w zarysie z wypukłą i gładką powierzchnią, a ich średnica wynosiła 1070,2 µm (Tab. 2, Ryc. 2a-d). Średnia wysokość brodawek wynosiła ok. 1980,7 µm, a ich wyniesienie ponad nabłonek międzybrodawkowy osiągało średnio 413,4 µm (Tab. 2, 4, Ryc. 9a). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego na brodawkach grzybowatych wynosiła 115,4 µm, a jego warstwa rogowa miała średnio 17,9 µm wysokości (Tab. 4, Ryc. 9c). Na podstawie pomiarów średnicy trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych w części podstawnej, środkowej i apikalnej, a także obserwacji modeli 3D, kształt trzonu brodawki opisano jako balonowaty (Tab. 3, Ryc. 2a, 8a, 9b). Analiza modeli 3D wskazała, że kubki smakowe były ułożone na grzbietowej powierzchni brodawki grzybowatej w części pośrodkowej, w formie pasma prostopadłego do długiej osi języka lub skupisk znajdujących się po lewej stronie brodawki lub w jej centralnej części (Ryc. 2b-d). Na pierwszym modelu 3D obserwowano 31 kubków smakowych, na drugim 15, a na trzecim 10 (Tab. 1, Ryc. 2b-d). Średnia gęstość kubków smakowych osiągnęła

20 kubków/mm² (Tab. 1). Średnica kubków smakowych wynosiła od 29,9 μm do 62,9 μm (Tab. 5).

Brodawki grzybowate obserwowane u **żubra europejskiego** były równomiernie rozmieszczone wśród brodawek nitkowatych, a ich liczba i gęstość wynosiła odpowiednio 31 i 0,4 brodawki/cm² (Tab. 1). Owalne w zarysie brodawki miały wypukłą i gładką powierzchnię grzbietową, a ich średnica wynosiła 953,8 μm (Tab. 2, Ryc. 2e-g). Średnia wysokość brodawek grzybowatych wynosiła 1442,2 μm, a jej wyniesienie ponad nabłonek międzybrodawkowy osiągało wartość 390,5 μm (Tab. 2, 4, Ryc. 9a). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego wynosiła średnio 140,8 μm, a jego warstwa rogowa miała wysokość 20,8 μm (Tab. 4, Ryc. 9c). Różnica między środkową i apikalną częścią trzonu łącznotkankowego wynosiła 233,5 μm, stąd jego kształt opisano jako balonowaty (Tab. 3, Ryc. 2e, 8a, 9b). Na pierwszym modelu 3D brodawek grzybowatych u żubra europejskiego obserwowano 17 kubków smakowych, a na drugim 7 (Tab. 1, Ryc. 2 f, g). Na obu modelach kubki smakowe były rozmieszczone w skupiskach po prawej lub lewej stronie powierzchni grzbietowej brodawek (Ryc. 2 f, g). Gęstość kubków smakowych na powierzchni brodawek grzybowatych wynosiła 12 kubków/mm², a ich średnica wynosiła około 47,9 μm (Tab. 1, 5).

Liczba równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych **żubronia** wynosiła 222 (Tab. 1). Ich gęstość osiągała 9 brodawek/cm² (Tab. 1). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate charakteryzowały się płaską i gładką powierzchnią, a ich średnica wahała się od 554,8 μm do 722,6 μm (Tab. 2, Ryc. 2h-k). Średnia wysokość brodawek grzybowatych wynosiła 1326,2 μm, a wysokość nabłonka międzybrodawkowego osiągała wartość 1166,2 μm, stąd brodawki były wyniesione na wysokość 160 μm (Tab. 2, 4, Ryc. 9a). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego pokrywającego brodawki grzybowate wynosiła średnio 119,7 μm, a warstwa rogowa miała 19,2 μm wysokości (Tab. 4, Ryc. 9c). Wartości środkowej oraz apikalnej średnicy trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych były porównywalne, dlatego kształt trzonu opisano jako kolumnowy (Tab. 3, Ryc. 2h, 8b, 9b). W dwóch modelach 3D brodawek grzybowatych zaobserwowano pojedynczy kubek smakowy umiejscowiony centralnie na powierzchni grzbietowej brodawki o średniej średnicy 32,5 μm (Tab. 1, 5, Ryc. 2i, k). Natomiast w trzecim modelu 3D nie obserwowano kubków smakowych (Ryc. 2j). Średnia gęstość kubków smakowych wynosiła 3 kubki/mm² (Tab. 1).

4.2.2. Powierzchnia brzuszna wierzchołka języka

Na bocznych krawędziach brzusznej powierzchni wierzchołka języka **bydła** obserwowano 47 symetrycznie rozmieszczonych brodawek grzybowatych, z gęstością wynoszącą 7,8 brodawki/cm² (Tab. 1). Wypukłe i okrągłe w zarysie brodawki grzybowate osiągały średnicę 1056,2 µm (Tab. 2, Ryc. 3a-c). Wysokość tych brodawek oraz wysokość nabłonka międzybrodawkowego wynosiła odpowiednio 1358,6 µm i 1016,4 µm, stąd średnie wyniesienie brodawek grzybowatych ponad powierzchnię nabłonka wynosiło 342,2 µm (Tab. 2, 4, Ryc. 9a). Nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący pokrywający brodawki grzybowate miał wysokość 108,2 µm, a jego warstwa rogowa osiągała wysokość 11,1 µm (Tab. 4, Ryc. 9c). Kształt trzonu łącznotkankowego brodawek grzybowatych, przedstawiony na Ryc. 8a, charakteryzujący się najszerszą średnicą w części apikalnej, przypominał balon (Tab. 3, Ryc. 3a, 9b). Na pierwszym modelu 3D, 82 kubki smakowe były równomiernie rozmieszczone na całej powierzchni grzbietowej brodawek grzybowatych (Tab. 1, Ryc. 3b). Z kolei, na drugim modelu 3D, 47 kubków smakowych występowało głównie w tylnej części grzbietowej powierzchni brodawki (Tab. 1, Ryc. 3c). Gęstość kubków smakowych wynosiła 41 kubków/mm², a ich średnica wynosiła ok. 39,5 µm (Tab. 1, 5).

Na lewej i prawej krawędzi brzusznej powierzchni języka **żubra europejskiego** obserwowano średnio 50 brodawek grzybowatych (Tab. 1). Gęstość tych owalnych lub okrągłych w zarysie brodawek wynosiła 2,6 brodawki/cm² (Ryc. 3d-f; Tab. 1). Brodawki grzybowate miały płaską, gładką powierzchnię grzbietową, a ich średnica wahała się od 552,6 µm do 1212,9 µm (Ryc. 3d; Tab. 2). Różnica między wysokością brodawek grzybowatych a nabłonkiem międzybrodawkowym wynosiła 245,6 µm, co stanowiło średnią wartość wyniesienia brodawek ponad powierzchnię nabłonka (Ryc. 9a; Tab. 2, 4). Średnia wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego wynosiła 139,5 µm, a jego warstwa rogowa miała 14,9 µm wysokości (Ryc. 9c; Tab. 4). Obserwacje modeli 3D trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych oraz ich analiza morfometryczna, wskazały na porównywalne wartości średnicy środkowej i apikalnej, co wskazało na kolumnowy kształt trzonów (Ryc. 3d, 8b, 9b; Tab. 3). Na pierwszym modelu 3D brodawek grzybowatych, kubki smakowe w liczbie 6 były rozmieszczone w pobliżu prawego brzegu grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych, natomiast na drugim modelu 3D, 30 kubków smakowych występowało w przedniej części grzbietowej powierzchni brodawki (Tab. 1, Ryc. 3 e, f). Szacunkowa gęstość kubków

smakowych wynosiła 20 kubków/mm², a ich średnica wynosiła około 41,7 μm (Tab. 1, 5).

Liczba brodawek grzybowatych **żubronia** na powierzchni brzusznej wierzchołka języka wynosiła 220, a ich rozmieszczenie przypominało kształt litery „V” (Tab. 1). Zaobserwowano dwa typy brodawek grzybowatych. Większe brodawki tworzyły granicę między gładkim obszarem brzusznej powierzchni wierzchołka języka a obszarem pokrytym brodawkami językowymi, podczas gdy mniejsze brodawki grzybowate były rozproszone między brodawkami nitkowatymi. Ich gęstość wynosiła 20 brodawek/cm² (Tab. 1). Brodawki grzybowate były owalne lub okrągłe w zarysie, a ich średnica wynosiła 664,9 μm (Tab. 2, Ryc. 3g-i). Grzbietowa powierzchnia tych brodawek była wypukła i gładka (Ryc. 3g). Wysokość brodawek grzybowatych, nabłonka międzybrodawkowego oraz wyniesienie tych brodawek ponad nabłonek wynosiły odpowiednio 1104 μm, 930,1 μm i 173,9 μm (Ryc. 9a; Tab. 2, 4). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego na brodawkach grzybowatych wynosiła 96,9 μm, a wysokość warstwy rogowej osiągała 9,2 μm (Tab. 4, Ryc. 9c). Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych charakteryzowały się porównywalną wartością średnicy środkowej i apikalnej, stąd ich kształt został opisany, jako kolumnowy (Tab. 3, Ryc. 3g, 8b, 9b). Kubki smakowe w liczbie 30 były rozmieszczone w tylnej części brodawek grzybowatych w kształcie półksiężyca lub w liczbie 10 po prawej stronie grzbietowej powierzchni brodawek (Ryc. 3h, i; Tab. 1). Szacunkowa gęstość kubków smakowych wynosiła 21 kubków/mm², a ich średnica miała około 42,6 μm (Tab. 1, 5).

4.2.3. Powierzchnia grzbietowa trzonu języka

U bydła i żubra europejskiego brodawki grzybowate obserwowano na bocznych częściach trzonu języka, a u żubronia były rozmieszczone na całej powierzchni grzbietowej trzonu języka.

Liczba brodawek grzybowatych u **bydła** wynosiła 35, a ich gęstość wynosiła 0,8 brodawki/cm² (Tab. 1). Okrągłe lub owalne w zarysie brodawki grzybowate miały wypukłą i gładką powierzchnię grzbietową o średnicy wynoszącej 1173,1 μm (Tab. 2; Ryc. 4 a-d). Wysokość brodawek grzybowatych osiągała średnio 1343,9 μm, a nabłonka międzybrodawkowego 1096,9 μm, co dawało wyniesienie brodawek grzybowatych ponad powierzchnię nabłonka na wysokość ok. 247 μm (Ryc. 9a; Tab. 2, 4). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego na brodawkach grzybowatych wynosiła 122,3 μm, a jego warstwy rogowej 16,2 μm (Tab. 4; Ryc. 9c). Analiza morfometryczna

średnic trzonów łącznotkankowych i obserwacje mikroskopowe wykazały, że trzony miały kształt balonowaty, z uwagi na 216 μm różnicy między średnicą środkową, a szerszą średnicą apikalną. (Tab. 3; Ryc. 4a, 8a, 9b). Kubki smakowe obserwowane na modelach 3D brodawek grzybowatych układały się w prostopadłe lub równoległe pasma względem długiej osi języka (Ryc. 4b-d). Na pierwszym modelu 3D zaobserwowano 48 kubków smakowych, na drugim 55, a na trzecim 20 kubków smakowych (Tab. 1, Ryc. 4b-d). Szacunkowa gęstość kubków smakowych wynosiła 22 kubki/ mm^2 , a ich średnica wahała się od 30,2 do 55,6 μm (Tab. 1, 5).

Liczba i gęstość brodawek grzybowatych **żubra europejskiego** wynosiła odpowiednio 32 i 1 brodawka/ cm^2 (Tab. 1). Brodawki były okrągłe w zarysie i miały wypukłą, gładką powierzchnię grzbietową, a ich średnica wynosiła 1102,5 μm (Tab. 2; Ryc. 4e-h). Średnia wysokość brodawek i nabłonka międzybrodawkowego osiągała odpowiednio 1508,2 μm i 1067,1 μm , zatem wyniesienie brodawek grzybowatych ponad powierzchnię nabłonka wynosiło 441,1 μm (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki grzybowate wynosiła 166,5 μm , a warstwa rogowa miała 20,6 μm wysokości (Tab. 4; Ryc. 9c). Średnice trzonów łącznotkankowych oraz obserwacje modeli 3D wskazały na porównywalne wartości średnicy środkowej i apikalnej, w związku z czym kształt trzonu zostało opisany jako kolumnowy (Tab. 3; Ryc. 4e, 8b, 9b). Rozmieszczenie kubków smakowych na grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych różnił się w zależności od zrekonstruowanej brodawki. Na pierwszym modelu 3D, kubki smakowe, w liczbie 13, były rozmieszczone pośrodkowo w kształcie półksiężyca (Tab. 1; Ryc. 4f). Na drugim modelu 3D, 11 kubków smakowych tworzyło centralnie położone pasmo ułożone prostopadłe do długiej osi języka (Tab. 1; Ryc. 4g). Na trzecim modelu 3D, grupę 5 kubków smakowych zlokalizowano w lewej części brodawki grzybowatej (Tab. 1; Ryc. 4h). Średnia gęstość kubków smakowych wyniosła 10 kubków/ mm^2 (Tab. 1). Średnica kubków smakowych wynosiła ok. 42,4 μm (Tab. 5).

Na powierzchni grzbietowej trzonu języka **żubronia** liczba brodawek grzybowatych wynosiła 118, a ich gęstość osiągała wartość 3 brodawki/ cm^2 (Tab. 1). Brodawki były okrągłe w zarysie z płaską i gładką powierzchnią grzbietową oraz miały średnicę ok. 828,9 μm (Tab. 2; Ryc. 4i-k). Ich średnia wysokość wahała się od 1269,2 μm do 1380,6 μm (Tab. 2). Analiza wysokości nabłonka międzybrodawkowego wykazała, że wyniesienie brodawek grzybowatych ponad powierzchnię nabłonka wynosiło 101,2 μm (Tab. 4; Ryc. 9a). Średnia wartość wysokości nabłonka pokrywającego

brodawki grzybowate wynosiła 118,6 μm , a warstwa rogowa miała średnią wysokość 19,0 μm (Tab. 4; Ryc. 9c). Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych charakteryzowały się kształtem przypominającym balon z uwagi na 310 μm różnicy pomiędzy środkową a apikalną średnicą trzonu (Tab. 3; Ryc. 4i, 8a, 9b). Na dwóch modelach 3D brodawek grzybowatych kubki smakowe były rozmieszczone pośrodkowo na powierzchni grzbietowej brodawek w liczbie 4 na oby dwóch modelach (Tab.1; Ryc. 4j, k). Średnia gęstość kubków smakowych osiągnęła 5 kubków/ mm^2 , a ich średnica wynosiła około 45,2 μm (Tab. 1, 5).

4.2.4. Powierzchnia grzbietowa środkowej części wału języka

Na grzbietowej powierzchni środkowej części wału języka **bydła** zaobserwowano 15 brodawek grzybowatych o gęstości 0,5 brodawki/ cm^2 (Tab. 1). Brodawki były owalne w zarysie, o średnicy 1865,6 μm , a ich powierzchnia była płaska i pofałdowana (Tab. 2; Ryc. 5a-c). Wysokość brodawek grzybowatych, nabłonka międzybrodawkowego oraz wyniesienie brodawek ponad powierzchnię nabłonka wynosiły odpowiednio 1319,8 μm , 1006,9 μm i 312,9 μm (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim o wysokości 143,2 μm , którego warstwa rogowa miała wysokość 29,2 μm (Tab. 4; Ryc. 5a, 9c). Średnice trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych malały od części podstawnej brodawki, ku części apikalnej, stąd kształt trzonu, widoczny na rycinie 8c, został opisany jako stożkowaty (Tab. 3; Ryc. 5a, 9b). Na modelach 3D brodawek grzybowatych kubki smakowe tworzyły skupiska zlokalizowane z tyłu lub centralnie na grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych (Ryc. 5b, c). Liczba kubków smakowych na pierwszym modelu 3D wynosiła 22, a na drugim 4 (Tab.1). Gęstość kubków smakowych wynosiła 5 kubków/ mm^2 , a ich średnica osiągała 41,1 μm (Tab. 1, 5).

Liczba i gęstość pigmentowanych brodawek grzybowatych **żubra europejskiego** wynosiły odpowiednio 23 i 0,8 brodawki/ cm^2 (Tab. 1). Brodawki grzybowate były owalne w zarysie, a ich powierzchnia grzbietowa była wypukła i nieregularna (Ryc. 5d-f). Średnica brodawek osiągała 1628 μm (Tab. 2). Porównanie wysokości brodawek grzybowatych i nabłonka międzybrodawkowego wykazało, że wyniesienie brodawek ponad jego powierzchnię wynosiło 327 μm (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego na brodawkach grzybowatych wynosiła 150,6 μm , a warstwa rogowa miała wysokość 37,1 μm (Tab. 4; Ryc. 9c). Średnica trzonów łącznotkankowych w części apikalnej, środkowej i podstawnej wskazywała

na stożkowaty kształt trzonu (Tab. 3; Ryc. 5d, 8c, 9b). Na oby dwóch modelach 3D brodawek grzybowatych zaobserwowano 4 kubki smakowe rozmieszczone po lewej stronie lub centralnie na grzbietowej powierzchni brodawki (Tab. 1; Ryc. 5e, f). Szacunkowa gęstość kubków smakowych wynosiła 2 kubki/mm², a ich średnica miała około 45,1 µm (Tab. 1, 5).

Na powierzchni grzbietowej środkowej części wału języka **żubronia** liczba brodawek wynosiła 15, a ich gęstość osiągała 0,6 brodawki/cm² (Tab. 1). Brodawki grzybowate były okrągłe w zarysie, miały płaską i gładką powierzchnię, a ich średnica miała 1357,7 µm (Tab. 2; Ryc. 5g-i). Wysokość tych brodawek wynosiła 2060,1 µm, a nabłonka międzybrodawkowego 1897,8 µm, stąd wyniesienie brodawek ponad powierzchnię nabłonka osiągało 162,3 µm wysokości (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego na brodawkach grzybowatych wynosiła 121,9 µm, a wysokość warstwy rogowej osiągała średnio 35,8 µm (Tab. 4; Ryc. 9c). Średnica apikalna trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych była o 310 µm szersza od średnicy środkowej, stąd ich kształt opisano jako balonowaty (Tab. 3; Ryc. 5g, 8a, 9b). Na pierwszym modelu 3D zaobserwowano 5 kubków smakowych, a na drugim 20 (Tab. 1). W oby dwóch przypadkach kubki smakowe były rozmieszczone z przodu brodawki (Ryc. 5h, i). Średnia gęstość kubków smakowych wynosiła 11 kubków/mm², a ich średnica miała 42,2 µm (Tab. 1, 5).

4.2.5. Powierzchnia grzbietowa tylnej części wału języka

Na tylnej części wału języka **bydła** zaobserwowano 30 brodawek grzybowatych o gęstości 0,9 brodawki/cm² (Tab. 1). Brodawki były okrągłe w zarysie, miały wypukłą powierzchnię grzbietową i średnicę wynoszącą około 1095,7 µm (Tab. 2; Ryc. 6a-c). Analiza wysokości brodawek grzybowatych i nabłonka międzybrodawkowego wykazała wyniesienie brodawek na poziomie 932,1 µm (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Średnia wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki grzybowate wynosiła od 47,4 µm do 193,1 µm, a warstwa rogowa miała wysokość około 17,2 µm (Tab. 4; Ryc. 9c). Trzony łącznotkankowe charakteryzowały się szerszą średnicą apikalną o 232 µm w stosunku do średnicy środkowej, stąd ich kształt przypominał balon (Tab. 3; Ryc. 6a, 8a, 9b). Na oby dwóch modelach 3D kubki smakowe były równomiernie rozmieszczone na grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych (Ryc. 6b, c). Na pierwszym modelu 3D liczba kubków smakowych wynosiła 43, a na drugim 31 (Tab. 1). Szacunkowa gęstość

kubków smakowych wynosiła 24 kubki/mm², a ich średnica wahała się od 30,1 μm do 49,4 μm (Tab. 1, 5).

Gęstość brodawek grzybowatych u **żubra europejskiego** wynosiła 0,9 brodawki/cm², a ich liczba 20 (Tab. 1). Grzbietowa powierzchnia brodawek grzybowatych, okrągłych lub owalnych w zarysie, była wypukła i gładka, a ich średnica wahała się od 1134,6 μm do 1883,1 μm (Tab. 2; Ryc. 6d-f). Wyniesienie brodawek grzybowatych ponad powierzchnię nabłonka, obliczone jako różnica wysokości badanych brodawek i nabłonka międzybrodawkowego, wynosiło 706,7 μm (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego wynosiła 129,5 μm, a warstwy rogowej 19,2 μm (Tab. 4; Ryc. 9c). Z uwagi na niewielką różnicę szerokości pomiędzy środkową i apikalną średnicą trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych, kształt trzonu został opisany jako kolumnowy (Tab. 3; Ryc. 6d, 8b, 9b). Liczba kubków smakowych w pojedynczej brodawce wynosiła 24 na jednym modelu 3D i 4 na drugim (Tab. 1). Na obydwóch modelach kubki smakowe tworzyły małe skupiska na przodzie, tyle i na bokach powierzchni grzbietowej brodawek grzybowatych (Ryc. 6e, f). Gęstość kubków smakowych wynosiła 4 kubki/mm², a ich średnica osiągała 42,9 μm (Tab. 1, 5).

W tylnej części wału języka **żubronia** występowały 46 brodawek grzybowatych okrągłych w zarysie i wypukłych, których gęstość wynosiła 2,7 brodawki/cm² (Tab. 1; Ryc. 6g-i). Średnica brodawek grzybowatych wynosiła 895 μm (Tab. 2). Wysokość brodawek osiągała 1221,5 μm, a wysokość nabłonka międzybrodawkowego 944,4 μm, co dawało wyniesienie brodawek na poziomie 277,1 μm (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim o wysokości 113,3 μm oraz warstwą rogową o wysokości 16,8 μm (Tab. 4; Ryc. 9c). Trzony łącznotkankowe miały kształt przypominający balon, ponieważ różnica między środkową a apikalną średnicą wynosiła 104 μm (Tab. 3; Ryc. 6g, 8a, 9b). Na pierwszym modelu 3D, 8 kubków smakowych tworzyło pionowe skupiska ułożone pośrodkowo na grzbietowej powierzchni brodawki, podczas gdy na drugim modelu 3D obserwowano 18 kubków smakowych zebranych w okrągłe skupisko na powierzchni grzbietowej brodawki grzybowatej (Tab. 1; Ryc. 6h, i). Szacunkowa gęstość kubków smakowych wynosiła 11 kubków/mm², a ich średnica miała średnio 36,5 μm (Tab. 1, 5).

4.2.6. Powierzchnie boczne wału języka

Na bocznych powierzchniach wału języka **bydła** zaobserwowano 45 regularnie rozmieszczonych brodawek grzybowatych o gęstości 1,0 brodawki/cm² (Tab. 1). Średnica tych okrągłych w zarysie brodawek z wypukłą i gładką powierzchnią wynosiła 1071,7 µm (Tab. 2; Ryc. 7a-c). Różnice w wysokości brodawek grzybowatych i nabłonka międzybrodawkowego wskazały na wyniesienie brodawek na wysokość 108,7 µm (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego na brodawkach grzybowatych wynosiła 147,1 µm, a wysokość warstwy rogowej osiągała od 14,8 µm do 74,3 µm wysokości (Tab. 4; Ryc. 9c). Modele 3D brodawek oraz pomiary morfometryczne trzonów łącznotkankowych wskazały malejącą średnicę trzonów brodawek od części podstawnej do apikalnej, stąd kształt trzonu został opisany jako stożkowaty (Tab. 3; Ryc. 7a, 8d, 9b). Na pierwszym modelu 3D zaobserwowano 29 kubków smakowych zgrupowanych po lewej stronie grzbietowej powierzchni brodawki, a na drugim modelu, 4 kubki smakowe było ułożone centralnie (Tab. 1; Ryc. 7b, c). Gęstość kubków smakowych na brodawkach grzybowatych wynosiła średnio 16 kubków/mm², a ich średnica była w przedziale 32,2 µm do 63,0 µm (Tab. 1, 5).

Liczba brodawek grzybowatych na lewej i prawej powierzchni wału języka **żubra europejskiego** wynosiła 46, a ich gęstość osiągała 1,1 brodawki/cm² (Tab. 1). Grzbietowa powierzchnia owalnych w zarysie brodawek grzybowatych była wypukła i gładka, a ich średnica wynosiła 655,6 µm (Tab. 2; Ryc. 7d-f). Średnia wysokość brodawek grzybowatych i nabłonka międzybrodawkowego wynosiła odpowiednio 1589 µm i 1147,8 µm, stąd wyniesienie brodawek grzybowatych ponad nabłonek wynosiło 441,2 µm (Tab. 2, 4; Ryc. 9a). Nabłonek wielowarstwowy płaski pokrywający brodawki grzybowate miał wysokość 120,9 µm, a jego warstwa rogowa miała wysokość 20,9 µm (Tab. 4; Ryc. 9c). Z uwagi na niewielkie różnice między środkową a apikalną średnicą trzonu łącznotkankowego, jego kształt został opisany jako kolumnowy (Tab. 3; Ryc. 7d, 8b, 9b). Na dwóch rekonstrukcjach 3D brodawek grzybowatych żubra zaobserwowano odpowiednio 21 i 6 kubków smakowych rozmieszczonych w skupiskach na lewej stronie i tylnej powierzchni grzbietowej brodawek grzybowatych (Tab. 1; Ryc. 7e, f). Ich gęstość wynosiła 18 kubków/mm², a średnica wahała się od 23,8 µm do 56,1 µm (Tab. 1, 5).

Liczba i gęstość brodawek grzybowatych na bocznych powierzchniach wału języka **żubronia** wynosiła odpowiednio 38 i 1,2 brodawki/cm² (Tab. 1). Brodawki o okrągłym lub owalnym zarysie z płaską i gładką grzbietową powierzchnią miały średnicę 964 µm i wysokość 1601,9 µm (Tab. 2; Ryc. 7g-i). Wysokość nabłonka

międzybrodawkowego wynosiła 1408,9 μm , a wyniesienie brodawek osiągało 193 μm (Tab. 4; Ryc. 9a). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim o wysokości 121,2 μm , a warstwa rogowa miała 17,7 μm wysokości (Tab. 4; Ryc. 9c). Szeroka apikalna średnica trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych była o 138 μm szersza niż średnica środkowa, co wskazywało na balonowaty kształt (Tab. 3; Ryc. 7g, 8a, 9b). Kubki smakowe rozmieszczone były w tylnej lub centralnej części, blisko lewej strony powierzchni grzbietowej brodawek grzybowatych (Ryc. 7h, i). Ich liczba wynosiła 16 na pierwszym modelu 3D i 29 na drugim (Tab. 1). Średnia gęstość kubków smakowych wynosiła 19 kubków/ mm^2 , a ich średnica osiągała średnio 36,9 μm (Tab. 1, 5).

W pliku o nazwie „Animacja 1” znajduje się model 3D brodawki grzybowatej bydląt z trzonem łącznotkankowym oraz rozmieszczeniem kubków smakowych.

4.3. Obserwacje makroskopowe języka królika europejskiego, królika domowego i zająca szaraka

Przednia część języka królika europejskiego, królika domowego oraz zająca szaraka była płaska, natomiast w tylnej części trzonu języka obserwowano mięśniowe wzniesienie, zwane wyniosłością językową (Ryc. 10a-c). Długość całkowita języka królika europejskiego, królika domowego i zająca wynosiła odpowiednio 4,6 cm, 5,7 cm i 5,9 cm. Długości poszczególnych części języka tj. wierzchołka języka, trzonu języka, wyniosłości językowej oraz korzenia języka wynosiły odpowiednio 0,6 cm, 1,5 cm, 2,0 cm i 0,5 cm u królika europejskiego, 0,9 cm, 1,7 cm, 2,7 cm i 0,3 cm u królika domowego i 0,7 cm, 1,9 cm, 2,8 cm i 0,5 cm u zająca szaraka.

4.4. Obserwacje mikroskopowe brodawek grzybowatych na języku królika europejskiego, królika domowego i zająca szaraka

4.4.1. Powierzchnia grzbietowa wierzchołka języka

Brodawki grzybowate u **królika europejskiego** były równomiernie rozmieszczone, a ich średnia liczba wynosiła 35 (Tab. 6). Szacowana gęstość brodawek grzybowatych wynosiła 0,6 brodawki/ mm^2 (Tab. 6). Obserwacje w skaningowym mikroskopie elektronowym wykazały, że brodawki grzybowate były gęsto otoczone przez zrogowaciałe wyrostki brodawek nitkowatych (Ryc. 11a). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate miały spłaszczoną powierzchnię oraz były otoczone przez wał

nabłonkowy (Ryc. 11a, b). Średnica brodawek grzybowatych wynosiła 252,3 μm , a ich wysokość osiągała 422,8 μm (Tab. 7). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym, którego wysokość wynosiła 48,9 μm , a jego warstwa rogowa osiągała 11,1 μm (Tab. 9; Ryc. 11b). Średnica trzonów łącznotkankowych brodawek w części apikalnej była szersza niż średnica środkowa, stąd kształt trzonu opisano jako balonowaty (Tab. 9; Ryc. 11d-f). Na bocznych powierzchniach trzonu brodawki obserwowano 12–14 podłużnych blaszek bocznych (Ryc. 11c-i). Na dwóch modelach 3D obserwowano 4 kubki smakowe rozmieszczone centralnie, natomiast na trzecim modelu znajdowało się 6 kubków smakowych ułożonych liniowo (Tab. 6; Ryc. 11g-i). Średnica kubków smakowych wynosiła ok. 30,4 μm (Tab. 10).

Na powierzchni grzbietowej wierzchołka języka **królika domowego** było 35 równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych, których gęstość wynosiła 0,4 brodawki/ mm^2 (Tab. 6). Brodawki grzybowate były wyższe niż brodawki nitkowate (Ryc. 12a, b). Brodawki były owalne w zarysie z płaską powierzchnią grzbietową i otoczone wałem nabłonkowym (Ryc. 12a, b). Średnica brodawek grzybowatych wynosiła od 211,8 μm do 293,2 μm , a ich wysokość wahała się od 430,5 μm do 498,3 μm (Tab. 7). Średnia wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego wraz z wysokością warstwy rogowej wynosiła odpowiednio 72,8 μm oraz 7,1 μm (Tab. 8). Z uwagi na szerszą średnicę apikalną trzonów łącznotkankowych brodawek, w porównaniu ze średnicą środkową, kształt trzonu został opisany jako balonowaty (Tab. 9, Ryc. 12c-f). Na bocznych powierzchniach trzonów łącznotkankowych obserwowano 10 - 18 podłużnych blaszek bocznych (Ryc. 12c-i). Na pierwszym modelu 3D brodawek grzybowatych zaobserwowano 5 kubków smakowych rozmieszczonych wzdłuż krawędzi brodawki (Tab. 6, Ryc. 12g). Na drugim modelu 3D, 6 kubków smakowych było zgrupowanych po jednej stronie grzbietowej powierzchni brodawki, a na trzecim modelu, 7 kubków smakowych znajdowało się w centralnej części brodawki (Tab. 6; Ryc. 12h, i). Średnica kubków smakowych wahała się od 24,3 μm do 47,9 μm (Tab. 10).

Brodawki grzybowate **zajęcia szaraka** w liczbie około 47 brodawek były równomiernie rozmieszczone i gęsto otoczone wyższymi, zrogowaciałymi wyrostkami brodawek nitkowatych (Tab. 6; Ryc. 13a, b). Średnia gęstość brodawek wynosiła 0,6 brodawek/ mm^2 (Tab. 6). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate, o płaskiej lub pochylonej powierzchni grzbietowej, były otoczone wałem nabłonkowym

(Ryc. 13a, b). Średnica brodawek wahała się od 140,0 μm do 334,4 μm , a ich wysokość wynosiła ok. 470,1 μm (Tab. 7). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki grzybowate wynosiła 58,8 μm , a wysokość jego warstwy rogowej sięgała około 9,1 μm (Tab. 8). Analiza morfometryczna średnic trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych oraz obserwacje modeli 3D przedstawione na rycinach 13d-f pozwoliły na wyróżnienie balonowatego oraz kolumnowego kształtu trzonu brodawki (Tab. 9, Ryc. 13d-f). Każdy obserwowany trzon łącznotkankowy brodawki miał około 14 podłużnych blaszek na powierzchni bocznej (Ryc. 13c-i). Na powierzchni grzbietowej trzonu łącznotkankowego obserwowano okrągłe w zarysie zagłębienia (Ryc. 13c). Na dwóch modelach 3D brodawek grzybowatych zaobserwowano 2 kubki smakowe umieszczone w centralnej części brodawki, natomiast na trzecim modelu 1 kubek smakowy znajdował się na krawędzi brodawki (Ryc. 13 g-i). Średnica kubków smakowych wynosiła około 29,6 μm (Tab. 10).

4.4.2. Powierzchnia brzuszna wierzchołka języka

Na powierzchni brzusznej wierzchołka języka **królika europejskiego** znajdowało się około 41 brodawek grzybowatych skupionych w okolicy szczytowej wierzchołka języka o średniej gęstości 1,79 brodawki/ mm^2 (Tab. 6). Brodawki były gęsto otoczone wyższymi i zrogowaciałymi wyrostkami brodawek nitkowatych (Ryc. 14a, b). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate były otoczone wałem nabłonkowym i charakteryzowały się płaską powierzchnią grzbietową (Ryc. 14a, b). Średnica brodawek wynosiła około 282,1 μm , a ich wysokość osiągała 384,1 μm (Tab. 7). Nabłonek wielowarstwowo płaski pokrywający brodawki grzybowate miał 47,3 μm wysokości, a warstwa rogowa miała wysokość 8,4 μm (Tab. 8). Na podstawie obserwacji macerowanych prób tkankowych w SEM, modeli 3D trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych oraz ich analizy morfometrycznej, wyróżniono balonowaty kształt trzonu brodawki, gdzie na bocznych powierzchniach obserwowano 10 - 11 blaszek bocznych, a na powierzchni grzbietowej widoczne były okrągłe w zarysie zagłębienia (Tab. 9; Ryc. 14c-i). Na każdym modelu 3D brodawki grzybowatej, kubki smakowe były rozmieszczone w części centralnej (Ryc. 14g-i). Na pierwszym modelu 3D liczba kubków smakowych wynosiła 5, a na drugim i trzecim modelu po 4 (Tab. 6, Ryc. 14 g-i). Średnica kubków smakowych wynosiła ok. 29,5 μm (Tab. 10).

Na brzusznej powierzchni wierzchołka języka **królika domowego**, około 44 brodawek grzybowatych o średniej gęstości 2,4 brodawki/ mm^2 było skupionych

w okolicy szczytowej wierzchołka języka (Tab. 6). Badane brodawki były gęsto otoczone wyższymi i zrogowaciałymi wyrostkami mechanicznych brodawek nitkowatych (Ryc. 15a, b). Brodawki grzybowate charakteryzowały się okrągłym zarysem i spłaszczoną powierzchnią grzbietową oraz były otoczone wałem nabłonkowym (Ryc. 15a, b). Średnica badanych brodawek smakowych wahała się od 193,3 μm do 362,4 μm , a ich średnia wysokość wynosiła 388,8 μm (Tab. 7). Średnia wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki grzybowate i jego warstwy rogowej osiągała odpowiednio 59,6 μm oraz 6,7 μm (Tab. 8). Rozszerzenie trzonu łącznotkankowego brodawki grzybowatej w apikalnej części obserwowane na macerowanych próbach tkankowych, modelach 3D i potwierdzone analizą morfometryczną świadczyło o balonowatym kształcie trzonu brodawki (Tab. 9; Ryc. 15 c-f). Na bocznych powierzchniach trzonów łącznotkankowych obserwowano 10-16 podłużnych blaszek bocznych, które rozszerzały się w okolicy apikalnej trzonu brodawek (Ryc. 15c-i). Na powierzchni grzbietowej trzonu łącznotkankowego obserwowano okrągłe w zarysie zagłębienia (Ryc.15c). Na trzech modelach 3D kubki smakowe były rozmieszczone pośrodkowo na grzbietowej powierzchni brodawek, jednak ich liczba była zróżnicowana (Ryc. 15g-i). Na pierwszym modelu obserwowano pojedynczy kubek smakowy, na drugim modelu były 2, a na trzecim 3 kubki smakowe o średnicy 31,2 μm (Tab. 6, 10, Ryc. 15g-i).

Brzuszna powierzchnia wierzchołka języka **zająca szaraka** charakteryzowała się występowaniem średnio 96 brodawek grzybowatych, w większości skupionych w okolicy szczytowej wierzchołka, o średniej gęstości 2,2 brodawek/ mm^2 (Tab. 6). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate posiadały zaokrągloną powierzchnię grzbietową i były gęsto otoczone brodawkami nitkowatymi o podobnej wysokości (Ryc. 16a, b). Średnica badanych brodawek smakowych wynosiła około 222,5 μm , a ich wysokość osiągała 470,3 μm (Tab. 7). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym o średniej wysokości 50,9 μm oraz warstwą rogową o 7,3 μm wysokości (Tab. 8). Z uwagi na porównywalną średnicę trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych w części środkowej i apikalnej, kształt trzonu został opisany jako kolumnowy (Tab. 9; Ryc. d, e). Na bocznych powierzchniach trzonów brodawek obserwowano około 17 podłużnych blaszek bocznych (Ryc. 16c-f). Powierzchnia grzbietowa trzonów łącznotkankowych brodawek cechowała się obecnością okrągłych w zarysie zagłębień (Ryc. 16c). Na rycinie 16f pokazano widok z góry trzech sąsiadujących brodawek grzybowatych z kubkami smakowymi

ulokowanymi w pośrodkowej części powierzchni grzbietowej brodawek. Na pierwszym modelu 3D obserwowano 3 kubki smakowe, natomiast na drugim i trzecim modelu 6 kubków smakowych (Tab. 6; Ryc. 16f). Średnica kubków smakowych wyniosła ok. 36,2 μm (Tab. 10).

4.4.3. Powierzchnia grzbietowa trzonu języka

Liczba i gęstość równomiernie rozłożonych brodawek grzybowatych **królika europejskiego** wynosiła odpowiednio 63 i 0,4 brodawki/ mm^2 (Tab. 6). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate o lekko wklęsłej powierzchni grzbietowej były otoczone wyższymi, zrogowaciałymi wyrostkami brodawek nitkowatych (Ryc. 17a, b). Średnica badanych brodawek wyniosła 177,6 μm , a wysokość osiągała 521,1 μm (Tab. 7). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym o średniej wysokości 59,2 μm i wysokości warstwy rogowej sięgającej 13,4 μm (Tab. 8). Analiza morfometryczna oraz obserwacje macerowanych prób tkankowych i modeli 3D wskazały na występowanie kolumnowego typu trzonu łącznotkankowego brodawek grzybowatych (Tab. 9, Ryc. 17c, e). Na macerowanych próbach tkankowych zaobserwowano zgięcie trzonu łącznotkankowego brodawki w kierunku dogardłowym (Ryc. 17c). Na bocznej powierzchni trzonu łącznotkankowego, w połowie wysokości trzonu występowało około 11 blaszek bocznych, a na powierzchni grzbietowej niewielkie zagłębienia (Ryc. 17c-g). Na rycinach 17f i 17g przedstawiono widok z góry modeli 3D brodawek grzybowatych z 1 lub 2 kubkami smakowymi rozmieszczonymi w pośrodkowej części brodawek o średnicy około 47,5 μm (Tab. 6, 10).

Na grzbietowej powierzchni trzonu języka **królika domowego** obserwowano około 37 równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych o gęstości 0,3 brodawki/ mm^2 (Tab. 6). Brodawki grzybowate charakteryzowały się okrągłym zarysem i skośną powierzchnią grzbietową (Ryc. 18 a, b). Brodawki były gęsto otoczone wyższymi, zrogowaciałymi wyrostkami brodawek nitkowatych (Ryc. 18a, b). Średnica brodawek grzybowatych wahała się od 218,6 μm do 289,8 μm , a wysokość od 544,1 μm do 623,7 μm (Tab. 7). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki grzybowate oraz jego warstwy rogowej wynosiły odpowiednio 79,2 μm oraz 7,6 μm (Tab. 8). Z uwagi na rozszerzenie trzonu łącznotkankowego brodawki grzybowatej w części apikalnej, wyznaczono balonowaty kształt trzonu (Tab. 9, Ryc. 18 d-f). W części apikalnej, bocznej powierzchni trzonu brodawki obserwowano 10 - 16 blaszek bocznych (Ryc. 18 c-i). Na grzbietowej powierzchni trzonu brodawki

widoczne były zagłębienia (Ryc. 18c). Na pierwszym i trzecim modelu 3D określono odpowiednio 6 i 1 kubków smakowych rozmieszczonych w pośrodkowej części brodawek, a na drugim modelu, 4 kubki smakowe były ułożone peryferyjnie (Tab. 6; Ryc. 18 g-i). Średnica kubków smakowych wynosiła około 45,3 μm (Tab. 10).

Brodawki grzybowate w liczbie około 41 były równomiernie rozmieszczone na grzbietowej powierzchni trzonu języka **zajęcia szaraka** (Tab. 6). Średnia gęstość brodawek wynosiła 0,2 Fu/mm^2 (Tab. 6). Wyższe brodawki nitkowate, gęsto otaczały brodawki grzybowate (Ryc. 19a, b). Okrągłe lub owalne w zarysie brodawki grzybowate charakteryzowały się uwypukloną powierzchnią grzbietową (Ryc. 19a, b). Średnica brodawek wynosiła około 149,1 μm , a ich wysokość osiągała 548,6 μm (Tab. 7). Średnia wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki grzybowate oraz jego warstwy rogowej wynosiła odpowiednio 52,3 μm i 8,3 μm (Tab. 8). Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych charakteryzowały się dogardłowym zgięciem (Ryc. 19c). Z uwagi na niewielkie różnice w średnicy trzonu brodawki w części środkowej i apikalnej, kształt opisano jako kolumnowy (Tab. 9; Ryc. 19 c-f). Okrągłe w zarysie zagłębienia były widoczne na powierzchni grzbietowej trzonu brodawki (Ryc. 19c). Błazki boczne, w liczbie 5 - 10, znajdowały się w apikalnej części bocznej powierzchni trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych (Ryc. 19 c-i). Na pierwszym modelu 3D wskazano 3 kubki smakowe ułożone liniowo, podczas gdy na drugim i trzecim modelu kubki smakowe były rozmieszczone równomiernie na całej grzbietowej powierzchni brodawek, a ich liczba wynosiła odpowiednio 8 i 4 (Ryc. 19 g-i). Średnica kubków smakowych wynosiła średnio 35,6 μm (Tab. 10).

4.4.4. Powierzchnie boczne wyniosłości językowej

Po prawej i lewej stronie wyniosłości językowej **królika europejskiego** obserwowano od 4 do 6 brodawek grzybowatych o liniowym ułożeniu i średniej gęstości 0,07 brodawki/ mm^2 (Tab. 6). Obserwacje preparatów histologicznych w mikroskopie świetlnym oraz prób tkankowych w skaningowym mikroskopie elektronowym wskazały, że brodawki były zagłębione w błonie śluzowej języka i gęsto otoczone brodawkami nitkowatymi, które pokrywały grzbietową powierzchnię brodawek grzybowatych (Ryc. 20a, b). Brodawki grzybowate były okrągłe lub owalne w zarysie, z zaokrągloną powierzchnią grzbietową (Ryc. 20a, b). Średnica i wysokość brodawek wynosiły odpowiednio 262,9 μm i 391,8 μm (Tab. 7). Brodawki były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym o średniej wysokości 41,1 μm (Ryc. 20b,

Tab. 8). Warstwa rogowa miała 11,4 μm wysokości (Tab. 8). Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych charakteryzowały się podobnymi średnicami w części środkowej oraz apikalnej, stąd ich kształt został opisany jako kolumnowy (Tab. 9, Ryc. 20d, e). Obserwacje macerowanych prób tkankowych uwidoczniły wygięcie brodawek grzybowatych w kierunku zębów (Ryc. 20c). Na bocznej powierzchni trzonów łącznotkankowych obserwowano około 12 blaszek bocznych (Ryc. 20 c-e). Na powierzchni grzbietowej trzonów łącznotkankowych były widoczne zagłębienia (Ryc. 20c). Kubki smakowe obserwowane na modelach 3D brodawek grzybowatych były rozmieszczone na całej grzbietowej powierzchni brodawek w liczbie 8 na pierwszym modelu 3D i 7 na drugim (Tab. 6; Ryc. 20f, g). Średnica kubków smakowych wynosiła ok. 30,2 μm (Tab. 10).

Na bocznych powierzchniach wyniosłości językowej **królika domowego** znajdowało się od 8 do 12 liniowo ułożonych brodawek grzybowatych o gęstości 0,07 brodawki/ mm^2 (Tab. 6). Obserwowane brodawki grzybowate były zagłębione w błonie śluzowej języka i częściowo pokryte otaczającymi brodawkami nitkowatymi (Ryc. 21a, b). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate miały zaokrągloną powierzchnię grzbietową, a ich średnica i wysokość wynosiły odpowiednio 255,9 μm i 466,6 μm (Tab. 7, Ryc. 21a, b). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki grzybowate osiągnęła 79,8 μm , a warstwa rogowa miała 10,6 μm wysokości (Tab. 8; Ryc. 21b). Na podstawie obserwacji macerowanych prób tkankowych, modeli 3D i analizy morfometrycznej brodawek grzybowatych wyróżniono balonowaty kształt trzonów łącznotkankowych brodawek z 8 - 12 podłużnymi blaszkami bocznymi, które rozszerzają się w apikalnej części trzonu brodawki (Tab. 9; Ryc. 21c-i). Kubki smakowe widoczne na grzbietowej powierzchni modeli 3D były skupione na bocznej części brodawek, skierowanej do zębów (Ryc. 21g-i). Liczba kubków smakowych była zmienna i wynosiła 3 kubki smakowe na pierwszym modelu 3D, 6 na drugim, i 4 na trzecim (Tab. 6; Ryc. 21 g-i). Średnica kubków smakowych wahała się od 24,3 μm do 40,5 μm (Tab. 10).

Brodawki grzybowate w liczbie 12 do 16 były liniowo rozmieszczone na prawej i lewej stronie wyniosłości językowej u **zajęcia szaraka** (Tab. 6). Średnia gęstość brodawek wynosiła 0,08 brodawki/ mm^2 (Tab. 6). Brodawki te były zagłębione w nabłonku i otoczone wyższymi brodawkami nitkowatymi, które nie pokrywały grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych (Ryc. 22a, b). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate miały spłaszczoną powierzchnią grzbietową, a ich średnica

i wysokość wynosiły odpowiednio 351,8 μm i 519,3 μm (Tab.7; Ryc. 22a, b). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego występującego na brodawkach grzybowatych i jego warstwy rogowej wynosiła 65,5 μm oraz 11,8 μm (Tab. 8; Ryc. 21b). Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano balonowate trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych, zgięte w kierunku przednim (Tab. 9; Ryc. 22c-f). Na bocznych powierzchniach trzonów występowało 8 - 12 podłużnych blaszek, które rozszerzały się w apikalnej części brodawek (Ryc. 22c-f). Na rycinach 22g - i przedstawiono widok z góry modeli 3D trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych z zmiennym rozmieszczeniem oraz liczbą kubków smakowych. Na pierwszym i drugim modelu 3D obserwowano równomiernie rozmieszczone kubki smakowe w liczbie odpowiednio 6 i 16 (Tab. 6; Ryc. 22g, h). Na trzecim modelu, 11 kubków smakowych było skupionych po jednej stronie grzbietowej powierzchni brodawki, która była skierowana w kierunku zębów (Tab. 6; Ryc. 22 i). Średnica kubków smakowych wahała się od 23,2 μm do 46,9 μm (Tab. 10).

Animacja przedstawiająca model 3D brodawki grzybowatej zajęczaków z trzonem łącznotkankowym i rozmieszczeniem kubków smakowych znajduje się w pliku o nazwie „Animacja 2”.

4.5. Obserwacje mikroskopowe brodawek okolonych na języku królika europejskiego, królika domowego oraz zająca szaraka

Dwie brodawki okolone **królika europejskiego** znajdowały się na tylnopółśrodkowej powierzchni wyniosłości językowej (Ryc. 10a). Na elektronogramach z skaningowego mikroskopu elektronowego brodawek okolonych obserwowano owalny zarys trzonu brodawki, z wypukłą i nieregularną powierzchnią oraz płaski wał brodawki oddzielony od trzonu bruzdą o średniej szerokości 52,0 μm (Tab. 11; Ryc. 23a, b). Średnica brodawek okolonych mierzona wzdłuż długiej osi wahała się od 1,4 mm do 3,4 mm, natomiast średnica i wysokość trzonu brodawki wynosiły odpowiednio ok. 794,1 μm i 632,3 μm (Tab. 11). Trzon brodawki okolonej, jak i wał były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym, a kubki smakowe były rozmieszczone na bocznych powierzchniach trzonu i wału brodawki (Ryc. 23b, c). Pomiar morfometryczny nabłonka wielowarstwowego płaskiego na powierzchni grzbietowej trzonu brodawki, wału brodawki oraz nabłonka z kubkami smakowymi wynosiły odpowiednio 159,0 μm , 204,1 μm i 59,4 μm (Tab. 11). Wysokość warstwy

rogowej osiągała 8,2 μm wysokości (Tab. 11). Obserwacje trzonów łącznotkankowych trzonu brodawki okolonej wykazały obecność środkowych, palczastych wypustek otoczonych przez bocznie spłaszczone blaszki ułożone na kształt płatków w kwiecie (Ryc. 23d, g). Średnica trzonu łącznotkankowego w trzonie brodawki okolonej wynosiła 578,9 μm (Tab. 11). Trzon łącznotkankowy wału brodawki okolonej tworzył blaszki otaczające trzon brodawki (Ryc. 23d, g). Modele 3D brodawek okolonych ujawniły liczne kubki smakowe rozmieszczone w 3-6 rzędach wzdłuż bocznych powierzchni trzonu i wału brodawki, a także rozproszone na powierzchni grzbietowej brodawki (Ryc. 23e, f, g). Dodatkowo część kubków smakowych była zgrupowana w skupiskach złożonych z 17-26 kubków smakowych (Ryc. 23h, i, j). Liczba kubków smakowych w pojedynczej brodawce oznaczona na czterech modelach 3D wynosiła 41, 160, 207 oraz 272 (Tab. 11). Średnica kubków smakowych wynosiła od 22,6 μm do 54,5 μm (Tab. 11).

Na tylnopośrodkowej części trzonu języka **królika domowego** obserwowano dwie brodawki okolone (Ryc. 10b). Trzon brodawki okolonej był okrągły w zarysie, miał nieregularną powierzchnię grzbietową i był otoczony przez gładki wał brodawki oddzielony bruzdą o szerokości od 21,9 μm do 122,7 μm (Tab. 11; Ryc. 24a, b). Obserwacje elektronogramów SEM wykazały obecność szerokiej bruzdy brodawkowej, podczas gdy modele 3D wskazały, że poniżej powierzchni grzbietowej brodawki znajdują się miejsca, gdzie wał brodawki jest częściowo zrośnięty z trzonem brodawki (Ryc. 24a, 25b). Średnica brodawek, mierzona wzdłuż długiej osi brodawki, wynosiła 2,1 mm, a średnica i wysokość trzonu brodawek okolonych wynosiła odpowiednio 980,5 μm i 467,9 μm (Tab. 11). Obserwacje przekroi histologicznych wskazały, że boczne powierzchnie trzonu jak i wału brodawek okolonych były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim z warstwą rogową (Ryc. 24b, c). Średnia wysokość nabłonka na powierzchni trzonu brodawki okolonej wyniosła 179,2 μm , na wale brodawki 166,5 μm , a w okolicy kubków smakowych 60,9 μm (Tab. 11). Wysokość warstwy rogowej wynosiła od 3,6 μm do 18,1 μm (Tab. 11). Trzon łącznotkankowy trzonu brodawki okolonej był zbudowany z systemu blaszek z palczastymi wypustkami, co razem przypominało kształtem kwiat (Ryc. 24d, e, f). Średnia szerokość trzonu łącznotkankowego brodawek okolonych wynosiła 805,1 μm (Tab. 11). Kubki smakowe były rozmieszczone równomiernie w 3-5 rzędach, w nabłonku na bocznej powierzchni trzonu brodawki i w nabłonku wału brodawki (Ryc. 24b, c, e, 25a - d). W miejscach częściowego zrośnięcia trzonu i wału brodawki nie występowały kubki smakowe (Ryc.

25b). Liczba kubków smakowych obserwowana na modelach 3D brodawek okolonych wynosiła 134 i 206, a ich średnica wahała się od 25,7 μm do 57,5 μm (Tab. 11).

Obserwacje makroskopowe, SEM i LM brodawek okolonych **zająca szaraka**, występujących na tylnopiętrowej powierzchni języka, wykazały obecność dwóch owalnych w zarysie brodawek o nieregularnym na powierzchni grzbietowej trzonie brodawki, płaskim i lekko pofałdowanym wale brodawki oraz szerokiej bruzdzie brodawkowej osięgającej 58,8 μm (Tab. 11; Ryc. 10c, 26a, b). Średnia szerokość brodawek okolonych, a także średnica i wysokość trzonu brodawki wynosiły odpowiednio 2,1 mm, 801,2 μm i 676,5 μm (Tab. 11). Brodawki okolone były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym, którego średnia wysokość na trzonie brodawki wynosiła 208,2 μm , na wale brodawki 194,5 μm , a w okolicy kubków smakowych 72,3 μm (Tab. 11; Ryc. 26b). Wysokość warstwy rogowej wynosiła średnio 8,7 μm (Tab. 11). Trzon łącznotkankowy trzonu brodawki okolonej składał się z nieregularnych, bocznie spłaszczonych blaszek (Ryc. 26c - e). Trzon łącznotkankowy wału brodawki był zbudowany z blaszek, wśród których wewnętrzna blaszka był ciągła i skierowana ku bruzdzie, a pozostałe posiadały stożkowate wyrostki na powierzchni (Ryc. 26c, d, e). Średnica trzonu łącznotkankowego trzonu brodawki wynosiła 655,0 μm (Tab. 11). Modele 3D wykazały, że kubki smakowe były rozmieszczone równomiernie w 3-6 rzędach wzdłuż bocznej powierzchni trzonu i wału brodawki oraz częściowo na apikalnej powierzchni trzonu brodawek okolonych (Ryc. 26e-i). Liczba kubków smakowych wynosiła 445 na pierwszym modelu 3D i 458 na drugim modelu, a ich średnica wynosiła 38,3 μm (Tab. 11).

Animacja przedstawiająca model 3D brodawki okolonej zajęczaków z trzonem łącznotkankowym i rozmieszczeniem kubków smakowych znajduje się w pliku o nazwie „Animacja 3”.

4.6. Obserwacje mikroskopowe brodawek liściastych królika europejskiego, królika domowego oraz zająca szaraka

Dwie brodawki liściaste obserwowane na tylnobocznej powierzchni języka **królika europejskiego** miały owalny w zarysie kształt i były zbudowane z 12 - 16 fałdów błony śluzowej (Tab. 12; Ryc. 27a, b). Średnica brodawki liściastej wynosiła 0,4 cm (Tab. 12). Bruzdy brodawkowe między fałdami błony śluzowej miały szerokość od 11,8 μm do 102,5 μm (Tab. 12). Część fałdów błony śluzowej w brodawce dzieliło się na dodatkowe fałdy (Ryc. 27a). Szerokość i wysokość pojedynczego fałdu błony śluzowej wynosiły odpowiednio 304,7 μm i 602,3 μm (Tab. 12). Brodawki liściaste były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim z warstwą rogową na bocznych powierzchniach każdego fałdu błony śluzowej (Ryc. 26b, c). Średnia wysokość nabłonka na powierzchni fałdów, w okolicy kubków smakowych oraz wysokość warstwy rogowej wynosiła odpowiednio 106,1 μm , 45,6 μm i 7,7 μm (Tab. 12). Trzon łącznotkankowy pojedynczego fałdu błony śluzowej brodawek liściastych był zbudowany z jednej środkowej, prostej blaszki oraz dwóch blaszek bocznych skierowanych na zewnątrz (Ryc. 27b, d-g). Średnica całego trzonu łącznotkankowego w pojedynczym fałdzie błony śluzowej brodawki liściastej wynosiła 226,5 μm (Tab. 12). Blaszki boczne miały wysokość 325,1 μm , a środkowa blaszka miała wysokość ok. 400,6 μm (Tab. 12). Kubki smakowe znajdowały się w nabłonku pokrywającym boczne powierzchnie każdego fałdu błony śluzowej brodawki i były ułożone w 1 - 4 rzędy (Ryc. 27b, d, f, g). Analiza modeli 3D pojedynczego fałdu błony śluzowej brodawki liściastej umożliwiła dokładne określenie liczby kubków smakowych po obu stronach fałdu. Na jednej powierzchni fałdu występowało od 56 do 216 kubków smakowych, a na przeciwnej powierzchni od 84 do 211 kubków smakowych, których średnica wynosiła od 27,6 μm do 54,1 μm (Tab. 12).

Na tylnobocznej powierzchni języka **królika domowego** obserwowano dwie owalne w zarysie brodawki liściaste, które dzieliły się na 13 - 17 równoległych ułożonych fałdów błony śluzowej oddzielonych bruzdą o średniej szerokości 38,2 μm (Tab. 12; Ryc. 28 a-c). Średnica brodawek liściastych wynosiła od 0,4 do 0,6 cm (Tab. 12). W brodawkach liściastych zaobserwowano podział pojedynczego fałdu na dwa nowe fałdy błony śluzowej (Ryc. 28a). Szerokość i wysokość pojedynczego fałdu wynosiły odpowiednio 268,0 μm i 370,1 μm (Tab. 12). Brodawki były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim z warstwą rogową pokrywającą boczne powierzchnie fałdów (Ryc. 28b, f). Wysokość nabłonka na powierzchni fałdów wynosiła średnio 106,5 μm , w okolicy kubków smakowych 55,7 μm , a wysokość warstwy rogowej wahała się

od 3,3 μm do 20,8 μm (Tab. 12). W pojedynczym fałdzie błony śluzowej brodawki liściastej, trzon łącznotkankowy był podzielony na trzy blaszki, wśród których środkowa była prosta, a boczne były skierowane na zewnątrz (Ryc. 28b - e). Średnica trzonu łącznotkankowego fałdów błony śluzowej wynosiła 164,5 μm (Tab. 12). Wysokość blaszki środkowej i blaszek bocznych wynosiła odpowiednio 303,6 μm i 239,5 μm (Tab. 12). Kubki smakowe były regularnie rozmieszczone po każdej stronie pojedynczego fałdu błony śluzowej w 2 - 4 rzędach (Ryc. 28b, c, e-i). Średnia liczba kubków smakowych po lewej stronie fałdu wynosiła 193, a po prawej 219 (Tab. 12). Średnica kubków smakowych wahała się od 26,9 μm do 51,7 μm (Tab. 12).

Dwie brodawki liściaste **zajęca szaraka** o owalnym kształcie i średnicy 0,6 cm występowały na tylnobocznej powierzchni trzonu języka i były zbudowane z 14-21 fałdów błony śluzowej oddzielonych bruzdami o szerokości od 11,7 μm do 104,2 μm (Tab. 12; Ryc. 29a - c). Modele 3D brodawek wykazały, że pojedynczy fałd błony śluzowej może się podzielić na dwa nowe fałdy (Ryc. 29d, e). Szerokość i wysokość pojedynczego fałdu wynosiły odpowiednio 268,6 μm i 367,2 μm (Tab. 12). Każdy fałd błony śluzowej był pokryty nabłonkiem wielowarstwowym płaskim o wysokości 97,2 μm na powierzchni grzbietowej fałdów i 53,3 μm w okolicy kubków smakowych (Tab. 12). Warstwa rogowa występowała na powierzchni grzbietowej i powierzchniach bocznych fałdów błony śluzowej i miała średnią wysokość 6,8 μm (Tab. 12; Ryc. 29b). W każdym fałdzie błony śluzowej brodawki liściastej zaobserwowano podział trzonu łącznotkankowego o średnicy 188,0 μm na środkową, pionową blaszkę oraz dwie blaszki boczne skierowane na zewnątrz. (Tab. 12; Ryc. 29b-f). Wysokość blaszki środkowej i blaszek bocznych wynosiły odpowiednio 327,1 μm i 252,9 μm (Tab. 12). Kubki smakowe, ułożone w 2 - 7 rzędów, znajdowały się na bocznych powierzchniach każdego fałdu błony śluzowej brodawki (Ryc. 29g). Średnia liczba kubków smakowych po lewej stronie fałdów błony śluzowej wynosiła 228, a po prawej 208 (Tab. 12). Średnica kubków smakowych w brodawkach liściastych wahała się od 24,0 μm do 53,5 μm (Tab. 12).

Dołączony plik o nazwie „Animacja 4” przedstawia model 3D brodawki liściastej zajęczaków z trzonem łącznotkankowym oraz rozmieszczeniem kubków smakowych.

4.7. Obserwacje makroskopowe języka kota domowego

Makroskopowo na języku kota wyróżniono trzy anatomiczne części języka: zaokrąglony wierzchołek języka, trzon języka oraz korzeń języka (Ryc. 30). W przedniej części trzonu języka zaobserwowano pasmo silnie zrogowaciałych dużych brodawek nitkowatych, nazywanych zębami rogowymi (Ryc. 30). Długość języka kotów wahała się od 5,5 cm do 7,3 cm, a średnie długości wierzchołka języka, trzonu języka oraz korzenia języka wynosiły odpowiednio 0,9 cm, 4,4 cm i 1,1 cm.

Na powierzchni języka zaobserwowano dwa rodzaje brodawek smakowych, tj. brodawki grzybowate i okolone oraz brodawki nitkowate i brodawki stożkowate reprezentujące brodawki mechaniczne. Na dolnej powierzchni wierzchołka języka nie wykazano obecności brodawek językowych, natomiast na korzeniu języka występowały wyłącznie brodawki stożkowate (Ryc. 30).

4.8. Obserwacje mikroskopowe brodawek grzybowatych kota domowego

4.8.1. Krawędź wierzchołka języka oraz powierzchnia grzbietowa wierzchołka języka

Na krawędzi wierzchołka języka kota obserwowano pasmo 10 - 15 okrągłych w zarysie brodawek grzybowatych o płaskich lub wypukłych powierzchniach (Tab. 13; Ryc. 31a, b). Średnica brodawek wynosiła ok. 472,1 μm , a wysokość 296,1 μm (Tab. 13). Brodawki grzybowate były otoczone przez masywne brodawki nitkowate posiadające 1-3 krótsze zrogowaciałe wyrostki skierowane dogrzebietowo (Ryc. 31b). Brodawki nitkowate nie pokrywały powierzchni brodawek grzybowatych (Ryc. 31b). Nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący pokrywający brodawki grzybowate miał ok. 56,5 μm wysokości, a jego warstwa rogowa była cienka i wynosiła 4,3 μm (Tab. 13; Ryc. 32a, b). Na rycinie 31c przedstawiono elektronogram SEM, na którym wskazano pory smakowe na powierzchni grzbietowej brodawki grzybowatej. Macerowane próby tkankowe obserwowane w SEM, modele 3D oraz analiza morfometryczna trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych wskazały na występowanie dwóch typów trzonów: (i) kolumnowego i (ii) grzybowatego, których średnia wysokość wynosiła 255,6 μm (Tab. 14; Ryc. 31d, 32d, e). Typ kolumnowy charakteryzował się podobnymi średnicami trzonu w części środkowej i apikalnej, które wynosiły odpowiednio 114,3 μm i 109,9 μm (Tab. 14, Ryc. 32e). W typie grzybowatym średnica apikalna była szersza od średnicy środkowej o ok. 138 μm i charakteryzowała się spłaszczoną powierzchnią grzbietową (Tab. 14, Ryc. 32d). Na kolumnowych trzonach łącznotkankowych

zaobserwowano 8 podłużnych blaszek bocznych, a w typie grzybowatym około 8 blaszek bocznych wyznaczono wyłącznie w apikalnej części trzonu (Ryc. 31d, 32d, e). W każdym typie trzonu łącznotkankowego oznaczono płytkie zagłębienia na ich powierzchniach grzbietowych (Ryc. 31d). Na modelu 3D brodawki grzybowatej z kolumnowym trzonem łącznotkankowym, około 12 kubków smakowych było rozmieszczonych pośrodkowo w 2-3 rzędach na powierzchni grzbietowej brodawki (Tab. 13; Ryc. 32h). Brodawki o grzybowatym trzonie łącznotkankowym charakteryzowały się równomiernie rozłożonymi kubkami smakowymi w liczbie 30 (Tab. 13; Ryc. 32g). Średnica kubków smakowych wynosiła ok. 24,6 μm (Tab. 13).

Na powierzchni grzbietowej wierzchołka języka kota zaobserwowano około 75 równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych o średniej gęstości 0,39 brodawki/ mm^2 (Tab. 13; Ryc. 31a). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate charakteryzowały się spłaszczoną powierzchnią grzbietową (Ryc. 31e, 32c). Średnica i wysokość brodawek wynosiły odpowiednio 294,7 μm i 274,6 μm (Tab. 13). Brodawki grzybowate były gęsto otoczone małymi brodawkami nitkowatymi z 6-10 krótkimi, cienkimi, zrogowaciałymi wyrostkami skierowanymi ku tyłowi (Ryc. 31e). Brodawki nitkowate nie pokrywały brodawek smakowych (Ryc. 31e). Na powierzchni grzbietowej brodawek grzybowatych obserwowano nabłonek wielowarstwowy płaski o średniej wysokości 56,1 μm z warstwą rogową o wysokości ok. 4,9 μm (Tab. 13; Ryc. 32c). Trzony łącznotkankowe charakteryzowały się szerszą średnicą w części apikalnej, w porównaniu do części środkowej oraz zaokrągloną powierzchnią grzbietową brodawki, stąd kształt trzonu został opisany jako maczugowaty (Tab. 14; Ryc. 31f, 32f). W apikalnej części trzonu łącznotkankowego zaobserwowano około 11 podłużnych blaszek bocznych, a na powierzchni grzbietowej występowały okrągłe w zarysie zagłębienia (Ryc. 31f, 32f). Dwa przygotowane modele 3D brodawek grzybowatych wykazały podobne rozmieszczenie i liczbę kubków smakowych. Na rycinie 32i przedstawiono model 3D z 18 kubkami smakowymi, równomiernie rozmieszczonymi na powierzchni grzbietowej brodawek, których średnica wynosiła około 23,8 μm (Tab. 13).

4.8.2. Przednio-boczna część trzonu języka

W przednio-bocznej powierzchni trzonu języka okrągłe w zarysie brodawki grzybowate o płaskich lub zaokrąglonych powierzchniach były równomiernie rozmieszczone pomiędzy małymi brodawkami nitkowatymi (Ryc. 33a, b, 34a-c). Średnia liczba brodawek po każdej stronie wynosiła 60, natomiast ich średnia gęstość, średnica i wysokość wynosiły odpowiednio 0,35 brodawki/mm², 422,3 μm i 371,5 μm (Tab. 13). Wykazano, że brodawki grzybowate występujące wzdłuż zębów rogowych były o około 92 μm szersze i bardziej spłaszczone niż te położone doobocznie pomiędzy małymi brodawkami nitkowatymi (Ryc. 33a, b). Na bocznych krawędziach języka obserwowano wydłużone brodawki grzybowate skierowane dogrzbietowo, które w apikalnej części powierzchni bocznej trzonu posiadały zagłębienia (Ryc. 33d). Małe brodawki nitkowate nie pokrywały powierzchni brodawek grzybowatych, były skierowane doogonowo i posiadały od 4 do 10 zrogowaciałych wyrostków (Ryc. 33b). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym z cienką warstwą rogową (Ryc. 34a - c). Średnia wysokość nabłonka i warstwy rogowej wynosiły odpowiednio 58,0 μm i 4,5 μm (Tab. 13). Analiza uzyskanych modeli 3D oraz analiza morfometryczna wskazały na występowanie trzech typów trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych (Tab. 14). Brodawki grzybowate ułożone wzdłuż zębów rogowych miały trzony łącznotkankowe w kształcie grzybowatym i kolumnowym, natomiast trzony łącznotkankowe bocznie ułożonych brodawek grzybowatych, pomiędzy małymi brodawkami nitkowatymi, miały kształt maczugowaty (Tab. 14; Ryc. 33c, 34d-f). Średnia wysokość wszystkich trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych wynosiła 289,3 μm (Tab. 14). Grzbietowa powierzchnia grzybowatego trzonu łącznotkankowego była spłaszczona, a jego apikalna średnica była o około 113 μm szersza niż średnica środkowa (Tab. 14; Ryc. 34d). W typie kolumnowym średnica trzonu w części apikalnej i środkowej były podobne (Tab. 14; Ryc. 34e). W typie maczugowatym, apikalna średnica trzonu brodawki była większa od średnicy w części środkowej (Tab. 14; Ryc. 34f). Na apikalnej części trzonu łącznotkankowego o kształcie grzybowatym i maczugowatym zaobserwowano od 6 do 13 bocznych blaszek, a wzdłuż bocznych powierzchni typu kolumnowego widoczne były liczne, krótkie i ostro zakończone wyrostki łącznotkankowe (Ryc. 33c, 34d-f). Niezależnie od kształtu trzonu łącznotkankowego, na powierzchni grzbietowej występowały zagłębienia (Ryc. 33c). W brodawkach grzybowatych z grzybowatym i kolumnowym trzonem łącznotkankowym oznaczono odpowiednio 40 i 35 kubków smakowych, rozmieszczonych na bocznej części

powierzchni grzbietowych brodawek w formie pasma o kształcie półksiężyca (Tab. 13; Ryc. 34g, h). Na powierzchni trzonu brodawki typu maczugowatego kubki smakowe były równomiernie rozmieszczone na całej apikalnej powierzchni brodawek, a ich liczba wynosiła 20 (Tab. 13; Ryc. 34i). Średnica kubków smakowych wynosiła około 26,4 μm (Tab. 13).

4.8.3. Tylina część trzonu języka

Na tylnej części trzonu języka brodawki grzybowate były analizowane na bocznych krawędziach trzonu języka, gdzie brodawki nitkowate były skierowane ukośnie do linii pośrodkowej języka oraz w obszarze pośrodkowym, za zębami rogowymi, gdzie brodawki grzybowate były rozmieszczone nierównomiernie pomiędzy rzędami brodawek nitkowatych skierowanymi ku tyłowi (Ryc. 35a, b). Średnia gęstość brodawek grzybowatych na całej tylnej części trzonu języka wynosiła 0,24 brodawki/ mm^2 (Tab. 13).

Na obu powierzchniach tylnobocznej części trzonu języka zaobserwowano około 22 brodawek grzybowatych o okrągłym lub nieregularnym zarysie, których powierzchnie grzbietowe były płaskie (Tab. 13; Ryc. 35a, 36a-c). Brodawki miały średnicę ok. 567,5 μm i wysokość 395,8 μm (Tab. 13). Brodawki nitkowate otaczały, ale nie pokrywały brodawek grzybowatych (Ryc. 35b). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym o wysokości 57,7 μm , a wysokość jego warstwy rogowej wynosiła 4,5 μm (Tab. 13; Ryc. 36a-c). Przeprowadzone analizy wskazały dwa typy trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych o średniej wysokości 320,5 μm (Tab. 14; Ryc. 36d-f). Trzony łącznotkankowe brodawek o kształcie grzybowatym z płaskimi powierzchniami grzbietowymi charakteryzowały się szerszą średnicą apikalną o 212 μm w porównaniu do części środkowej (Tab. 14; Ryc. 36d, e). Na bocznej powierzchni apikalnej części trzonu łącznotkankowego brodawki obserwowano krótkie wypustki łącznotkankowe (Ryc. 36d). W maczugowatym typie trzonów łącznotkankowych powierzchnia grzbietowa była zaokrąglona i gładka, a wzdłuż powierzchni bocznych trzonów wyróżniono kilka krótkich blaszek bocznych (Ryc. 36f). Różnica między średnicą apikalną a środkową w typie maczugowatym wynosiła 69 μm (Tab. 14). Na pierwszym modelu 3D zaobserwowano 41 kubków smakowych podzielonych na 3 mniejsze grupy występujące w różnych miejscach na krawędziach grzbietowej powierzchni brodawki (Tab. 13; Ryc. 36g). Na drugim modelu 3D, 26 kubków smakowych było

zlokalizowanych na krawędziach powierzchni grzbietowej brodawki tworząc pasmo w kształcie półksiężyca (Tab. 13; Ryc. 36h). Na trzecim modelu 3D, spośród 23 kubków smakowych, 4 występowały w centralnej części brodawki, a pozostałe były zgrupowane na krawędzi, grzbietowej powierzchni brodawki (Tab. 13; Ryc. 36i). Średnica kubków smakowych wahała się od 17,2 μm do 38,2 μm (Tab. 13).

W tylnopiętrowej części trzonu języka zaobserwowano około 51 brodawek grzybowatych, które były okrągłe w zarysie i płaskie na powierzchni grzbietowej (Tab. 13; Ryc. 35b, c, 36j, m). Średnica i wysokość brodawek wynosiły odpowiednio około 474,7 μm i 402,3 μm (Tab. 13). Ostro zakończone brodawki nitkowate były pozbawione mniejszych wyrostków i otaczały brodawki grzybowate, nie pokrywając ich powierzchni grzbietowej (Ryc. 35b, c). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim o wysokości 62,5 μm i posiadały cienką warstwę rogową, której średnia wysokość wynosiła 3,8 μm (Tab. 13; Ryc. 36j, m). Typy trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych wyznaczono w oparciu o obserwacje modeli 3D oraz analizę morfometryczną. Średnia wysokość trzonów wynosiła 347,5 μm (Tab. 14). W pierwszym modelu 3D, trzony łącznotkankowe miały kształt grzybowaty z płaską powierzchnią grzbietową, gdzie część apikalna trzonu była szersza od środkowej o około 185 μm (Tab. 14; Ryc. 36k). Na powierzchniach bocznych, apikalnej części tych trzonów zaobserwowano liczne, krótkie wypustki łącznotkankowe (Ryc. 35e, 36k). Około 53 kubków smakowych było rozmieszczonych w 2-4 rzędach na krawędziach grzbietowej powierzchni brodawki, kształtem przypominające półksiężyc (Tab. 13; Ryc. 36l). Na drugim modelu 3D, trzon łącznotkankowy brodawki przypominał pęk kwiatu, gdzie apikalna średnica była węższa od środkowej o około 104 μm (Tab. 14; Ryc. 36n). Cała powierzchnia trzonu brodawki była pokryta krótkimi wypustkami łącznotkankowymi (Ryc. 36n). Na powierzchni grzbietowej brodawki zaobserwowano 10 kubków smakowych rozmieszczonych w dwóch grupach: 3 kubki znajdowały się centralnie, a grupa 7 kubków leżała na krawędzi brodawki (Tab. 13; Ryc. 36o). Średnica kubków smakowych w tym obszarze wynosiła 28,3 μm (Tab. 13).

Animacje przedstawiające cztery typy trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych kota domowego wraz z rozmieszczeniem kubków smakowych znajdują się w plikach o nazwie „Animacja 5-8”.

4.9. Obserwacje mikroskopowe brodawek okolonych na języku kota domowego

Brodawki okolone w liczbie od 4 do 6 były ułożone w pary rozmieszczone skośnie po prawej i lewej stronie tylnej części trzonu języka, w kształcie przypominającym odwróconą literę „V” (Ryc. 37a). Owalny lub okrągły w zarysie trzon brodawki otoczony był bruzdą o szerokości około 111,3 μm , a wał brodawki składał się z pojedynczych lub zrośniętych brodawek stożkowych (Tab. 15; Ryc. 37a, b). Odległość między przednią parą brodawek okolonych wynosiła około 8 mm, natomiast w przypadku ostatniej tylnej pary odległość wynosiła 3,3 mm. Średnica brodawek okolonych w przedniej parze wynosiła około 2,2 mm, natomiast brodawek w ostatniej parze osiągała 1,6 mm (Tab. 15). Średnica trzonu brodawki w przedniej i tylnej parze wyniosła odpowiednio 1,3 mm i 0,9 mm, a średnia wysokość trzonu brodawki osiągała 797,6 μm (Tab. 15). Szerokość wału brodawek okolonych wynosiła 0,4 mm w przedniej parze brodawek i 0,3 mm w tylnej parze brodawek. W przedniej parze brodawek okolonych wał brodawki od strony pośrodkowej języka był zbudowany z zrośniętych brodawek stożkowych, natomiast ten sam wał od zewnętrznej strony języka składał się z 3-5 oddzielnych brodawek stożkowych (Ryc. 37b). W tylnej parze brodawek okolonych, wał brodawki był utworzony ze zrośniętych brodawek stożkowatych (Ryc. 37b). Tylko w doogonowej części wału brodawki obserwowano zaostrome wyrostki brodawek stożkowatych (Ryc. 37b). Brodawki okolone były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim nierogowaciejącym, którego wysokość na powierzchni trzonu brodawki wynosiła 81,8 μm , a w obszarze kubków smakowych 73,0 μm (Tab. 15; Ryc. 38a). Nabłonek pokrywający powierzchnię wału brodawki osiągnął 90,5 μm (Tab. 15). Owalny w zarysie trzon łącznotkankowy trzonu brodawki okolonej obserwowany na macerowanych próbach tkankowych oraz na modelach 3D charakteryzował się występowaniem licznych, krótkich wyrostków na całej powierzchni grzbietowej (Ryc. 37c, d, 38c, d). Trzon brodawki okolonej kształtem przypominał grzyb, w którym średnica podstawy trzonu była wąska i wynosiła 590,3 μm , natomiast od połowy wysokości trzonu, średnica wzrastała do około 750 μm (Tab. 15). Wysokość trzonu łącznotkankowego pomiędzy dwoma analizowanymi brodawkami była różna się i wynosiła odpowiednio 431,9 μm i 839,7 μm (Tab. 15). Trzony łącznotkankowe wału brodawki powstały w wyniku zrośnięcia trzonów łącznotkankowych brodawek stożkowatych (Ryc. 37c, 38b). Zarówno w przedniej, jak i tylnej części wału brodawki obserwowano przerwy w ciągłości wału brodawki z uwagi na występowanie trzonów łącznotkankowych 1-3 mniejszych, pojedynczych brodawek stożkowych (Ryc. 37c). Wykazano, że w pobliżu korzenia

języka dwie sąsiadujące brodawki okolone mogły dzielić wspólny wał brodawki (Ryc. 37c). Powierzchnia grzbietowa trzonu łącznotkankowego wału brodawki razem z krawędziami bocznymi były gęsto pokryte krótkimi wypustkami łącznotkankowymi, natomiast powierzchnia boczna wału była gładka (Ryc. 37c, d). Na dnie bruzdy brodawki okolonej obserwowano liczne ujścia gruczołów surowiczych von Ebnera (Ryc. 37d).

Analizie poddano dwa modele 3D brodawek okolonych należących do przedniej pary brodawek i pochodzących od dwóch osobników kota domowego. Pomiędzy modelami obserwowano różnice w rozmieszczeniu i liczbie kubków smakowych. Ryciny 38c i e przedstawiają model 3D mniejszy brodawki okolonej, gdzie 223 kubki smakowe były ułożone w 5-7 rzędach i zgrupowane po prawej i lewej stronie trzonu brodawki okolonej (Tab. 15). W drugim modelu 3D, 632 kubki smakowe były rozmieszczone w 6-10 rzędach w nabłonku pokrywającym całe, boczne powierzchnie trzonu brodawki (Tab. 15; Ryc. 38 d, f-i). Pojedyncze kubki smakowe obserwowano również na grzbietowej krawędzi trzonu brodawki okolonej (Ryc. 38d). Średnica kubków smakowych na brodawkach okolonych wahała się od 23,7 μm do 47,5 μm (Tab. 15).

Plik o nazwie „Animacja 9” prezentuje model 3D trzonu łącznotkankowego brodawki okolonej kota domowego z dokładnym rozmieszczeniem kubków smakowych.

4.10. Obserwacje makroskopowe języka psa domowego

Makroskopowo język psa domowego był podzielony na wierzchołek języka, trzon języka i korzeń języka. Długość języka badanych psów wynosiła ok. 10,3 cm, przy czym długości poszczególnych części języka osiągały: 1,9 cm na wierzchołku języka, 6,7 cm na trzonie języka i 1,6 cm na korzeniu języka. Na powierzchni grzbietowej błony śluzowej języka u badanych psów występowała bruzda pośrodkowa o długości od 3,7 cm do 10,7 cm, która rozciągała się od wierzchołka języka do około połowy jego długości lub wzdłuż całego języka (Ryc. 39a, 41a, 42a, 44a).

Na powierzchni grzbietowej języka psa domowego zaobserwowano trzy typy brodawek smakowych oraz dwa typy brodawek mechanicznych. Do brodawek smakowych należały brodawki grzybowate, okolone i liściaste, natomiast w grupie brodawek mechanicznych stwierdzono obecność brodawek nitkowatych i stożkowatych. Brodawki grzybowate były rozmieszczone równomiernie na powierzchni grzbietowej wierzchołka języka, przedniej i tylnej części trzonu języka oraz na obszarze pomiędzy brodawkami okolonymi (Ryc. 39a, b; 41a, 42a, 44a). Na powierzchni brzusznej

wierzchołka języka obserwowano pojedynczą, spłaszczoną brodawkę grzybowatą w pobliżu krawędzi języka (Ryc. 39f).

4.11. Obserwacje mikroskopowe brodawek grzybowatych na języku psa domowego

4.11.1. Krawędź języka oraz powierzchnia grzbietowa wierzchołka języka

Na krawędzi wierzchołka języka obserwowano 8-10 brodawek grzybowatych o okrągłym w zarysie kształcie (Tab. 16; Ryc. 39a, b, d). Średnica oraz wysokość brodawek grzybowatych wynosiły odpowiednio 250,0 μm i 336,4 μm (Tab. 16). Brodawki były otoczone masywnymi brodawkami nitkowatymi zbudowanymi z jednego głównego wyrostka otoczonego przez 4-6 mniejsze boczne wyrostki, które były skierowane ku grzbietowej powierzchni języka (Ryc. 39c–d). Niektóre brodawki nitkowate, znajdujące się przy brodawkach grzybowatych, były skierowane do boku i nie pokrywały powierzchni brodawek grzybowatych (Ryc. 39 c, d). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym o średniej wysokości 43,9 μm oraz o wysokości warstwy rogowej wynoszącej około 4,9 μm (Tab. 16; Ryc. 40a, d). Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych, obserwowane w skaningowym mikroskopie elektronowym i na modelach 3D są skierowane w kierunku dogardłowym (Ryc. 39g, h, 40b, e). Analizy morfometryczne wskazują na wzrost średnicy trzonu łącznotkankowego brodawki grzybowatej od podstawy do części apikalnej, co wraz z obserwacjami mikroskopowymi i modelami 3D, było podstawą do opisu kształtu trzonu jako maczugowaty (Tab. 17; Ryc. 40b, e). Średnia wysokość trzonów łącznotkankowych w badanych brodawkach wynosiła 269,5 μm (Tab. 17). Na bocznych powierzchniach trzonów łącznotkankowych nie zaobserwowano blaszek bocznych, jednak w jednym z dwóch zrekonstruowanych modeli 3D brodawek grzybowatych występowały małe wypustki łącznotkankowe obecne na apikalnej części brodawki (Ryc. 40e). Dodatkowo na grzbietowej powierzchni trzonu brodawki oznaczono zagłębienia (Ryc. 39g,h). Ryciny 40b i 40c przedstawiają pierwszy model 3D brodawki grzybowatej, w której obserwowano 7 kubków smakowych zlokalizowanych na tej części powierzchni grzbietowej brodawki, która była skierowana doogonowo (Tab. 16; Ryc. 40c). W drugim modelu 3D, 9 kubków smakowych było rozmieszczonych środkowo - bocznie (Tab. 16; Ryc. 40e, f). Średnica kubków smakowych wynosiła 35,5 μm (Tab. 16).

Na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka psa domowego zaobserwowano od 61 do 64 równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych o średniej gęstości

0,19 brodawki/mm² (Tab. 16). Średnica badanych brodawek wahała się od 95,7 µm do 220,9 µm, a wysokość od 354,7 µm do 409,1 µm (Tab. 16). Brodawki grzybowate były otoczone, ale nie pokryte przez mechaniczne brodawki nitkowate, zbudowane z jednego głównego wyrostka i 3-8 mniejszych, zrogowaciałych wyrostków skierowanych doogonowo (Ryc. 39c). Na grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych, obserwowanych w skaningowym mikroskopie elektronowym, wskazano pory smakowe (Ryc. 39e). Wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego na brodawkach grzybowatych wynosiła 43,0 µm, a warstwa rogowa miała 6,0 µm wysokości (Tab. 16, Ryc. 40g, j). Na podstawie obserwacji macerowanych prób tkankowych, analizy morfometrycznej i modeli 3D brodawek grzybowatych wyróżniono dwa typy trzonów łącznotkankowych: (i) maczugowaty oraz (ii) kolumnowy (Tab. 17; Ryc. 39g, 40h, k). W typie maczugowatym średnica apikalna trzonu brodawki była większa od średnicy środkowej, a w typie kolumnowym wartości tych dwóch średnic były porównywalne (Tab. 17). Wysokość trzonu łącznotkankowego w typie maczugowatym wynosiła 321,9 µm, a w typie kolumnowym 353,0 µm (Tab. 17). Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych były pozbawione blaszek bocznych, ale na ich grzbietowej powierzchni obserwowano płytkie zagłębienia (Ryc. 39g). W brodawkach grzybowatych o kolumnowym typie trzonów łącznotkankowych, przedstawionych na rycinach 40h i 40i, 3 kubki smakowe znajdowały się w tylnej części grzbietowej powierzchni brodawki (Tab. 16). W brodawkach o maczugowatym typie trzonów łącznotkankowych, 6 kubków smakowych było równomiernie rozmieszczonych na całej powierzchni grzbietowej brodawki (Tab. 16; Ryc. 40k, l). Średnica kubków smakowych wynosiła 32,3 µm (Tab. 16).

4.11.2. Przednia część trzonu języka

Na przedniej części trzonu języka znajdowało się od 54 do 93 równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych o średniej gęstości 0,12 brodawki/mm² (Tab. 16; Ryc. 41a). Brodawki grzybowate były otoczone mechanicznymi brodawkami nitkowatymi skierowanymi ku tyłowi, z 6 - 8 mniejszymi zrogowaciałymi wypustkami (Ryc. 41b). Brodawki nitkowate nie pokrywały grzbietowej powierzchni brodawek smakowych. Średnica i wysokość brodawek grzybowatych wynosiły odpowiednio 220,7 µm i 358,1 µm, natomiast średnia wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki wynosiła 56,2 µm, a warstwy rogowej miała średnio 7,3 µm wysokości (Tab. 16; Ryc. 41d,). Ryciny 41e-f przedstawiają modele 3D trzonów

łącznotkankowych brodawek grzybowatych o kształcie palczastym, w którym średnica zmniejszała się od podstawy do apikalnej części brodawki (Tab. 17). Średnia wysokość trzonu łącznotkankowego brodawki wynosiła 297,7 μm , a jego powierzchnie boczne i grzbietowe były gładkie (Tab. 17; Ryc. 41c, e, f). W pierwszym modelu 3D brodawek grzybowatych, dwa kubki smakowe występowały na grzbietowej powierzchni brodawki, w części skierowanej dogardłowo, natomiast w drugim modelu 3D, 4 kubki smakowe były rozmieszczone środkowo - bocznie (Tab. 16; Ryc. 41e-h). Średnica kubków smakowych wynosiła ok. 34,6 μm (Tab. 16).

4.11.3. Tylne części trzonu języka

W tylnej części trzonu języka psa domowego obserwowano od 58 do 76 równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych o średniej gęstości 0,12 brodawki/ mm^2 (Tab. 16; Ryc. 42a). Okrągłe w zarysie brodawki grzybowate charakteryzowały się zaokrągloną powierzchnią grzbietową (Ryc. 42b-c, 43a, b). Średnica i wysokość brodawki wynosiły odpowiednio 329,9 μm i 544,5 μm (Tab. 16). Brodawki grzybowate były rozmieszczone pomiędzy gęsto ułożonymi brodawkami nitkowatymi, skierowanymi ku tyłowi i zbudowanymi z jednego głównego wyrostka oraz 2-4 mniejszych, zrogowaciałych wyrostków bocznych (Ryc. 42b - c). Podczas obserwacji prób tkankowych w skaningowym mikroskopie elektronowym, na powierzchni grzbietowej brodawek grzybowatych obserwowano pojedyncze pory smakowe (Ryc. 42d). Brodawki grzybowate były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym o średniej wysokości 65,5 μm , z warstwą rogową o wysokości 6,1 μm (Tab. 16; Ryc. 43a, b). Ze względu na różnicę wynoszącą jedynie 2 μm między średnicą środkową a apikalną trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych, kształt trzonu opisano jako kolumnowy (Tab. 17; Ryc. 42e, f, 43c, d). Na bocznych powierzchniach trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych obserwowano podłużne blaszki boczne, a na krawędziach grzbietowej powierzchni trzonu brodawki zauważono okrągłe w zarysie zagłębienia (Ryc. 42e, f, 43d). Średnia wysokość trzonów łącznotkankowych wynosiła 479,0 μm (Tab. 17). Rozmieszczenie i liczba kubków smakowych na grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych były zróżnicowane. Na Rycinach 43c i 43e, 6 kubków smakowych było skupionych na tylnej części, grzbietowej powierzchni brodawki, skierowanej doogonowo (Tab. 16). Na rycinach 42d i 42f, 12 kubków smakowych było równomiernie rozmieszczonych na całej grzbietowej

powierzchni brodawek (Tab. 16). Średnica kubków smakowych wynosiła od 28,9 μm do 53,1 μm (Tab. 16).

Pomiędzy brodawkami okolonymi, znajdowało się od 17 do 34 równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych o gęstości 0,12 brodawki/ mm^2 (Tab. 16; Ryc. 44a, b). Brodawki były okrągłe w zarysie o zaokrąglonej lub płaskiej powierzchni grzbietowej (Ryc. 44b, 45a, b). Średnica brodawek wahała się od 377,9 μm do 682,5 μm , a wysokość wynosiła od 528,4 μm do 662,4 μm (Tab. 16). Masywne brodawki nitkowate były skierowane doogonowo i gęsto otaczały brodawki grzybowate (Ryc. 44a). Brodawki nie posiadały zrogowaciałych wyrostków i nie pokrywały brodawek grzybowatych (Ryc. 44b). Na macerowanych próbach tkankowych obserwowano silnie zredukowane trzony łącznotkankowe wyrostków bocznych brodawek nitkowatych (Ryc. 44d). Nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący pokrywający brodawki grzybowate miał około 70,7 μm wysokości, a warstwa rogowa wynosiła 5,0 μm (Tab. 16; Ryc. 45a, b). Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych, przypominające na modelach 3D balon, charakteryzowały się szerszą średnicą środkową niż apikalną (Tab. 17, Ryc. 45b, d). Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych, których średnica środkowa i apikalna były podobne, został opisany jako kolumnowy (Tab. 17; Ryc. 45a, c). W brodawkach grzybowatych o balonowatym kształcie trzonów łącznotkankowych, około 29 kubków smakowych było rozmieszczonych na bocznych krawędziach powierzchni grzbietowej brodawki oraz częściowo w jej centralnej części (Tab. 16; Ryc. 44d, f). Na całej grzbietowej i bocznej powierzchni balonowatych trzonów łącznotkankowych obserwowano niewielkie łącznotkankowe wypustki (Ryc. 44d, f). Na grzbietowej powierzchni brodawki grzybowatej z kolumnowym kształtem trzonu łącznotkankowego, 8 kubków smakowych było równomiernie rozmieszczonych (Tab. 16; Ryc. 45e). Na bocznych powierzchniach apikalnej części kolumnowego trzonu obserwowano podłużne blaszki boczne (Ryc. 45c). Obserwacja preparatów histologicznych oraz analiza morfometryczna wskazała, że kubki smakowe w brodawkach grzybowatych o kolumnowym kształcie trzonu łącznotkankowego były szerokie, a w brodawkach grzybowatych o balonowatym typie trzonu, były wąskie (Ryc. 45a, b). Średnica kubków smakowych w tych brodawkach wynosiła od 17,0 μm do 53,2 μm (Tab. 16).

Pliki o nazwie „Animacja 10-13” zawierają animacje przedstawiające różne kształty trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych psa domowego wraz z rozmieszczeniem przestrzennym kubków smakowych.

4.12. Obserwacje mikroskopowe brodawek okolonych na języku psa domowego

U jednego osobnika psa domowego obserwowano 4 brodawki okolone, ułożone w pary i rozmieszczone symetrycznie po prawej i lewej stronie tylnej części trzonu języka w ukośnych rzędach w kształcie odwróconej litery „V”. U dwóch pozostałych osobników liczba brodawek okolonych wynosiła odpowiednio 3 i 5, a brodawki były rozmieszczone asymetrycznie (Ryc. 44a).

Przednia i tylna para brodawek okolonych miały owalny lub okrągły zarys (Ryc. 44a). Przednie brodawki charakteryzowały się większymi wymiarami w porównaniu do tylnych. Krótsza i dłuższa średnica przednich brodawek wynosiły odpowiednio 2,3 mm i 2,8 mm, podczas gdy wymiary tylnych brodawek były równe i wynosiły 2,2 mm (Tab. 18). Wał brodawki był zbudowany ze zrośniętych podstaw brodawek stożkowatych, których ostro zakończone wierzchołki były widoczne w tylnej części brodawki (Ryc. 44a, b). Średnica trzonu brodawki w przednich i tylnych brodawkach okolonych wynosiła odpowiednio 1091,0 μm i 866,9 μm , natomiast szerokość wału brodawki wynosiła 531,9 μm w przednich brodawkach okolonych i 557,0 μm w tylnych (Tab. 18). Ciągła bruzda brodawki, o średniej szerokości 64,9 μm , oddzielała trzon brodawki od wału brodawki (Tab. 18; Ryc. 44b, c). Brodawki okolone były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim niezrogowaciałym, którego wysokość na trzonie brodawki wynosiła 69,8 μm , na wale brodawki 85,3 μm i na powierzchni bocznej trzonu brodawki, w obszarze kubków smakowych, 66,7 μm (Tab. 18; Ryc. 46a). Trzon łącznotkankowy trzonu brodawki miał owalny zarys, a jego kształt był grzybowaty (Ryc. 45d, 46a-c). Szerokość trzonu łącznotkankowego trzonu brodawki wynosił 1,3 mm, a jego wysokość osiągała 1,0 mm (Tab. 18). Na grzbietowej powierzchni trzonu łącznotkankowego trzonu brodawki okolonej obserwowano 2-3 podłużne lub okrągłe zagłębienia, podczas gdy powierzchnie boczne trzonu brodawki były gładkie (Ryc. 44d, 46b-d). Obserwacje w skaningowym mikroskopie elektronowym macerowanych brodawek okolonych wykazały, że wał brodawki w przedniej i tylnej części brodawki był nieciągły (Ryc. 44d). Trzony łącznotkankowe wału brodawki w tylnej części były zbudowane z oddzielnych szkieletów kolagenowych brodawek stożkowatych (Ryc. 44d). Na grzbietowej powierzchni wału brodawki okolonej obserwowano, różnej wielkości, zagłębienia, a powierzchnie boczne były gładkie (Ryc. 44d).

Na trzonie brodawek okolonych znajdowały się dwa obszary zawierające wewnątrz nabłonkowe kubki smakowe: (i) boczna powierzchnia trzonu brodawki

oraz (ii) grzbietowa powierzchnia trzonu brodawki. Na modelu 3D przedniej, większej brodawki okolonej zliczono 1285 kubków smakowych (Tab. 18; Ryc. 46c,). Większość kubków smakowych była rozmieszczona w 4-23 rzędach na bocznych powierzchniach trzonu brodawki, a tylko 6 kubków smakowych znajdowało się na grzbietowej powierzchni trzonu brodawki (Ryc. 46c - f). Zaobserwowano również 7 kubków smakowych na bocznej powierzchni wału brodawki (Ryc. 46c). Na drugim modelu 3D przedstawiającym tylną, mniejszą brodawkę okoloną występowały 332 kubki smakowe (Tab. 18, Ryc. 46b). Kubki smakowe były rozmieszczone głównie na bocznych powierzchniach trzonu brodawki w 2-8 rzędach, a 52 kubki smakowe były ułożone w dwa pasma przecinające grzbietową powierzchnię trzonu brodawki (Ryc. 46b). Dodatkowo 10 kubków smakowych znajdowało się na bocznej powierzchni wału brodawki (Ryc. 46b). Średnica kubków smakowych w brodawkach okolonych wynosiła od 21,3 μm do 57,7 μm (Tab. 18).

Plik o nazwie „Animacja 14” prezentuje model 3D trzonu łącznotkankowego brodawki okolonej psa domowego z dokładnym rozmieszczeniem kubków smakowych.

4.13. Obserwacje mikroskopowe brodawek liściastych na języku psa domowego

Brodawki liściaste zlokalizowane po prawej i lewej stronie na tylnobocznych powierzchniach trzonu języka miały okrągły zarys i były otoczone, od strony przedniej, tylnej i dogrzebietowej, przez brodawki stożkowate (Ryc. 47a). Średnica brodawek wynosiła około 3,5 mm (Tab. 19). Brodawki liściaste były zbudowane z odrębnych, nieregularnie ułożonych 7 - 8 fałdów błony śluzowej (Ryc. 47a). Niektóre fałdy układały się na kształt litery "S" (Ryc. 47a, 48b). Obserwowano również, że pojedyncze fałdy błony śluzowej brodawki liściastej od strony dogrzebietowej zrastają się z podstawą brodawki stożkowatej (Ryc. 47a). Analizy modeli 3D brodawek liściastych przedstawione na rycinie 48d wykazały, że niektóre fałdy błony śluzowej brodawki liściastej w środkowej części dzielą się na dwa lub trzy węższe fałdy, które w dalszym przebiegu ponownie się zrastają. Szerokość i wysokość pojedynczego fałdu błony śluzowej były zróżnicowane. Węższe fałdy były zazwyczaj wyższe (Ryc. 47d - g). Szerokość węższego fałdu błony śluzowej wynosiła około 104,0 μm , podczas gdy szerszego około 1,1 mm (Tab. 19). Wysokość pojedynczego fałdu błony śluzowej wahała się od 104,0 μm do 718,8 μm (Tab. 19). Szerokość bruzdy brodawkowej wynosiła od 14,5 do 86,3 μm (Tab. 19). Szerokie i krótkie fałdy błony śluzowej były otoczone

plytkimi bruzdami, podczas gdy wąskie i wysokie fałdy głębszymi bruzdami (Ryc. 47e-g). Średnia głębokość płytkich i głębokich bruzd wynosiła odpowiednio 239,6 μm i 506,8 μm . Obserwacje próbek tkankowych przygotowanych metodą maceracji w NaOH oraz przekroi histologicznych wykazały obecność ujść gruczołów surowiczych na dnie bruzd brodawek, a także na grzbietowej powierzchni fałdów błony śluzowej oraz wokół brodawek liściastych (Ryc. 47c-g). Dodatkowo na macerowanych tkankach, modelach 3D i obrazach mikroskopowych brodawek liściastych obserwowano otwory na grzbietowej powierzchni fałdów błony śluzowej brodawek prowadzące do zagłębień z grudkami limfatycznymi występującymi w trzonach łącznotkankowych fałdów (Ryc. 47c, g, 48b). Na elektronogramach SEM zauważono obecność kubków smakowych na grzbietowej powierzchni fałdów błony śluzowej (Ryc. 47b). Brodawki liściaste były pokryte nabłonkiem wielowarstwowym płaskim niezrogowaciałym, którego wysokość na grzbietowej powierzchni fałdów błony śluzowej wynosiła 87,2 μm , a na bocznych powierzchniach fałdów 50,2 μm (Tab. 19; Ryc. 47. e- g). Trzon łącznotkankowy brodawek liściastych miał nieregularny kształt i różnił się między badanymi osobnikami (Ryc. 47c, d; 48a, b). Pojedynczy fałd błony śluzowej składał się zazwyczaj z jednej blaszki o szerokości i wysokości wynoszącej odpowiednio 491,9 μm i 449,4 μm (Tab. 19). Na grzbietowej powierzchni niektórych fałdów błony śluzowej brodawki liściastej zauważono podłużne zagłębienia, które miejscowo dzieliły pojedynczy fałd na dwie części (Ryc. 47c, 48c, e, f). Powierzchnie boczne fałdów błony śluzowej brodawki były gładkie.

Kubki smakowe na brodawkach liściastych psa były rozmieszczone na grzbietowych i bocznych powierzchniach fałdów błony śluzowej brodawki, wzdłuż całej ich długości lub tylko na 1/3 - 2/3 ich długości (Ryc. 48a - f). W niektórych fałdach błony śluzowej brodawki liściastej kubki smakowe występowały tylko po jednej stronie, a na innych znajdowały się wyłącznie w górnej części fałdu (Ryc. 47e-g; 48c - f). Na pierwszym modelu 3D brodawek liściastych, który charakteryzował się szerszymi i krótszymi fałdami błony śluzowej, zliczono w sumie 1074 kubków smakowych, z czego 952 kubki smakowe były rozmieszczone w 3-16 rzędach na grzbietowej powierzchni fałdów błony śluzowej, a 122 kubki smakowe, ułożone w 2 - 8 rzędach były obecne na powierzchniach bocznych fałdów (Tab. 19; Ryc. 48a ,c , d). Ryciny 48b, e oraz f przedstawiają drugi model 3D brodawki liściastej z węższymi i wyższymi fałdami błony śluzowej. Na brodawce występowało 1814 kubków smakowych (Tab. 19). Kubki smakowe występowały głównie na powierzchniach bocznych fałdów w liczbie

1238 kubków ułożonych w 2-13 rzędach. Na powierzchni grzbietowej fałdów błony śluzowej obecnych było 576 kubków smakowych rozmieszczonych w 2-9 rzędach (Ryc. 48e). Średnica kubków smakowych wynosiła od 22,4 μm do 58,9 μm (Tab. 19).

Plik o nazwie „Animacja 15” prezentuje model 3D trzonu łącznotkankowego brodawki liściastej psa domowego z dokładnym rozmieszczeniem kubków smakowych.

5. Dyskusja

Zgodnie z założonymi celami badań nad rozmieszczeniem i mikrostrukturą brodawek smakowych dokonano analizy jakościowej i ilościowej ich budowy makro i mikroskopowej z zastosowaniem po raz pierwszy metodyki tworzenia modeli 3D na drodze rekonstrukcji komputerowej, co pozwala na dokonanie charakterystyki porównawczej w ramach badanych grup pokarmowych tj. przeżuwaczy, zajęczaków i gatunków mięsożernych i odniesienie do opisów struktury brodawek u dotąd badanych ssaków.

5.1. Omówienie wyników badań grzybowatych brodawek językowych trzech gatunków przeżuwaczy, tj. bydła, żubra europejskiego i żubronia

Zaprezentowane badania brodawek grzybowatych oraz ich kubków smakowych u bydła, żubra europejskiego i hybrydy żubra z bydlęciem, czyli żubronia poszerzają wiedzę o różnorodności brodawek smakowych, wykazanych we wcześniejszych analizach morfologicznych języków tych gatunków (Plewa i Jackowiak 2020). Na podstawie tych danych szacowano liczbę i gęstość brodawek grzybowatych gatunków rodzicielskich oraz hybrydy. U bydła i żubra europejskiego całkowita liczba brodawek grzybowatych na języku była podobna, natomiast u żubronia liczba brodawek grzybowatych była około 3,4 razy większa niż u gatunków rodzicielskich. Dotychczas liczba brodawek grzybowatych u ssaków została określona u wybranych gatunków zwierząt owadożernych, gryzoni, drapieżników, przeżuwaczy i ludzi, wynosząc 10 – 12 u ryjówki aksamitnej, 150 – 300 u myszy, 114 – 221 u szczura, 500 u oposów, 240 – 260 u kotów, 250 u psów, 424 – 442 u owiec, 200 – 250 u bydła oraz około 200 u człowieka (Davies i in. 1979, Robinson i Winkles 1990, Cheng i Robinson 1991, Spielman i Brand 1995, Unsal i in. 2003, Jackowiak i in. 2004b).

Na podstawie uzyskanych własnych danych wykazano, że u gatunków rodzicielskich od 51% do 59% brodawek grzybowatych znajdowało się w przedniej

części języka, tj. na wierzchołku i trzonie języka, podczas gdy u żubronia wartość ta wzrosła do 85%. Ponadto zaobserwowano różnicę w liczbie brodawek grzybowatych pomiędzy grzbietową a brzuszną powierzchnią wierzchołka języka, gdyż gatunki rodzicielskie miały więcej brodawek grzybowatych na powierzchni brzusznej wierzchołka języka w porównaniu z powierzchnią grzbietową. Z kolei u żubronia liczba brodawek grzybowatych na obu powierzchniach wierzchołka języka była niemal równa i wynosiła średnio o 86% i 82% więcej brodawek niż u bydła i żubra europejskiego. Dodatkowo określono, że gęstość brodawek grzybowatych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka żubronia była nawet 50-krotnie większa w porównaniu z innymi badanymi obszarami języka bydła i żubra europejskiego. Nierównomierne rozmieszczenie brodawek grzybowatych na wierzchołku języka obserwowano wcześniej u innych przeżuwaczy, takich jak alpaka, koza domowa, daniel i wół domowy (Zheng i Kobayashi 2006; Bergvall 2007, Emura i El-Bakary 2014, Jackowiak i in. 2017b, Mahdy i in. 2020).

Z badań behawioralnych dotyczących mechanizmu pobierania pokarmu i jego analizę pod względem składników odżywczych prowadzonych u przeżuwaczy wynika, że brzuszna powierzchnia wierzchołka języka, charakteryzująca się dużą liczbą brodawek grzybowatych, pełni kluczową rolę we wstępnej analizie pobieranego pokarmu (Erdogan i in. 2016, Jackowiak i in. 2017b). Drugim istotnym obszarem języka u przeżuwaczy jest wał języka, który odgrywa ważną rolę w procesie żucia pokarmu. W trakcie cyklicznych ruchów szczęk z boku na bok, (ang. *side by side movements*) drobne cząstki pokarmu, odłykane ze żwacza, są ponownie miażdżone przez zęby i rozcierane pomiędzy powierzchnią języka a podniebieniem. Podczas przeżuwania, pokarm jest przesuwany po powierzchni wału języka, co powoduje pobudzenie receptorów smakowych w brodawkach grzybowatych występujących w tej części języka.

W niniejszych badaniach po raz pierwszy scharakteryzowano brodawki grzybowate na grzbietowej i bocznej powierzchni wału języka, ze szczególnym uwzględnieniem grzbietowej powierzchni tylnej części wału. Wykazano, że na grzbietowej powierzchni wału języka, liczba i gęstość brodawek grzybowatych wzrasta od części środkowej do tylnej u bydła i żubronia o około 50%-67%. W przeciwieństwie do gatunków hodowlanych, u dziko żyjącego żubra europejskiego wartości te pozostawały niemal stałe. Wyniki uzyskane u gatunków rodzicielskich wskazują, że liczba i gęstość brodawek grzybowatych na bocznych powierzchniach wału języka przewyższały wartości odnotowane na tylnej części wału. Z uwagi na

występowanie brodawek grzybowatych oraz brodawek okolonych na tylno-bocznych powierzchniach wału języka, miejsca te są identyfikowane jako kluczowe pod względem analizy pokarmu podczas długich cykli żucia. Otrzymane wyniki obserwacji mają także aspekt metodologiczny, ponieważ sugerują, aby u przeżuwaczy pobierać próbki do badań nie tylko ze środkowej części grzbietowej powierzchni wału, która często jest uważana za obszar reprezentatywny, ale także z tylnej i bocznej powierzchni wału języka.

Brodawki grzybowate obserwowane na modelach 3D u bydła, żubra europejskiego i żubronia były generalnie okrągłe w zarysie, a ich powierzchnia grzbietowa była wypukła lub spłaszczona. U ssaków takich jakich jak bydlę, dzo, koza domowa, wół domowy, hipopotam, koala, lis arktyczny, borsuk japoński czy dzik brodawki grzybowate były opisywane jako struktury o kształcie grzyba lub kopuły (Kobayashi i in. 2003, Zheng i Kobayashi 2006, Jackowiak i in. 2009a, Yoshimura i in. 2009a, Yoshimura i in 2009b, Mahabady i in. 2010, Shao i in. 2010, Ding i in. 2016, Plewa i Jackowiak 2020). U badanych przeżuwaczy wykazano również różnice w średnicy brodawek grzybowatych w odniesieniu do poszczególnych części języka. Wykonane pomiary morfometryczne wskazały, że średnice brodawek grzybowatych w przedniej części języka były mniejsze niż na wale języka, a uzyskane różnice były na poziomie 18% u bydła, 23% u żubra europejskiego i nawet 32% u żubronia.

Analiza porównawcza wysokości brodawek grzybowatych u trzech badanych gatunków przeżuwaczy pokazała, że u bydła brodawki grzybowate w przedniej części języka były o około 16% wyższe niż te na wale języka. U żubra europejskiego i żubronia wysokość brodawek grzybowatych na wale języka była większa odpowiednio o 5% i 23%. Stopień wyniesienia grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych ponad błonę śluzową języka stanowi dobry wskaźnik do oceny ekspozycji kubków smakowych występujących na grzbietowej powierzchni tych brodawek smakowych na bodźce smakowe, w związku z selekcją pokarmu i/lub kontrolą połkniętej żywności. Uzyskane wyniki wskazały, że u bydła, żubra europejskiego i żubronia średnie wyniesienie brodawek grzybowatych wynosiło odpowiednio 392 μm , 425 μm i 177 μm . Porównując przednią i tylną powierzchnię języka zaobserwowano mniejsze wyniesienie brodawek grzybowatych w przedniej części języka w porównaniu z wałem języka o około 46% u bydła, 20% u żubra europejskiego i 41% żubronia. Wyniesienie brodawek grzybowatych badanych gatunków rodzicielskich, było mniejsze na brzusznej powierzchni wierzchołka języka, w porównaniu z jego powierzchnią grzbietową, o około 17% u bydła i 37% u żubra europejskiego. U żubronia zaobserwowano odwrotną

sytuację, ponieważ brodawki grzybowate na brzusznej powierzchni wierzchołka języka były o 8% bardziej wyniesione ponad powierzchnię języka niż brodawki na powierzchni grzbietowej.

Obserwacje porównawcze modeli 3D brodawek grzybowatych utworzonych z seryjnych przekrojów histologicznych umożliwiły analizę dwóch struktur brodawek grzybowatych, tj. nabłonka pokrywającego brodawki, w którym znajdują się kubki smakowe oraz trzonu łącznotkankowego.

Funkcją nabłonka wielowarstwowego płaskiego rogowaciejącego, pokrywającego brodawki grzybowate przeżuwaczy jest ochrona brodawek przed uszkodzeniami mechanicznymi, na które są brodawki narażone podczas rozdrabniania i przeżuwania pokarmu. Uzyskane wyniki wskazały, że średnia grubość nabłonka wielowarstwowego płaskiego na brodawkach grzybowatych była najwyższa u żubra europejskiego, co prawdopodobnie jest związane ze spożywaniem strukturalnie zróżnicowanego pokarmu, do którego dostęp zmienia się wraz ze zmianą pór roku. Odwrotną sytuację obserwuje się u zwierząt hodowlanych, karmionych jednorodnymi strukturalnie paszami. Analizując poszczególne części języka, wskazano, że najwyższy nabłonek pokrywający brodawki grzybowate opisano u żubra europejskiego i żubronia na środkowej części wału języka, a najniższe na brzusznej powierzchni wierzchołka języka. Średnia wysokość warstwy rogowej u badanych gatunków przeżuwaczy wyniosła 21 μm , co stanowiło 16% całkowitej wysokości nabłonka. Na brzusznej powierzchni wierzchołka języka wysokość warstwy rogowej zmalała do 9-14 μm , co stanowiło 9,5-10,5% wysokości całego nabłonka. Cieńsze nabłonki występujące na brodawkach grzybowatych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka przyczyniają się do lepszego eksponowania porów smakowych na powierzchni brodawek grzybowatych podczas preselekcji pokarmu.

Trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych stanowiące wewnętrzny szkielet dla sieci naczyń włosowatych i włókien nerwowych są silnie połączone z nabłonkiem błony śluzowej. Dotychczas kształty trzonów łącznotkankowych badano przy użyciu mikroskopii skaningowej po chemicznej maceracji nabłonka u takich gatunków jak królik, koala, hipopotam, koza, bydło, mundżak chiński, borsuk japoński, świnia oraz zwierzęta naczelne (Kobayashi 1997, Pfeiffer i in. 2000, Kobayashi i in. 2003, Kobayashi i in. 2004, Nonaka i in. 2008, Yoshimura i in. 2009a, Yoshimura i in. 2009b). W przedstawionych badaniach opisano różne kształty trzonów łącznotkankowych, określane jako struktury przypominające kwiat, balon, kalafior, szyszkę lub kolumnę

(Pfeiffer i in. 2000, Kobayashi 1997, Kobayashi i in. 2003, Kobayashi i in. 2004, Kobayashi i in. 2005, Nonaka i in. 2008, Yoshimura i in. 2009a, Yoshimura i in. 2009b).

Analiza morfometryczna oraz rekonstrukcje 3D brodawek grzybowatych umożliwiły wyróżnienie trzech typów trzonów łącznotkankowych w brodawkach grzybowatych. Trzony łącznotkankowe o kształcie balonowatym charakteryzowały się szeroką podstawą, zwężającą się w części środkowej i rozszerzającą się w części apikalnej trzonu brodawki. Typ kolumnowy trzonów łącznotkankowych cechował się względnie równymi wymiarami w części apikalnej i środkowej, z nieco szerszą podstawą. W przypadku typu stożkowatego szerokość trzonu stopniowo malała od podstawy ku powierzchni grzbietowej brodawek. U żubra europejskiego zaobserwowano wszystkie trzy typy trzonów łącznotkankowych, natomiast u bydła występował jedynie typ balonowaty i stożkowaty. Typ kolumnowy i balonowaty był charakterystyczny dla żubronia.

Analiza przestrzennego rozmieszczenia brodawek grzybowatych i ich trzonów łącznotkankowych wskazała, że na obu powierzchniach wierzchołka języka u każdego badanego przeżuwacza występowały trzony łącznotkankowe brodawek w kształcie balonu lub kolumny. Na wale języka bydła i żubra europejskiego często obserwowano stożkowate trzony łącznotkankowe, co odpowiadało mniejszemu wyniesieniu brodawek grzybowatych ponad powierzchnię nabłonka. Na wszystkich powierzchniach wału języka żubronia obserwowano wyłącznie balonowaty typ trzonów łącznotkankowych.

Przygotowane modele 3D trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych u badanych gatunków przeżuwaczy wskazały na występowanie wydłużonych wyrostków tkanki łącznej zapewniające mocniejsze zakotwiczenie nabłonka do trzonu brodawki. Mikrostruktury występujące na powierzchni brodawek w postaci pionowych fałd, pofałdowań i bruzd, które zapewniają dobrą przyczepność nabłonka, były wcześniej badane z wykorzystaniem mikroskopii skaningowej (Kobayashi 1997, Pfeiffer i in. 2000, Kobayashi i in. 2003, Kobayashi i in. 2004, Nonaka i in. 2008, Yoshimura i in. 2009a, Yoshimura i in. 2009b). Zgodnie z wynikami Yoshimury i in. (2009b), w trzonach łącznotkankowych brodawek grzybowatych obecny był główny rdzeń brodawki otoczony licznymi wyrostkami wtórnymi. Ponadto wokół trzonu łącznotkankowego brodawek grzybowatych obserwowano liczne, odrębne brodawki łącznotkankowe w obrębie nabłonka międzybrodawkowego (Yoshimura i in. 2009b). Obserwacje modeli 3D trzonów łącznotkankowych badanych przeżuwaczy wykazały obecność licznych, krótkich, wtórnych wyrostków na powierzchni trzonów o balonowatym i stożkowatym

kształcie. W przypadku kolumnowych trzonów łącznotkankowych, wspomniane wyrostki były smukłe i rzadko rozmieszczone. Dodatkowo w przypodstawnej części trzonów łącznotkankowych w kształcie balonu i kolumny zaobserwowano wydłużone, kolagenowe brodawki łącznotkankowe będące częścią nabłonka międzybrodawkowego.

We wcześniejszych badaniach mikrostrukturalnych brodawek grzybowatych ssaków, które miały na celu określenie liczby i rozmieszczenia kubków smakowych, stosowano trzy główne metody badawcze. Pierwsza polegała na analizie przekrojów poprzecznych brodawek grzybowatych, a druga opierała się na liczeniu porów smakowych widocznych na elektronogramach z skaningowego mikroskopu elektronowego. Tego rodzaju badania przeprowadzono m.in. u rudawca nilowego, dzika, świni, hipopotama, kozy, jaka, wilka i borsuka japońskiego (Yoshimura i in. 2009a i b, Jackowiak i in. 2009b, Bergvall 2007, Shao i in. 2010, Harem i in. 2011, Plewa i Jackowiak 2020). Trzecia metoda, bardziej pośrednia, wykorzystywała technikę macerowania w HCl trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych, gdzie zagłębienia na grzbietowej powierzchni trzonów uznawano za miejsca występowania kubków smakowych (Kobayashi i in. 2003, Nonaka i in. 2008).

W przedstawionych badaniach po raz pierwszy zastosowano technikę trójwymiarowej analizy kubków smakowych, co umożliwiło przestrzenny opis ich rozmieszczenia oraz określenie dokładnej liczby w pojedynczej brodawce. Metoda ta okazała się bardziej efektywna w opisie systemu kubków smakowych w brodawkach grzybowatych, w porównaniu z wcześniej opisanymi metodami badawczymi. Obserwacje seryjnych skrawków histologicznych pozwoliły określić średnicę kubków smakowych, która wahała się od 33 μm do 48 μm . Wyniki te wskazały, że wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki okolone nie miała wpływu na średnicę kubków smakowych. Obserwacje modeli 3D brodawek grzybowatych, z zaznaczonymi kubkami smakowymi, wskazały, że liczba kubków smakowych u badanych przeżuwaczy wynosi od 1 do 64. Dodatkowo, na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka żubronia obserwowano jedną brodawkę grzybowatą pozbawioną kubków smakowych.

We wcześniejszych badaniach liczba kubków smakowych ssaków, określana na podstawie obserwacji pojedynczych skrawków histologicznych, była opisywana w sposób ogólny używając sformułowań tj. „liczne, kilka lub niewiele” (Kobayashi i in. 2004, Zheng i Kobayashi 2006, Yoshimura i in. 2009a, Shao i in. 2010, Erdogan i Perez 2013, Ding i in. 2016). Znając dokładną liczbę brodawek grzybowatych oraz dzięki

zastosowaniu techniki modelowania 3D do opisanie liczby kubków smakowych w pojedynczej brodawce, uzyskano możliwość oszacowania przybliżonej liczby kubków smakowych na całym języku. Najwięcej kubków smakowych zaobserwowano u bydła (6659) oraz żubronia (6620), podczas gdy u żubra europejskiego liczba ta była o około 60% niższa i wynosiła 2608. W poprzednich publikacjach liczba kubków smakowych w brodawkach grzybowatych bydła była szacowana między 1580 – 1838, co wydaje się być wartością zaniżoną w porównaniu z wynikami niniejszego badań (Davies i in. 1979). U innych ssaków, takich jak owca, liczba kubków smakowych wynosiła 1165–1243, a u szczeniąt obserwowano 1444 kubki smakowe w brodawkach grzybowatych (Holliday 1940, Unsal i in. 2003).

Obserwując większą liczbę brodawek grzybowatych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka w stosunku do jego powierzchni grzbietowej u wszystkich badanych przeżuwaczy, ustalono, że liczba kubków smakowych na brzusznej powierzchni wierzchołka wahała się od 900 do 4000 i była o 60–95% wyższa niż na powierzchni grzbietowej. Ponadto obliczono, że liczba kubków smakowych w przedniej części języka bydła, żubra europejskiego oraz żubronia przewyższała liczbę kubków smakowych na badanych powierzchniach wału języka o odpowiednio 60%, 46% i 67%. Cechą charakterystyczną brodawek grzybowatych występujących na grzbietowej powierzchni przedniej części języka żubronia było znaczące zmniejszenie liczby kubków smakowych do 1–3 w pojedynczej brodawce. Przeprowadzona analiza ilościowa wskazała, że u bydła i żubra europejskiego liczba kubków smakowych na pojedynczej brodawce była wyższa odpowiednio o około 94% i prawie 82% w porównaniu z żubroniem.

Dobrze rozwinięty system kubków smakowych w przedniej części języka gatunków rodzicielskich, tj. na wierzchołku i trzonie języka, potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące dużej liczby i gęstości brodawek grzybowatych na tym obszarze, zwłaszcza na brzusznej powierzchni wierzchołka. Sugeruje to, że przednia część języka pełni kluczową rolę w początkowej analizie lub preselekcji pokarmu podczas jego pobierania. Z kolei niewielka liczba kubków smakowych w pojedynczej brodawce grzybowatej na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka żubronia wydaje się odbiegać od tych założeń. Wykazano jednak, że duża liczba brodawek grzybowatych na grzbietowej powierzchni wierzchołka i trzonu języka żubronia kompensuje obniżoną liczbę kubków smakowych. Ostateczne wyniki wskazują, że łączna liczba miejsc percepcji smaku u hybrydy może być porównywalna do tej u gatunków rodzicielskich, w szczególności bydła. Na wale języka całkowita liczba kubków smakowych wzrastała

od części środkowej do tylnej, zwiększając się w zależności od gatunku od 3 do 5 razy, co dawało wartości w przedziale od 280 do 1110 kubów smakowych. Ponadto u żubra europejskiego i żubronia liczba kubków smakowych na powierzchniach bocznych wału języka była o 41% i 30% wyższa niż na grzbietowej powierzchni tylnej części wału języka. Ponadto całkowita liczba kubków smakowych na całej grzbietowej powierzchni wału tych gatunków była mniejsza niż na powierzchniach bocznych.

Funkcjonalnie wał językowy związany jest z procesem przeżuwania pokarmu. Funkcję tą potwierdzono w obecnych badaniach, wskazując najmniejszą całkowitą liczbę kubków smakowych w brodawkach grzybowatych w środkowej części wału języka wszystkich badanych przeżuwaczy. W niektórych opisywanych wcześniej badaniach naukowych obserwowano gigantyczne brodawki grzybowate zlokalizowane na tylnobocznej powierzchni wału języka (Mack i in. 1997, Inatomi i Kobayashi 1999, Yoshimura i in. 2000, Yamaguchi i in. 2002, Yoshimura i in. 2009b). Nasze wyniki wskazują, że średnica brodawek grzybowatych na bocznych powierzchniach wału języka była podobna lub mniejsza niż w innych częściach wału. Jednak całkowita liczba kubków smakowych w tym obszarze była wyraźnie większa, co sugeruje istotną rolę bocznych powierzchni wału języka w percepcji smaku. Obserwacje te pozwoliły określić wał języka jako część języka istotną zarówno z punktu widzenia funkcji mechanicznych, jak i sensorycznych. Niemniej jednak, percepcja smaku u badanych przeżuwaczy będzie wymagała dalszych badań nad liczbą i rodzajami komórek receptorowych w kubkach smakowych.

Analiza modeli 3D brodawek grzybowatych pozwoliła po raz pierwszy szczegółowo określić rozmieszczenie kubków smakowych na grzbietowej powierzchni tych brodawek. Uzyskane wyniki są unikalne, ponieważ udało się określić układ kubków smakowych nie tylko jako rozproszony, lecz często tworzący ukośne i pionowe pasma lub skupiska o różnych kształtach. U bydła liczne kubki smakowe były równomiernie rozmieszczone lub tworzyły skupiska w środkowej części brodawek, natomiast u żubra europejskiego pasma znajdowały się w środkowej części lub na brzegach brodawek grzybowatych. U żubronia mniej liczne kubki smakowe występowały pośrodkowo. Porównując rozmieszczenie kubków smakowych w różnych częściach języka, następująca obserwacja wydaje się szczególnie interesująca. Kubki smakowe w brodawkach grzybowatych na trzonie języka oraz na bocznych powierzchniach wału języka tworzyły pasma, które najczęściej układały się prostopadłe do kierunku przemieszczania się pokarmu wzdłuż języka. Taka tendencja do grupowania kubków

smakowych może ułatwić kontakt podczas transportu pokarmu i wzmocnić percepcję smaku przeżuwanych fragmentów roślin na trzonie języka lub podczas przemieszczania się rozdrobnionych cząstek pokarmu w obszarze między zębami a walem języka.

Uzyskane dane porównawcze ujawniły pewne cechy specyficzne dla żubronia, który jest hybrydą powstałą w wyniku krzyżowania w 1970 roku w Polsce i jest nadal hodowany w prywatnych gospodarstwach rolnych. Hybryda żubra europejskiego, zwana żubroniem, została wyhodowana jako przeżuwacz hodowlany w celu stworzenia nowej rasy bydła mięsnego przystosowanego do swobodnej hodowli (Kraśńska 1988). W świetle uzyskanych danych zaskakujący był fakt, że całkowita liczba brodawek grzybowatych żubronia była około 3,5 razy większa niż u gatunków rodzicielskich, a także to, że na każdej części języka żubronia liczba i gęstość brodawek grzybowatych na 1 cm² przewyższały wartości obserwowane u bydła i żubra europejskiego. Niemniej jednak wyniesienie brodawek grzybowatych ponad powierzchnię nabłonka na każdej części języka była o około 50% mniejsza niż u gatunków rodzicielskich.

Obserwacje modeli 3D brodawek grzybowatych tych zwierząt wskazały również na niewielką liczbę lub brak kubków smakowych w brodawkach grzybowatych na wierzchołku języka oraz obecność brodawek grzybowatych wyłącznie z balonowatym trzonem łącznotkankowym na wale języka. Nasze badania wykazały także podobieństwo wielu cech brodawek grzybowatych między żubroniem a gatunkiem macierzystym, czyli udomowionym bydlęciem. Do wspólnych cech należy niemal równa szacowana, całkowita liczba kubków smakowych u bydła i hybrydy, liczba i gęstość brodawek grzybowatych na określonych częściach wału języka oraz wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego na brodawkach grzybowatych. Wymienione cechy u żubronia oraz wcześniej opisane dane anatomiczne można uznać za specyficzne dla tego gatunku, co może mieć zarówno funkcjonalne implikacje lub być konsekwencją hybrydyzacji.

5.2. Omówienie wyników badań mikrostruktury smakowych brodawek językowych trzech gatunków zajęczaków, tj. królika europejskiego, królika domowego i zająca szaraka

Gatunki zajęczaków posiadają strukturalne i funkcjonalne adaptacje narządów jamy ustnej, takie jak charakterystyczny typ uzębienia, język z wyniosłością językową oraz podniebienie z licznymi marszczkami podniebiennymi, które zwiększają efektywność pobierania pokarmu i przyspieszają proces żucia. W trakcie badań zaobserwowano podobieństwo w morfologii i wielkości języka oraz równomierne rozmieszczenie poszczególnych rodzajów brodawek smakowych na języku zajęczaków, jednak dzięki komputerowej metodzie tworzenia modeli trójwymiarowych uzyskano nowe dane dotyczące różnorodności mikrostruktur brodawek smakowych oraz charakterystycznych cech specyficznych dla gatunku, które występują u trzech blisko spokrewnionych, dziko żyjących i udomowionych gatunków z rzędu zajęczaków. Obserwacje brodawek grzybowatych w przedniej części języka, tj. na wierzchołku i trzonie języka, wskazały, że grzbietowa i brzuszna powierzchnia wierzchołka języka posiadają wiele cech ułatwiających kontakt z pokarmem. Brodawki smakowe na trzonie języka zajęczaków uczestniczą w odbieraniu bodźców smakowych podczas wstępnych cykli żucia oraz transportowania pokarmu w kierunku tylnej części języka (Schwartz i in., 1989). Makroskopowe obserwacje brodawek grzybowatych na wierzchołku języka wykazały, że brodawki na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka badanych gatunków zajęczaków były równomiernie rozmieszczone wśród mechanicznych brodawek nitkowatych, natomiast na brzusznej powierzchni wierzchołka tworzyły skupiska w pobliżu krawędzi języka.

Porównanie liczby i gęstości brodawek grzybowatych na obu powierzchniach wierzchołka języka wykazało, że brodawki grzybowate były wyższe na brzusznej powierzchni wierzchołka. Dodatkowo zaobserwowano różnice międzygatunkowe, ponieważ liczba brodawek grzybowatych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka zająca szaraka była o 57% większa niż u królika europejskiego oraz o 54% większa niż królika domowego. Gęstość brodawek grzybowatych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka w porównaniu z jego powierzchnią grzbietową była najwyższa u królików domowych i wynosiła 83% a u zająca szaraka odpowiednio 72%, natomiast dla królików europejskich wynosiła 66%. Liczba równomiernie rozmieszczonych brodawek grzybowatych na grzbietowej powierzchni trzonu języka wzrosła o 44% u królików europejskich i o 5% u królików domowych w stosunku do grzbietowej

powierzchni wierzchołka języka, natomiast liczba brodawek grzybowatych zająca szaraka zmniejszyła się o około 13%. Gęstość brodawek grzybowatych na trzonie języka była porównywalna u wszystkich badanych gatunków i wynosiła 0,2–0,4 Fu/mm². Z kolei, gęstość brodawek grzybowatych na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka królików europejskich, królików domowych i zająca szaraka była odpowiednio 1,5x, 1,3x i 3x wyższa niż na powierzchni trzonu języka. Całkowita liczba brodawek grzybowatych na języku badanych zajęczaków była najwyższa u gatunków dziko żyjących i wynosiła 196 dla zająca szaraka i 149 dla królika europejskiego. Stąd, zające mają około 24% więcej brodawek grzybowatych niż króliki europejskie. Wśród królików, gatunek udomowiony miał o 15% mniej brodawek grzybowatych w porównaniu z gatunkiem dziko żyjącym.

Obserwacje mikrostruktury brodawek grzybowatych na obu powierzchniach wierzchołka języka oraz trzonu języka wskazały obecność okrągłych w zarysie brodawek grzybowatych, z wyjątkiem owalnych brodawek na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka obserwowanych wyłącznie u królików domowych. Brodawki grzybowate na wierzchołku języka królików miały spłaszczone powierzchnie, podczas gdy zająca szaraka były przeważnie lekko wypukłe. W dalszej części, na trzonie języka, powierzchnie brodawek grzybowatych badanych zajęczaków były wypukłe. Do charakterystycznych cech brodawek grzybowatych na wierzchołku i trzonie języka badanych zajęczaków zaliczono również (i) występowanie wału nabłonkowego wokół brodawek grzybowatych, który oddzielał brodawki grzybowate od gęsto rozmieszczonych brodawek nitkowatych i (ii) otwarty dostęp do powierzchni grzbietowych brodawek grzybowatych na wierzchołku i trzonie języka, pomimo występowania licznych zrogowaciałych wyrostków brodawek nitkowatych, które wystawały powyżej poziomu brodawek grzybowatych o około 13%-15%. Te cechy, wraz z płaską lub zaokrągloną powierzchnią grzbietową brodawek grzybowatych, zapewniają bezpośredni dostęp do cząstek pokarmowych, co wpływa na percepcję smaku. Podczas obserwacji zwrócono uwagę na 10-12 brodawek grzybowatych, które były rozmieszczone liniowo na obu powierzchniach bocznych wyniosłości językowej. Podobnie do brodawek na trzonie języka, brodawki grzybowate na wyniosłości językowej miały kopulasto wzniesione powierzchnie. Podczas obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym, brodawki grzybowate na bocznej powierzchni wyniosłości językowej były niemal niewidoczne, z uwagi na częściowe pokrycie tych brodawek przez wydłużone zrogowaciałe wypustki brodawek nitkowatych.

Dopiero maceracja nabłonka przy użyciu 10% NaOH pozwoliła na dobre ujawnienie tych brodawek smakowych. Prawdopodobnie wyrostki brodawek nitkowatych odgrywają na wale języka rolę w ochronie wrażliwej powierzchni brodawek grzybowatych, które są rozmieszczone wzdłuż linii zgryzu zębów przedtrzonowych i trzonowych.

Warto dodać, że analiza histomorfometryczna nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki grzybowate wykazała średnią wysokość wynoszącą 53,0 μm , z czego około 9,4 μm stanowiła warstwa rogowa. Należy jednak zauważyć, że wartości te były zmienne w poszczególnych częściach języka. U królika domowego wysokość nabłonka była średnio o 27% wyższa w porównaniu z badanymi gatunkami dziko żyjącymi. Najcieńsza warstwa rogowa we wszystkich badanych gatunkach występowała na brodawkach grzybowatych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka.

Poprzednie prace opisujące morfologię języka wskazują, że brodawki grzybowate na grzbietowej powierzchni przedniej części języka były okrągłe w zarysie z wklęsłą lub kopulastą powierzchnią (Shindo i in. 2006, Ciena i in. 2013, Menezes i in. 2013, Reginato i in. 2014, Al-Mahmodi 2016, Ciena i in. 2019, Davydova i in. 2017, Wannaprasert 2018, Wannaprasert i in. 2020, Megawati i in. 2023). Tylko w przypadku nornicy rudej opisano, że każda brodawka grzybowata na wierzchołku języka miała spłaszczoną powierzchnię (Jackowiak i Godynicki, 2005). U niektórych gatunków brodawki grzybowate opisywano również na tylnej powierzchni języka. U bobra amerykańskiego brodawki grzybowate obserwowano na tylnej powierzchni wyniosłości językowej, u świnki morskiej między brodawkami okolonymi, u nornicy rudej były rozmieszczone u podstawy wyniosłości językowej, natomiast u bambusowczyka kasztanowego, występowały rzadko na tylnej części języka (Jackowiak i Godynicki 2005, Shindo i in. 2006, Ciena i in. 2019, Wannaprasert i in. 2020). Badania Kulawik i Godynicki (2007) u królika domowego wspominają o obecności brodawek grzybowatych także na powierzchniach bocznych wyniosłości językowej, podczas gdy Al-Mahmodi (2016) u dzikich królików obserwował brodawki grzybowate jedynie na grzbietowej powierzchni przedniej części języka.

Poprzednie badania dotyczące rozmieszczenia i mikrostruktury brodawek grzybowatych wskazały skupienia tych brodawek w formie półksiężyca w pobliżu granicy języka na brzusznej powierzchni wierzchołka języka jak wspomniano wyżej u przeżuwaczy, a ich typową cechą była wyraźna wypukłość ponad błonę śluzową (Plewa i in. 2022). Podobne skupiska brodawek grzybowatych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka

zaobserwowano także u przeżuwaczy, takich jak daniel, serau tajwański, sarny, sarniaki pampasowe (Atoji i in. 1998, Erdogan i Perez 2013, Jackowiak i in. 2017b).

Obserwacje macerowanych prób tkankowych w SEM oraz modeli 3D, umożliwiły obserwacje trzonu łącznotkankowego brodawek grzybowatych zajęczaków, który zapewnia stabilność brodawkom grzybowatymi. U badanych zajęczaków wyróżniono dwa różne typy kształty trzonów łącznotkankowych brodawek smakowych opisanych jako typ "balonowaty" i "kolumnowy", przy czym ich rozmieszczenie było specyficzne dla gatunku. U królika europejskiego balonowaty kształt trzonów występował wyłącznie na wierzchołku języka, podczas gdy kolumnowy był obserwowany na tylnej części języka. U królików domowych obserwowano wyłącznie balonowaty kształt trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych. U zająca szaraka rozmieszczenie brodawek grzybowatych z określonym kształtem trzonu łącznotkankowego był zmienny, ponieważ kolumnowy kształt występował na brzusznej powierzchni wierzchołka oraz na trzonie języka, podczas gdy balonowaty kształt trzonu łącznotkankowego miały brodawki grzybowate jedynie na grzbietowej powierzchni wierzchołka oraz bocznych powierzchniach wyniosłości językowej.

W poprzednich badaniach prowadzonych na królikach domowych przez Nonaka i in. (2008) oraz Kulawik i Godynicki (2007) trzony łącznotkankowe brodawek grzybowatych miały kształt balonowaty, podczas gdy Silva i in. (2002) zaobserwowali trzony jedynie o kształcie kolumnowym. Żadne z tych badań nie wskazywały jednak na zmienność kształtów trzonów łącznotkankowych między częściami języka, co potwierdza konieczność przeprowadzania analizy próbek tkankowych z różnych obszarów języka, z wykorzystaniem komputerowo wygenerowanych modeli 3D, w przyszłych badaniach brodawek językowych u ssaków.

Dane dotyczące trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych u szczurów i aguti opisują kształt przypominający wulkan. U świnki morskiej i bobra amerykańskiego trzony łącznotkankowe miały kształt pięści, a u chomika były w formie grubej kolumny (Kobayashi 1990, Kitajima i Kobayashi 1992, Shindo 2006, Ciena i in. 2013, Reginato i in. 2014). U koali, czyli roślinożernego torbacza, trzony łącznotkankowe również miały formę grubej kolumny (Kobayashi i in. 2003). Wspomnieć należy, że w badaniach prowadzonych u przeżuwaczy tj. bydła, żubra europejskiego oraz żubronia dzięki zastosowaniu analizy trójwymiarowej, po raz pierwszy, wykazano trzy typy kształtów trzonów łącznotkankowych (i) balonowaty, (ii) kolumnowy oraz (iii) stożkowy o wzorcu zróżnicowanym w kolejnych częściach języka (Plewa i in. 2022).

Obecne badania mikrostrukturalne trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych wykazały, że obecność blaszek bocznych na powierzchni trzonów zwiększa przyczepność, czy zakotwiczenia nabłonka wielowarstwowego pokrywającego brodawki, jednocześnie stabilizując strukturę brodawek grzybowatych względem sił mechanicznych działających na powierzchnię języka. U badanych zajęczaków w trzonie łącznotkankowym o kształcie balonowatym boczne blaszki występowały głównie w górnej części brodawki lub były węższe u podstawy i rozszerzały się ku górze. Natomiast w kolumnowym trzonie łącznotkankowym blaszki boczne miały równą szerokość na całej wysokości brodawek. U zająca szaraka blaszki boczne były najwęższe. Warto wspomnieć, że u zająca szaraka i królika domowego liczba blaszek bocznych była najbardziej zmienna i wynosiła od 5 do 18 w pojedynczym trzonie łącznotkankowym brodawki grzybowatej. U królika europejskiego liczba blaszek była porównywalna i wynosiła średnio 12. W badaniach prowadzonych na królikach domowych, Nonaka i in. (2008) oraz Kulawik i Godynicki (2007) zauważyli odpowiednio od 15 do 20 oraz od 10 do 17 blaszek bocznych na trzonach łącznotkankowych brodawek grzybowatych. U gatunków należących do gryzoni, trzony łącznotkankowe z kilkoma blaszkami bocznymi w brodawkach grzybowatych opisano jedynie u świnki morskiej, podczas gdy u roślinożernych torbaczy, takich jak koala, opisywano pionowe blaszki boczne trzonów łącznotkankowych jako liczne (Kobayashi 1990, Kobayashi i in. 2003, Ciena i in. 2019).

Obserwacje modeli 3D brodawek grzybowatych pozwoliły określić dokładne rozmieszczenie i liczbę kubków smakowych na pojedynczych brodawkach i wskazać różnice w liczbie i rozmieszczeniu kubków smakowych na powierzchni brodawek grzybowatych, zależnie od kształtu trzonu łącznotkankowego. Na trzonie łącznotkankowym o kształcie balonowatym, 1–16 kubków smakowych było równomiernie rozmieszczonych na całej powierzchni grzbietowej lub zgrupowanych centralnie bądź liniowo. W przypadku trzonów łącznotkankowych o kształcie kolumnowym 1–3 kubki smakowe były zgrupowane w środkowej części brodawki lub układały się liniowo. Na brzusznej powierzchni wierzchołka i trzonu języka zająca szaraka obserwowano w brodawkach grzybowatych kolumnowe trzony łącznotkankowe z równomiernie rozmieszczonymi kubkami smakowymi o liczbie od 3 do 8.

Ocena ilościowa kubków smakowych u badanych gatunków zajęczaków wskazuje na ich zróżnicowanie w pojedynczych brodawce. Takie dane były podstawą do próby obliczenia liczby kubków smakowych w brodawkach grzybowatych na określonych powierzchniach i częściach języka oraz całkowitej liczby kubków

smakowych w brodawkach grzybowatych na całym języku. Szacunkowo, u wszystkich badanych gatunków liczba kubków smakowych w przedniej części języka wynosiła od 1 do 5 na pojedynczą brodawkę grzybowatą. U badanych królików liczba kubków smakowych w pojedynczej brodawce grzybowatej zmniejszała się w kierunku trzonu języka, podczas gdy u zająca szaraka wzrastała. Na wyniosłości językowej liczba kubków smakowych była wyższa i wynosiła 4 u królika domowego, 7 u królika europejskiego, a nawet 11 u zająca szaraka, co może sugerować pewną kompensację w relacji do mniejszej liczby brodawek grzybowatych w tym obszarze w porównaniu z innymi częściami języka, w celu efektywnego odbioru smaku pokarmu rozdrabnianego bezpośrednio w pobliżu linii zgryzu zębów przedtrzonowych i trzonowych.

Na podstawie otrzymanych wyników podjęto próbę oszacowania i porównania całkowitej liczby kubków smakowych na językach badanych gatunków. Obliczenia ujawniły interesujące różnice w liczbie kubków smakowych, którą u królika europejskiego oszacowano na 437 kubków smakowych, u królika domowego na 414, natomiast u zająca szaraka aż 911. Oznacza to, że u zająca szaraka występuje odpowiednio o 54% i 52% więcej kubków smakowych niż u królika domowego i dziko żyjącego królika europejskiego. Odnosząc do wyników całkowitej liczby kubków smakowych na poszczególnych częściach języka u dziko żyjących badanych zajęczaków, największe wartości występowały na brzusznej powierzchni wierzchołka języka, przy czym u zająca szaraka były one o 66% wyższe niż u królika europejskiego. U królika domowego zaobserwowano o 50% więcej kubków smakowych na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka. Ponadto u królika domowego znaleziono o 20% i 46% więcej kubków smakowych na grzbietowej powierzchni wierzchołka niż u królika europejskiego i zająca szaraka. Wyniki te mogą wskazywać zróżnicowanie preferowanych miejsc wstępnej selekcji pokarmu między badanymi gatunkami dziko żyjącymi a udomowionymi zajęczakami. Przy tej okazji można wspomnieć, że u przeżuwaczy szacowana liczba kubków smakowych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka była wyższa w stosunku do powierzchni grzbietowej o 60–95% i wynosiła 900 u żubra europejskiego oraz 3008 u bydła domowego (Plewa i in. 2022).

Obserwowane różnice ilościowe w liczbie brodawek grzybowatych i ich kubków smakowych zajęczaków mogą wskazywać, że różne nisze ekologiczne oraz sezonowe zmiany, które zapewniają szeroki zakres pożywienia dla badanych gatunków dziko żyjących, mogły wpłynąć na charakterystyczną dla roślinożerców większą liczbę kubków smakowych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka, odgrywającej istotną rolę

w wstępnej selekcji pokarmu. Seidenstücker (2000) zauważył, że dziko żyjące króliki mogą być bardzo wybiórcze w doborze pokarmu, wybierając jedną część rośliny lub rodzaj rośliny o najwyższej zawartości azotu. Bell i Watson (1993) stwierdzili, że różnice w zawartości cukru w odmianach roślin w pełni nie wyjaśniły podejścia królików do selektywnego wyboru roślin. Mniejsza liczba kubków smakowych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka, obserwowana u królika domowego, może być pośrednio związana z procesem udomowienia, który obejmuje zmiany warunków życia podczas hodowli oraz stosunkowo mniejsze zróżnicowanie pożywienia w porównaniu do gatunków dziko żyjących i hipotetycznie zmianę sposobu i miejsca kontaktu języka z pożywieniem.

W literaturze naukowej istnieją ograniczone dane dotyczące dokładnej liczby kubków smakowych w brodawkach grzybowatych gryzoni. U szczurów obserwowano pojedyncze kubki smakowe w brodawkach grzybowatych, podczas gdy u bambusowca indomalajskiego liczba ta wzrastała do 4 kubków na pojedynczej brodawce (Mistretta i Baum 1984; Reginato i in. 2014; Wannaprasert 2018).

Uzyskane wyniki wykazały także, że średnica kubków smakowych u królików i zająca szaraka wynosiła od 29,0 μm do 47,0 μm . Jednak porównując te parametry w korelacji z poszczególnymi częściami języka, ujawniono, że u obu gatunków królików średnica kubków smakowych w brodawkach grzybowatych na trzonie języka wzrosła odpowiednio o 36% i 28%, podczas gdy u zająca szaraka miały one podobny rozmiar. W dobrze zrogowaciałym nabłonku pokrywającym brodawki grzybowate u przeżuwaczy kubki smakowe charakteryzowały się podobnymi wymiarami wynoszącymi od 32,0 μm do 48,0 μm (Plewa i in. 2022).

Ponieważ u zajęczaków podczas żucia dwie z trzech faz, tj. faza rozdrabniania i faza tuż przed połknięciem, odbywają się w tylnej części języka, dwie brodawki okolone oraz dwie brodawki liściaste tworzą obszar analizy rozdrobnionego pokarmu przed połknięciem. Proponujemy, aby do analizy brodawek smakowych zlokalizowanych w tylnej części języka, włączyć wcześniej wspomniane brodawki grzybowate na bocznych powierzchniach wyniosłości językowej, które analizują smak wzdłuż linii zgryzu zębów przedtrzonowych i trzonowych. Warto dodać, że wcześniejsze badania przeprowadzone na przeżuwaczach po raz pierwszy ujawniły liczne brodawki grzybowate, na bocznych i grzbietowych powierzchniach wału języka, co ma istotne znaczenie w funkcjach sensorycznych (Plewa i in. 2022).

Szczegółowa analiza preparatów histologicznych, obserwacje prób tkankowych w SEM oraz zastosowanie systemu komputerowego do rekonstrukcji i wizualizacji trójwymiarowych modeli brodawek smakowych umożliwiły po raz pierwszy u ssaków przeprowadzić szczegółową mikroanalizę brodawek okolonych i liściastych. Wykonano również analizę rozmieszczenia i liczby ich kubków smakowych.

Dwie brodawki okolone występujące u badanych zajęczaków różniły się kształtem i u królików były okrągłe w zarysie, natomiast u zająca szaraka były owalne, z płaską lub lekko nieregularną powierzchnią trzonu brodawki. Bruzdy brodawek oddzielające trzon od gładkiego wału brodawki były szerokie, choć u królika domowego miejscami częściowo zrosnięte. Ogólna morfologia brodawek okolonych u innych gryzoni i zajęczaków wykazała podobieństwa, np. u nornicy rudej bruzda była ciągła, a u szczura nie wykazywała pełnej ciągłości (Jackowiak i Godynicki 2005, Reginato i in. 2014). W przypadku bambusowca indomalajskiego powierzchnia brodawek okolonych była nierówna, a bruzda była płytka (Wannaprasert 2018).

Nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący pokrywający powierzchnię trzonu i wału brodawek okolonych wykazuje podobną wysokość ok. 182 μm u wszystkich badanych zajęczaków. Jednakże na bocznych powierzchniach trzonu i wału brodawki oraz w obszarze występowania kubków smakowych wysokość tego nabłonka zmniejszała się o około 65%. Warstwa rogowa tego nabłonka u badanych gatunków miała średnio 8,7 μm wysokości, co stanowi około 5% całkowitej wysokości nabłonka. Wysokość warstwy rogowej pokrywającej brodawki okolone jest porównywalna jak na brodawkach grzybowatych. U gryzoni, cienką warstwę rogową nabłonka na powierzchni brodawek okolonych zaobserwowano u aguti, bambusowczyka kasztanowego, bambusowca indomalajskiego oraz świnki morskiej (Ciena i in. 2013, Wannaprasert 2018, Ciena i in. 2019, Wannaprasert i in. 2020). Z kolei u bobra amerykańskiego stwierdzono „grubą warstwę rogową” na grzbietowej powierzchni trzonu brodawek oraz nabłonek pozbawiony warstwy rogowej na bocznych powierzchniach trzonu i wału brodawki (Shindo i in. 2006). W badaniach Kulawik i Godynicki (2008) wysokość nabłonka na brodawkach okolonych u sześciomiesięcznego królika domowego wynosiła około 164 μm .

Analiza trójwymiarowa brodawek okolonych pokazała, że trzony łącznotkankowe tych brodawek przypominały kwiat, jednak posiadały różnice mikrostrukturalne charakterystyczne dla danego gatunku zajęczaka. U królika europejskiego trzon łącznotkankowy przyjmował formę palczastych wypustek otoczonych przez bocznie

splaszczone blaszki, w których obserwowano zagłębienia na kubki smakowe. U zająca szaraka trzon składał się z nieregularnych, bocznie splaszczonych blaszek, natomiast u królika domowego trzon łącznotkankowy był zbudowany z systemu blaszek z palczastymi wyrostkami. U wszystkich badanych gatunków trzon łącznotkankowy wału brodawki był stworzony z splaszczonych blaszek otaczających trzon brodawki, jednak u zająca szaraka w jego strukturze obserwowano dodatkowo stożkowate wyrostki na powierzchni grzbietowej. Wysoce nieregularna, przypominająca kwiat struktura trzonu łącznotkankowego trzonu brodawki okolonej zapewniła mocne zakotwiczenie nabłonka pokrywającego brodawki z kubkami smakowymi.

Wcześniejsze badania, gdzie materiałem badawczym był królik domowy, bóbr amerykański, bambusowczyk kasztanowaty i szczur wykazały, że trzony łącznotkankowe trzonu brodawek okolonych były zwarte w budowie, nieregularne, a czasami posiadały wtórne odgałęzienia (Silva i in. 2002, Shindo i in. 2006, Reginato i in. 2014, Wannaprasert i in. 2020). Tylko Nonaka i in. (2008) opisywali trzon łącznotkankowy brodawek okolonych u królika domowego jako strukturę przypominającą kwiat. U innych ssaków, takich jak kozioł śnieżny i bydło, trzony łącznotkankowe brodawek okolonych, obserwowane na próbach tkankowych macerowanych w HCl, były bardziej zwarte i posiadały małe kolczaste elementy powierzchniowe (Kobayashi i in. 2005).

Kubki smakowe w brodawkach okolonych zajęczaków były rozmieszczone na bocznych i/lub grzbietowych powierzchniach trzonu brodawek, a także wale brodawki. Tylko dziko żyjące zajęczaki charakteryzowały się występowaniem kubków smakowych na powierzchni grzbietowej brodawek (Abumandour i El-Bakary 2013, Al-Mahmoodi 2016). W trzonie łącznotkankowym trzonu brodawki okolonej królika europejskiego wskazano na występowanie zagłębień w trzonach łącznotkankowych, w których występowały niewielkie grupy kubków smakowych. Modele 3D brodawek okolonych królika domowego wykazały brak kubków smakowych w miejscach częściowego zarośnięcia bruzdy brodawki. Kubki smakowe gryzoni obserwowane w brodawkach okolonych występowały głównie na bocznych powierzchniach trzonu brodawki lub na wale brodawki (Mistretta i Baum 1984, Shindo i in. 2006, Jackowiak i Godynicki 2005, Wannaprasert 2018, Wannaprasert i in. 2020).

Określając średnią liczbę kubków smakowych w pojedynczej brodawce okolonej wykazano, że najwyższą wartością, równą 451 ustalono u zająca szaraka, podczas gdy średnie wartości uzyskane dla królików były porównywalne i wynosiły średnio 170. Dużą

zmienność w liczbie kubków smakowych w brodawkach okolonych od 41 do 272 obserwowano u królika europejskiego, co stanowiło wartość o około 62% niższą od zająca szaraka. Co istotne, liczba kubków smakowych w brodawkach okolonych zająca szaraka była bardziej stabilna, z odchyleniem wynoszącym jedynie 3%. Dotychczas brakowało precyzyjnych danych dotyczących liczby kubków smakowych w brodawkach okolonych zajęczaków (Abumandour i El-Bakary 2013, Menezes i in. 2013, Al-Mahmodi 2016). Mistretta i Baum (1984) sugerowali, że liczba kubków smakowych w brodawkach okolonych szczura może wynosić od 394 do 450, natomiast Davydova i in. (2017) wskazali na obecność jednego lub dwóch kubków smakowych w pojedynczej brodawce, co wydaje się znacznym niedoszacowaniem.

Brodawki liściaste wszystkich badanych gatunków zajęczaków składały się z kilku fałdów błony śluzowej zwanych liśćmi, oddzielonych głębokimi bruzdami brodawki. Średnia liczba fałdów błony śluzowej u królików wynosiła około 15, podczas gdy zająca szaraka była wyższa o około 17%. Podczas obserwacji brodawek liściastych badanych zajęczaków zauważono, że niektóre fałdy błony śluzowej rozdzielały się miejscowo na dwa nowe, zwiększając powierzchnię smakową brodawki. Średnice brodawek liściastych zajęczaków były podobne, ale bruzda brodawki liściastej królika europejskiego była szersza o około 20% w porównaniu z królikiem domowym i zającem szarakiem, co może w praktyce ułatwiać dostęp pokarmu do kubków smakowych znajdujących się w bruzdzie. Analiza szerokości i wysokości pojedynczego fałdu brodawki wykazała, że wartości uzyskane dla królika europejskiego były odpowiednio o 12% i 39% wyższe niż u królika domowego i zająca szaraka. Z kolei, wysokość nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego brodawki liściaste była podobna dla wszystkich badanych gatunków i wynosiła średnio 103,2 μm , zmniejszając się na powierzchniach bocznych, zawierających kubki smakowe w bruzdzie brodawki o około 50%. Wysokość warstwy rogowej nabłonka w brodawkach liściastych wynosiła około 7,1 μm i była cieńsza niż warstwa rogowa obserwowana dotąd w brodawkach grzybowatych i okolonych odpowiednio o 24% i 18%. Ciena i in. (2019) oraz Davydova i in. (2017) opisali cienką warstwę rogową u świnki morskiej i szczura na grzbietowej powierzchni brodawek liściastych. Natomiast u aguti zaobserwowano grubą warstwę rogową na bocznych powierzchniach pojedynczych fałdów błony śluzowej (Ciena i in. 2013). Wcześniejsze badania przeprowadzone na króliku domowym, odmiennie do naszych wyników, wykazały obecność nabłonka

wielowarstwowego płaskiego nierogowaciejącego pokrywającego brodawki liściaste (Kulawik i Godynicki 2006, Al-Mahmodi 2016).

Analiza przestrzenna trzonów łącznotkankowych brodawek liściastych za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej oraz modeli 3D wykazała charakterystyczną strukturę fałdów błony śluzowej, składającą się z jednej pośrodkowej i dwóch bocznych blaszek łącznotkankowych. Pośrodkowe blaszki były o około 52% wyższe niż łukowate blaszki boczne. Dodatkowo u dziko żyjącego królika europejskiego blaszki boczne i pośrodkowe były odpowiednio o 24% i 21% wyższe niż u królika domowego i zająca szaraka. Podobną strukturę trzonów łącznotkankowych obserwowano wcześniej u królika domowego, jednak w przypadku gryzoni struktury te różniły się kształtem, gdyż trzony łącznotkankowe szczura i świnki morskiej miały formę szerokich, owalnych rowków, u aguti były to cienkie równoległe blaszki, a u bobra amerykańskiego struktury te pokrywały elementy w kształcie prętów (Kulawik i Godynicki 2006, Shindo i in. 2006, Ciena i in. 2013, Reginato i in. 2014, Ciena i in. 2019). Modele 3D fałdów błony śluzowej brodawek liściastych pokazały, że kubki smakowe we wszystkich badanych gatunkach zajęczaków były rozmieszczone w rzędach na powierzchni blaszek bocznych. Liczba rzędów kubków smakowych różniła się między gatunkami wynosiła od 2 do 7 dla zająca szaraka oraz od 1 do 4 dla królika europejskiego. Największą liczbę kubków smakowych na pojedynczym fałdzie, równą 436, odnotowano u zająca szaraka, podczas gdy u królika domowego i europejskiego liczby te były odpowiednio o 6% i 25% niższe.

Z liczby fałdów błony śluzowej w brodawkach liściastych oraz liczby kubków smakowych na krótszych i dłuższych fałdach oszacowano, że całkowita liczba kubków smakowych w brodawkach liściastych wynosiła 4550 u królika europejskiego, 6180 dla królika domowego oraz 7848 dla zająca szaraka. Wyniki te wskazują, że liczba kubków smakowych o średnicy od 24 do 54 μm w brodawkach liściastych jest specyficzna dla gatunku, co podkreśla ich rolę w percepcji smaku rozdrobnionego pokarmu zmieszanego ze śliną przed połknięciem.

Dzięki danym o średniej liczbie kubków smakowych w każdym typie brodawek smakowych na językach zajęczaków, po raz pierwszy było możliwe podjęcie próby szacowania całkowitej liczby kubków smakowych na języku badanych zajęczaków. Kolejno, u zająca szaraka całkowita liczba kubków smakowych wynosi 17 509, królika domowego 13 114, a królika europejskiego 9877, co względem liczby kubków zająca szaraka oznacza różnice wynoszące odpowiednio 25% i 43%. Zaskakującą informacją wynikającą z szacowania jest to, że królik domowy ma o 24% więcej kubków smakowych

niż jego dziko żyjący przodek. W poprzednich badaniach przeprowadzonych u trzech gatunkach przeżuwaczy najwyższą liczbę kubków smakowych zaobserwowano u gatunków udomowionych, takich jak bydło i żubroń, podczas gdy dziko żyjący żubr europejski miał około 60% mniej kubków smakowych (Plewa i in. 2022).

Podsumowując, średnia liczba kubków smakowych w brodawkach grzybowatych okolonych i liściastych na tylnej powierzchni języka stanowiła około 96% całkowitej liczby kubków smakowych na języku, co podkreśla znaczenie tej części języka w percepcji smaku podczas żucia i przygotowania pokarmu do połykania.

5.3.Omówienie wyników badań smakowych brodawek językowych kota domowego

Niniejsze badania wskazują na występowanie na języku kota domowego brodawek smakowych grzybowatych i brodawek okolonych. Badanie brodawek grzybowatych na języku kotów domowych przeprowadzone przez Robinsona i Winklesa (1990) wykazało, że ich liczba wynosi od 227 do 265, przy czym zaobserwowano zmniejszanie się liczby brodawek w kierunku dogardłowym. Jednak we wspomnianych badaniach brakowało szczegółowych informacji dotyczących wielkości języka oraz rasy analizowanych kotów.

Obecne obserwacje przeprowadzone u kotów domowych wykazały zbliżoną liczbę brodawek grzybowatych, w zakresie od 177 do 266. Analizując rozmieszczenie brodawek w przednich częściach języka, od wierzchołka do obszaru dużych brodawek nitkowatych, stwierdzono, że oprócz rzędu 12 brodawek ułożonych wzdłuż przedniej krawędzi wierzchołka języka, około 75 brodawek grzybowatych rozmieszczonych równomiernie na płaskiej, grzbietowej powierzchni wierzchołka. Następnie liczba brodawek zmniejszała się o około 20% na przednio-bocznych powierzchniach języka, by w tylnej części trzonu języka ponownie wzrosnąć do około 70 brodawek grzybowatych. Co istotne, liczba brodawek grzybowatych w tylnej części trzonu języka była o 57% wyższa w linii środkowej w porównaniu z powierzchniami tylnio-bocznymi. Analizowana gęstość brodawek grzybowatych maleje w kierunku tylnym z wartości 0,39 brodawki/mm² na wierzchołku języka do wartości 0,24 brodawki/mm² w tylnej części trzonu języka. Liczba brodawek grzybowatych rozmieszczonych wzdłuż przednich i tylnych brzegów trzonu języka wynosiła 82, co oznacza to, że są one liczniejsze niż na płaskich powierzchniach wierzchołka i tylnej części trzonu języka.

W badaniach prowadzonych z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego i mikroskopu świetlnego zaobserwowano, że brodawki grzybowate, przeważnie owalne w zarysie, miały spłaszczone powierzchnie, choć niektóre miały kształt kopuły. Wysokość brodawek grzybowatych stopniowo wzrastała w kierunku doogonowym. W tylnej części trzonu języka brodawki grzybowate były około 73% wyższe niż brodawki na wierzchołku języka, co może być związane ze zwiększeniem rozmiaru tylnych brodawek nitkowatych i zachowanie warunków ekspozycji górnej powierzchni brodawek z kubkami smakowymi. Warto wspomnieć, że u kota domowego zrogowaciałe wyrostki małych i dużych brodawek nitkowatych nie zasłaniają grzbietowej powierzchni brodawek grzybowatych, co ułatwia kontakt komórek receptorowych w kubkach smakowych z cząstkami pokarmu i odbieranie bodźców smakowych.

W trakcie badań zaobserwowano wzrost średnicy brodawek grzybowatych między wierzchołkiem języka, a tylnymi częściami języka. Największą średnicę brodawek grzybowatych odnotowano na 12 brodawkach zlokalizowanych na krawędzi wierzchołka języka, które były o około 38% większe niż średnice brodawek na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka. Natomiast najwyższe wartości średnic miały brodawki grzybowate rozmieszczone wzdłuż bocznych części trzonu języka. Warto jednak zauważyć, że brodawki grzybowate umiejscowione przy paśmie dużych brodawek nitkowatych, były znacznie szersze niż te znajdujące się na bocznych krawędziach języka.

Obserwacje wysokości nabłonka brodawek grzybowatych była stosunkowo jednorodna na całej powierzchni języka i wynosiła około 56 μm , przy czym cienka warstwa rogowa stanowiła 6–9% całkowitej grubości nabłonka. Wcześniejsze badania brodawek grzybowatych u trzech gatunków przeżuwaczy pokazały zmienność wysokości nabłonka wielowarstwowego w zależności od części języka, z najwyższymi wartościami w centralnej części wału języka, związanej z przeżuwaniem, i najniższymi w brodawkach grzybowatych na brzusznej powierzchni wierzchołka języka, uczestniczących w odbieraniu smaku i selekcji pokarmu (Plewa i in. 2022). W przypadku zajęczaków różnice w wysokości nabłonka brodawek grzybowatych także dotyczyły poszczególnych części języka gdzie najwyższy nabłonek występował na trzonie języka i bocznych powierzchniach wyniosłości językowej i był funkcjonalnie związany z transportem pokarmu. Opisane różnice mogą wynikać z rodzaju tzw. miękkiej diety zwierząt mięsożernych i twardszej diety zwierząt roślinożernych.

Wynikiem analizy mikrostruktury brodawek grzybowatych na modelach 3D i w obserwacji w SEM jest wyróżnienie czterech morfologicznie odmiennych kształtów trzonów łącznotkankowych, tj. grzybowatego, maczugowatego, kolumnowego i pąkowatego. Grzybowaty kształt trzonów łącznotkankowych, charakteryzujący się szeroką i płaską powierzchnią grzbietową, był obecny na każdej badanej części języka. Kształt maczugowaty trzonu występował w brodawkach grzybowatych na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka oraz przednio- i tylnobocznych powierzchniach trzonu języka, a kształt kolumnowy na wierzchołku języka i przednio-bocznych powierzchniach trzonu języka. Pąkowate trzony łącznotkankowe ograniczały się do brodawek na tylnopośrodkowej powierzchni trzonu języka. Kluczową cechą każdego trzonu łącznotkankowego były liczne kolagenowe blaszki boczne lub wyrostki, które zapewniały mocne zakotwiczenie nabłonka na powierzchni brodawki. Na powierzchni grzbietowej brodawek grzybowatych występowały łącznotkankowe wypukłości przypominające wulkan, co prawdopodobnie również zwiększało powierzchnię przyczepu nabłonka.

Dane dotyczące budowy trzonu łącznotkankowego brodawek grzybowatych i innych brodawek smakowych u kotów domowych oraz dziko żyjących są ograniczone i często generalizowane na całą powierzchnię języka. Emura i in. (2014, 2018a, 2018b) opisali, że trzon łącznotkankowy brodawek grzybowatych lamparta plamistego i kotka cętkowanego charakteryzował się gęstą siecią kolagenową bez dodatkowych struktur powierzchniowych, natomiast u mormona złocistego zawierał niewielkie zagłębienia na powierzchni.

Na modelach 3D brodawek grzybowatych kota domowego obserwowano zróżnicowane wzorce rozmieszczenia kubków smakowych na ich powierzchni. Na przedniej części języka kubki smakowe były równomiernie rozmieszczone na całej powierzchni grzbietowej brodawki, natomiast w tylnej części języka miały tendencję do grupowania się lub tworzenia pasm w pobliżu bocznych krawędzi brodawki. Z kolei dane ilościowe dotyczące liczby kubków smakowych zlokalizowanych na pojedynczych brodawkach grzybowatych są następujące: na brodawkach na brzegu wierzchołka języka stwierdzono najwyższą średnią liczbę kubków smakowych, wynoszącą 21 na pojedynczą brodawkę grzybowatą, co stanowi około 14% więcej kubków w porównaniu do dalszej grzbietowej powierzchni wierzchołka. Na trzonie języka liczba kubków smakowych na pojedynczej brodawce grzybowatej wzrasta średnio o 43%, osiągając około 30 kubków. W tylnopośrodkowym obszarze trzonu języka liczba

kubków smakowych w pojedynczej brodawce była zróżnicowana i wahała się od 10 do 53. Wyniki te precyzują wcześniejsze badania Robinsona i Winklesa (1990), w których szacunkowa liczba kubków smakowych na brodawkach grzybowatych w różnych częściach języka wynosiła 6,9–16,6, co w odniesieniu do naszych danych było zaniżone o 32% do nawet 51%.

Zestawienie danych dotyczących kształtów trzonów łącznotkankowych oraz liczby kubków smakowych wykazało, że brodawki grzybowate z grzybowatym typem trzonu miały największą liczbę kubków smakowych. Najmniejszą liczbę kubków smakowych stwierdzono w brodawkach posiadających pąkowaty kształt trzonu. W brodawkach z grzybowatym kształtem trzonów łącznotkankowych apikalna część tworzyła szeroką, stabilną platformę dla śródnabłonkowych kubków smakowych, które łączyły się z włóknami nerwowymi. Skromniej uformowane trzony łącznotkankowe o kształcie maczugowatym, kolumnowym i pąkowatym charakteryzowały się mniejszą liczbą kubków smakowych, co wydaje się być związane z szybkim wzrostem brodawek nitkowatych otaczających brodawki grzybowate i ich napieraniem na wcześniej rozwinięte brodawki grzybowate podczas postnatalnego wzrostu błony śluzowej.

Dzięki danym dotyczącym średniej liczby brodawek grzybowatych i kubków smakowych oszacowano całkowitą liczbę kubków smakowych w poszczególnych częściach języka dorosłych kotów. Wyniki pokazały, że liczba kubków smakowych wzrasta w kierunku tylnym i na krawędzi języka wynosiła 252, na grzbietowej powierzchni wierzchołka 1350, na przednio- i tylnobocznych powierzchniach trzonu 2520, a na tylnej powierzchni trzonu 1581, co łącznie dało 5703 kubków smakowych w brodawkach grzybowatych. W badaniach Robinsona i Winklesa (1990), przy zastosowaniu innej metody liczenia na przekrojach brodawek, oszacowana liczba kubków smakowych była o 50% mniejsza i wynosiła 2735. Wyniki niniejszych badań wykazały, że w przedniej części języka znajduje się o 35% więcej kubków smakowych na brodawkach grzybowatych niż w tylnej części.

Przypomnieć należy, że badania 3D przeprowadzone u dzikich i udomowionych przeżuwaczy wskazywały, że na grzbietowych i brzusznych powierzchniach wierzchołka języka oraz przedniej części trzonu języka znajdowało się od 61% do 75% więcej kubków smakowych w brodawkach grzybowatych niż na wale języka (Plewa i in. 2022).

Morfologiczne zróżnicowanie liczby i wielkości brodawek grzybowatych, różnorodność kształtów trzonów łącznotkankowych, a także rozmieszczenie i liczba

kubków smakowych w poszczególnych częściach języka wskazują na funkcjonalną adaptację języka kota do odbioru smaku podczas wstępnej selekcji pokarmu, żucia i transportu cząstek pokarmowych. Wstępna selekcja pokarmu przy pierwszym kontakcie z żywnością jest zapewniana przez większe brodawki grzybowate ułożone liniowo na brzegu wierzchołka języka, które wraz z położonym, za nimi brodawkami grzybowatymi na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka zawierają 30% wszystkich kubków smakowych. Dzięki elastyczności języka kota dochodzi do jego licznych rotacji, w tym unoszenia bocznych części języka podczas żucia (Thexton i McGarrick, 1989). Przeprowadzone analizy wykazały, że 44% wszystkich kubków smakowych w brodawkach grzybowatych znajduje się na przednio- i tylnobocznych powierzchniach trzonu języka, co podkreśla ich istotną rolę w odczuwaniu smaku podczas gryzienia pokarmu w linii występowania przedtrzonowców i trzonowców, miażdżących przyjmowany pokarm. Jak wykazały badania Thextona i McGarricka (1989), podczas transportu pokarmu doogonowo język wydłuża się i unosi ku fałdom podniebiennym. Cząstki pokarmu są kierowane wzdłuż ukośnie ułożonych rzędów brodawek nitkowatych do tylnopośrodkowej powierzchni trzonu języka, gdzie znajduje się 28% wszystkich kubków smakowych skupionych gęsto w brodawkach grzybowatych. Obszar ten, sąsiadujący z brodawkami okolonymi, które cechują się bardzo licznymi kubkami smakowymi, stanowi trzeci istotny region percepcji smaku, wspierający wtórną ocenę smaku w formowanym kęsie pokarmowym przed połknięciem.

Koty domowe, podobnie jak inni przedstawiciele kotowatych mają brodawki okolone ułożone w kształcie odwróconej litery „V” (Kobayashi i in. 1988, Guimares i in. 2007, Haddad i in. 2019, Ibrahim i in. 2024). Brodawki te są rozmieszczone symetrycznie w parach. Owalne brodawki okolone w przedniej parze są większe niż okrągłe brodawki w tylnych parach. Podobnie jak w poprzednich badaniach, liczba brodawek okolonych wahała się od 4 do 6, jednak uzyskane w niniejszych badaniach pomiary średnicy wskazują na wartości wyższe o około 64% (Kobayashi i in. 1988, Guimares i in. 2007, Freire i in. 2019, Haddad i in. 2019, Goździewska-Harłajczuk i in. 2023, Ibrahim i in. 2024). Liczba brodawek okolonych dzikich gatunków kotowatych wahała się od 4 do 9 (Emura i in. 2004, Toprak i Ulusoy 2011, Emura i in. 2014, Goździewska-Harłajczuk i in. 2023). Obecne badania wskazały, że wał brodawek okolonych tworzą połączone lub pojedyncze brodawki stożkowate, co jest zgodne z obserwacjami brodawek okolonych morma złocistego (Kobayashi i in. 1988 Emura 2018a). Charakterystyczną

cechą brodawek okolonych jest brak warstwy rogowej w ich nabłonku wielowarstwowym płaskim, co różni się od wyników przedstawionych przez Haddada i in. (2019).

Rekonstrukcje 3D brodawek okolonych kotów, przeprowadzone po raz pierwszy wśród ssaków mięsożernych, dostarczyły szczegółowych danych ilościowych i jakościowych na temat rozmieszczenia kubków smakowych. Zgodnie z wynikami badań histologicznych, kubki smakowe w brodawkach okolonych występowały na bocznych powierzchniach trzonu brodawki. Na bocznych powierzchniach wału brodawek okolonych nie zaobserwowano kubków smakowych, co wynika z uformowania wału brodawki z osobnych mechanicznych brodawek stożkowatych. Układ kubków smakowych kotów potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące innych gatunków kotowatych (Toprak i Ulusoy 2011, Freire i in. 2019, Haddad i in. 2019, Goździewska-Harłajczuk i in. 2023). Zaobserwowane różnice w liczbie i rozmieszczeniu kubków smakowych w brodawkach okolonych kotów były związane z wielkością brodawek. Wcześniejsze obserwacje modeli 3D brodawek okolonych u zająca szaraka i królików wykazały, że kubki smakowe były rozmieszczone równomiernie lub w małych grupach, co wskazuje na różnorodność ich rozmieszczenia w brodawkach okolonych u różnych gatunków ssaków.

W ramach badań oszacowano po raz pierwszy całkowitą liczbę kubków smakowych w brodawkach okolonych kotów, wynoszącą ok. 2562. Po uwzględnieniu liczby kubków smakowych w brodawkach grzybowatych i okolonych oszacowano, że język kota zawiera łącznie około 8265 kubków smakowych.

Analiza ilościowa kubków smakowych w brodawkach grzybowatych i okolonych wykazała, że tylna część języka kota domowego zawiera 58% całkowitej liczby kubków smakowych. Uwzględniając nasze wcześniejsze badania wśród zajęczaków, u których na tylnej powierzchni języka oprócz brodawek grzybowatych i okolonych występują także duże smakowe brodawki liściaste, udział kubków smakowych na tylnej części języka tej grupy ssaków wzrasta do 95%–97%.

5.4.Omówienie wyników badań smakowych brodawek językowych psa domowego

Skorelowane obserwacje modeli 3D oraz obserwacje LM i SEM, wykazały charakterystyczne dla gatunku cechy mikrostruktury brodawek grzybowatych, okolonych oraz liściastych u psów. Jak w przypadku przeżuwaczy, czy zajęczaków i kota domowego, uzyskano wiele szczegółowych informacji na temat trzonów łącznotkankowych oraz ilościowego i jakościowego rozmieszczenia kubków smakowych w nabłonkach brodawek smakowych.

Brodawki grzybowate psa domowego były równomiernie rozmieszczone na grzbietowej powierzchni wierzchołka i trzonu języka, przy czym obserwowano je także wzdłuż krawędzi wierzchołka języka oraz pomiędzy rzędami brodawek okolonych. Charakterystyczną cechą brodawek grzybowatych było zgięcie apikalnej części tych brodawek, w wyniku czego ich powierzchnia wierzchołkowa z kubkami smakowymi była skierowana ku tyłowi języka. Wyjątkiem były pionowo ułożone brodawki grzybowate, obserwowane w niedużym obszarze przy brodawkach okolonych. Brodawki nitkowate, otaczające brodawki grzybowate, charakteryzowały się posiadaniem licznych wyrostków rogowych, których liczba i rozmiar zmniejszały się w kierunku tylnym. Wyrostki rogowe brodawek nitkowatych zwiększają powierzchnię adhezyjną dla wody, krwi oraz drobnych cząstek pokarmowych, tym samym dzięki wyrównanej wysokości brodawek grzybowatych i nitkowatych, zgięcie brodawek smakowych ku tyłowi, może ułatwiać analizę pokarmu i płynów zarówno podczas szybkiego ich transportu po powierzchni języku, jak podczas adhezji do struktur powierzchniowych błony śluzowej języka.

Wcześniejsze badania innych zwierząt mięsożernych również wykazały liczne i równomiernie rozmieszczone brodawki grzybowate na grzbietowej powierzchni wierzchołka i trzonu języka (Iwasaki i Sakata 1985, Jackowiak i Godynicki 2004a, Emura i in. 2006, 2007, Jackowiak i in. 2009a, Emura i Sugiyama 2014, Haligur i in. 2019). Jedynie u lisa srebrzystego i fretki domowej brodawki grzybowate znajdowały się na korzeniu języka (Jackowiak i Godynicki 2004a, Takemura i in. 2009, El-Bakary i Emura 2016). U psowatych oraz fretki, jako przedstawiciela łasicowatych, zauważono liniowe rozmieszczenie brodawek grzybowatych wzdłuż krawędzi wierzchołka języka (Jackowiak i Godynicki 2004a, Emura i in. 2006, Jackowiak i in. 2009a, Takemura i in. 2009, Emura i Sugiyama 2014, Haligur i in. 2019).

Wśród badanych zwierząt mięsożernych u kotów domowych, z uwagi na obecność pośrodkowego pasma tzw. zębów rogowych na przedniej części trzonu języka, brodawki

grzybowate były równomiernie rozmieszczone jedynie na wierzchołku, bocznych i tylnych częściach trzonu języka. Na krawędziach wierzchołka języka kotów brodawki grzybowate były rozmieszczone gęściej niż u psów.

Średnia całkowita liczba brodawek grzybowatych na języku psa domowego wynosiła 226, z czego 60% znajdowało się w przedniej części języka. Średnia liczba brodawek na grzbietowej powierzchni wierzchołka oraz przedniej i tylnej części trzonu języka była zbliżona i wynosiła po 64. Jednocześnie 25% brodawek na tylnej części trzonu języka znajdowało się w obszarze pomiędzy brodawkami okolonymi. Porównanie liczby brodawek grzybowatych psów w liczbie 226 z 220 u kota domowego wskazuje znaczące podobieństwo. Analizując gęstości brodawek grzybowatych na poszczególnych częściach języka psa wskazano, że największe ich zagęszczenie występowało na wierzchołku języka, a na przedniej i tylnej części trzonu języka wartość ta zmalała o 36% i wynosiła 0,12 brodawki/mm².

Podobnie jak u wyżej badanych gatunków ssaków, średnica i wysokość brodawek grzybowatych psów generalnie rosła od wierzchołka języka w kierunku tylnej części trzonu. Na krawędzi języka brodawki były o 43% szersze i o 12% krótsze w porównaniu z brodawkami na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka. Na przedniej części języka przybliżona średnica i wysokość wynosiły odpowiednio 220,7 µm i 358,1 µm, co stanowiło o 35% więcej i 6% mniej w porównaniu z wierzchołkiem języka. Tyłne brodawki grzybowate były o 54% szersze i 38% wyższe niż brodawki w przedniej części języka. Podobne wyniki zanotowano u fretki, u której średnica brodawek grzybowatych zwiększała się w kierunku tylnym, natomiast u lisa srebrzystego i polarnego średnica brodawek zmniejszała się od krawędzi wierzchołka języka w kierunku trzonu (Jackowiak i Godynicki 2004a, Jackowiak i in. 2009a, Takemura i in. 2009). U psów rasy beagle średnica brodawek grzybowatych wynosiła 300–400 µm, jednak różnice między częściami języka nie zostały odnotowane (Iwasaki i Sakata 1985). Również u kotów, według Robinsona i Winklesa (1990) oraz naszych obserwacji, średnica brodawek grzybowatych wzrastała w kierunku tylnym. Zmienność średnicy brodawek grzybowatych na różnych obszarach języka psa została również potwierdzona u innych psowatych (Iwasaki i Sakata 1985, Jackowiak i Godynicki 2004a, Jackowiak i in. 2009a, Takemura i in. 2009).

Obserwacje przeprowadzone za pomocą mikroskopii świetlnej oraz analiza morfometryczna nabłonka wielowarstwowego na brodawkach grzybowatych psów wykazały, że nabłonek posiada warstwę rogową, z wyjątkiem brodawek grzybowatych

w tylnej części trzonu języka. Wysokość nabłonka wzrastała w kierunku tylnym, osiągając na trzonie języka wartość o około 26% większą niż na wierzchołku. Jednocześnie wysokość warstwy rogowej, wynosząca około 5,9 μm , była podobna na każdej części języka. W wcześniejszych obserwacjach u kotów stwierdzono obecność zrogowaciałego nabłonka wielowarstwowego o grubości 56 μm na wszystkich brodawkach grzybowatych, co wskazuje, że nabłonek u kotów był o około 11% grubszy w porównaniu do psów.

Metoda rekonstrukcji trójwymiarowej zastosowana do opisu mikrostruktury brodawek grzybowatych w poszczególnych częściach języka umożliwiła identyfikację kilku rodzajów kształtów trzonów łącznotkankowych. Najczęściej występującym kształtem trzonu brodawki był typ kolumnowy i maczugowaty, które występowały na brzegu wierzchołka języka, wierzchołku języka, tylnej części trzonu języka oraz w obszarze między brodawkami okolonymi. W przedniej części trzonu języka obserwowano trzony łącznotkankowe o palczastym kształcie, natomiast trzony balonowate charakteryzowały brodawki grzybowate umiejscowione między brodawkami okolonymi. Pomiary przekrojów histologicznych brodawek wskazały, że wraz ze wzrostem wysokości brodawek grzybowatych trzony łącznotkankowe zwiększały się w kierunku tylnym o około 40%. Trzony o kształcie kolumny okazały się najwyższe, niezależnie od lokalizacji brodawki grzybowatej na języku.

W wcześniejszych badaniach 3D brodawek grzybowatych kotów również wyróżniono cztery kształty trzonów łącznotkankowych. Podobnie jak u psów, zaobserwowano kształt kolumnowy i maczugowaty, ale kształt grzybowaty i pąkowaty były charakterystyczne wyłącznie dla kotów. Yoshimura i in. (2009a) opisali trzony łącznotkankowe o kształcie kolumny w brodawkach grzybowatych borsuków japońskich.

Struktura trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych psa domowego posiada postaci blaszek bocznych i wyrostków służące silnemu zakotwiczeniu nabłonka powierzchniowego psów. Trzony łącznotkankowe brodawek na krawędzi języka oraz na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka miały gładką powierzchnię z kolagenowymi wyrostkami lub płytkimi zagłębieniami, natomiast trzony brodawek w tylnej części trzonu języka i w brodawkach ułożonych pomiędzy brodawkami okolonymi, posiadały podłużne blaszki boczne oraz/lub głębsze zagłębienia. Wyjątkowo, brodawki grzybowate z balonowatym kształtem trzonu łącznotkankowego, występujące między brodawkami okolonymi, miały liczne boczne i grzbietowe wyrostki. W przeciwieństwie do psów, u kotów wszystkie typy trzonów łącznotkankowych miały

blaszki boczne lub kolagenowe wyrostki. U kuny japońskiej i szakali pręgowanych trzony łącznotkankowe cechowały się zagłębieniami na powierzchni grzbietowej brodawki lub gładkimi powierzchniami grzbietowymi i bocznymi (Emura i in. 2007, Emura i Sugiyama 2014).

Jednym z głównych wyzwań wcześniejszych badań mikrostruktury brodawek smakowych była analiza przestrzennego rozmieszczenia i dokładnego liczenia kubków smakowych na brodawkach grzybowatych, prowadzone na podstawie obserwacji pojedynczych przekrojów histologicznych lub obrazów z mikroskopii skaningowej. Pionierskie zastosowanie techniki rekonstrukcji 3D przez Plewę i Jackowiak (2022) na brodawkach grzybowatych przeżuwaczy pokazało wysoką skuteczność tej metody w precyzyjnym określaniu rozmieszczenia i liczby kubków smakowych.

Obserwując rozmieszczenie kubków smakowych na wygiętych brodawkach grzybowatych psów wykazano, że większość kubków smakowych była skupiona na boczno-pośrodkowej na powierzchni brodawek. Niemniej jednak zidentyfikowano także brodawki grzybowate z równomiernie rozmieszczonymi kubkami smakowymi. Sugeruje to, że pozycja kubków smakowych może być związana z wygięciem brodawek grzybowatych, co sprzyja bardziej efektywnej analizie smaku małych cząstek pokarmu i płynów, niejako zatrzymanych na wyrostkach brodawek mechanicznych.

Analiza porównawcza liczby kubków smakowych w pojedynczej brodawce grzybowatej psa domowego wykazała różnice w liczbie kubków smakowych w kolejnych częściach języka oraz wzrost liczby kubków smakowych i średnicy brodawek grzybowatych w kierunku tylnej części języka. Na brzegu wierzchołka języka obserwowano większą liczbę kubków smakowych równą 8, podczas gdy na powierzchni wierzchołka języka oraz przedniej części trzonu języka, liczba kubków w brodawkach malała do 4. Na tylnej części języka średnia liczba kubków smakowych ponownie zwiększyła się o 71%, osiągając wartość 14. Najwyższą liczbę kubków smakowych, wynoszącą 29, odnotowano na modelu 3D brodawki grzybowatej o największej średnicy, zlokalizowanej pomiędzy brodawkami okolonymi. Wspomniana liczba była o ok. 58%-79% wyższa w porównaniu z innymi brodawkami grzybowatymi. Wcześniejsze badania przeprowadzone na szczeniętach przez Hollidaya (1940) wskazywały, że maksymalna liczba kubków smakowych w jednej brodawce grzybowatej wynosiła 6. Z kolei badania prowadzone na kotach wykazały średnio 26 kubków smakowych w pojedynczej brodawce grzybowatej na tylnej części języka, co stanowiło około 38% więcej niż na jego krawędzi.

Analiza histomorfometryczna wykazała, że średnica kubków smakowych w przedniej części języka była o 17% mniejsza niż w tyle języka. W obszarze pomiędzy brodawkami okolonymi zaobserwowano zmniejszenie średnicy kubków smakowych o 38% przy jednoczesnym wzroście ich liczby w pojedynczej brodawce grzybowatej.

Dzięki możliwości ustalenia liczby kubków smakowych w pojedynczej brodawce oraz przy znajomości średniej liczby brodawek grzybowatych, podobnie jak u poprzednio analizowanych gatunkach, oszacowano całkowitą liczbę kubków smakowych w brodawkach grzybowatych języka psa. Odpowiednio ta liczba na grzbietowej powierzchni wierzchołka języka, przedniej oraz tylnej części trzonu języka wynosiła 324, 195 i 1008, a całkowita liczba kubków smakowych w brodawkach grzybowatych na całym języku psa wyniosła 1527. Najmniejszą liczbę kubków smakowych, wynoszącą 195, obserwowano w przedniej części trzonu języka, co stanowiło odpowiednio 39% i 80% mniej niż na wierzchołku języka oraz tylnej części trzonu języka. Uzyskane wyniki są w zasadzie zbliżone do obserwacji prowadzonych wg odmiennej metody przez Holliday (1940), który opisał 1444 kubków smakowych w brodawkach grzybowatych psów.

Wykazanie dużej liczby kubków smakowych na wierzchołku języka, funkcjonalnie wiąże się z wstępnym kontaktem i preselekcją pokarmu, a w przypadku psów także z odczuwaniem smaku wody (Chibuzo, 1979). Z kolei największa liczba kubków smakowych w brodawkach na tylnej części trzonu języka może świadczyć o ich zaangażowaniu w intensywną analizę i odczuwanie smaku pokarmu podczas jego miażdżenia przez przedtrzonowce i trzonowce oraz podczas połykania. Warto zauważyć, że brodawki grzybowate na przedniej części trzonu języka są unerwione przez strunę bębenkową, natomiast tylna część języka z rozmieszczonymi brodawkami grzybowatymi jest unerwiana przez nerw językowo-gardłowy (Andersson i in. 1950, Chibuzo 1979).

Większość badań dotyczących zwierząt mięsożernych, w tym obecne obserwacje psów domowych, wskazuje, że brodawki okolone występują w parach, symetrycznie rozmieszczonych w układzie przypominającym literę „V” (Chibuzo 1979, Nickel i in. 1973, Ellenport 1975, Jackowiak i Godynicki 2004a, Emura i in. 2007, El-Bakary i Emura 2016, Haligur i in. 2019). Niektóre badania wskazują na obecność 2–3 par brodawek okolonych u lisa polarnego i beagle’a, lub 7 brodawek u borsuka japońskiego (Iwasaki i Sakata 1985, Jackowiak i in. 2009a, Yoshimura i in. 2009a). Badania przeprowadzone na fretkach przez Takemurę i in. (2009) wykazały obecność nawet 8 brodawek okolonych rozmieszczonych w 4 parach lub 12 brodawek ułożonych w trzech poziomach w kształcie

literę „V”, po 4 brodawki w każdej strony. W badaniach dotyczących psów domowych najczęściej stwierdzano obecność dwóch par brodawek okolonych, choć odnotowano również nieparzystą liczbę, taką jak 3 lub 7 brodawek. Nasze obserwacje wykazały, że średnica przedniej pary brodawek okolonych była większa od tylnych. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na srebrnych lisach i fretkach (Jackowiak i Godynicki 2004a, Takemura i in. 2009). Natomiast u lisa polarnego zaobserwowano odwrotną zależność, tj. wielkość brodawek okolonych zwiększała się doogonowo (Jackowiak i in. 2009a). Generalnie brodawki okolone są otoczone ciągłym wałem utworzonym przez pojedyncze lub zrosnięte brodawki stożkowate (Chibuzo 1979, Jackowiak i Godynicki 2004a, Emura i in. 2006, Jackowiak i in. 2009a). U lisa polarnego brodawki okolone w trzeciej parze otaczały dwa pierścienie połączonych brodawek stożkowatych (Jackowiak i in. 2009a). W obecnych badaniach wał brodawki stanowi całkowicie lub częściowo zrosnięte brodawki stożkowate otaczające trzon brodawek okolonych, jednak na tylnej części takiego wału brodawkowego występowały oddzielne brodawki stożkowate. Nieciągłe wały z brodawkami stożkowatymi na przedniej i tylnej części brodawek okolonych odnotowano u kotów, natomiast u fretek wał był całkowicie podzielony (Takemura i in. 2009).

Nabłonek wielowarstwowy płaski pokrywający brodawki okolone psa był pozbawiony warstwy rogowej. Charakterystyczną cechą trzonów łącznotkankowych brodawek okolonych była obecność okrągłych i podłużnych zagłębień na grzbietowej powierzchni trzonu brodawki oraz zagłębień o różnej wielkości i okrągłym kształcie na grzbietowej powierzchni wału brodawki. U innych zwierząt mięsożernych, tj. borsuków japońskich i kotów, trzon łącznotkankowy brodawek okolonych był pokryty drobnymi wyrostkami (Yoshimura i in. 2009a). U szakala czaprakowego, trzony łącznotkankowe brodawek okolonych, oprócz małych wyrostków, zawierały liczne bruzdy (Emura i Sugiyama 2014). Powierzchnia grzbietowa trzonu łącznotkankowego w brodawce okolonej kuny japońskiej miała struktury o zygzakowatym kształcie (Emura i in. 2007). El-Sharaby i in. (2014) obserwując przekroje histologiczne wykazali, że kubki smakowe w brodawkach okolonych psów znajdują się na powierzchni grzbietowej oraz bocznej trzonu brodawki, a także w nabłonku bocznej powierzchni wału brodawki. Dzięki zastosowanej metodzie modelowania 3D po raz pierwszy określono precyzyjną lokalizację kubków smakowych w brodawkach okolonych, a także ich liczbę na każdej powierzchni brodawki. Wyniki wykazały, że w mniejszych brodawkach okolonych liczba kubków smakowych była niższa i wynosiła 332, podczas gdy w większych brodawkach

liczba ta była wyższa o 74%, osiągając 1285. W obu zrekonstruowanych brodawkach kubki smakowe obserwowano także na powierzchni grzbietowej trzonu brodawki, gdzie w mniejszych brodawkach okolonych stanowiły one 15% wszystkich kubków smakowych, a w większych mniej niż 1%. Również w oby dwóch modelach 3D brodawek okolonych obserwowano od 7 do 10 kubków smakowych na powierzchniach bocznych wału brodawki. Podobnie jak u kota domowego, można przyjąć, że rozmieszczenie i liczba kubków smakowych na pojedynczej brodawce okolonej zależą od jej wielkości. Średnice kubków smakowych były zbliżone w brodawkach okolonych zlokalizowanych zarówno z przodu, jak i z tyłu języka.

Uwzględniając występowanie 4 brodawek okolonych psa, oszacowano, że łączna liczba kubków smakowych w tych brodawkach wynosi 3232, co stanowi około 92% więcej niż liczba podana przez Hollidaya (1940) w badaniach na szczeniętach.

Jak wspomniano wcześniej, w danych literaturowych wskazuje się, że brodawki liściaste nie występują u wszystkich gatunków zwierząt mięsożernych. Podstawowe dane anatomiczne dotyczące języka psów opisują, że brodawki liściaste są niewielkich rozmiarów (Nickel i in. 1973, Ellenport 1975). Dotychczas obecność brodawek liściastych w rodzinie psowatych odnotowano u srebrnych i polarnych lisów, wilków oraz szopów pracy, natomiast w rodzinie łasicowatych jedynie u kuny japońskiej (Jackowiak i Godynicki 2004a, Emura i in. 2006, 2007, Jackowiak i in. 2009a, Haligur i in. 2019). W przypadku psa, jedynie niektórzy autorzy wspominali o występowaniu brodawek liściastych (Holliday 1940, Chibuzo 1979, Iwasaki i Sakata 1985). W rodzinie kotowatych brodawek liściastych nie stwierdzono (Crouch 1969, Kobayashi i in. 1988, Dyce i in. 2010, Emura i in. 2004, Toprak i Ulusoy 2011, Emura i in. 2014, Emura 2018a, Emura 2018b, Freire i in. 2019).

Liczba liści, czyli fałdów błony śluzowej brodawek liściastych była zróżnicowana i wśród gatunków psowatych badacze opisywali od 4-5 u srebrnego lisa i wilka, przez 7-9 u lisa polarnego, do 8-13 u psa (Chibuzo 1979, Jackowiak i Godynicki 2004a, Jackowiak i in. 2009a, Haligur i in. 2019). Nasze wyniki wskazały na obecność 7-8 fałdów w pojedynczej brodawce liściastej psa domowego. Wspólną cechą brodawek liściastych u dzikich gatunków psowatych, potwierdzoną w obecnych badaniach psów, było zrośnięcie fałdów z podstawą brodawek stożkowatych (Jackowiak i Godynicki 2004a, Emura i in. 2006). Badania te opisywały typowe, symetryczne, równoległe ułożenie fałdów w brodawkach liściastych, podczas gdy nasze obserwacje psów domowych wskazały na nieregularną

strukturę fałdów, które mogą nawet przyjmować kształt litery S (Chibuzo 1979, Haligur i in. 2019).

Analiza przestrzenna trójwymiarowych modeli brodawek liściastych i ich trzonów łącznotkankowych wykazała obecność szerszych i węższych fałdów błony śluzowej brodawek. Niektóre z szerszych liści brodawki rozdzielały się w środkowej części na dwa lub trzy węższe, i następnie ponownie się łączyły. Na grzbietowej powierzchni modeli 3D niektórych fałdów brodawki zaobserwowano podłużne, czasem głębokie zagłębienia z towarzyszącymi krótkimi wyrostkami kolagenowymi, które zapewniają silniejsze zakotwiczenie nabłonka wielowarstwowego płaskiego nierogowaciejącego na brodawkach. Jedynymi dostępnymi danymi na temat mikrostruktury trzonów łącznotkankowych brodawek liściastych u zwierząt mięsożernych są wyniki badań kun japońskich, gdzie Emura i in. (2007) opisali zygzakowate struktury na powierzchni trzonów łącznotkankowych liści brodawki liściastej. Uzyskane wyniki sugerują, że wcześniej opisywany brak brodawek liściastych u psów, a być może także u innych psowatych, mógł wynikać z ich nieregularnej struktury, nietypowego rozmieszczenia kubków smakowych oraz niewielkich rozmiarów brodawek z płytkimi bruzdami.

Z uwagi na brak szczegółowych informacji na temat lokalizacji oraz liczby kubków smakowych także u psa przeprowadzono analizę przestrzenną na trójwymiarowych modelach tych brodawek. Wyniki pokazały znaczne zróżnicowanie rozmieszczenia kubków smakowych pomiędzy fałdami błony śluzowej brodawki. Kubki smakowe nie zawsze były obecne wzdłuż całej długości fałdów, czasami zajmowały jedynie 1/3 ich długości lub ograniczały się do powierzchni grzbietowej, co można uznać za cechy gatunkowo-specyficzne dla psa.

Oznaczenie liczby kubków smakowych w brodawkach liściastych psa domowego na dwóch modelach 3D wykazało, że liczba kubków smakowych wahała się od 1074 do 1814. Ponadto wykazano, że wymiary liści błony śluzowej w pojedynczej brodawce mogą znacząco wpływać także na rozmieszczenie kubków smakowych. W szerszych i niższych fałdach, charakterystycznych dla pierwszego modelu 3D, aż 88% kubków smakowych znajdowało się na powierzchni grzbietowej liści, natomiast w drugim modelu, gdzie fałdy były wyższe i węższe, 68% kubków smakowych była zlokalizowana na powierzchniach bocznych.

Na podstawie zebranych danych ilościowych dotyczących liczby kubków smakowych na wszystkich typach brodawek smakowych psa oszacowano, że średnia liczba kubków smakowych wynosi od 7418 do 8027. Wcześniejsze badania Holliday

(1940) wykazały, że język szczeniąt zawiera około 1706 kubków smakowych, z czego 1444 występuje w brodawkach grzybowatych, a 262 w brodawkach okolonych. Autor ten nie uwzględnił jednak obecności brodawek liściastych. Z kolei można wspomnieć, że na brodawkach smakowych kotów domowych oszacowano występowanie zbliżonej liczby jak u psa, bo 8265 kubków smakowych, przy czym należy pamiętać, że koty nie posiadają na języku brodawek liściastych.

Z analizy ilościowej kubków smakowych wynika, że aż 93% całkowitej liczby kubków smakowych psów znajduje się na tylnej części języka, gdy u kotów było to ok. 58% kubków smakowych. Z kolei badania 3D brodawek smakowych zajęczaków wykazały liczbę kubków smakowych na trzech rodzajach brodawek smakowych w tylnej części języka dochodzącą od 95% do 97% całkowitej liczby kubków smakowych na całym języku. Przedstawione wyniki wskazują, że tylna część języka funkcjonalnie, także u poprzednio badanych ssaków stanowi kluczowe miejsce dla precyzyjnej analizy wstępnie przetworzonego i zmieszanego ze śliną pokarmu, uformowanego w kęs gotowy do połknięcia. Badania Anderssona i współpracowników (1950) wykazały, że obszar języka unerwiony przez nerw językowo-gardłowy jest niewrażliwy na słodki i słony smak. Na tej podstawie można przypuszczać, że brodawki smakowe tylnej części języka są bardziej czułe na gorzki smak, co mogłoby wskazywać na ich istotną rolę kontrolną i ochronną podczas ostatecznego połykania pokarmu. W tej kwestii niezbędne są jednak dalsze badania molekularne kubków smakowych i ich receptorów.

6. Wnioski

1. Przedstawione wyniki badań jakościowych i ilościowych rozmieszczenia i budowy mikroskopowej brodawek smakowych wybranych gatunków przeżuwaczy, zajęczaków i zwierząt mięsożernych wskazały wobec postawionej hipotezy szerokie zróżnicowanie mikrostruktury brodawek smakowych oraz rozmieszczenia i liczby ich kubków smakowych w badanych grupach pokarmowych ssaków.
2. Charakterystyka rozmieszczenia brodawek grzybowatych, okolonych i liściastych na powierzchni języka wykazuje zasadnicze różnice między grupą zwierząt roślinożernych i mięsożernych, przy specyfice gatunkowej ujawnionej podczas analiz prób pochodzących z poszczególnych części języka.
3. W badaniach mikrostruktury brodawek smakowych, obok rutynowych badań w mikroskopie świetlnym i skaningowym mikroskopie elektronowym, po raz pierwszy zastosowano metodę komputerowego tworzenia unikalnych trójwymiarowych modeli brodawek grzybowatych, okolonych i liściastych, wykazując znaczące zróżnicowanie specyfiki budowy trzonów łącznotkankowych oraz zmienność rozmieszczenia i liczebności kubków smakowych.
4. Analiza 3D mikrostruktury trzonów łącznotkankowych, stanowiących w brodawkach smakowych platformę dla kotwiczenia nabłonka z kubkami smakowymi, wykazała w brodawkach grzybowatych występowanie siedmiu typów budowy trzonów łącznotkankowych brodawek grzybowatych, występujących w zmiennej konfiguracji w poszczególnych częściach języka. Trzony łącznotkankowe brodawek okolonych wykazały zróżnicowaną postać przypominającą kwiat lub masywne grzybowate struktury, natomiast w brodawkach liściastych obserwowano płaskie, pojedyncze lub potrójne blaszki łącznotkankowe o zmiennym przebiegu.
5. Obserwacje modeli przestrzennych badanych brodawek smakowych umożliwiły unikalną wizualizację sposobów rozmieszczenia kubków smakowych, począwszy od ich równomiernego rozproszenia, poprzez konfigurację w pasma, rzędy lub grupy. Możliwość obliczenia liczby kubków smakowych w pojedynczych modelach brodawek w poszczególnych częściach języka pokazała zróżnicowanie zakresu liczebności kubków w badanych grupach pokarmowych.

6. Średnia liczba kubków smakowych w pojedynczych brodawkach grzybowatych wynosi odpowiednio u przeżuwaczy od 13 do 64 u bydła, od 4 do 8 u żubra europejskiego, a u żubronia od 1 do 3. Wśród zajęczaków liczby kubków były mniejsze i wynosiły od 1 do 7 u królika europejskiego, od 2 do 5 u królika domowego, i u zająca szaraka 2-11. U badanych zwierząt mięsożernych od 18 do 32 kubków smakowych obserwowano u kota domowego i od 13 do 18 u psa domowego. Średnia liczba kubków smakowych w pojedynczej brodawce okolonej królika europejskiego, królika domowego, zająca szaraka, kota domowego i psa domowego wynosiła odpowiednio 170, 170, 451, 427 i 808. W brodawkach liściastych na powierzchni jednego liścia liczba kubków smakowych wynosi 325 u królika europejskiego, 412 u królika domowego, 436 u zająca szaraka i 181 u psa domowego.
7. Próby oszacowania całkowitej liczby kubków smakowych na brodawkach języka poszczególnych grup pokarmowych badanych ssaków wskazują, że wyniki uzyskane na modelach 3D kilkakrotnie przewyższają wartości opisywane wcześniej u badanych gatunków. Stąd, całkowita liczba kubków smakowych wynosi 9877 u królika europejskiego, 13 114 u królika domowego i 17 509 u zająca szaraka. U gatunków mięsożernych, tj. kota i psa liczba ta wynosi odpowiednio 8265 i 7647. U przeżuwaczy analizowano jedynie liczbę kubków smakowych brodawek grzybowatych i ich liczba wynosi 6812 u bydła, 2608 u żubra europejskiego oraz 6643 u żubronia.
8. Porównanie liczby brodawek smakowych i ich kubków smakowych gatunków dziko żyjących wobec udomowionych przeżuwaczy i zajęczaków szacunkowo wskazuje na występowanie znaczących różnic. U bydła występuje około 62% więcej kubków smakowych w brodawkach grzybowatych, niż u żubra europejskiego, natomiast liczba kubków smakowych zająca szaraka, jest największa, a królik domowy posiada około 25% więcej kubków smakowych niż jego dziko żyjący przodek. Takie wyniki mogą być w przyszłych badaniach podstawą rozważań w odniesieniu do wpływu różnorodności diety zwierząt i być może warunków środowiskowych na liczbę kubków smakowych.

9. Charakterystyka rozmieszczenia, jak i cech jakościowych i ilościowych mikrostruktury analizowanych brodawek smakowych przeżuwaczy, zajęczaków czy zwierząt mięsożernych pozwala na wyróżnienie dwóch obszarów o zwiększonej percepcji smaku. Pierwszy z nich występuje na wierzchołku języka z gatunkowo specyficzną konfiguracją brodawek grzybowatych o największej liczbie kubków smakowych u badanych gatunków, co funkcjonalnie jest związane z preselekcją przyjmowanego pokarmu. Drugi obszar już związany z analizą chemiczną rozdrobnionego pokarmu jest położony w tylnej lub/i tylnobocznej części trzonu języka obejmując skupienia brodawek grzybowatych, brodawki okolone i u wybranych gatunków brodawki liściaste.
10. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowana metoda trójwymiarowej rekonstrukcji z seryjnych skrawków histologicznych jest efektywnym i nowoczesnym narzędziem do przygotowania oceny mikrostrukturalnej smakowych brodawek językowych ssaków oraz oceny liczebności kubków smakowych, która będzie przydatna w dalszych badaniach narządu smaku ssaków w warunkach normy i patologii badanych zwierząt.

7. Literatura

- Abumandour, M. M. A., & El-Bakary, R. M. A. (2017). Anatomic reference for morphological and scanning electron microscopic studies of the New Zealand white rabbits tongue (*Oryctolagus cuniculus*) and their lingual adaptation for feeding habits. *Journal of Morphological Sciences*, 30(4), 0-0.
- Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, 100(6), 693-702.
- AL-Mahmodi, A. M. M. (2016). Anatomical and Histological study of the Tongue of wild adult male Rabbits (*Oryctolagus cuniculus* f. domestica) in AL-Najaf province. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, 7(2), 79-94.
- Andersson, B., Landgren, S., Olsson, L., & Zotterman, Y. (1950). The sweet taste fibres of the dog. *Acta Physiologica Scandinavica*, 21(2-3), 105-119.
- Atoji, Y., Yamamoto, Y., & Suzuki, Y. (1998). Morphology of the tongue of a male formosan serow (*Capricornis crispus swinhoei*). *Anatomia, histologia, embryologia*, 27(1), 17-19.
- Barlow, L. A. (2015). Progress and renewal in gustation: new insights into taste bud development. *Development*, 142(21), 3620-3629.
- Bell, A. C., & Watson, S. (1993). Preferential grazing of five varieties of spring barley by wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Annals of applied biology*, 122(3), 637-641.
- Bergvall, U. (2007). *Food choice in fallow deer—experimental studies of selectivity* (Doctoral dissertation, Zoologiska institutionen).
- Besoluk, K., Eken, E., & Sur, E. (2006). Morphological studies on lyssa in cats and dogs. *VETERINARNI MEDICINA-PRAHA*-, 51(10), 485.
- Bosch, G., Hagen-Plantinga, E. A., & Hendriks, W. H. (2015). Dietary nutrient profiles of wild wolves: insights for optimal dog nutrition?. *British Journal of Nutrition*, 113(S1), S40-S54.
- Bradshaw, J. W. (2006). The evolutionary basis for the feeding behavior of domestic dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus*). *The Journal of nutrition*, 136(7), 1927S-1931S.
- Brown, S. (2024). Diet and nutrition for pet rabbits. Veterinary Partner, Veterinary Information Network®. Diet and Nutrition for Pet Rabbits - *Veterinary Partner - VIN*. Accessed 16 Dec. 2024.

- Chamorro, C. A., Fernandez, J. G., Paz, P. D., Pelaez, B., & Anel, L. (1994). Scanning electron microscopy of the wild boar and pig lingual papillae. *Histology and histopathology*.
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444(7117), 288-294.
- Chapuis, J. L. (1990). Comparison of the diets of two sympatric lagomorphs, *Lepus europaeus* (Pallas) and *Oryctolagus cuniculus* (L.) in an agroecosystem of the Ile-de-France. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 55(3), 176-185.
- Cheng, L. H. H., & Robinson, P. P. (1991). The distribution of fungiform papillae and taste buds on the human tongue. *Archives of oral biology*, 36(8), 583-589.
- Chibuzo, G.A. (1979). The tongue. In: Evans, H.E., Christensen, G.C. (Eds.), *Miller's anatomy of the dog*, 2nd Edn. *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, London, Toronto, s. 423-436.
- Ciená, A. P., Bolina, C. D. S., de Almeida, S. R. Y., Rici, R. E. G., de Oliveira, M. F., Silva, M. C. P. D., Miglino, M. A., & Watanabe, I. S. (2013). Structural and ultrastructural features of the agouti tongue (*Dasyprocta aguti* Linnaeus, 1766). *Journal of Anatomy*, 223(2), 152-158.
- Ciená, A. P., Santos, A. C. D., Vasconcelos, B. G., Rici, R. E. G., de Assis Neto, A. C., de Almeida, S. R. Y., ... & Watanabe, I. S. (2019). Morphological characteristics of the papillae and lingual epithelium of guinea pig (*Cavia porcellus*). *Acta Zoologica*, 100(1), 53-60.
- Cortinovis, C., & Caloni, F. (2016). Household food items toxic to dogs and cats. *Frontiers in veterinary science*, 3, 191521.
- Crouch, J. E. (1969). Text-Atlas of cat anatomy, *Lea & Febiger*, Philadelphia, s. 131-138.
- Dasgupta, K., Singh, A., & Ireland, W. P. (1990). Taste bud density in circumvallate and fungiform papillae of the bovine tongue. *Histology and histopathology*, 5(2), 169-172.
- Davies, R. O., Kare, M. R., & Cagan, R. H. (1979). Distribution of taste buds on fungiform and circumvallate papillae of bovine tongue. *The Anatomical Record*, 195(3), 443-446.
- Davydova, L., Tkach, G., Tymoshenko, A., Moskalenko, A., Sikora, V., Kyptenko, L., Lyndin, M., Muravskiy, D., Maksymova, O. & Suchonos, O. (2017). Anatomical and morphological aspects of papillae, epithelium, muscles, and glands of rats'

- tongue: Light, scanning, and transmission electron microscopic study. *Interventional Medicine and Applied Science*, 9(3), 168-177.
- Ding, Y., Yu, S., & Shao, B. (2016). Anatomical and histological characteristic of the tongue and tongue mucosa linguae in the cattle-yak (Bos taurus× Bos grunniens). *Frontiers in biology*, 11, 141-148.
- Dransfield, E. (2008). The taste of fat. *Meat Science*, 80(1), 37-42.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., Wensing, C. J. G. (2010). Textbook of Veterinary Anatomy, 4th Edn. *Saunders Elsevier*, St. Louis, Missouri, s. 399-405, 675-676.
- Eizirik, E., & Murphy, W. J. (2009). Carnivores (Carnivora). *The Timetree of Life. Oxford: Oxford University Press*, 504-507.
- El Bakary, N. E., & Emura, S. (2016). Morfología de las Papilas Linguales en la Comadreja Común (Mustela nivalis). *International Journal of Morphology*, 34(1), 305-309.
- El-Bakary, N. E. R., & Abumandour, M. M. A. (2017). Morphological studies of the tongue of the Egyptian water buffalo (Bubalus bubalis) and their lingual papillae adaptation for its feeding habits. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 46(5), 474-486.
- Ellenport, C. R. (1975). Carnivore digestive system. In: Getty, R. (Ed.), Sisson and Grossman's The Anatomy of the Domestic Animals, 5th Edn. W.B. *Saunders Company*. Philadelphia, London, Toronto, s. 1538-1544.
- El Sharaby, A. A., El-Gendy, S. A., Alsafy, M. A., Nomir, A. G., & Wakisaka, S. (2014). Morphological variations of the vallate papillae in some mammalian species. *Anatomical science international*, 89, 161-170.
- Emura, S., Hayakawa, D., Chen, H., & Shoumura, S. (2004). Morphology of the lingual papillae in the tiger. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 81(2.3), 39-44.
- Emura, S., Okumura, T., Chen, H., & Shoumura, S. (2006). Morphology of the lingual papillae in the raccoon dog and fox. *Okajimas folia anatomica Japonica*, 83(3), 73-76.
- Emura, S., Okumura, T., & Chen, H. (2007). Morphology of the lingual papillae in the Japanese marten. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 84(2), 77-82.
- Emura, S., Okumura, T., & Chen, H. (2012). Morphology of the lingual papillae in the Egyptian rousette bat (Rousettus aegyptiacus). *Okajimas folia anatomica Japonica*, 89(3), 61-66.

- Emura, S., & El Bakary, N. E. (2014a). Morphology of the lingual papillae of Egyptian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 91(1), 13-17.
- Emura, S., Okumura, T., & Chen, H. (2014b). Morphology of the lingual papillae in the fishing cat. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 90(4), 79-83.
- Emura, S., & Sugiyama, K. (2014). Morphology of the lingual papillae of the black-backed jackal (*Canis mesomelas*). *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 91(1), 19-24.
- Emura, S. (2018a). Morphology of the lingual papillae in the Asian golden cat. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 95(1), 19-22.
- Emura, S. (2018b). Morphology of the lingual papillae in the leopard. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 95(2), 29-32.
- Erdoğan, S., & Pérez, W. (2013). Anatomical and scanning electron microscopic characteristics of the tongue in the pampas deer (*Cervidae: Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758). *Microscopy research and technique*, 76(10), 1025-1034.
- Erdoğan, S., & Pérez, W. (2014). Anatomical and scanning electron microscopic studies of the tongue and lingual papillae in the chital deer (*Axis axis*, Erxleben 1777). *Acta Zoologica*, 95(4), 484-492.
- Erdoğan, S., Villar Arias, S., & Pérez, W. (2016). Morphofunctional structure of the lingual papillae in three species of South American Camelids: alpaca, guanaco, and llama. *Microscopy research and technique*, 79(2), 61-71.
- Farbman, A. I., Hellekant, G., & Nelson, A. (1985). Structure of taste buds in foliate papillae of the rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *American journal of anatomy*, 172(1), 41-56.
- Ferreira, A. M., Marques, A. T., Fontanesi, L., Thulin, C. G., Sales-Baptista, E., Araújo, S. S., & Almeida, A. M. (2016). Identification of a Bitter-Taste Receptor Gene Repertoire in Different Lagomorphs Species. *Frontiers in Genetics*, 7, 55.
- Feuer, D. (2006). Your dog's nutritional needs. A science-based guide for pet owners. *National Research Council of the National Academies*
- Freire, E. C. B., Moreira, L. G. D. S., Giese, E. G., Branco, É., da Silva, L. M., & de Lima, A. R. (2019). Papillary architecture of the *Leopardus pardalis* tongue. *Anatomia, histologia, embryologia*, 48(5), 421-428.
- Gebczynska, Z., Gebczynski, M., & Martynowicz, E. (1991). Food eaten by the free-living European bison in Białowieża Forest. *Acta Theriologica*, 36(3-4).

- Ginane, C., Baumont, R., & Favreau-Peigné, A. (2011). Perception and hedonic value of basic tastes in domestic ruminants. *Physiology & behavior*, 104(5), 666-674.
- Goździewska-Harłajczuk, K., Barszcz, K., Klećkowska-Nawrot, J., Hamouzová, P., Čížek, P., Kuropka, P., & Kvapil, P. (2023). Comparative Study of Lingual Papillae, Lingual Glands and Lyssa of the Tongue of Selected Wild Felids (Carnivora, Felidae) in Biological Aspects. *Biology*, 12(4), 516.
- Guimarães, G. C., Machado, M. R. F., Santos, A. L. Q., & Miglino, M. A. (2007). Anatomic study and distribution of the vallate papillae in domestic cats. *Braz. j. vet. res. anim. sci*, 81-87.
- Haddad, S., Noreldin, A. E., Kamal, B., Abdeen, A., Farouk, S. M., Abbott, L. C., & Abdo, M. (2019). Morphological and functional comparison of lingual papillae in suckling and adult feral cats: Forensic evidence. *Anatomia, histologia, embryologia*, 48(5), 404-414.
- Haligur, A., Ozkadif, S., & Alan, A. (2019). Light and scanning electron microscopic study of lingual papillae in the wolf (*Canis lupus*). *Microscopy Research and Technique*, 82(5), 501-506.
- Harem, M. K., Harem, I. S., Sari, E. K., & Aydin, M. F. (2011). Light and scanning electron microscopic study of the dorsal lingual papillae of the Goitered gazelle (*Gazelle subgutturosa*).
- Holliday, J. C. (1940). Total distribution of taste buds on the tongue of the pup. *Ohio J Sci*, 40, 337-344.
- Horwitz, D., Soulard, Y., & Junien-Castagna, A. (2008). The feeding behaviour of the cat. *Encyclopedia of Feline Clinical Nutrition*, 439-473.
- Haupt, K. A., Hintz, H. F., & Shepherd, P. (1978). The role of olfaction in canine food preferences. *Chemical senses*, 3(3), 281-290.
- Ibrahim, M. K., Hussein, A. A., & Mutlak, B. H. (2024). Morphological Features of Tongue in Domestic Cat *Felis Catus*. *Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Sciences*, 37(1), 33-42.
- Inatomi, M., & Kobayashi, K. (1999). Comparative morphological studies on the tongue and lingual papillae of the Japanese black bear (Carnivora) and the mountain goat (Artiodactyla). *ODONTOLOGY-TOKYO-*, 87(3), 313-328.
- Iwasaki, S. I., & Sakata, K. (1985). Scanning electron microscopy of the lingual dorsal surface of the beagle dog. *Okajimas folia anatomica japonica*, 62(1), 1-13.

- Jabbar, A. I. (2014). Macroscopical and microscopical observations of the tongue in the Iraqi goat (*Capra hircus*). *International Journal of Advanced Research*, 2(6), 642-648.
- Jackowiak, H., & Godynicki, S. (2004a). The scanning electron microscopic study of lingual papillae in the silver fox (*Vulpes vulpes fulva*, Desmarest, 1820). *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 186(2), 179-183.
- Jackowiak, H., Godynicki, S., Jaroszevska, M., & Wilczyńska, B. (2004b). scanning electron microscopy of lingual papillae in the common shrew, *Sorex araneus*, L. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 33(5), 290-293.
- Jackowiak, H., & Godynicki, S. (2005). The distribution and structure of the lingual papillae on the tongue of the bank vole *Clethrionomys glareolus*. *Folia Morphologica*, 64(4), 326-333.
- Jackowiak, H. (2006). Scanning electron microscopy study of the lingual papillae in the European mole (*Talpa europea*, L., Talpidae). *Anatomia, histologia, embryologia*, 35(3), 190-195.
- Jackowiak, H., Godynicki, S., Skiersz-Szewczyk, K., & Trzcielińska-Lorych, J. (2009a). Scanning electron microscopic study of the lingual papillae in the arctic fox (*Alopex lagopus* L., 1758). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38(5), 377-381.
- Jackowiak, H., Trzcielinska-Lorych, J., & Godynicki, S. (2009b). The microstructure of lingual papillae in the Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*) as observed by light microscopy and scanning electron microscopy. *Archives of histology and cytology*, 72(1), 13-21.
- Jackowiak, H., Jerbi, H., Skiersz-Szewczyk, K., & Prozorowska, E. (2017a). LM and SEM studies on tongue and lingual papillae in the donkey (*Equus asinus*). *Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches to Applied Research and Education*, 216-222.
- Jackowiak, H., Skubis, J., Łakomy, P., Nasiadka, P., & Godynicki, S. (2017b). Anatomy of the tongue and microstructure of the lingual papillae in the fallow deer *Dama dama* (Linnaeus, 1758). *Mammalian Biology*, 85, 14-23.
- Kitajima, K., & Kobayashi, K. (1992). Light and electron microscopic studies on the lingual papillae and their connective tissue cores in hamster. *Japanese Journal of Oral Biology*, 34(5), 503-530.

- Kobayashi, S., Shimoda, T., & Shimamura, A. (1983). Scanning electron microscopic study on the lingual papillae of the Chinese hamster, *Cricetulus griseus*. *Japanese Journal of Oral Biology*, 25(3), 649-655.
- Kobayashi, K., Miyata, K., Iwasaki, S. I., & Takahashi, K. (1988). Three dimensional structure of the connective tissue papillae of cat lingual papillae. *Japanese Journal of Oral Biology*, 30(6), 719-731.
- Kobayashi, K. (1990). Three-dimensional architecture of the connective tissue core of the lingual papillae in the guinea pig. *Anatomy and embryology*, 182, 205-213.
- Kobayashi, K. (1997). Stereo structural differences of lingual papillae and their connective tissue cores in three kinds of artiodactyla. *Recent advances in microscopy of cells, tissues and organs*, 357-361.
- Kobayashi, K., Kumakura, M., Yoshimura, K., Nonaka, K., Murayama, T., & Henneberg, M. (2003). Comparative morphological study of the lingual papillae and their connective tissue cores of the koala. *Anatomy and embryology*, 206, 247-254.
- Kobayashi, K., Kumakura, M., Yoshimura, K., Takahashi, M., Zeng, J. H., Kageyama, I., ... & Hama, N. (2004). Comparative morphological studies on the stereo structure of the lingual papillae of selected primates using scanning electron microscopy. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 186(5-6), 525-530.
- Kobayashi, K., Jackowiak, H., Frackowiak, H., Yoshimura, K., & Kumakura, M. (2005). Comparative morphological study on the tongue and lingual papillae of horses (Perissodactyla) and selected ruminantia (Artiodactyla). *Italian journal of anatomy and embryology= Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 110(2 Suppl 1), 55-63.
- Kraśńska, M. (1988). Hybrydy żubra i bydła domowego. *Prace Habilitacyjne-Polska Akademia Nauk. Zakład Badania Ssaków*.
- Kulawik, M., & Godynicki, S. (2006). Foliate papillae on the tongue in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus* F. domestica).
- Kulawik, M., & Godynicki, S. (2007). Fungiform papillae of the tongue in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Polish journal of veterinary sciences*, 10(1), 25.
- Kulawik, M., & Godynicki, S. (2008). Development dynamics of vallate papillae in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus* f. domestica).
- Kumar, S., & Bate, L. A. (2004). Scanning electron microscopy of the tongue papillae in the pig (*Sus scrofa*). *Microscopy research and technique*, 63(5), 253-258.

- Kurihara, K. (2020). Canine taste responses to elements of food deliciousness closely resemble those of human responses, while rodent responses are very different from canine responses. *SMJ Nutr Metab* 6, 9.
- Kurtul, I., & Atalgın, S. H. (2008). Scanning electron microscopic study on the structure of the lingual papillae of the Saanen goat. *Small Ruminant Research*, 80(1-3), 52-56.
- Laffitte, A., Gibbs, M., Hernangomez de Alvaro, C., Addison, J., Lonsdale, Z. N., Giribaldi, M. G., Rossignoli, A., Vennegeerts, T., Winnig, M., Klebansky, B., Skiles, J., Logan, D. W., & McGrane, S. J. (2021). Kokumi taste perception is functional in a model carnivore, the domestic cat (*Felis catus*). *Scientific Reports*, 11(1), 10527.
- Li, X., Li, W., Wang, H., Cao, J., Maehashi, K., Huang, L., Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Legrand-Defretin, V., Beauchamp, G. K., & Brand, J. G. (2005). Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS genetics*, 1(1), e3.
- Li, X., Li, W., Wang, H., Bayley, D. L., Cao, J., Reed, D. R., Bachmanov, A. A., Huang, L., Legrand-Defretin, V., Beauchamp, G. K., & Brand, J. G. (2006). Cats Lack a Sweet Taste Receptor1–3. *The Journal of nutrition*, 136(7), 1932S-1934S.
- Li, P., & Wu, G. (2024). Characteristics of Nutrition and Metabolism in Dogs and Cats. In *Nutrition and Metabolism of Dogs and Cats* (pp. 55-98). Cham: Springer Nature Switzerland.
- Liu, H. C., & Lee, J. C. (1982). Scanning electron microscopic and histochemical studies of foliate papillae in the rabbit, rat and mouse. *Cells Tissues Organs*, 112(4), 310-320.
- Lossow, K., Hübner, S., Roudnitzky, N., Slack, J. P., Pollastro, F., Behrens, M., & Meyerhof, W. (2016). Comprehensive analysis of mouse bitter taste receptors reveals different molecular receptive ranges for orthologous receptors in mice and humans. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 15358-15377.
- Mack, A., Singh, A., Gilroy, C., & Ireland, W. (1997). Porcine lingual taste buds: a quantitative study. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 247(1), 33-37.
- Mahabady, M. K., Morovvati, H., & Khazaeil, K. (2010). A microscopic study of lingual papillae in Iranian buffalo (*Bubalus bubalus*).

- Mahdy, M. A., Abdalla, K. E., & Mohamed, S. A. (2021). Morphological and scanning electron microscopic studies of the lingual papillae of the tongue of the goat (*Capra hircus*). *Microscopy Research and Technique*, 84(5), 891-901.
- McGrane, S. J., Gibbs, M., Hernangomez de Alvaro, C., Dunlop, N., Winnig, M., Klebansky, B., & Waller, D. (2023). Umami taste perception and preferences of the domestic cat (*Felis catus*), an obligate carnivore. *Chemical Senses*, 48.
- Megawati, E. I., Pradipta, S. I. D., Damia, U., Kustiati, U., Wihadmadyatami, H., & Kusindarta, D. L. (2023). Morphological identification of the squirrel (*Callosciurus notatus*) tongue through Scanning Electron Microscopy (SEM) and histochemistry. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(4).
- Menezes, L. T., Kaminishi, A. P. S., Vieira, L. G., Oliveira, S. R. P., Ferreira, C. H., Beletti, M. E., Santo, A. L. Q. (2013). Morfologia das papilas linguais de coelhos *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae). *Biotemas*. 26, 163-173.
- Mistretta, C. M., & Baum, B. J. (1984). Quantitative study of taste buds in fungiform and circumvallate papillae of young and aged rats. *Journal of Anatomy*, 138(Pt 2), 323.
- Mistretta, C. M., & Bradley, R. M. (2021). The fungiform papilla is a complex, multimodal, oral sensory organ. *Current opinion in physiology*, 20, 165-173.
- Naik, P. K. (2005). What makes cat to an obligate carnivores. *Vet. Alumnus*. Vol. XXV
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106(3), 381-390.
- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., & Sack, W. O. (1979). *The viscera of the domestic mammals* (Vol. 2, pp. 255-78). P. Parey.
- Nomina Anatomica Veterinaria, 2017. ed. 6th. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (I.C.V.G.A.N.). Published by the Editorial Committee Hanover (Germany), Ghent (Belgium), Columbia, MO (U.S.A.), Rio de Janeiro (Brazil)
- Nomina Histologica Veterinaria, 2017. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (I.C.V.G.A.N.).
- Nonaka, K., Zheng, J. H., & Kobayashi, K. (2008). Comparative morphological study on the lingual papillae and their connective tissue cores in rabbits. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 85(2), 57-66.
- Pastor, J. F., Moro, J. A., Verona, J. A. G., Gato, A., Represa, J. J., & Barbosa, E. (1993). Morphological study by scanning electron microscopy of the lingual

- papillae in the common European bat (*Pipistrellus pipistrellus*). *Archives of oral biology*, 38(7), 597-599.
- Pfeiffer, C. J., Levin, M., & Lopes, M. A. F. (2000). Ultrastructure of the horse tongue: further observations on the lingual integumentary architecture. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 29(1), 37-44.
- Plewa, B., & Jackowiak, H. (2020). Macro-and microscopic study on the tongue and lingual papillae of *Bison bonasus* hybrid as an interspecific species (*Bos taurus* × *Bison bonasus*). *Microscopy Research and Technique*, 83(10), 1241-1250.
- Plewa, B., Skiersz-Szewczyk, K., & Jackowiak, H. (2022). Three-dimensional characteristic of fungiform papillae and its taste buds in European bison (*Bison bonasus*), cattle (*Bos taurus*), and *Bison bonasus* hybrid. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 21.
- Pucek, Z. (Ed.). (2004). *European bison: status survey and conservation action plan* (p. 54). Gland, Switzerland and Cambridge: IUCN.
- Reed, D. R., & Knaapila, A. (2010). Genetics of taste and smell: poisons and pleasures. *Progress in molecular biology and translational science*, 94, 213-240.
- Reginato, G. D. S., Bolina, C. D. S., Watanabe, I. S., & Ciena, A. P. (2014). Three-dimensional aspects of the lingual papillae and their connective tissue cores in the tongue of rats: A scanning electron microscope study. *The Scientific World Journal*, 2014(1), 841879.
- Reichlin T, Klansek E, Hackländer K (2006). Diet selection by hares (*Lepus europaeus*) in arable land and its implications for habitat management. *Eur. J. Wildl. Res.* 52, 109-118.
- Robinson, P. P., & Winkles, P. A. (1990). Quantitative study of fungiform papillae and taste buds on the cat's tongue. *The Anatomical Record*, 226(1), 108-111.
- Romeis, B. (1989). Mikroskopische Technik. *Urban and Schwarzenberg*, Munchen
- Roper, S. D., & Chaudhari, N. (2017). Taste buds: cells, signals and synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(8), 485-497.
- Ross, M. H., Romrell, L. J., Kaye, G. I. (1995). Histology. A text and atlas. 3rd ed. Baltimore: *Williams & Wilkins*; s. 426-429
- Samuelson, D. A. (2007). Textbook of veterinary histology. St. Louis: *Saunders Elsevier*. Chap. 14, s. 315-318.
- Sari, E. K., Harem, M. K., & Harem, I. S. (2010). Characteristics of dorsal lingual papillae of Zavot cattle.

- Schwartz, G., Enomoto, S., Valiquette, C., & Lund, J. (1989). Mastication in the rabbit: a description of movement and muscle activity. *Journal of neurophysiology*, 62(1), 273-287.
- Seidenstücker, S. (2000). *Rabbit grazing and N-fertilization on high grass-encroachment in dry coastal grassland in 'Meijendel', The Netherlands*.
- Shao, B., Long, R., Ding, Y., Wang, J., Ding, L., & Wang, H. (2010). Morphological adaptations of yak (*Bos grunniens*) tongue to the foraging environment of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Journal of Animal Science*, 88(8), 2594-2603.
- Shindo, J., Yoshimura, K., & Kobayashi, K. (2006). Comparative morphological study on the stereo-structure of the lingual papillae and their connective tissue cores of the American beaver (*Castor canadensis*). *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 82(4), 127-138.
- Silva, M. C. P., Watanabe, I., & Kronka, M. C. (2002). Three-dimensional architecture of the connective tissue core and surface structures of the lingual papillae in the rabbit. *Histology and histopathology*, 17, 455-461.
- Smith, S. M. (2021). Gastrointestinal physiology and nutrition of rabbits. *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. 4th edn. Elsevier, Inc., New York, 162-173.
- Spielman, A. I., & Brand, J. G. (1995). 1.3. Collection of taste tissue from mammals. *Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction: Current Techniques and Protocols*, 25.
- Tabata, S., Wada, A., Kobayashi, T., Nishimura, S., Muguruma, M., & Iwamoto, H. (2003). Bovine circumvallate taste buds: Taste cell structure and immunoreactivity to α -gustducin. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 271(1), 217-224.
- Takemura, A., Uemura, M., Toda, I., Fang, G., Hikida, M., & Suwa, F. (2009). Morphological study of the lingual papillae in the ferret (*Mustela putorius furo*). *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 86(1), 17-24.
- Toprak, B. U. R. H. A. N., & Ulusoy, Y. (2011). Macroscopic and light microscopic structure of lingual papillae on the tongue of a young lion (*Panthera leo*). *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 66(3), 114-117.
- Thexton, A. J., & McGarrick, J. D. (1989). Tongue movement in the cat during the intake of solid food. *Archives of Oral Biology*, 34(4), 239-248.

- Unsal, S., Aktumsek, A., Celik, I., & Sur, E. (2003). The number and distribution of fungiform papillae and taste buds in the tongue of young and adult Akkaraman sheep. *Revue de médecine vétérinaire*, 154(11), 709-714.
- Wannaprasert, T. (2018). Morphological characteristics of the tongue and lingual papillae of the large bamboo rat (*Rhizomys sumatrensis*). *Anatomical Science International*, 93, 323-331.
- Wannaprasert, T., Phanthuma-opas, P., & Jindatip, D. (2020). Morphology and microstructure of the tongue of the lesser bamboo rat (*Cannomys badius*). *Acta Zoologica*, 101(3), 282-291.
- Włodarczyk, R., & Budvytis, M. (2011). Właściwe żywienie krów wysoko wydajnych-jak w pełni wykorzystać ich potencjał produkcyjny. *Życie weterynaryjne*, 86(10).
- Wu G (2024). Recent advances in the nutrition and metabolism of dogs and cats. *Adv Exp Med Biol*, 1446, 1-14.
- Yamaguchi, T., Asami, T., & Kobayashi, K. (2002). Comparative anatomical studies on the stereo structure of the lingual papillae and their connective tissue cores in the Japanese serow and Bighorn sheep. *Japanese Journal of Oral Biology*, 44(2), 127-141.
- Yoshimura, K., Kumakura, M., Koizumi, K., Abe, T., Yamaguchi, T., & Kobayashi, K. (2000). Comparative morphological study on the stereo-structure of the lingual papillae and their connective tissue cores of the pronghorn. *ODONTOLOGY-TOKYO-*, 88(1), 47-57.
- Yoshimura, K., Shindo, J., & Kageyama, I. (2009a). Light and scanning electron microscopic study on the tongue and lingual papillae of the Japanese badgers, *Meles meles anakuma*. *Okajimas folia anatomica Japonica*, 85(4), 119-127.
- Yoshimura, K., Hama, N., Shindo, J., Kobayashi, K., & Kageyama, I. (2009b). Light and scanning electron microscopic study on the tongue and lingual papillae of the common hippopotamus, *Hippopotamus amphibius amphibius*. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 292(7), 921-934.
- Zheng, J., & Kobayashi, K. (2006). Comparative morphological study on the lingual papillae and their connective tissue cores (CTC) in reeves' muntjac deer (*Muntiacus reevesi*). *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 188(6), 555-564.

The IUCN Czerwona Lista Zagrożonych Gatunków. Version 2024-1.
<https://www.iucnredlist.org> ISSN 2307-8235. Dostęp: 20.12.2024

8. Spis załączników:

(Załącznik nr 1) – Autorska publikacja naukowa

(Załącznik nr 2 i 3) – Oświadczenie o współautorstwie

Załącznik 2

Prof. dr hab. Hanna Jackowiak

Pracownia Histologii i Embriologii Zwierząt

Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

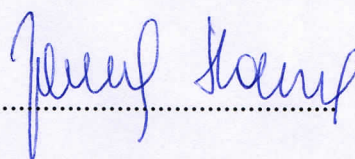
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Plewa B, Skieresz-Szewczyk K, Jackowiak H (2022) Three-dimensional characteristic of fungiform papillae and its taste buds in European bison (*Bison bonasus*), cattle (*Bos taurus*), and *Bison bonasus* hybrid. BMC Vet. Res. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03111-5> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, przygotowaniu projektu badań, opracowaniu manuskryptu i ostatecznych korektach językowych tekstu.

Data 23.12.2024.....

Podpis

.....


- * wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

Załącznik 2

Dr hab. Kinga Skieresz-Szewczyk

Pracownia Histologii i Embriologii Zwierząt

Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Plewa B, Skieresz-Szewczyk K, Jackowiak H (2022) Three-dimensional characteristic of fungiform papillae and its taste buds in European bison (*Bison bonasus*), cattle (*Bos taurus*), and *Bison bonasus* hybrid. BMC Vet. Res. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03111-5> mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w gromadzeniu materiału badawczego, przygotowywaniu preparatów histologicznych oraz ich dokumentacji fotograficznej, przygotowywaniu modeli 3D oraz wykonywaniu pomiarów morfometrycznych.

Data 23.12.2024.....

Podpis

Kinga Skieresz-Szewczyk

- * wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)