

wpi. 9.12.2024r.



SEKRETARIAT
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
/ mgr Małgorzata Malinowska /
starszy specjalista

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Łukasz Przemysław Zdrojkowski

Ekspresja mRNA czynników wzrostu i transformacji fibroblastów w błonie śluzowej macicy kłaczy względem nasilenia endometrozy i zmian histopatologicznych

Expression of mRNA of growth factors and fibroblast
transformation markers in equine endometrium regarding
endometrosis severity and occurrence of histopathological lesions

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

Dr hab. Bartosz Pawliński, prof. SGGW

Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika

Promotor pomocniczy:

Dr Małgorzata Wierzbicka

Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika

Warszawa 2024

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 06.12.2024 Czytelny podpis promotora Barbara Paulus

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 6.12.2024 Czytelny podpis autora rozprawy Zdrójkowski

Spis treści

Summary	7
Wykaz skrótów	8
1. Wstęp	11
2. Przegląd piśmiennictwa	13
2.1. Mechanizmy odporności w macicy kłaczy	13
2.2. Czynniki ryzyka zmniejszenia płodności kłaczy	13
2.3. Budowa i adaptacja funkcjonalna ściany macicy kłaczy	15
2.3.1. Nabłonek powierzchniowy endometrium	16
2.3.2. Nabłonek gruczołowy endometrium	17
2.3.3. Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM)	19
2.3.4. Naczynia krwionośne i limfatyczne	20
2.3.5. Komórki zapalne	22
2.4. Endometroza	24
2.4.1. Badanie histopatologiczne endometrium	25
2.4.2. Zmiany histopatologiczne związane z endometrozą	27
2.4.3. Patogeneza endometrozy	29
2.4.3.1. Stan zapalny i włóknienie endometrium	30
2.4.3.2. Komórki zapalne i NETs	31
2.4.3.3. Stan zapalny i niszczenie błony podstawnej nabłonka gruczołowego ..	33
2.4.3.4. Przebudowa ECM	35
2.4.3.5. Przebudowa ECM i aktywność MMP, TIMP i ADAMTS	37
2.4.3.6. Zmiana fenotypu fibroblastów	39
2.4.3.7. Zmiana fenotypu nabłonka	40
2.4.3.8. Regulacja hormonalna	42
2.4.3.9. Regulacja humoralna i rola cytokin	43
2.4.3.10. Regulacja humoralna i rola prostaglandyn	45
2.4.3.11. Regulacja ze strony szlaków sygnałowych	47
2.4.3.12. Regulacja ekspresji genów	49
2.4.4. Kierunek badań patogenezy endometrozy	51
2.4.4.1. Białko jądrowe Ki67	51
2.4.4.2. Insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF1)	52
2.4.4.3. Receptor α płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR α)	54
2.4.4.4. Antygen komórek grasicy 1 (Thy1)	57
3. Cel pracy i hipoteza badawcza	59
4. Materiały i metodyka badań	61
4.1. Materiał wykorzystany do badań	61
4.2. Metodyka histologiczna	61
4.3. Ocena szkiełek według klasyfikacji KD	62
4.4. Ocena parametrów histologicznych	62
4.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy	64
4.5.1. Izolacja RNA	64
4.5.2. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy	64
4.5.3. Analiza względnej ekspresji mRNA	65

4.6. Analiza statystyczna	65
5. Przedstawienie i omówienie wyników	67
5.1. Statystyka opisowa zmiennych jakościowych	67
5.2. Statystyka opisowa zmiennych ilościowych w podziale na kategorie endometrozy	84
5.3. Statystyka opisowa zmiennych ilościowych względem zmiennych jakościowych	89
5.4. Korelacje międzyklasowe zmiennych ilościowych i zmiennych jakościowych ..	93
5.5 Korelacje wewnątrzklasowe zmiennych ilościowych	95
5.6 Korelacje wewnątrzklasowe zmiennych jakościowych	95
6. Dyskusja	99
6.1. Zmiana ekspresji <i>TGFB1</i> i <i>Thy1</i> względem nasilenia endometrozy	99
6.2. Zmiany ekspresji <i>TGFB1</i> i <i>Thy1</i> względem zmian histopatologicznych w endometrium	100
6.3. Regulacja ekspresji i rola <i>TGFB1</i> i <i>Thy1</i> w przebiegu endometrozy	102
6.4. Zmiany ekspresji <i>MKI67</i> względem zmian histopatologicznych w endometrium	105
6.5. Regulacja ekspresji i rola <i>Ki67</i> w przebiegu endometrozy	105
6.6. Zmiany ekspresji <i>IGF1</i> względem zmian histopatologicznych w endometrium	107
6.7. Regulacja ekspresji i rola <i>IGF1</i> w przebiegu endometrozy	108
6.8. Rola α SMA i <i>PDGFRα</i> w przebiegu endometrozy	109
6.9. Regulacja hormonalna w przebiegu endometrozy	111
6.10. Zmiany wysokość nabłonka powierzchniowego względem zmian histopatologicznych w endometrium	112
6.11. Ocena zmian histopatologicznych w endometrium	113
6.12. Ocena zmian histopatologicznych w endometrium względem kategorii endometrozy	114
6.13. Dynamika zmian histopatologicznych w endometrium w przebiegu endometrozy	116
6.14. Rekomendacje dla modyfikacji oceny zmian histopatologicznych w endometrium w przebiegu endometrozy	120
7. Wnioski	123
8. Literatura	125

Summary

Horses, among other farm animals, have the lowest fertility rates, which may be caused by age-associated abnormalities. Uterine diseases are considered the main cause of decreased fertility in mares. Endometrosis, a degenerative process in endometrium is associated with fibrosis of extracellular matrix (ECM) and degeneration of endometrial glands, which is associated with decreased histotroph production, resulting in early embryonic death. Diagnosis can be performed only using histopathological assessment of endometrial biopsy. The disease may be categorized with Kenney and Doig classification system depending on severity of lesions. Pathogenesis of endometrosis is yet unknown, while the only confirmed risk factor is age. Thus, aims of this study are: assessment of the impact of *THY1*, *IGF1*, *PDGFRA*, and *MKI67* expression on the severity of endometrosis, occurrence of histopathological changes in endometrium affected by endometrosis, assessment of interactions between them, interactions between their expression of reference genes known for their involvement in endometrosis, as well as interactions between their expression and histopathological changes in endometrium affected by endometrosis. 47 full-thickness uterine sections were collected post-mortem. They were used to prepare histological slides stained with hematoxylin and eosin, and to quantify gene expression of *THY1*, *IGF1*, *PDGFRA*, *MKI67*, *TGFB1*, *ACTA2*, *ESR1*, and *PGR* with qPCR. Histological slides were categorized according to Kenney and Doig. Apart from that, all present endometrial lesions were evaluated separately, including morphological alterations and inflammatory infiltration. *THY1* expression increases in the early stages of endometrosis and with the destruction of the basement membrane, suggesting that *THY1* influences enhanced cell interaction with the ECM and intensifies signaling via extracellular vesicles. *IGF1* expression is negatively correlated with the histopathological criteria for assessing endometrosis, including the severity of inflammatory infiltration, suggesting a reduced influence of *IGF1* on degenerated endometrium and inhibition of regenerative processes. *PDGFRA* expression is positively correlated with *ACTA2*, *MKI67*, *THY1*, and *ESR1* expression, suggesting the involvement of *PDGFRα*-related signaling in fibroblast differentiation and activation. The evaluation of co-occurring histopathological changes in endometrium affected by endometrosis may be a useful diagnostic tool in assessing disease progression.

Key words: *endometrosis, pathogenesis, Thy1, IGF1, PDGFRα, Ki67, equine*

Wykaz skrótów

α SMA – *alpha smooth muscle actin* – aktyna mięśni gładkich alfa

ACTA2 – gen kodujący aktynę mięśni gładkich alfa

ADAMTS – *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* – dezintegriny i metaloproteinazy z motywem trombospondyny

AMH – *anti-müllerian hormone* – hormon antymüllerowski

Ct – *threshold cycle* – cykl graniczny wykrywania fluorescencji w metodzie qPCR

CTGF – *connective tissue growth factor* – czynnik wzrostu tkanki łącznej

DNMT1 – *DNA methyltransferase 1* – metylotransferaza DNA 1

DNMT3A – *DNA methyltransferase 3 alpha* – metylotransferaza DNA 3 alfa

DNMT3B – *DNA methyltransferase 3 beta* – metylotransferaza DNA 3 beta

ECM – *extracellular matrix* – macierz zewnątrzkomórkowa

ER α – *estrogen receptor α* – receptor estrogenowy alfa

ERK – *extracellular signal-regulated kinases* – kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym

ESR1 – gen kodujący receptor estrogenowy alfa

FAM – *fluorescein amidites* – 5(6)–karboksylfluoresceina

FGF2 – *fibroblast growth factor 2* – czynnik wzrostu fibroblastów 2

FSH – *follicle-stimulating hormone* – hormon folikulotropowy

GADPH – *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene* – gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3–fosfoglicerynowego

HE – hematoksylina–eozyna

HK2 – *hexokinase 2* – heksokinaza 2

IDO – *indoleamine 2,3-dioxygenase* – 2,3–dioksygenaza indolaminy

IGF1 – *insulin-like growth factor 1* – insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IGF1 – gen kodujący insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IGF1R – *insulin-like growth factor 1 receptor* – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1

IGF2R – *insulin-like growth factor 2 receptor* – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 2

IL–1 – *interleukin 1* – interleukina 1

IL–1 α – *interleukin 1* – interleukina 1 alfa

IL–1 β – *interleukin 1 β* – interleukina 1 beta

IL–6 – *interleukin 6* – interleukina 6

IL-10 – *interleukin 10* – interleukina 10

IL-17 – *interleukin 17* – interleukina 17

KD – klasyfikacja endometrozy według Kenney’a i Doiga

LH – *luteinizing hormone* – hormon luteinizujący

LPA – *lysophosphatidic acid* – kwas lizofosfatydowy

MALT – *mucosa-associated lymphoid tissue* – tkanka limfoidalna związana z błoną śluzową

MCP1 – *monocyte chemoattractant protein 1* – białko chemotaktyczne monocytów 1

MKI67 – gen kodujący Ki67

MMP1 – *matrix metalloproteinase 1* – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 1

MMP2 – *matrix metalloproteinase 2* – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2

MMP3 – *matrix metalloproteinase 3* – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 3

MMP9 – *matrix metalloproteinase 9* – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9

MMP13 – *matrix metalloproteinase 13* – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 13

NETs – *neutrophil extracellular traps* – zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe

NF κ B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B

PBIE – *persistent breeding induced endometritis* – przetrwałe zapalenie błony śluzowej macicy związane z kryciem

qPCR – *real-time polymerase chain reaction* – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

PDGF – *platelet derived growth factor* – płytkopochodny czynnik wzrostu

PDGFR α – *platelet derived growth factor receptor α* – receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa

PDGFRA – gen kodujący receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa

PDGFR β – *platelet derived growth factor receptor β* – receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu beta

PGE2 – *prostaglandin E2* – prostaglandyna E2

PGF2 α – *prostaglandin F2 α* – prostaglandyna F2 alfa

PGR – gen kodujący receptor progesteronowy
PI3K – *phosphoinositide 3-kinase* – kinaza 3-fosfatydylinozytolu
PR – *progesterone receptor* – receptor progesteronowy
Rt – *reverse transcription* – odwrotna transkrypcja
SDHA – *succinate dehydrogenase complex, subunit A gene* – gen kodujący podjednostkę A dehydrogenazy bursztynianowej
SSc – *systemic scleroderma* – twardzina układowa
STAT – *signal transducer and activator of transcription* – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji
TGFβ1 – *transforming growth factor β1* – transformujący czynnik wzrostu beta 1
TGFB1 – gen kodujący transformujący czynnik wzrostu beta 1
Thy1 – *thymus cell antigen 1* – antygen komórek grasicy 1
THY1 – gen kodujący antygen komórek grasicy 1
TIMP1 – *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* – tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1
TIMP2 – *tissue inhibitor of metalloproteinase 2* – tkankowy inhibitor metaloproteinaz 2
TIMP3 – *tissue inhibitor of metalloproteinase 3* – tkankowy inhibitor metaloproteinaz 3
TLR – *toll-like receptor* – receptory toll-podobne
TNFα – *tumor necrosis factor α* – czynnik martwicy nowotworu alfa
VEGF – *vascular endothelial growth factor* – czynnik wzrostu śródbłónka naczyńniowego

1. Wstęp

Konie, spośród wszystkich zwierząt gospodarskich charakteryzują się najniższą płodnością, co może być tłumaczone na kilka sposobów. Pierwszy aspekt, dotyczy założeń hodowlanych, w których selekcja koni gorącokrwistych opiera się przede wszystkim na osiągnięciach sportowych, a w mniejszym stopniu również na względach estetycznych, temperamencie konia i wynikającej z tego umiejętności współpracy z człowiekiem. W przypadku części ras koni gorącokrwistych i zimnokrwistych w programach hodowlanych uwzględnia się również zachowanie specyfiki rasy, a w przypadku koni użytkowanych mięśnie lub mlecznie również wydajność rzeźną, przyrost masy ciała i wydajność mleczną. Z związku z takimi kryteriami, płodność nie jest kluczowym kryterium brany pod uwagę w postępie hodowlanym, pomimo, że jest ona u koni wysoko odziedziczalna (Mahon & Cunningham, 1982; Westendorf et al., 2022a). Innym istotnym aspektem związanym z niską płodnością koni jest wiek klaczy użytkowanych w rozrodzie. W porównaniu do innych zwierząt gospodarskich większość koni żyje zdecydowanie dłużej, a wcześniejsze użytkowanie sportowe lub wyścigowe dodatkowo opóźnia i ogranicza wykorzystanie klaczy w rozrodzie. W przypadku koni sportowych wartość hodowlana zależy od indywidualnych wyników, stąd takie klacze są rozmnażane zazwyczaj dopiero po zakończeniu kariery. Z tej przyczyny, patologie układu rozrodczego pojawiające się i nasilające z wiekiem, odgrywają szczególnie istotną rolę w rozrodzie koni (Derisoud et al., 2021; Scarlet et al., 2023; Westendorf et al., 2022a).

U większości klaczy istotny spadek płodności występuje już po 10 roku życia. U starszych zwierząt obserwowane są zmiany morfologiczne i funkcjonalne w oocytach, skutkujące mniejszą szansą na prawidłowy rozwój zarodka w przypadku zapłodnienia (Derisoud et al., 2021). Spadek płodności z wiekiem może również wynikać ze zmniejszającej się rezerwy jajnikowej, czyli liczby pęcherzyków pierwotnych rozwijających się w jajniku podczas rozwoju płodowego lub bezpośrednio po porodzie. U ludzi, wyczerpanie rezerwy jajnikowej jest związane z menopauzą i końcem okresu rozrodczego, których wskaźnikiem jest zmniejszanie stężenia hormonu antymüllerowskiego (ang. *anti-müllerian hormone*, AMH). U klaczy stwierdzono stopniowy spadek stężenia AMH po dwudziestym roku życia, jednak aktywność jajnikowa utrzymuje się zwykle zdecydowanie dłużej, najczęściej przez całe życie klaczy. Warto zauważyć, że po 15 roku życia klaczy aktywność jajników może się zmniejszać, a także zatrzymywać u klaczy starszych niż 20 lat (Ulani et al., 2019;

Derisoud et al., 2021). Jednak najczęściej za kluczowe dla zmniejszenia płodności starszych klaczy uznaje się nasilające się z wiekiem zmiany morfologiczne i funkcjonalne w macicy (Schöniger & Schoon, 2020).

Patologie macicy uznawane są za najważniejszą przyczynę niepłodności klaczy, a zapalenie błony śluzowej macicy (łac. *endometritis*) i zwyrodnienie błony śluzowej macicy (endometroza) są określane jako jedne z najczęstszych i najistotniejszych klinicznie problemów zdrowotnych występujących u koni (Byron et al., 2024). Zapalenie błony śluzowej macicy, zwłaszcza przedłużone zapalenie związane z kryciem (ang. *persistent breeding induced endometritis*, PBIE), jest najczęściej występującą patologią macicy u klaczy. W tym przypadku zmiany funkcjonalne w macicy związane z wiekiem skutkują tendencją do gromadzenia się płynu w macicy, która wynika z większej produkcji płynu i/lub zaburzenia kurczliwości mięśniówki gładkiej. Do innych często występujących problemów należy endometroza – zwyrodnienie błony śluzowej macicy występujące powszechnie u starszych klaczy, a także przebudowa ściany naczyń krwionośnych oraz zaburzenia funkcji gruczołów macicznych w odpowiedzi na nieprawidłową regulację hormonalną (Katila & Ferreira–Dias, 2022; Schöniger & Schoon, 2020).

Przyczyny zwyrodnienia błony śluzowej macicy klaczy nie są znane, pomimo pojawiających się nowych badań dotyczących patogenezy. Ze względu na częste występowanie zwyrodnienia u starszych klaczy jest to obiecujący obszar badań, a zidentyfikowanie przyczyny i mechanizmu odpowiedzialnego za nasilanie się zmian może nie tylko zwiększyć opłacalność użytkowania rozrodowego, ale również zwiększyć możliwości postępu hodowlanego, przez uzyskanie liczniejszego potomstwa od osobników o pożądanym cechach fenotypowych (Derisoud et al., 2021; Westendorf et al., 2022a). Z tych powodów warto podejmować próby wyjaśnienia etiopatogenezy endometrozy, do czego można wykorzystać wyniki badań dotyczące innych procesów związanych z włóknieniem i weryfikować udział poszczególnych czynników profibrotycznych w kontekście zmian występujących w endometrium.

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1. Mechanizmy odporności w macicy klaczy

Wraz z wiekiem klaczy dochodzi do zmian morfologicznych i topograficznych w anatomii układu rozrodczego. Rozluźnienie więzadeł, wiotczenie tkanki łącznej, zanik mięśni i tkanki tłuszczowej w okolicy miednicy powoduje zapadnięcie się sromu, a w konsekwencji nieszczelność warg sromowych. Dochodzi również do opuszczenia macicy w jamie brzusznej, co utrudnia jej efektywne oczyszczanie. Zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej w okolicy miednicy jest związane również z użytkowaniem sportowym klaczy i często dotyczy klaczy o dużej wartości hodowlanej. Nieszczelność warg sromowych stwierdzono już u klaczy poniżej trzeciego roku życia poddanych treningowi sportowemu (Westendorf et al., 2022a). Zmiany te wiążą się ze spadkiem lokalnej odporności macicy, przez co staje się ona bardziej podatna na obniżające płodność długo utrzymujące się stany zapalne. Nieszczelność warg sromowych umożliwia dostawanie się powietrza i patogenów do pochwy (łac. *pneumovagina*), co powoduje wysychanie i podrażnienie błony śluzowej, predysponując klacz do infekcji (Hurtgen, 2006). Kolejną barierą anatomiczną, której funkcjonowanie może zmieniać się z wiekiem klaczy, jest szyjka macicy. Nawet u klaczy, które nie były użytkowane rozrodowo mogą wystąpić zrosty/zwłóknienia w świetle szyjki macicy, co utrudnia lub uniemożliwia jej otwieranie i oczyszczanie macicy z zalegającego w niej płynu (Katila, 2012).

Opuszczenie macicy w jamie brzusznej jest najczęściej skutkiem wcześniej przebytych ciąż, co również wiąże się z wiekiem klaczy. W takim przypadku grawitacja utrudnia oczyszczenie macicy z wysięku zapalnego i nasienia, przyczyniając się do częstszego występowania stanów zapalnych macicy, zarówno związanych z infekcją dróg rodnych jak i kryciem (Canisso et al., 2020; Hurtgen, 2006; Rebordão et al., 2014a). Stany zapalne błony śluzowej macicy, utrzymujące się przez dłuższy czas, mogą przyczyniać się do zaburzeń cyklicznych zmian w obrębie macicy, a także do powstawania zmian zwyrodnieniowych, w związku z długotrwałą obecnością większych ilości mediatorów zapalenia i innych cytokin (Byron et al., 2024).

2.2. Czynniki ryzyka zmniejszenia płodności klaczy

Czynniki ryzyka zmniejszające płodność klaczy wykazują znaczną zmienność osobniczą, jednak pewna ich grupa pozostaje stała i powinna być uwzględniona podczas badania klinicznego klaczy ukierunkowanego na ocenę przydatności do rozrodu.

Większość z nich dotyczy informacji standardowo uzyskiwanych podczas wywiadu i obejmuje wiek klaczy, jej użytkowanie czy liczbę przebytych ciąż i porodów (McKinnon et al., 2011).

Wiek klaczy ma znaczący wpływ na wskaźniki rozrodu. Pojawiające się zaburzenia funkcjonowania barier anatomicznych, takie jak nieszczelność warg sromowych i zwężenie światła szyjki macicy, predysponują klacz do nawracających i przewlekłych stanów zapalnych macicy. Zarówno *endometritis* jak i nasilająca się z wiekiem klaczy endometrioza przyczyniają się do wczesnego zamierania zarodków, przez co są uznawane za kluczowy problem w rozrodzie klaczy (Katila & Ferreira–Dias, 2022; Schöniger & Schoon, 2020).

Sportowe użytkowanie klaczy może wiązać się z wcześniej występującymi problemami ze szczelnością warg sromowych, ale także z zaburzeniami hormonalnymi wynikającymi z większego stresu i sztucznego regulowania cyklu rujowego (Kilgenstein et al., 2015).

Liczba wcześniej przebytych ciąż i porodów może wpływać na stosunki anatomiczne w jamie miednicy i jamie brzusznej. Opuszczenie się macicy w jamie brzusznej wiąże się z omówionymi predyspozycjami do zalegania płynu, ale może również wpływać na dostępność w badaniach palpacyjnych i obrazowych i ich wiarygodność diagnostyczną, warunki pobierania materiału do badań dodatkowych czy wykonywanie płukania macicy. Wcześniej przebyte ciążę wiążą się też ze zmianami w obrębie naczyń krwionośnych macicy. Ze względu na daleko idącą przebudowę całego narządu podczas rozwoju ciąży, a także po porodzie, głębokie procesy adaptacyjne w ukrwieniu macicy skutkują nawarstwiającymi się zmianami w budowie ścian naczyń, powodując ich zgrubienie i sztywnienie. Z kolei uszkodzenia mechaniczne, które mogą wystąpić w przebiegu porodu, mogą wpływać na szczelność warg sromowych, zrosty w szyjce macicy, a także kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy (Derisoud et al., 2021; McKinnon et al., 2011).

Niewłaściwa kondycja klaczy wpływa na metabolizm i funkcjonowanie wielu układów, w tym rozrodczego. Zbyt niski stan odżywienia wiąże się z deficytem energii. Biorąc pod uwagę, że rozmnażanie się nie jest niezbędne do utrzymania życia zwierzęcia, przy znacznych deficytach energii dochodzi do ograniczenia płodności. Nadmierne otyłosczenie klaczy jest pod tym względem mniej problematyczne, jednak może skutkować zwiększonym nasileniem stanów zapalnych i zwiększeniem stresu oksydacyjnego (Losinno & Pietrani, 2023; McKinnon et al., 2011).

2.3. Budowa i adaptacja funkcjonalna ściany macicy klaczy

Ściana macicy zbudowana jest z trzech warstw: błony śluzowej i podśluzowej (endometrium), błony mięśniowej (miometrium) i błony surowiczej (perimetrium). Aktywność skurczowa miometrium, zbudowanej z dwóch warstw mięśni gładkich – poprzecznej i podłużnej – jest kluczowa dla funkcjonowania macicy, jako że jest związana z transportem nasienia, oczyszczaniem macicy, migracją zarodka i porodem. Niemniej, o aktywności miometrium decyduje w znacznej mierze to, co dzieje się w świetle macicy i endometrium. Endometrium poddawane jest intensywnym zmianom związanym z sezonowością i cyklicznością, a komórki tworzące je są zdolne do wydzielania wielu mediatorów i odbierania licznych bodźców, które warunkują adaptację funkcjonalną macicy w zależności od zmieniających się potrzeb (McKinnon et al., 2011; Thompson et al., 2020).

Wyścielająca wewnątrz warstwa endometrium, kontaktująca się ze światłem macicy, tworzona jest przez nabłonek powierzchniowy. Pod nim znajduje się warstwa zbita endometrium, w której zlokalizowane są wierzchołkowe części (przewody wyprowadzające) gruczołów macicznych, macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*, ECM), fibroblasty, naczynia krwionośne oraz komórki zapalne. Nieco głębiej wyróżnia się warstwę gąbczastą endometrium, w której zlokalizowane są gruczoły maciczne. Gruczoły maciczne wnikają w głąb endometrium i tworzą rozgałęzienia, które otoczone są ECM, fibroblastami, naczyniami krwionośnymi i limfatycznymi oraz niewielką liczbą komórek zapalnych. Większe naczynia krwionośne obsługujące krążenie w endometrium znajdują się pod gruczołami, w warstwie podśluzowej, pomiędzy luźniej utkanymi włóknami tkanki łącznej (McKinnon et al., 2011; Oddsdóttir, 2007; Schöniger & Schoon, 2020; Thompson et al., 2020). W fazie pęcherzykowej cyklu jajnikowego, pod wpływem działania estrogenów, grubość endometrium zwiększa się ze względu na obrzęk tkanki łącznej. Z kolei w fazie lutealnej cyklu jajnikowego zwiększa się względna gęstość gruczołów macicznych ze względu na zmniejszający się obrzęk i potrzebę bardziej intensywnej produkcji wydzieliny gruczołów macicznych (Lefranc & Allen, 2007; McKinnon et al., 2011).

We wczesnej ciąży, endometrium jest kluczowym elementem strukturalnym macicy biorącym udział w interakcji z rozwijającym się zarodkiem. Odbierając sygnały od przemieszczającego się w świetle macicy zarodka, endometrium odpowiada za podtrzymanie wczesnej ciąży. Zablockowanie produkcji prostaglandyny F2 α (ang.

prostaglandin F2 α , *PGF2 α*) w endometrium wstrzymuje luteolizę, utrzymując protekcyjne stężenie progesteronu. Dodatkowo gruczoły maciczne odpowiadają za właściwe odżywienie zarodka, dostarczając substancji budulcowych, odżywczych i działając immunomodulująco, co jest niezbędne ze względu na wydłużony u klaczy okres przed wytworzeniem łożyska (Schoon & Schoon, 2003; Thompson et al., 2020). Co więcej, gęstość mikrokotyledonów wytwarzanych w trakcie ciąży jest zależna od gęstości gruczołów macicznych w endometrium. Z tego względu stan endometrium wpływa również na rozwój ciąży na późniejszych jej etapach (Lefranc & Allen, 2007).

2.3.1. Nabłonek powierzchniowy endometrium

Powierzchnową warstwę endometrium stanowi jednowarstwowy walcowaty nabłonek powierzchniowy. Wysokość i morfologia komórek nabłonka powierzchniowego są jednorodne w całej macicy, co umożliwia jego wiarygodną ocenę histopatologiczną na podstawie oceny pojedynczego skrawka (Lefranc & Allen, 2007). Nabłonek ten kontaktuje się bezpośrednio ze światłem macicy, biorąc udział w rozpoczęciu reakcji zapalnej w odpowiedzi na bodziec ze strony światła macicy, jak również w rozpoznaniu ciąży. Oprócz pełnienia roli bariery mechanicznej, na powierzchni nabłonka powierzchniowego znajdują się receptory toll-podobne (ang. *toll-like receptor*, TLR), które rozpoznają lipopolisacharyd pochodzący z bakterii Gram-ujemnych i aktywują szlaki sygnałowe bezpośrednio regulujące stan zapalny (Schöniger et al., 2018; Zdrojkowski et al., 2023). Komórki nabłonka powierzchniowego wykazują ekspresję receptorów estrogenowych (ang. *estrogen receptor*, ER) i progesteronowych (ang. *progesterone receptor*, PR), a ich morfologia zmienia się w trakcie cyklu jajnikowego. Ekspresja ER jest najwyższa w fazie pęcherzykowej, natomiast PR w fazie lutealnej. Podczas fazy pęcherzykowej wysokość komórek nabłonka powierzchniowego najczęściej mieści się w zakresie od 20 do 30 μm , a w ich części podstawnej występuje wakuolizacja. Z kolei w fazie lutealnej komórki nabłonka powierzchniowego są zdecydowanie niższe, a ich wysokość mieści się w przedziale od 10 do 20 μm (Oddsdóttir, 2007; Thompson et al., 2020). W komórkach nabłonka powierzchniowego endometrium występują receptory oksytocynowe, których ekspresja w cyklu jajnikowym jest stała, a zmniejsza się w trakcie ciąży. Obecność receptorów oksytocynowych jest związana z przekazywaniem informacji ze światła macicy i indukcją wydzielania *PGF2 α* , co skutkuje luteolizą i przygotowaniem do kolejnego cyklu (Thompson et al., 2020).

Wpływ na produkcję prostaglandyn jest prawdopodobnie regulowany również poprzez hormon luteinizujący (ang. *luteinizing hormone*, LH), dla którego receptory również występują w nabłonku powierzchniowym (Piotrowska–Tomala et al., 2020).

Komórki nabłonka powierzchniowego mają na swojej powierzchni mikrokosmki, a część z nich jest urzęsiona, co dodatkowo zwiększa powierzchnię kontaktu ze światłem macicy (Ferreira–Dias et al., 1994). Podczas fazy pęcherzykowej, w okolicy ujść gruczołów macicznych zwiększa się proporcja komórek wydzielniczych, odpowiadających za produkcję śluzu zapewniającego odpowiednie warunki w świetle macicy, natomiast liczba komórek urzęsionych zmniejsza się (Thompson et al., 2020). W drugim tygodniu ciąży zmniejsza się liczba komórek urzęsionych, natomiast wysokość nabłonka zwiększa się (Camacho et al., 2020; Camozzato et al., 2019).

Warto zauważyć, że pomiary histomorfometryczne dotyczące nabłonka powierzchniowego mogą być przydatnym uzupełnieniem oceny histopatologicznej. Stwierdzono, że u starszych klaczy nasilenie cyklicznych zmian zmniejsza się, co może świadczyć o ekspresji receptorów dla hormonów płciowych. W przypadku stanów zapalnych może dojść do wakuolizacji nabłonka powierzchniowego, a nawet jego ubytków i tworzenia się nadżerek, zwłaszcza w okolicy ujść gruczołów macicznych. Ponadto w ostrym zapaleniu, pomiędzy komórkami nabłonka powierzchownego mogą być obecne neutrofile (Camacho et al., 2020; Dubrovskaya et al., 2019). W przypadku endometrozy, wraz z jej nasileniem, zmniejsza się liczba wypustek cytoplazmatycznych na komórkach nabłonka powierzchownego, a granice między komórkami zacierają się. W przypadku endometrozy, podobnie jak przy *endometritis*, może dochodzić do miejscowych ubytków lub nadżerek dotyczących większych powierzchni endometrium (Ferreira–Dias et al., 1994).

2.3.2. Nabłonek gruczołowy endometrium

Podstawowym zadaniem gruczołów macicznych jest produkcja mleczka macicznego (histotrofu), którego zadaniem jest odżywienie zarodka we wczesnej ciąży, przed placentacją. U klaczy, w związku z wyjątkowo długą migracją zarodka, materiał zapasowy zarodka nie jest wystarczający i w przypadku niedoboru histotrofu dochodzi do wczesnego zamierania zarodka w wyniku deficytu substancji odżywczych. Produkcja wydzieliny utrzymuje się również podczas ciąży, wspomagając komórki trofoblastu i biorąc dalszy udział w odżywianiu rozwijającej się ciąży (Allen & Wilsher, 2009; Schöniger & Schoon, 2020).

Wygląd i funkcjonowanie nabłonka gruczołowego zmieniają się w zależności od stężeń hormonów płciowych w trakcie cyklu jajnikowego w sezonie rozrodczym jak również w zależności od okresu sezonu. W okresie braku aktywności jajników (anestrus) gruczoły maciczne są nieaktywne i zdecydowanie mniejsze, zarówno pod względem średnicy gruczołu jak i rozmiaru komórek. Również gęstość gruczołów macicznych w endometrium jest w tym okresie najniższa, a komórki nabłonka gruczołowego wykazują niewielką aktywność metaboliczną. W sezonie rozrodczym gruczoły maciczne ulegają przebudowie w odpowiedzi na regulację ze strony estrogenów i progesteronu. Hormony te, mogą działać za pośrednictwem swoistych receptorów, których ekspresja w prawidłowym nabłonku gruczołowym zmienia się adekwatnie do fazy cyklu (Dubrovskaya et al., 2019; Schöniger & Schoon, 2020; Thompson et al., 2020).

Podczas fazy pęcherzykowej komórki nabłonka gruczołowego dzielą się, rozbudowując rozgałęzienia gruczołów macicznych, co przygotowuje endometrium do zwiększonej produkcji wydzieliny w fazie lutealnej. Pobudzanie mitozy nabłonka gruczołowego wynika z działania estrogenów, tak, że w niektórych gruczołach macicznych można zauważyć objawy intensyfikacji podziałów komórkowych w postaci obecności pseudowarstwowości. W tak intensywnie dzielących się komórkach między blaszką podstawną a światłem gruczołów widoczne są dwa jądra komórkowe, jednak wszystkie komórki mają kontakt z błoną podstawną (Bischofberger et al., 2019; Schöniger & Schoon, 2020). W fazie pęcherzykowej wysokość komórek nabłonka gruczołowego jest mniejsza niż w fazie lutealnej, a chromatyna w jądrach komórkowych jest lepiej upakowana. W fazie pęcherzykowej gęstość gruczołów macicznych jest mniejsza niż w fazie lutealnej ze względu na większe uwodnienie włókien kolagenowych w ECM, a także mniejszy rozmiar samych gruczołów. W fazie lutealnej podziały komórkowe zachodzą rzadziej, chromatyna się rozluźnia, a komórki nabłonka gruczołowego zwiększają produkcję i wydzielanie histotrofu. Zwiększa się również wysokość i wakuolizacja komórek nabłonkowych, ze względu na gromadzące się w nich składników wydzielanych od światła gruczołu. Ponadto, światło gruczołów macicznych poszerza się i może być wypełnione produkowaną wydzieliną (Schöniger & Schoon, 2020; Thompson et al., 2020).

U starszych klaczy, gęstość gruczołów macicznych w warstwie zbitej endometrium zmniejsza się. Wraz z wiekiem klaczy zmniejsza się również podatność gruczołów macicznych na działanie hormonów płciowych, co może być związane

z mniejszą ekspresją ich receptorów. Słabiej różnicujące się gruczoły maciczne lub różnicujące się nieadekwatnie do fazy cyklu jajnikowego wydzielają do światła macicy mniej substancji odżywczych, co może skutkować zamieraniem zarodka (Dubrovskaya et al., 2019; Hoffmann, Bazer, et al., 2009; Lefranc & Allen, 2007).

2.3.3. Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM)

ECM stanowi podporę mechaniczną dla gruczołów macicznych oraz naczyń krwionośnych i limfatycznych obecnych w endometrium. ECM stanowi także środowisko do wymiany substancji odżywczych oraz cząsteczek sygnałowych pomiędzy nabłonkiem powierzchniowym, nabłonkiem gruczołowym i krwioobiegami. ECM bierze udział w cyklicznych zmianach w endometrium, a także w implantacji zarodka i wnikaniu komórek trofoblastu (Centeno et al., 2024; Sikora et al., 2017). ECM tworzą przede wszystkim włókna kolagenowe typu 1 i 3, podczas gdy włókna kolagenowe typu 4 wraz z innymi białkami strukturalnymi współtworzy błony podstawne nabłonków (Centeno et al., 2024; Mansour et al., 2003). Błona podstawna jest częścią pośrednią między ECM a komórkami nabłonkowymi, zarówno nabłonka powierzchniowego jak i nabłonka gruczołowego. Błona podstawna dzięki sieci tworzonej przez włókienka białkowe, głównie kolagen typu 4, lamininę i fibronektynę, przytwierdza nabłonki do podłoża, jednocześnie przechodząc płynnie w ECM (Mansour et al., 2003).

Głównymi komórkami znajdującymi się w ECM są fibroblasty, które produkują i wydzielają składniki ECM (Centeno et al., 2024). Fibroblasty posiadają dobrze rozwinięty cytoszkielecik, którego elementy pozwalają im znosić naprężenia tkanki łącznej oraz wpływać na kierunek układu włókien. Część fibroblastów w prawidłowym endometrium wykazuje ekspresję wimentyny, niektóre również desminy oraz α -aktyny mięśni gładkich (ang. *alpha smooth muscle actin*, α SMA). W zależności od badań, procent fibroblastów wykazujących ekspresję α SMA waha się od 1 do 20% (Bischofberger et al., 2019; Minkwitz et al., 2019; Schöniger & Schoon, 2020). Fibroblasty poddają się receptorowemu działaniu estrogenu i progesteronu, a liczba receptorów dla tych hormonów obecnych w błonie komórkowej fibroblastów zmienia się w trakcie cyklu jajnikowego w sposób analogiczny do omówionych komórek nabłonkowych (Thompson et al., 2020). Pod koniec fazy lutealnej fibroblasty, razem z komórkami nabłonkowymi produkują PGF2 α , natomiast podczas fazy pęcherzykowej

fibroblasty intensywniej produkują włókna kolagenowe w odpowiedzi na regulowaną przez estrogeny lokalną stymulację humoralną (Amaral et al., 2023).

Zmiany cykliczne dotyczą zarówno fibroblastów jak i elementów niekomórkowych ECM. W fazie pęcherzykowej, w porównaniu do fazy lutealnej, włókna kolagenowe są bardziej uwodnione, przez co zwiększają swój rozmiar i zajmują proporcjonalnie większą część endometrium. Dzięki wiązaniu wody, endometrium staje się bardziej reaktywne, ułatwiona jest komunikacja między komórkami, a cząsteczki sygnałowe mogą łatwiej docierać do miejsc docelowych. Również migracja komórek zapalnych jest ułatwiona, co sprzyja zwiększeniu liczby neutrofili w świetle macicy (Amaral et al., 2023; Lefranc & Allen, 2007). Włókna ECM poddawane są stałym procesom niszczenia, produkcji i przebudowy. Dużą rolę w tym procesie odgrywają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinase*, MMP), czyli enzymy aktywujące niektóre cytokiny i rozkładające białkowe włókna strukturalne ECM. Z kolei tkankowe inhibitory metaloproteinaz (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase*, TIMP) hamują aktywność MMP poprzez zablokowanie ich miejsca aktywnego. W fazie pęcherzykowej zwiększa się produkcja MMP2 i MMP9 w fibroblastach, co wskazuje na aktywną przebudowę ECM. W fazie lutealnej aktywność MMP spada, natomiast zwiększa się produkcja i aktywność TIMP oraz prostaglandyny E2 (ang. *prostaglandin E2*, PGE2), w celu zapewnienia sprzyjającego środowiska dla potencjalnego rozwoju zarodka (Silva et al., 2014; Wong et al., 2023).

2.3.4. Naczynia krwionośne i limfatyczne

Gęstość naczyń krwionośnych w endometrium nie zmienia się w trakcie cyklu jajnikowego (Thompson et al., 2020), chociaż obserwowana jest różnica w średnicy i gęstości naczyń krwionośnych między fazą lutealną a wczesną ciążą. Waskularyzacja endometrium zwiększa się prawdopodobnie pod wpływem mediatorów produkowanych przez zarodek, ponieważ analogiczne zmiany uzyskano poprzez eksperymentalny wlew domaciczny białek zarodkowych (Camacho et al., 2020).

W trakcie ciąży zachodzi adaptacyjna przebudowa naczyń krwionośnych, pozwalająca na zwiększenie dopływu krwi do macicy. Po porodzie naczynia adaptują się ponownie, powracając do standardowego przepływu krwi przez narząd. Brak zmian w obrębie naczyń krwionośnych stwierdza się jedynie w biopsjach endometrium pobranych od młodych klaczy nieużytkowanych wcześniej w rozrodzie. Zmiany związane z wiekiem dotyczą przede wszystkim warstwy wewnętrznej (łac. *intima*)

i zewnętrznej ściany naczyń (łac. *adventitia*), podczas gdy przebudowa związana z przebytymi wcześniej ciążami dotyczy wszystkich warstw ściany naczyń. U klaczy wieloródek obserwuje się przerwania, rozwarstwienie i zgrubienie warstwy wewnętrznej naczyń, zanik miocytów gładkich w warstwie środkowej, a także zwiększenie ilości włókien elastynowych i kolagenowych oraz ogniska kalcyfikacji na całej grubości ściany naczyń (Schöniger & Schoon, 2020). Przemiany w strukturze ściany naczyń krwionośnych, skutkujące trwałą przebudową ściany, określane jest jako angiopatie (Esteller-Vico et al., 2015; Hanada et al., 2014; Kilgenstein et al., 2015; Schoon et al., 1999). Angiopatie są często obserwowane jako współwystępujące z endometrozą, co może być związane z wpływem zmian zwyrodnieniowych na strukturę naczyń, bądź skutkiem wspólnej predyspozycji związanej z wiekiem klaczy (Hanada et al., 2014; Kabisch et al., 2019; Schöniger & Schoon, 2020; Schoon et al., 1999).

Angiopatie mogą zmniejszać zdolność adaptacyjną naczyń krwionośnych do zmiany zapotrzebowania na krew w macicy w trakcie ciąży. Angiopatie dotyczą zwiększenia zawartości włókien elastynowych we wszystkich warstwach ściany naczynia, przez co naczynia stają się grubsze. W prawidłowej ciąży, na początkowym etapie migracji zarodka, przepływ krwi w części endometrium kontaktującej się z zarodkiem zwiększa się, podczas gdy występowanie angiopatii zmniejsza siłę tego efektu (Esteller-Vico et al., 2015; Ferreira et al., 2015; Schöniger & Schoon, 2020; Schoon & Schoon, 2003). Zwłóknienie naczyń krwionośnych skutkuje mniejszym przepływem krwi, a także mniejszą gęstością kosmków łożyska, co dodatkowo wpływa na słabsze odżywienie płodu (Ferreira et al., 2015). Z drugiej strony, w badaniach dotyczących masy łożyska, łożyska klaczy wieloródek były cięższe niż łożyska klaczy pierworódek, podobnie jak urodzone źrebięta (Bracher et al., 1996). Możliwe więc, że początkowo przebyte ciążę mają pozytywny wpływ na krążenie w macicy, natomiast sumujące się zmiany w obrębie naczyń krwionośnych prowadzą w końcu do jego ograniczenia (Ferreira et al., 2015; Kabisch et al., 2019). Podejrzewa się również wpływ zmian naczyniowych na kurczliwość mięśniówki gładkiej miometrium, co mogłoby wskazywać, że jest to jeden z czynników predysponujących klacz do zaburzenia oczyszczania macicy i wynikającej z tego obniżonej płodności (Esteller-Vico et al., 2015; Katila, 2012).

Naczynia chłonne odgrywają istotną rolę w odprowadzaniu limfy z macicy, a ich wypełnienie w endometrium jest jednorodne w całym narządzie (Lefranc & Allen,

2007). Spadek drenażu limfatycznego jest jednym z zaburzeń stwierdzanych u klaczy podatnych na gromadzenie się płynu w świetle macicy. W przypadku stanów zapalnych światło naczyń limfatycznych jest zwykle poszerzone (Lefranc & Allen, 2007). Natomiast w endometrozie obserwuje się często obecność rozstrzeni limfatycznych (Kabisch et al., 2019).

2.3.5. Komórki zapalne

Ocena nasilenia i składu komórkowego nacieku zapalnego jest rutynowo wykorzystywana w diagnostyce stanów zapalnych, zarówno podczas badania cytologicznego jak i w ocenie histopatologicznej biopsji endometrium. Należy jednak mieć na uwadze, że w endometrium, podobnie jak w innych błonach śluzowych, obecność komórki zapalne w ograniczonej liczbie jest fizjologiczna. Niewielki naciek, zwłaszcza limfocytny, należy traktować jako prawidłowy i będący częścią tkanki limfoidalnej związanej z błoną śluzową (ang. *mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT). W niektórych przypadkach, dookoła gruczołów macicznych można zaobserwować naciek limfocytny ułożony koncentrycznie. W związku z tym, że występowanie takich nacieków nie jest związane z obecnością ostrego lub przewlekłego stanu zapalnego, można zakładać, że jest to również część MALT (Klose & Schoon, 2016; Skarzynski et al., 2020). Aktywność i funkcje komórek zapalnych podlega cyklicznej regulacji za pośrednictwem estrogenów i progesteronu. W fazie pęcherzykowej prawdopodobnie w wyniku działania receptorowego estrogenów, liczba komórek zapalnych oraz ich aktywność wydzielnicza są zwiększone, co usprawnia reakcję komórek ściany macicy na bodźce zewnętrzne. Podstawowym celem komórek zapalnych jest umożliwienie oczyszczenia macicy z resztek nasienia po kryciu, a także niszczenie patogenów, które dostały się do światła macicy wraz z nasieniem lub przez otwartą szyjkę macicy. W fazie lutealnej i w ciąży, progesteron obniża aktywność leukocytów, umożliwiając przeżycie zarodka. Omawiane hormony płciowe regulują również aktywność mediatorów, takich jak czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF α), interleukiny (ang. *interleukin*, IL) 1 i 6, a także prostaglandyny, które pełnią ważne funkcje w regulacji odpowiedzi zapalnej endometrium oraz regulacji cykliczności (Skarzynski et al., 2020).

Pojedyncze neutrofile, rozsiane w warstwie zbitej endometrium i między komórkami nabłonka powierzchniowego, mogą obecne w fazie pęcherzykowej, natomiast w zdrowym endometrium nie powinny występować w innych fazach cyklu

(Schöniger & Schoon, 2020; Skarzynski et al., 2020). Liczba neutrofilów w ścianie i świetle macicy rośnie w *endometritis*, co uzasadnia ich wykorzystanie w diagnostyce. Obecność licznych neutrofilów świadczy o ostrym przebiegu zapalenia, tak, że w przypadku zapalenia związanego z kryciem, migracja neutrofilów do macicy następuje już pół godziny po zdeponowaniu nasienia. W przebiegu *endometritis* neutrofile lokalizują się przede wszystkim w świetle macicy, między komórkami nabłonka powierzchniowego i w świetle gruczołów macicznych (Camacho et al., 2020; Canisso et al., 2020; Oddsdóttir, 2007; Rebordão et al., 2014a; Skarzynski et al., 2020).

W prawidłowym endometrium obecna jest niewielka liczba limfocytów T, a limfocyty B niemal nie występują. Limfocyty T lokalizują się przede wszystkim w warstwie zbitej endometrium, ale mogą być obecne również w warstwie gąbczastej, a także między komórkami nabłonka powierzchniowego i gruczołowego. Naciek limfocytarny może być równomiernie rozsiany po endometrium, może też przybierać postać bardziej zogniskowaną (Oddsdóttir, 2007; Schöniger & Schoon, 2020). W przewlekłym stanie zapalnym, jak również w przypadku nieszczelności warg sromowych, dochodzi do długotrwałego kontaktu endometrium z antygenami i nacieku komórek plazmatycznych odpowiedzialnych za produkcję przeciwciał. Komórki plazmatyczne, podobnie jak limfocyty T, lokalizują się przede wszystkim w warstwie zbitej endometrium, ale mogą występować w całym endometrium (McKinnon et al., 2011; Oddsdóttir, 2007; Schöniger & Schoon, 2020). Obecność limfocytów świadczy o przewlekłym przebiegu zapalenia, chociaż są one rekrutowane również w stanach zapalnych o przebiegu ostrym i podostrym. Pomimo rekrutacji limfocytów, kryterium diagnostycznym ostrego *endometritis* pozostaje naciek neutrofilowy (Oddsdóttir, 2007). Natomiast we wczesnej ciąży, aktywność limfocytów jest prawdopodobnie hamowana przez mediatory produkowane przez zarodek, co umożliwia zatrzymanie reakcji zapalnej i utrzymanie ciąży (Camacho et al., 2020).

Makrofagi i komórki dendrytyczne pełnią funkcje komórek prezentujących antygeny oraz produkujących cytokiny. Ich liczba w endometrium rośnie bezpośrednio po owulacji jako element przygotowania macicy do oczyszczania z nasienia. W wycinkach endometrium, pobranych od klaczy po porodzie lub poronieniu, syderofagi obecne są często do 7 miesięcy. Syderofagi oczyszczają endometrium z erytrocytów, uwolnionej hemoglobiny i metabolizowanej hemosyderyny obecnych w ścianie macicy po uszkodzeniu naczyń krwionośnych (McKinnon et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020; Skarzynski et al., 2020). Naciek makrofagowy występuje

również w przewlekłych stanach zapalnych endometrium (McKinnon et al., 2011; Oddsdóttir, 2007; Schöniger & Schoon, 2020). Makrofagi odgrywają istotną rolę we wczesnej ciąży, a ich zwiększona liczba powoduje supresję limfocytów T, zwiększając tolerancję immunologiczną dla rozwijającego się zarodka (Klein et al., 2016).

Eozynofile występują pojedynczo w endometrium we wszystkich fazach cyklu, najczęściej w warstwie zbitej endometrium, bliżej światła macicy. Zwiększenie liczby eozynofili wiąże się najczęściej z zasysaniem powietrza do pochwy, powodowanym nieprawidłową konformacją sromu. Ogniskowy naciek eozynofilowy stwierdza się również w stanach zapalnych, przede wszystkim o przebiegu przewlekłym (McKinnon et al., 2011; Oddsdóttir, 2007; Schöniger & Schoon, 2020).

Komórki tuczne biorą udział w nieswoistej odpowiedzi zapalnej i występują w prawidłowym endometrium w niewielkiej liczbie. Wzrost liczby komórek tucznych może być związany z przewlekłym endometritis, lub z rują i przygotowaniem endometrium na większą presję środowiskową związaną z kryciem (Oddsdóttir, 2007; Schöniger & Schoon, 2020; Skarzynski et al., 2020).

2.4. Endometroza

Endometroza określana jest jako zwyrodnienie endometrium, włóknienie endometrium lub włóknienie okołogruzołowe. Termin ten został wprowadzony po raz pierwszy przez Kenneya i rozszerzony przez Schoon et al. (Hoffmann et al., 2009b; Kenney, 1978; Schöniger & Schoon, 2020).

W przebiegu endometrozy zmiany dotyczą przede wszystkim zaburzenia funkcjonowania gruczołów macicznych i skutkują zmniejszoną produkcją histotrofu, a także zwiększoną depozycją włókien kolagenowych w ECM, które zwiększa sztywność endometrium, zakłóca dyfuzję składników odżywczych i tlenu oraz powodując uszkodzenia komórek i aktywację miofibroblastów (Szóstek–Mioduchowska et al, 2023). Wydzielina gruczołów macicznych odżywia nie tylko migrujący zarodek, wspiera również tworzenie łożyska. U klaczy z endometrozą stwierdzono zmniejszoną gęstość kosmków, przekładającą się na mniejszą efektywną powierzchnią kontaktu pomiędzy maczyną i płodową częścią łożyska. Zmniejszona gęstość kosmków wiąże się również z mniejszą masą urodzeniową źrebięcia (Bracher et al., 1996). Oprócz włóknienia endometrium analogiczne zmiany stwierdzono w ścianie

jajowodu, co może utrudniać komunikację między jajowodem a komórką jajową oraz jajowodem a zarodkiem podczas migracji w kierunku macicy (Skarzynski et al., 2020).

Endometrozie nie towarzyszą objawy kliniczne, natomiast jedynym jej skutkiem jest obniżona płodność klaczy. Występowanie i nasilenie zmian w endometrium jest większe u starszych klaczy, wraz z wiekiem szansa na wystąpienie endometrozy rośnie. Nie stwierdzono natomiast ewidentnych predyspozycji związanych z innymi czynnikami ryzyka zidentyfikowanymi dla obniżonej płodności, chociaż część autorów sugeruje konieczność przypisania klaczom z wcześniejszą niepłodnością niższej spodziewanej płodności, niż świadczy o tym sam obraz histopatologiczny endometrium (Leishman et al., 1982; McKinnon et al., 2011; Lehmann et al., 2011). Natomiast przypisanie stopnia zwyrodnienia nie było wiązane z gromadzeniem płynu w macicy, zakaźnym *endometritis*, ani historią trudnych porodów. Nie stwierdzono również różnic w występowaniu endometrozy u zależności od rasy klaczy (De Witt et al., 2023). Endometroza może mieć natomiast wpływ na podatność klaczy na PBIE, utrudniając oczyszczanie macicy, co dodatkowo obniża płodność (Reghini et al., 2016). Wydzielina gruczołów macicznych jest nośnikiem, dzięki któremu (w połączeniu z kurczliwością mięśniówki gładkiej) możliwe jest usunięcie patogenów ze światła narządu. Z tego względu endometrium objęte endometrozą staje się mniej kompetentne do zwalczania bodźców wywołujących zapalenie (Gajos et al., 2015). W przebiegu niszczącej endometrozy częściej stwierdza się współwystępujący stan zapalny, co podkreśla rolę gruczołów macicznych w oczyszczaniu macicy (Hoffmann et al., 2009b). Dodatkowo endometroza może upośledzać oczyszczanie macicy poprzez ograniczenie kurczliwości mięśniówki gładkiej. Włóknieniu endometrium może towarzyszyć atrofia miocytów i jednoczesny wzrost ilości włókien kolagenowych. Zmiany te są szczególnie widoczne w warstwie zewnętrznej mięśniówki gładkiej, o przebiegu podłużnym. Ponadto związane ze zwyrodnieniem endometrium zaburzenia w produkcji prostaglandyn i kwasu lizofosfatydowego (ang. *lysophosphatidic acid*, LPA) mogą również odpowiadać za ograniczoną kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy (Skarzynski et al., 2020; Szóstek–Mioduchowska et al., 2020a).

2.4.1. Badanie histopatologiczne endometrium

Złotym standardem diagnostycznym chorób macicy i jedyną metodą diagnostyczną endometrozy jest ocena histopatologiczna skrawka endometrium pobranego kleszczykami biopsyjnymi. Wycinek z trzonu lub podstawy rogu macicy,

o minimalnym rozmiarze $10 \times 3 \times 3$ mm, jest uznawany za reprezentatywny dla całego endometrium. Pobrane wycinki barwione są rutynowo hematoksyliną i eozyną (HE) i oceniane w mikroskopie świetlnym według kryteriów klasyfikacji Kenneya–Doiga (klasyfikacja KD) (Schöniger & Schoon, 2020).

Do głównych kryteriów diagnostycznych uwzględnianych w klasyfikacji KD, wykorzystywanej do oceny zwyrodnienia błony śluzowej macicy, należą: odsetek gruczołów macicznych objętych zmianami, liczba warstw włókien kolagenowych otaczających gruczoły maciczne, obecność nacieku zapalnego i wcześniejsza niepłodność (Schöniger & Schoon, 2020). W klasyfikacji KD rozróżnia się 4 kategorie: I – obejmującą zdrowe endometrium (prognozowana płodność: $>90\%$), IIA – obejmującą niewielkie zwyrodnienie (prognozowana płodność: $50\text{--}80\%$), IIB – obejmującą umiarkowane zwyrodnienie (prognozowana płodność: $10\text{--}50\%$) i III – obejmującą znaczne zwyrodnienie (prognozowana płodność: $<10\%$). Jednak stosowana klasyfikacja KD nie uwzględnia wszystkich czynników mogących prowadzić do zmniejszenia płodności. Klasyfikacja KD nie uwzględnia nieregularnego różnicowania gruczołów macicznych, zmian naczyniowych, a także nie różnicuje nieniszczącego i niszczącego typu endometrozy. Podczas gdy wymienione zmiany histopatologiczne wiążą się z gorszym rokowaniem w kontekście płodności (Schoon & Schoon, 2003). Ponadto uwzględnienie w ocenie histopatologicznej gęstości gruczołów macicznych oraz rozdzielenie gruczołów prawidłowych i objętych zmianami może zmniejszyć subiektywność oceny skrawków (Lefranc & Allen, 2007). W ocenie endometrium powinno brać się pod uwagę zarówno wiek klaczy jak i historię niepłodności, ponieważ obydwa czynniki są negatywnie skorelowane z płodnością i związane z progresją endometrozy. Niestety często dane te nie są dostępne dla patologów lub są pomijane, a kategoria KD przypisywana jest wyłącznie na podstawie zmian histopatologicznych (Aresu et al., 2012; Hanada et al., 2014; Kenney, 1978).

Choć istnieją sprawdzone metody wizualizacji histologicznej włókien białkowych tkanki łącznej (Zdrojkowski, et al. 2024), barwienie HE jest najczęściej jedynym wykonywanym barwieniem w celu oceny włóknienia endometrium (Christoffersen et al., 2012; Overbeck et al., 2013; Sikora et al., 2017). Barwienia histologiczne specyficzne dla tkanki łącznej są łatwo dostępne i informatywne, jednak ich przydatność w ocenie endometrium jest często kwestionowana, przez co ich praktyczne wykonywanie jest rzadkie (Zdrojkowski et al., 2024).

Dyskutowana jest również kwestia reprezentatywności pojedynczego skrawka endometrium w ocenie jego stanu w obrębie całego narządu. Badania dotyczące oceny endometrium, pobranego z różnych miejsc w ścianie macicy, pokazują niewielkie różnice w przypisanej kategorii KD, co sugeruje podobne nasilenie zmian w obrębie całego narządu (Overbeck et al., 2013). Porównanie oceny histopatologicznej preparatu wykonanego z biopsji z preparatem wykonanym z wycinka pełnej grubości ściany macicy pobranego pośmiertnie nie wykazało różnic w przypisanej kategorii KD, co dowodzi, że wycinek biopsyjny jest wystarczający do oszacowania stanu endometrium (Aresu et al., 2012). Z drugiej strony, wątpliwości co do reprezentatywności tak małej próbki nadal się pojawiają (Alpoim–Moreira et al., 2022b).

2.4.2. Zmiany histopatologiczne związane z endometrozą

Zmiany w endometrozie mogą dotyczyć każdego elementu składowego endometrium, choć zasadnicze zmiany histopatologiczne związane są z gruczołami macicznymi i ECM.

Zwyrodnienie gruczołów macicznych może dotyczyć pojedynczych gruczołów lub grup gruczołów. W przypadku grupy gruczołów mogą powstawać gniazda gruczołowe widoczne w postaci dużych struktur złożonych z powiększonych gruczołów macicznych oraz otoczonej je torebki łącznotkankowej. W torebce łącznotkankowej włókna kolagenowe ułożone są koncentrycznie w postaci kilku warstw, między którymi znajdują się fibroblasty (McKinnon et al., 2011). Komórki nabłonka gruczołowego, w tak zmienionych gruczołach macicznych, są większe i objęte obrzękiem. W świetle zmienionych gruczołów może zalegać wydzielina. W przypadku powiększonych gruczołów macicznych wypełnionych wydzieliną mówi się o ich rozstrzeni. W barwieniu HE powiększone gruczoły maciczne barwią się nieco słabiej niż gruczoły prawidłowe (Bischofberger et al., 2019; Hanada et al., 2014; Schöniger & Schoon, 2020). W wydzielinie zmienionych gruczołów macicznych stwierdzono spadek zawartości substancji odżywczych, co przekłada się na mniejszą produkcję histotrofu i skutkuje istotnym ograniczeniem płodności klaczy (Hoffmann et al., 2009a). Komórki nabłonkowa gruczołowego objęte endometrozą wykazują większą ekspresję białek cytoszkieletu, co może częściowo odpowiadać za ich zmniejszoną aktywność wydzielniczą (Alpoim–Moreira, 2023; Lehmann et al., 2011; Lunelli et al., 2013; Schöniger & Schoon, 2020). W nabłonku gruczołowym może dochodzić do pogrubienia, a także uszkodzenia błony podstawnej, co skutkuje odrywaniem się

komórek nabłonkowych od podłoża i brakiem ciągłości nabłonka gruczołowego. Cechy niszczenia błony podstawnej nabłonka gruczołowego są uwzględniane jako podstawowe kryterium do rozróżnienia endometrozy niszczącej i endometrozy nieniszczącej. W endometrozie niszczącej dochodzi do przerywania ciągłości błony podstawnej nabłonka gruczołowego, podczas gdy w endometrozie nieniszczącej ciągłość błony podstawnej jest zachowana. Dla pełniejszego rozróżnienia stosuje się barwienie lamininy, składnika błony podstawnej, który w przypadku jej uszkodzenia obecny jest w ECM. W endometrozie niszczącej laminina traci swój regularny układ w bezpośredniej bliskości komórek nabłonka gruczołowego (Hanada et al., 2014; Katila & Ferreira-Dias, 2022; Lehmann et al., 2011; Schoon & Schoon, 2003). Ze względu na mniejszą liczbę receptorów dla hormonów płciowych, zmienione gruczoły maciczne wykazują słabsze różnicowanie w cyklu jajnikowym (Bischofberger et al., 2019; Hanada et al., 2014; Schöniger & Schoon, 2020).

Przebudowa ECM dotyczy głównie warstwy gąbczastej endometrium. W przebiegu endometrozy ilość kolagenu w ECM zwiększa się, a co za tym idzie, tkanka łączna staje się bardziej zbita. Może się to wiązać z utrudnionym transportem substancji odżywczych, metabolitów, a także cząsteczek sygnałowych w endometrium. Włókna kolagenowe układają się warstwowo dookoła gruczołów macicznych. W fibroblastach zwiększa się ekspresja elementów cytoszkieletu, co jest adaptacją do zwiększonej gęstości tkanki łącznej, a także oznaką transformacji w miofibroblasty (Klose & Schoon, 2016). W zależności od statusu metabolicznego fibroblastów rozróżnia się endometrozę aktywną i nieaktywną. Aktywne metabolicznie fibroblasty mają luźniej utkaną chromatynę, przez co ich jądra komórkowe są większe i jaśniejsze. Aktywne metabolicznie fibroblasty mają również większą ilość cytoplazmy, co świadczy o intensywniejszej produkcji białek. Natomiast nieaktywne metabolicznie fibroblasty są mniejsze i mają silnie spłaszczony kształt nadawany im przez warstwy włókien kolagenowych. Ich jądra komórkowe są ciemne i spłaszczone. Aktywność fibroblastów wskazuje na dynamikę zmian w ECM i świadczy o trwającym procesie produkcji kolagenu związanym z możliwym nasileniem zmian (Hanada et al., 2014). Rozmiar jądra komórkowego i zwiększona ekspresja elementów cytoszkieletu świadczy o transformacji fibroblastów w miofibroblasty zachodzącej pod wpływem cytokin (Evans et al., 1998; Szóstek-Mioduchowska et al., 2019). Obecność lamininy w cytoplazmie fibroblastów może świadczyć o jej wzmożonej produkcji w fibroblastach

lub fagocytozie z otoczenia komórki, co wskazuje na możliwy udział fibroblastów w niszczeniu błony podstawnej nabłonków (Hoffmann et al., 2009b).

W przebiegu endometrozy, komórki nabłonka powierzchniowego mają mniej jednorodny wygląd i są miejscami zdegenerowane. W ciągłości nabłonka powierzchniowego pojawiają się ubytki i nadżerki. W badaniu elektronowym mikroskopem skaningowym wykazano znaczne zubożenie powierzchni nabłonka powierzchniowego próbek objętych endometrozą, widoczne w postaci zmniejszonej liczby lub braku wypustek cytoplazmatycznych. Obraz ten może być powiązany ze zmianami w ECM i błonie podstawnej nabłonków, które utrudniają przekazywanie substancji odżywczych do komórek nabłonkowych. Można podejrzewać, że uszkodzenia nabłonka powierzchniowego przyczyniają się do łatwiejszej inwazji bakterii i predysponują do zakaźnego *endometritis*. Ponadto, uszkodzenia nabłonka powierzchniowego utrudniają maczyne rozpoznanie ciąży, ze względu na słabsze przekazywanie sygnałów do głębszych warstw endometrium (Kabisch et al., 2019; Lehmann et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020).

Zmiany w obrębie naczyń krwionośnych są często związane z przebudową naczyń w trakcie wcześniejszej ciąży. W przypadku endometrozy włóknienie okołonaczyniowe, skutkujące pogrubieniem zewnętrznej części ściany naczynia, jest silniej wyrażone niż zmiana struktury całej ściany naczynia. Włóknienie okołonaczyniowe w dużym stopniu dotyczy naczyń krwionośnych znajdujących się w błonie podśluzowej, co może przyczyniać się do zmniejszonej adaptacji tych naczyń do faz cyklu jajnikowego i w rozwoju ciąży. W naczyniach krwionośnych i limfatycznych obserwuje się rozstrzeń, świadczącą o zmniejszonej perfuzji i możliwym przekrwieniu biernym. Rozstrzeń naczyń może skutkować tendencją do gromadzenia płynu w macicy. Powiększające się rozstrzenie limfatyczne mogą przybierać postać widocznych makroskopowo torbieli endometrialnych, utrudniających dodatkowo migrację zarodka w macicy we wczesnej ciąży (Ferreira et al., 2015; Flores et al., 1995; Kabisch et al., 2019; McKinnon et al., 2011)

2.4.3. Patogeneza endometrozy

Przebieg procesów patologicznych związanych z endometrozą jest obiektem wielu badań prowadzonych w ostatnim czasie. Zrozumienie mechanizmów prowadzących do zwyrodnienia może z jednej strony przyczynić się do rozwoju strategii zapobiegania nasilaniu się zmian, z drugiej natomiast umożliwić opracowanie

bezpiecznego i dostępnego postępowania terapeutycznego zwiększającego płodność klaczy.

Początkowo rozwój zwyrodnienia endometrium wiązano ze zmianami naczyniowymi rozwijającymi się w endometrium wraz z wiekiem oraz kolejnymi porodami. Według teorii Hanada et al. (2014) przebudowa ściany w obrębie tętnic wiązano ze zmniejszonym zaopatrywaniem narządu w krew. Pogrubienie ściany i rozstrzeń żył może wpływać na przekrwienie bierne ściany macicy, co z kolei wiąże się z rozstrzenią naczyń limfatycznych i upośledzeniem drenażu limfatycznego. Występujący w konsekwencji obrzęk endometrium, wraz z pogarszającym się odżywieniem i dotlenieniem komórek, odpowiada za ich uszkodzenie i zmianę funkcji, widoczną w postaci włóknienia, zwyrodnienia gruczołów macicznych i postępującego spadku płodności. Taka dynamika zmian nie tłumaczy jednak współwystępowania w endometrium objawów endometrozy i prawidłowej struktury naczyń krwionośnych. Obecnie uważa się, że zmiany naczyniowe zachodzą w macicy niezależnie od endometrozy, lecz są związane bezpośrednio z wcześniejszymi ciążami i porodami, z kolei kluczowym kryterium predysponującym do endometrozy jest wiek klaczy (Grüninger et al., 1998; Hanada et al., 2014).

2.4.3.1. Stan zapalny i włóknienie endometrium

Jednym z eksplorowanych obszarów badawczych jest udział zapalenia w procesie włóknienia endometrium. Wraz z wiekiem klaczy, w endometrium może dochodzić do zaburzeń funkcjonowania czynników modulujących działanie układu odpornościowego i przebudowy endometrium, co może wpływać na homeostazę ECM, powodując włóknienie (Katila & Ferreira-Dias, 2022; Skarzynski et al., 2020). Mimo związku zwyrodnienia z wiekiem klaczy, wiązanie patogenezы z eksploatowaniem endometrium i przewlekłym stanem zapalnym jest niepewne, jako że endometroza występuje też u klaczy nieużytkowanych rozrodowo, których endometrium nie mierzyło się z nasieniem, zapaleniem związanym z kryciem, ciążą, porodem i następującą po nim involucją (Katila & Ferreira-Dias, 2022). W badaniach wykorzystujących wielokrotnie indukowane *endometritis*, poprzez inokulację bakterii, po dwóch latach od powtarzającego się bodźca zapalnego nie stwierdzono wzrostu nasilenia zwyrodnienia endometrium po dwóch latach od powtarzającego się bodźca zapalnego (Hoffmann et al., 2009b). Również umiarkowana korelacja pomiędzy stanem zapalnym a stwierdzonym stopniem zwyrodnienia macicy sugeruje, że proces zwyrodniający jest

w jakimś stopniu niezależny od procesów zapalnych (Rebordão et al., 2018). Niemniej, komórki zapalne, cytokiny i inne szlaki sygnałowe związane z zapaleniem są najprawdopodobniej zaangażowane w patogenezę endometrozy.

Warto podkreślić, że faza cyklu jajnikowego, a więc stężenia estrogenów i progesteronu, ma istotny wpływ na dynamikę procesu zapalnego i aktywność leukocytów, co można wiązać z interakcjami hormonów z receptorami tych komórek (Skarzynski et al., 2020). Wydzielane przez komórki zapalne cytokiny stymulują transformację, proliferację i migrację fibroblastów, jak również wpływają na przebudowę ECM poprzez regulację ekspresji MMP i TIMP. Powtarzające się zapalenie może sprzyjać inicjacji zmian związanych z włóknieniem, które następnie nasilają się już niezależnie od występowania stanu zapalnego (Aresu et al., 2012; Lunelli et al., 2013).

Błonowe receptory TLR biorą udział w aktywacji nieswoistej odpowiedzi zapalnej w reakcji na patogeny, indukując produkcję mediatorów zapalenia. Ich aktywacja ma również wpływ na progresję włóknienia i rozwój nowotworów, zwłaszcza w przypadku narządów narażonych na wysoką ekspozycję na bakterie. W endometrium TLR występują w komórkach nabłonkowych i fibroblastach zarówno w prawidłowym endometrium, jak i objętym zwyrodnieniem. Ich aktywacja wiąże się z rozpoczęciem reakcji zapalnej, co może skutkować przewlekłym stanem zapalnym powiązanim z rozwojem włóknienia. Zwiększona transkrypcja mRNA dla TLR2 i TLR4 w kategorii IIA endometrozy sugeruje ich udział w inicjacji reakcji zapalnej powiązanej z początkowym etapem włóknienia (Cerveira–Pinto et al., 2024).

2.4.3.2. Komórki zapalne i NETs

W wielu przypadkach włóknienie endometrium jest skutkiem długo utrzymującego się stanu zapalnego o niewielkim nasileniu, stąd hipoteza, że również w przypadku endometrium klaczy komórki zapalne stanowią ważny aspekt patogenezy (Rebordão et al., 2018). Przykładowo trwale zamknięta lub zwężona szyjka macicy może powodować rozwój endometrozy. Taki stan uniemożliwia prawidłowe oczyszczanie się wnętrza macicy, co prowadzi do gromadzenia się w niej płynu zawierającego liczne neutrofile, a także cytokiny. W takim przypadku IL1 β , IL6 i IL10 i TNF α produkowane w trakcie zapalenia prowadzą do pogorszenia się stanu endometrium i nasilania zwyrodnienia (Skarzynski et al., 2020).

Neutrofile, oprócz fagocytozy i wydzielania enzymów litycznych, zdolne są do tworzenia zewnątrzkomórkowych pułapek (ang. *neutrophil extracellular traps*, NETs), czyli wyrzucania poza komórkę materiału genetycznego wraz z białkami, oplatając w ten sposób patogeny. Proces ten jest aktywowany w endometrium pod wpływem obecności patogennych bakterii, jak również przez białka nasienia w przypadku zapalenia związanego z kryciem. Uwalniane w ten sposób są między innymi mieloperoksydaza, katepsyna G i elastaza, które mogą powodować uszkodzenie komórek i inicjację włóknienia. Dodatek elastazy do hodowli fragmentów endometrium *in vitro* spowodował wzrost produkcji kolagenu typu 1, niezależnie od stanu endometrium i fazy cyklu (Amaral et al., 2018; Rebordão et al., 2018). Katepsyna wywołała podobny efekt, jednak tylko w zwyrodniałym endometrium w fazie pęcherzykowej. Z kolei mieloperoksydaza zwiększyła produkcję zarówno kolagenu typu 1 jak i kolagenu typu 3, niezależnie od fazy cyklu w endometrium objętym zwyrodnieniem. Natomiast w endometrium zdrowym i o niewielkim stopniu zwyrodnienia analogiczne zmiany były uchwytne tylko w fazie pęcherzykowej. Wzrost ilości mRNA dla kolagenu typu 1 pod wpływem katepsyny w większym stopniu dotyczy fazy pęcherzykowej (Amaral et al., 2023; Rebordão et al., 2018). W fazie pęcherzykowej białka NETs powodują również zwiększoną transkrypcję genu odpowiedzialnego za produkcję kolagenu typu 3, dominującego w prawidłowym endometrium i deponowanego w ECM na początku procesu włóknienia. W fazie pęcherzykowej obecne zmiany histopatologiczne nie wpływają na podatność endometrium na działanie białek zawartych w NETs, natomiast w fazie lutealnej endometrium objęte zwyrodnieniem staje się bardziej podatne na ich działanie niż prawidłowa błona śluzowa (Rebordão et al., 2018). Wskazuje to na nasilanie procesu włóknienia pod wpływem osłabionej regulacji ze strony hormonów steroidowych ze względu na mniejszą liczbę ich receptorów w zmienionym endometrium. Różnice w skutkach działania białek zawartych w NETs pomiędzy fazami cyklu mogą sugerować, że typ kolagenu, odkładanego w ECM pod wpływem bodźca uszkadzającego, może być zależny od fazy cyklu jajnikowego w której taki bodziec zadziałał (Katila & Ferreira-Dias, 2022; Rebordão et al., 2018).

Również w odpowiedzi na katepsynę G aktywność MMP2 w endometrium *in vitro* zwiększa się niezależnie od fazy cyklu jajnikowego. Dodatek inhibitora katepsyny do hodowli zniósł ten efekt w fazie pęcherzykowej. W przypadku MMP9 analogiczne działanie katepsyny i jej inhibitora stwierdzono tylko w fazie

pęcherzykowej (Amaral et al., 2020a). W analogicznych badaniach dotyczących mieloperoksydazy stwierdzono wzrost aktywności MMP2 w fazie lutealnej, a MMP9 w fazie pęcherzykowej. Natomiast zastosowanie w hodowli inhibitora mieloperoksydazy poskutkowało zahamowaniem tego działania (Amaral et al., 2021). Jako że źródłem mieloperoksydazy, oprócz NETs, mogą być również makrofagi, wpływ tego enzymu na MMP może występować również przy braku nacieku neutrofilowego (Amaral et al., 2023).

Wyniki dotyczące wpływu enzymów zawartych w NETs poskutkowały dalszymi badaniami dotyczącymi wpływu ich inhibitorów na zmiany zachodzące w ECM. W zastosowaniu inhibitorów NETs dostrzegano szansę na zaproponowanie bezpiecznej i skutecznej terapii endometrozy. Badano sivelestat, inhibitor elastazy, który spowodował zmniejszenie transkrypcji genu dla kolagenu typu 1 niezależnie od fazy cyklu jajnikowego. W fazie pęcherzykowej zmniejszył dodatkowo produkcję PGF2 α , stymulując przy tym produkcję PGE2. Stąd wniosek, że substancja ta może zmniejszać nasilenie włóknienia za pośrednictwem prostaglandyn zwłaszcza w fazie pęcherzykowej, w której intensywność nacieku neutrofilowego jest naturalnie większa (Amaral et al., 2018; Skarzynski et al., 2020). W późniejszych badaniach nad zastosowaniem sivelestatu wykazano w fazie pęcherzykowej hamujący efekt dla wywołanego przez elastazę wzrostu ilości kolagenu. Uzyskane wyniki sugerują, że wzrost ilości kolagenu jest powiązany z aktywnością estrogenową w endometrium. Z kolei zwiększenie ekspresji mRNA dla MMP9 pod wpływem elastazy wystąpiło w krótszym czasie w fazie lutealnej niż w fazie pęcherzykowej (Amaral et al., 2020b). Inny testowany pod tym kątem związek, noskapina, spowodował zahamowanie wpływu elastazy i katepsyny G na wzrost produkcji kolagenu w wycinkach endometrium, w obu fazach cyklu jajnikowego dla elastazy i w fazie pęcherzykowej dla katepsyny (Amaral et al., 2023; Skarzynski et al., 2020).

2.4.3.3. Stan zapalny i niszczenie błony podstawnej nabłonka gruczołowego

Podczas oceny histopatologicznej skrawków endometrium, często stwierdzanym zjawiskiem jest obecność okołogruzołowego nacieku komórek zapalnych. Naciek tego typu występuje nie tylko w przypadku *endometritis*, ale również w zdrowym endometrium bez oznak zapalenia (Klose & Schoon, 2016). Naciek limfocytarny dookoła gruczołów dotkniętych niszczeniem błony podstawnej może być skutkiem reakcyjnego przemieszczenia komórek zapalnych do miejsca uszkodzenia

lub świadczyć o udziale tych komórek w niszczeniu błony podstawnej. Za niszczenie błony podstawnej mogą być odpowiedzialne enzymy lityczne produkowane przez limfocyty, ponieważ uszkodzenie błony podstawnej jest jednym z elementów propagujących proces zapalny wokół gruczołu. Co więcej, uszkodzenie błony podstawnej skutkuje nasileniem procesów naprawczych, co przy ich zaburzonej regulacji może wiązać się z włóknieniem okolicznej tkanki łącznej (Klose & Schoon, 2016; Schöniger & Schoon, 2020).

Obecność makrofagów jest również stwierdzana w nacieku okołogruczołowym. Komórki te biorą czynny udział w wielu procesach włóknienia, a ich kierunek działania zależy od podtypu komórek i środowiska cytokinowego. Subpopulacja M1 produkuje TNF α i IL1 β zwiększające aktywność miofibroblastów, natomiast subpopulacja M2 produkuje transformujący czynnik wzrostu beta 1 (ang. *transforming growth factor beta 1*, TGF β 1) powodujący transformację miofibroblastów (Kim et al., 2018; Skarzynski et al., 2020). Natomiast udział komórek tucznych w endometrozie jest w dużej mierze nieznany, chociaż w innych narządach u koni stwierdzano ich zaangażowanie w procesy włóknienia. Komórki tuczne mogą wydzielać enzymy lityczne i mediatory zapalenia, a długotrwały kontakt z bodźcem uszkodzającym powoduje ich proliferację. Wydzielane przez komórki tuczne histamina i tryptaza mogą zwiększać ekspresję α SMA, a dłuższa obecność tych komórek w endometrium może skutkować jego włóknieniem (Skarzynski et al., 2020). W fibroblastach zlokalizowanych w pobliżu gruczołów objętych okołogruczołowym naciekiem komórek zapalnych zwiększa się ekspresja wimentyny, desminy i α SMA, wskazując na zachodzącą w nich transformację, prawdopodobnie w wyniku działania cytokin produkowanych przez leukocyty. Z tych względów naciek okołogruczołowy warto brać pod uwagę zarówno w kontekście patogenezy endometrozy jak i w kontekście dynamiki zmian zachodzących w endometrium przy ocenie histopatologicznej skrawków endometrium (Hoffmann et al., 2009b; Klose & Schoon, 2016).

Okołogruczołowy naciek komórek zapalnych i zmiany dotyczące fibroblastów mogą wskazywać na istotny udział w patogenezie uszkodzenia błony podstawnej nabłonków, co jest określane jako niszczący typ endometrozy (Hoffmann et al., 2009b; Mambelli et al., 2014). W ogniskach niszczącego zwyrodnienia stwierdza się występowanie miofibroblastów, a także zwiększoną ekspresję fibronektyny i proteoglikanów (głównie siarczanu chondroityny), co może być skutkiem działania transformowanych komórek. Stąd jedna z hipotez początkowego etapu patogenezy

obejmuje zgrubienie błony podstawnej wpływające na funkcjonowanie nabłonków. Mogłoby być to spowodowane okołogruzołowym naciekiem zapalnym, niedotlenieniem komórek w wyniku zmian naczyniowych, regeneracji po działaniu uszkodzającego bodźca mechanicznego lub zaburzeń normalnej przebudowy błony podstawnej. Zmiany w obrębie błony podstawnej skutkowałyby różnicowaniem i zwiększeniem aktywności pobliskich fibroblastów, które po transformacji mogą wydzielać enzymy oddziałujące na błonę podstawną i nasilające dalszą kaskadę zmian (Hoffmann et al., 2009b).

W endometrozie ekspresja lamininy stwierdzana jest nie tylko w błonach podstawnych, ale też głębiej w macierzy zewnątrzkomórkowej. Nietypowa ekspresja lamininy może być skutkiem niszczenia błon podstawnych i uwalniania zawartej w nich lamininy, lub jej syntezy przez komórki macierzy. Miofibroblasty są zdolne do wytwarzania wokół siebie niepełnej struktury błony podstawnej dzięki czemu mogą dłużej utrzymywać zmieniony fenotyp. Z tego względu fibroblasty mogą potencjalnie odpowiadać za zmienioną ekspresję lamininy.

Warto zauważyć, że domaciczne podanie mezenchymalnych komórek macierzystych poskutkowało zmniejszeniem ilości nieprawidłowo zlokalizowanej lamininy, sugerując, że zmiana w jej ekspresji w endometrium związana jest raczej ze zwiększoną syntezą przez komórki macierzy, hamowaną pod wpływem cząsteczek sygnałowych produkowanych przez komórki macierzyste (Mambelli et al., 2014). Domaciczne podanie mezenchymalnych komórek macierzystych spowodowało również spadek ekspresji α SMA i większą ekspresję Ki67 w endometrium (Mambelli et al., 2014), co czyni medycynę regeneracyjną jednym z obiecujących kierunków dalszych badań nad potencjalnym leczeniem endometrozy.

2.4.3.4. Przebudowa ECM

Spośród głównych składników ECM, w prawidłowym endometrium dominuje kolagen typu 3.

W miarę postępowania zwyrodnienia i włóknienia endometrium, a także w początkowym etapie procesów naprawczych, udział kolagenu typu 3 zmniejsza się na rzecz kolagenu typu 1. Kolagen typu 2 występuje głównie w tkance chrzęstnej i jest rzadziej rozpatrywany w kontekście włóknienia. W endometrium stwierdzono większą transkrypcję dla tego kolagenu w kategorii II endometrozy, względem prawidłowego endometrium i bardziej nasilonego zwyrodnienia (Centeno et al., 2024). Transkrypcja

mRNA dla kolagenu typu 1 w największym stopniu zwiększa się w kategorii IIB, a dalsza progresja włóknienia do kategorii III jest prawdopodobnie związana z mającym miejsce wcześniej sygnałem do produkcji większej ilości kolagenu (Cerveira–Pinto et al., 2024; Rebordão et al., 2018). W innych badaniach dotyczących ekspresji mRNA nie stwierdzono różnic dla kolagenu typu 1 i typu 3 pomiędzy kategoriami nasilenia endometrozy, fazami cyklu, ani wiekiem badanych klaczy, przy jednoczesnym zwiększonym udziale włókien kolagenowych w ECM. Stąd prawdopodobna jest hipoteza, że zwiększona depozycja kolagenu związana jest z jego zmniejszonym rozkładem w wyniku zaburzonej homeostazy w ECM. Innym wytłumaczeniem jest kilkukrotnie większa trwałość zdeponowanego białka od cząsteczek mRNA, która będzie nadal uchwytana w sytuacji, gdy materiał do badania został pobrany już po zakończeniu zwiększonej produkcji kolagenu (Alpoim–Moreira et al., 2022a; Alpoim–Moreira et al., 2022b; Rebordão et al., 2018). W zwyrodniałym endometrium zwiększa się też ilość hydroksyproliny, ważnego składnika włókien kolagenowych wpływającego na ich wytrzymałość mechaniczną. Ze względu na występowanie hydroksyproliny głównie we włóknach kolagenowych i elastynowych może być ona wykorzystywana jako marker włóknienia (Alpoim–Moreira et al., 2022b).

Chociaż mogłoby się wydawać, że kwestia zwiększonej ilości kolagenu w przypadku włóknienia jest bezdyskusyjna, dostępne są również badania, w których nie stwierdzono takich różnic, zaobserwowano natomiast większą depozycję składników błony podstawnej (lamininy i fibronektyny) i kwasu hialuronowego w ECM. Próba wytłumaczenia tego zjawiska może być wczesny etap zachodzących zmian w obrębie macierzy, związany z uszkodzeniem błon podstawnych nabłonków i skutkujący zmianą środowiska cytokinowego i zwiększeniem ilości kolagenu w endometrium (Walter et al., 2001a; Walter et al., 2001b).

Kolagen typu 1, kolagen typu 3 i hydroksyprolina były rozpatrywane jako potencjalne markery endometrozy dostępne do badania w surowicy. Najbardziej użyteczny w tym celu wydaje się kolagen typu 3, którego oznaczenie w surowicy umożliwiło rozróżnienie klaczy ze zdrowym endometrium i endometrozą niezależnie od stopnia nasilenia. Niestety metoda ta nie pozwala na rozróżnienie klaczy płodnych od tych o obniżonej płodności. Należy przy tym wziąć pod uwagę, że włókna kolagenowe występują w różnych tkankach i narządach, stąd przebudowa, procesy naprawcze lub włóknienie w ich obrębie mogą również wpływać na stężenia kolagenu i hydroksyproliny w surowicy (Alpoim–Moreira et al., 2022b).

2.4.3.5. Przebudowa ECM i aktywność MMP, TIMP i ADAMTS

Ekspresja MMP i TIMP zależna jest od fazy cyklu jajnikowego, a także stopnia zwyrodnienia błony śluzowej. Ich aktywność w tkankach jest zwykle niska, a zwiększa się podczas procesów zapalnych i w przebudowie tkanek. W większości przypadków MMP są wydzielane do macierzy w formie proenzymów, które są następnie aktywowane przez różne mediatory, w tym $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ i same MMP. Aktywacja MMP stanowi dodatkową możliwość regulowania ich aktywności, poza wpływaniem na transkrypcję genu, produkcję białka czy hamowanie jego działania przez inhibitory, takie jak TIMP (Amaral et al., 2020a; Aresu et al., 2012). W endometrium, w zależności od nasilenia endometrozy, dochodzi do zmian w ekspresji MMP1, -2, -3, -9 i -13, oraz TIMP-1 i -2 (Alpoim-Moreira et al., 2022a; Szóstek-Mioduchowska et al., 2023; Szóstek-Mioduchowska et al., 2020b).

W zdrowym endometrium w trakcie cyklu jajnikowego ekspresja MMP2 i -9 jest niska niezależnie od fazy, natomiast aktywność TIMP2 w fazie lutealnej jest wyższa niż w fazie pęcherzykowej. TIMP2 początkowo aktywuje działanie MMP2, natomiast w wyższych stężeniach działa hamująco. W stanach zapalnych macicy produkcja MMP2 i -9 znacząco się zwiększa, a wydłużona ekspozycja na zapalenie może przez to powodować zwiększenie ilości kolagenu. Zmniejszony poziom TIMP2 w zapaleniu może być związany ze zwiększeniem uwodnienia tkanki łącznej, a nie spadkiem produkcji, niemniej może to działać stymulująco na działanie MMP2, zamiast je hamować (Amaral et al., 2020a; Oddsdóttir, 2007; Szóstek-Mioduchowska et al., 2020b; Szóstek-Mioduchowska et al., 2023). W badaniu Centeno et al. (2024) ekspresja genu dla TIMP2 zmniejszyła się w zaawansowanej endometrozie, co również umożliwia wzrost aktywności MMP2. W kategorii III endometrozy stwierdzono niższą ekspresję genu dla MMP1 względem prawidłowego endometrium i kategorii II (Centeno et al., 2024). W endometrozie wykazano zwiększenie ekspresji MMP2 (zdolnej do rozkładu kolagenu typu 1, włókien elastynowych, ale także kolagenu typu 4 i lamininy, a więc składników błony podstawnej nabłonków), które powiązano z degeneracją gruczołów macicznych. Z kolei MMP9 odpowiada za rozkład kolagenu typu 3, nie wpływając na kolagen typu 1, stąd jej aktywność mogłaby tłumaczyć zmiany w proporcji między typami kolagenu w zwyrodniałym endometrium (Amaral et al., 2021; Centeno et al., 2024; Oddsdóttir, 2007; Rebordão et al., 2014b; Wong et al., 2023). Co ciekawe, obecność MMP9 w endometrium została stwierdzona w ECM, a także w eozynofilach, które również mogą być źródłem $\text{TGF}\beta 1$. Rola $\text{TGF}\beta 1$

w zwiększeniu produkcji składników ECM została stwierdzona w badaniach dotyczących fibroblastów w skórze (Oddsdóttir, 2007).

W innych badaniach ekspresja MMP2 i -9 nie różniła się między zdrowym a zwyrodniałym endometrium, pomimo zwiększonej ilości kolagenu typu 4 wokół gruczołów macicznych i gniazd gruczołowych (Aresu et al., 2012). U starszych kłaczy stwierdzono mniejsze występowanie transkryptów dla MMP9, z kolei we fragmentach endometrium poddanych hodowli z TGFβ1 produkcja MMP9 zwiększyła się (Amaral et al., 2021; Crociati et al., 2019). Stwierdzano również spadek ilości mRNA dla MMP2 i MMP9 wraz z nasileniem endometrozy, przy jednoczesnym braku zmian w mRNA dla kolagenu typu 1. Wraz z nasileniem zwyrodnienia zwiększała się metylacja MMP2 i MMP9, która była proporcjonalna do spadku ekspresji ich genów, sugerując raczej ich rolę w hamowaniu procesu włóknienia niż w jego progresji. W tym samym badaniu stwierdzono również wzrost transkrypcji TIMP1 wraz z postępem endometrozy, przy braku różnic w metylacji genu dla TIMP1, co wpływa na jego utrzymującą się produkcję. Z kolei w przypadku TIMP2 nie stwierdzono różnic związanym z nasileniem włóknienia (Alpoim-Moreira et al., 2022a).

Dezintegryny i metaloproteinazy z motywem trombospondyny (ang. *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*, ADAMTS) to grupa enzymów zawierających cynk związana z przebudową ECM, zwłaszcza w kontekście rozkładu prokolagenu i niektórych proteoglikanów. W endometrium kategorii IIB endometrozy zwiększa się ekspresja genu dla ADAMTS1, -4 i -5, z kolei jest ona zmniejszona dla ADAMTS9, -12 i -19. O ile kierunek działania i wzajemne zależności między ADAMTS nie są do końca poznane, zmiany w ich ekspresji występują w zmianach fibrotycznych w różnych narządach. IL1, IL17, TNFα, TGFβ1 oraz fibronektyna nasilają ekspresję i aktywację ADAMTS4, sugerując udział tego enzymu w patogenezie endometrozy. Fibroblasty hodowane z TGFβ1, niezależnie od stopnia zwyrodnienia endometrium, zwiększają transkrypcję genu dla ADAMTS4 i zmniejszając dla ADAMTS5. Wzrost ekspresji ADAMTS1 stwierdzono w fibroblastach z endometrium kategorii IIA, natomiast zmniejszenie ekspresji mRNA dla ADAMTS9 stwierdzono tylko w komórkach z endometrium kategorii IIB, co świadczy o zmieniającej się dynamice działania ADAMTS w zależności od stopnia zwyrodnienia endometrium (Szóstek-Mioduchowska et al., 2023).

2.4.3.6. Zmiana fenotypu fibroblastów

Komórki zapalne i komórki endometrium pod wpływem bodźca uszkodzającego mogą wydzielać cytokiny stymulujące włóknienie, co w sposób parakrynnny może wpływać na aktywność fibroblastów i ich transformację w miofibroblasty. Podczas transformacji dochodzi do zwiększenia ekspresji wimentyny, desminy, oraz α SMA, które umożliwiają miofibroblastom kurczenie się i przetrwanie w tkance łącznej o większej sztywności (Klose & Schoon, 2016). W endometrium klaczy miofibroblasty w początkowym etapie włóknienia zlokalizowane są przede wszystkim koncentrycznie wokół gruczołów macicznych. Stwierdzono również pozytywną korelację pomiędzy obecnością miofibroblastów, a nasileniem endometrozy, co dowodzi udziału transformacji fibroblastów w patogenezie zwyrodnienia (Szóstek–Mioduchowska et al., 2023). Utrzymujący się udział miofibroblastów w endometrium może być związany ze zmniejszeniem ich podatności na czynniki wywołujące apoptozę. Natomiast koncentryczne ułożenie wokół gruczołów macicznych i bardziej obfity cytoszkielet sugeruje możliwość wywierania mechanicznego nacisku na gruczoły, co tłumaczy rozstrzeń gruczołów i zwyrodnienie komórek nabłonkowych. Zmniejszona w przekształconych komórkach ekspresja receptorów dla hormonów steroidowych może wpływać na brak równowagi w prowadzonej przez nie przebudowie ECM w trakcie cyklu jajnikowego (Hoffmann et al., 2009b; Wong et al., 2023).

Najlepiej dotychczas poznanym czynnikiem regulującym transformację fibroblastów jest TGF β 1. W transformowanych fibroblastach TGF β 1 wiąże się ze specyficznym receptorem i aktywuje czynniki transkrypcyjne zwiększające produkcję włókien ECM i elementów cytoszkieletu. TGF β 1 jest produkowany przede wszystkim przez leukocyty. W tkankach ssaków TGF β 1 znajduje się w znacznej ilości w nieaktywnej formie. W przypadku aktywacji, jego ilość jest wystarczająca do wywołania silnego włóknienia. Stąd mechanizmy regulujące jego aktywację są bardziej istotne, z punktu widzenia patogenezy włóknienia niż zwiększenie produkcji TGF β 1 (Kim et al., 2018).

Fibroblasty wykazujące wyższą ekspresję elementów cytoszkieletu, są prawdopodobnie zdolne do aktywacji TGF β 1 za pośrednictwem integryn (Kim et al., 2018). Czynniki te uwalniane są głównie przez makrofagi pod wpływem bodźca zapalnego, hamując mechanizmy odporności nieswoistej i wspierając mechanizmy regeneracyjne. Wydłużone działanie bodźca i uwalnianie TGF β 1 prowadzi do nadmiernej produkcji kolagenu i włóknienia (Szóstek–Mioduchowska et al., 2023;

Wong et al., 2023). Udział TGFβ1 w endometrozie potwierdza zwiększenie jego aktywności wraz ze stopniem nasilenia endometrozy. Natomiast hodowla fibroblastów pobranych z endometrium klaczy z dodatkiem TGFβ1 powoduje zwiększenie zarówno ilości mRNA, jak i ostatecznego produktu dla kolagenu typu 1 i 3. Pod wpływem TGFβ1, w fibroblastach, zwiększa się produkcja elementów cytoszkieletu oraz dochodzi do stymulacji proliferacji fibroblastów (Szóstek–Mioduchowska et al., 2023; Szóstek–Mioduchowska et al., 2019; Wong et al., 2023). TGFβ1 wpływa też na aktywność MMP i TIMP w fibroblastach i komórkach nabłonkowych, co dowodzi jego kluczowej roli w patogenezie endometrozy. TGFβ1 stymuluje uwalnianie MMP1, MMP9 i MMP13 oraz zmniejsza aktywność MMP3. Również wpływ na TIMP nie jest jednostronny, jako że TGFβ1 zwiększa uwalnianie TIMP1 i jednocześnie zmniejsza uwalnianie TIMP2 do macierzy (Szóstek–Mioduchowska et al., 2020b; Szóstek–Mioduchowska et al., 2020c; Szóstek–Mioduchowska et al., 2023). Warto podkreślić, że komórki zapalne w endometrium także produkują MMP i TIMP, bezpośrednio wpływając na ilość kolagenu w tkance łącznej zrębu. Są one również prawdopodobnie głównym źródłem cytokin, takich jak IL1α, IL1β, IL6, IL10 i TNFα, których udział stwierdzono w patogenezie endometrozy (Katila & Ferreira–Dias, 2022; Skarzynski et al., 2020).

2.4.3.7. Zmiana fenotypu nabłonka

Źródłem miofibroblastów mogą być nie tylko fibroblasty, ale również komórki śródbłónka i inne komórki nabłonkowe, które mogą być poddane przemianie nabłonkowo–mezenchymalnej. Jednak ta transformacja nie musi być przyczyną obserwowanych zmian w obrazie komórek nabłonkowych w endometrozie. TGFβ1 może powodować w nabłonkach zmniejszenie ilości białek odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe i stymulować migrację komórek. Transformowane komórki nabłonkowe, podobnie jak w przypadku fibroblastów, charakteryzuje większa ekspresja elementów cytoszkieletu, przede wszystkim αSMA, dzięki czemu mają większą zdolność do kurczenia się i zwiększoną wytrzymałość w zwłókniałym endometrium o większej sztywności. Transformowane komórki nabłonkowe charakteryzują się też mniejszą podatnością na apoptozę, co sprzyja ich przedłużonemu przebywaniu w endometrium i większej syntezie włókien kolagenowych (Alpoim–Moreira, 2023; Skarzynski et al., 2020; Szóstek–Mioduchowska et al., 2023). Wysoka ekspresja αSMA w takich komórkach jest oznaką ich większej aktywności sekrecyjnej w kontekście składników ECM. Natomiast wydłużona stymulacja czynnikami

zwiększającymi produkcję składników macierzy może powodować powstanie fenotypu miofibroblastów, które w bardziej autonomiczny sposób utrzymują syntezę włókien ECM bez konieczności działania dodatkowych bodźców (Alpoim–Moreira, 2023).

Zmiany dotyczące komórek nabłonkowych w ogniskach zwyrodnienia dotyczą uszkodzeń w obrębie jądra komórkowego i mitochondriów, zmniejszenia liczby wypustek cytoplazmatycznych, zmiany w ekspresji cząsteczek związanych z odpornością nieswoistą oraz zmian w składzie produkowanej wydzieliny. W transformowanych komórkach nabłonkowych stwierdzono również wzrost ekspresji wimentyny i kalponiny przy jednoczesnym braku zmian w produkcji α SMA, co może świadczyć o niecałkowitym różnicowaniu w komórki o fenotypie mioepitelialnym (Minkwitz et al., 2019). Kalponina może odpowiadać za wiązanie się z aktyną i desminą, reguluje również funkcje komórki w zakresie migracji, proliferacji i różnicowania. Jednak w innych badaniach stwierdzano również spadek ekspresji wimentyny w endometrium o dużym nasileniu zmian zwyrodnieniowych (Minkwitz et al., 2019; Rojas et al., 2020).

O zmianie funkcji nabłonka gruczołowego świadczy zmiana charakteru produkowanej wydzieliny, mogąca wynikać ze zmiany fenotypu pod wpływem cząsteczek sygnałowych produkowanych w otoczeniu gruczołów, zaburzenia regulacji hormonalnej ze względu na zmiany w ekspresji receptorów lub w wyniku uszkodzenia. Zmniejszenie produkcji kalbindyny, uterokaliny, uteroglobiny i glikogenu powoduje pogorszenie odżywienia zarodka podczas migracji w świetle macicy i większej podatności zarodka na reakcję immunologiczną, co może prowadzić do wczesnego zamierania zarodków (Hoffmann et al., 2009a). Spadek jakości produkowanego mleczka macicznego może wynikać nie tylko z uszkodzenia komórek nabłonkowych, ale może być związany z przyjmowaniem przez nie innego fenotypu pod wpływem środowiska cytokinowego w endometrium (Minkwitz et al., 2019). Jednak zmiana ta wydaje się być odwracalna, ponieważ po tygodniu od miejscowego podania mezenchymalnych komórek macierzystych zanika zaburzona ekspresja α SMA w gruczołach macicznych. Uzyskane wyniki sugerują odwracalność różnicowania nabłonków pod wpływem działania mediatorów produkowanych przez komórki macierzyste (Mambelli et al., 2014).

2.4.3.8. Regulacja hormonalna

Często zauważaną zmianą w obrębie zwyrodniałych gruczołów jest zmniejszenie w ich komórkach ekspresji receptorów dla hormonów steroidowych, choć w badaniach Waltera et al. nie stwierdzono różnic pomiędzy zmienionymi a prawidłowymi gruczołami (Hoffmann et al., 2009b; Walter et al., 2001a; Walter et al., 2001b). Zmniejszona ekspresja ER i PR w nabłonku gruczołowym powoduje zmniejszenie wpływu fazy cyklu jajnikowego na funkcjonowanie gruczołów oraz skład ich wydzieliny. Różnicowanie gruczołów może w takim przypadku zależeć w większym stopniu od niezależnych od cyklu sygnałów parakrynnych pochodzących z otaczających komórek. Ponadto, w przypadku uszkodzenia błony podstawnej przekazywanie sygnałów hormonalnych przez ECM do gruczołów macicznych jest zaburzone (Lehmann et al., 2011).

Niewielki wzrost ekspresji receptorów dla hormonów płciowych stwierdzono w przypadku endometrozy bez niszczenia błony podstawnej gruczołów z aktywnymi metabolicznie fibroblastami. W pozostałych podtypach endometrozy ekspresja omawianych receptorów zmniejsza się wraz z progresją choroby, w największym stopniu w endometrozie niszczącej. Może mieć to związek z pośrednictwem fibroblastów w działaniu hormonów na nabłonek gruczołowy, który ulega zaburzeniu w zwyrodniałym endometrium. Z drugiej strony, może za to odpowiadać też zmieniona ekspresja lamininy, jako że tylko nieuszkodzona błona podstawna umożliwia prawidłową komunikację między nabłonkiem gruczołowym, a otaczającą go macierzą. Zmniejszoną ekspresję receptorów można również wiązać ze zwyrodnieniem komórek nabłonkowych, a także zmniejszeniem ilości połączeń pomiędzy komórkami nabłonka, z czego może wynikać wzrost w ekspresji wimentyny (Hoffmann et al., 2009b).

Zmniejszenie ekspresji ER i PR dotyczy również fibroblastów, zwłaszcza w ogniskach włóknienia. Fibroblasty pobrane z endometrium w fazie pęcherzykowej, podczas hodowli z TGFβ1 zmniejszyły ekspresję ER. Spadek ten może być związany z przyjmowaniem przez fibroblasty fenotypu miofibroblastów (Wong et al., 2023). Podobny wpływ TGFβ1 na ERα obserwowano również w badaniach dotyczących włóknienia w płucach oraz nowotworów gruczołu mlekowego (Kunzmann et al., 2018). Wyższa ekspresja genów związanych z włóknieniem w fazie pęcherzykowej niż w fazie lutealnej może mieć związek z zahamowaniem produkcji ER pod wpływem TGFβ1, co może odblokowywać procesy regulowane przez szlak jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of*

activated B cells, NFκB). Wiązanie estrogenów z ERα może bowiem hamować procesy zapalne które są przezeń mediowane (Monteiro et al., 2014). Natomiast zmniejszenie ekspresji genu dla receptora progesteronowego (*PGR*) stwierdzono zarówno w hodowli endometrium z samym TGFβ1, jak i w połączeniu z cytokinami prozapalnymi (Wong et al., 2023). Jako że efekt działania receptorowego progesteronu obejmuje również hamowanie procesów zapalnych, poprzez promowanie produkcji IL10 i zmniejszanie produkcji IL1β, IL6 i TNFα, można zaobserwować spadek aktywności szlaku NFκB. W konsekwencji zmniejszenie ekspresji *PGR* sprzyja środowisku cytokinowemu promującemu włóknienie. Potwierdza to również niższa fosforylacja białek SMAD2 i SMAD3, pośredniczących w działaniu TGFβ1, w fibroblastach w fazie lutealnej, która zwiększa się pod wpływem TGFβ1, zwiększając jego potencjał profibrotyczny (Wong et al., 2023).

2.4.3.9. Regulacja humoralna i rola cytokin

IL1α, IL1β, IL6, IL10 i TNFα wpływają w endometrium na zmianę produkcji TGFβ1, TIMP1 i kolagenu typu 1 (Crocianti et al., 2019). IL6 i IL1β biorą udział w procesach włóknienia dotyczących różnych narządów. IL6 odpowiada za stymulację syntezy cząsteczek adhezyjnych komórek i innych cytokin, a także za aktywację limfocytów T (Domino et al., 2020). Jej ekspresja jest większa u starszych kłacz, a w przypadku endometrozy zwiększa uwalnianie kolagenu typu 1 i 3 oraz fibronektyny niezależnie od stopnia zwyrodnienia. Działanie IL1β zwiększa syntezę kolagenu typu 1 tylko w zdrowym i silnie zwyrodniałym endometrium. Interleukiny te wpływają również na wydzielanie MMP i TIMP, jednak zakres regulowanych enzymów i kierunek tej regulacji zależy od stopnia zwyrodnienia endometrium, co wskazuje na dużą dynamikę zmian w obrębie ECM, a także niezwykle złożony układ mediatorów na nią wpływających (Crocianti et al., 2019; Szóstek–Mioduchowska et al., 2020b; Szóstek–Mioduchowska et al., 2023). W wycinkach zdrowego i objętego niewielkimi włóknieniem endometrium, IL6 spowodowała zmniejszenie ekspresji MMP9. Z kolei w endometrium z bardziej nasilonym zwyrodnieniem ekspresja MMP9 zwiększyła się. U starszych zwierząt wyższa transkrypcja genu dla IL6 została stwierdzona jednocześnie z niższą transkrypcją genu dla MMP9, co wydaje się potwierdzać zależność między nimi (Crocianti et al., 2019; Szóstek–Mioduchowska et al., 2018). W badaniach dotyczących aktywacji szlaku NFκB w endometrium objętym zwyrodnieniem stwierdzono spadek transkrypcji genu dla IL6, z wyjątkiem aktywnej

niszczącej endometrozy w fazie pęcherzykowej. Może być to związane z większą produkcją mediatorów zapalenia w związku z niszczeniem błony podstawnej (Jasiński et al., 2021).

Ekspresja IL1 i IL6 w trakcie cyklu jajnikowego zmienia się w endometrium, wskazując na ich możliwą rolę w regulacji cykliczności poprzez oddziaływanie na syntazy prostaglandyn. Wpływ interleukin na prostaglandyny w zmienionym endometrium zmniejsza się, jednak nadal mogą one być odpowiedzialne za zmieniające się stężenia prostaglandyn w przypadku endometrozy. IL1 α i IL1 β dodatkowo stymulują w fazie lutealnej produkcję, działającą luteotropowo i hamującą włóknienie, PGE2 (Szóstek et al., 2013). Większą ekspresję TNF α stwierdzono również w kategorii II endometrozy, w porównaniu z kategorią III i zdrowym endometrium. Wykazano również koekspresję TNF α i kolagenu typu 2 (Centeno et al., 2024).

Hodowla fibroblastów z endometrium w fazie pęcherzykowej z dodatkiem TGF β 1 oraz IL1 β , IL6 i/lub TNF α nie wpłynęła na zmianę fenotypu i ekspresję elementów cytoszkieletu fibroblastów. Kombinacje dodatków TGF β +IL6 i TGF β +IL1 β +IL6+TNF α w hodowli tych fibroblastów poskutkowały za to wzrostem ekspresji genów dla czynnika wzrostu tkanki łącznej (ang. *connective tissue growth factor*, CTGF) i kolagenu typu 1, wskazując na ważną rolę IL6 w rozwoju i nasileniu procesu włóknienia. Pod wpływem IL6 w fibroblastach zwiększyła się też ekspresja dla MMP9, zwiększając jej udział względem TIMP1, co w endometrium mogło skutkować zwiększeniem depozycji włókien ECM. Hodowane z cytokinami prozapalnymi fibroblasty zmniejszyły ekspresję MMP2 w fazie pęcherzykowej, co tłumaczy wzrost produkcji i depozycji kolagenu typu 1 (Wong et al., 2023). Transkrypcja genu dla TIMP1 i TIMP2 zwiększyła się w fazie pęcherzykowej, zwłaszcza przy dodatku cytokin prozapalnych, natomiast w fazie lutealnej tylko dla TIMP1, stąd proporcja MMP2:TIMP2 zmienia się na korzyść MMP2, potencjalnie hamując włóknienie w tej fazie. W tym samym badaniu pod wpływem TGF β 1 i innych cytokin stwierdzono także wzrost ekspresji genu *SLUG*, biorącego udział w regulacji przejścia epitelialno–mezenchymalnego, mechanizmach antyapoptotycznych oraz zwiększeniu syntezy kolagenu typu 1 (Wong et al., 2023).

CTGF jest produkowany przez fibroblasty i komórki śródbłónka naczyniowego. Reguluje on homeostazę tkanki łącznej poprzez stymulowanie fibroblastów do podziałów, migracji i syntezy elementów ECM. CTGF wpływa też bezpośrednio na działanie TGF β 1. W hodowanych in vitro wycinkach endometrium CTGF powodował

wzrost stężenia TGFβ1 i TIMP1 w fazie lutealnej, a także zwiększenie transkrypcji receptora dla TGFβ1, kolagenu typu 1 i kolagenu typu 3. W fazie pęcherzykowej produkcja TIMP1 również się zwiększyła, natomiast nie zaobserwowano zmian związanych z TGFβ1. Może to wskazywać na większy udział CTGF w procesie włóknienia w fazie lutealnej, który przebiega za pośrednictwem TGFβ1 (Rebordão et al., 2014a; Rebordão et al., 2014b).

2.4.3.10. Regulacja humoralna i rola prostaglandyn

W trakcie cyklu jajnikowego najniższą ekspresję mRNA dla cyklooksygenazy 2 stwierdzono we wczesnej fazie lutealnej. Z kolei najwyższą ekspresję odnotowano pod koniec fazy lutealnej, kiedy produkowana jest PGF2α w celu indukcji luteolizy. W drugiej połowie fazy lutealnej wzrasta ekspresja mRNA dla syntazy PGF2α, chociaż najwyższy poziom produktu występuje w fazie pęcherzykowej. Wzrost ten może mieć związek z nasileniem kurczliwości mięśniówki macicy w celu oczyszczania macicy z płynu, związanego z rują i kryciem. Dla syntazy PGE2 najwyższa ekspresja mRNA występuje w drugiej części fazy lutealnej, natomiast największe stężenia PGE2 stwierdzono w połowie fazy lutealnej. Może to wskazywać na przekształcanie PGE2 w PGF2α pod koniec fazy lutealnej, co ma związek z luteolizą. Zmiany w ekspresji dotyczą przede wszystkim nabłonka powierzchniowego i nabłonka gruczołowego w warstwie zbitej endometrium, wskazując na związek z komunikacją warunkującą rozpoznanie obecności zarodka w świetle macicy. We wczesnej ciąży zmniejsza się transkrypcja genu dla cyklooksygenazy 2, przy jednoczesnym wzroście transkrypcji dla syntaz PGF2α i PGE2, co wskazuje na istotną rolę prostaglandyn w utrzymaniu ciąży na wczesnym etapie (Boerboom et al., 2004; Szóstek et al., 2012).

PGF2α ma działanie stymulujące depozycję kolagenu w ECM. Pod wpływem jej działania dochodzi do zwiększenia depozycji kolagenu typu 1. Wydzielanie PGF2α w kontakcie z nasieniem powoduje zwiększenie nacieku neutrofilowego, który poprzez NETs może dalej zwiększać produkcję PGF2α. PGF2α bierze też udział w regulacji homeostazy ECM poprzez stymulowanie MMP2 i MMP13 i hamowanie MMP1 w fibroblastach. Jako że PGF2α jest produkowana w endometrium w trakcie cyklu prawdopodobne jest, że bierze ona udział w patogenezie endometrozy, a zaburzenia związane z jej syntezą mogą powodować przedwczesną luteolizę skutkującą utratą ciąży. Z kolei PGE2, działając poprzez receptor 2 i 4 zapobiega włóknieniu endometrium, również wywołanemu przez białka obecne w NETs (Rebordão et al.,

2018; Skarzynski et al., 2020; Szóstek–Mioduchowska et al., 2020c). PGE2 wpływa na aktywność MMP, regulując przebudowę ECM, stąd zmniejszenie ekspresji PGE2 lub receptora dla PGE2 powoduje nasilenie włóknienia. W fazie lutealnej, pod wpływem wysokiego stężenia progesteronu i niskiego stężenia estrogenu zwiększa się ekspresja syntazy PGE2 w endometrium. W endometrioze stwierdzono również spadek transkrypcji genu dla PGE2 wraz z nasileniem zmian. W badaniach dotyczących zwłóknienia płuc, spadek ekspresji receptora dla PGE2 w fibroblastach skutkował ich transformacją w miofibroblasty. Z drugiej strony, PGE2 mimo mniejszego powinowactwa może też wiązać się z receptorem PTGFR, powodując działanie analogiczne do PGF2 α (Byron et al., 2024; Katila & Ferreira–Dias, 2022; Rebordão et al., 2014a; Szóstek–Mioduchowska et al., 2023). Elastaza, mieloperoksydaza, katepsyna G, a także CTGF powodują w endometrium spadek produkcji PGE2, zwiększając przy tym produkcję kolagenu. (Rebordão et al., 2014a). W fibroblastach w fazie pęcherzykowej hodowanych z TGF β 1 obserwowano spadek produkcji PGE2 (Wong et al., 2023). Stwierdzany w fazie lutealnej spadek ekspresji genów związanych z włóknieniem (CTGF, kolagen typu 1, MMP2) oraz wzrost ekspresji genów dla TIMP1 i kolagenu typu 1 względem fazy pęcherzykowej może potwierdzać hamowanie włóknienia poprzez wyższe stężenia PGE2 w tej fazie cyklu (Wong et al., 2023).

Stan endometrium wpływa na jego zdolność do syntezy prostaglandyn. Wraz z nasilaniem zwyrodnienia, zmniejsza się transkrypcja odpowiedzialnych za to enzymów, a badane składniki NETs skutecznie zwiększały produkcję PGF2 α w endometrium o zachowanej funkcji. Pod wpływem białek zawartych w NETs dochodzi do zwiększonej ekspresji zarówno PGF2 α , jak i receptora prostaglandyn F (ang. *prostaglandin F receptor*, PTGFR) w fazie pęcherzykowej cyklu. W fazie lutealnej w zdrowym endometrium obserwowano spadek ekspresji PTGFR, jednak w endometrium objętym zwyrodnieniem ekspresja receptora rosła również w tej fazie cyklu (Katila & Ferreira–Dias, 2022; Rebordão et al., 2014a; Rebordão et al., 2021).

W endometrium objętym zwyrodnieniem stwierdzono niższą transkrypcję genu dla syntazy PGF2 α oraz niższe stężenie samej prostaglandyny, co może prowadzić do zaburzeń cykliczności. Zmiany w produkcji prostaglandyn w przebiegu endometrozy mogą również wpływać na maczyne rozpoznanie ciąży oraz utrudnioną migrację zarodka w macicy, co pokazuje szeroki wpływ występowania endometrozy na płodność klaczy (Szóstek et al., 2012). Z drugiej strony, w badaniu dotyczącym przewlekłego

stanu zapalnego endometrium nie stwierdzono wpływu zmian zwyrodnieniowych ani samego zapalenia na stężenie PGF2 α , z kolei we włóknieniu zwiększyła się produkcja leukotrienu B4 (Gajos et al., 2015). Ze względu na antagonistyczne działanie prostaglandyn, rozwój procesu włóknienia może być związany ze stosunkiem ilości PGE2 i PGF2 α . Stąd zmniejszenie ekspresji PGE2 lub zwiększenie ekspresji PGF2 α może odpowiadać za nasilanie zmian zwyrodnieniowych. Stężenie enzymu inaktywującego prostaglandyny zwiększa się w fazie pęcherzykowej w zwyrodniałym endometrium względem prawidłowej błony śluzowej, co może być odpowiedzialne za zmniejszenie ilości PGE2 (Byron et al., 2024).

2.4.3.11. Regulacja ze strony szlaków sygnałowych

Aktywacja szlaku NF κ B przez patogeny, cytokiny lub hormony skutkuje zwiększeniem transkrypcji dla wielu cytokin prozapalnych, które biorą udział w procesach włóknienia. Do jego aktywacji może dojść poprzez związanie białka NF κ B1 z białkiem relA (szlak kanoniczny) lub związanie białka NF κ B2 z białkiem relB (szlak niekanoniczny). Połączone dimery następnie działają jako aktywujący czynnik transkrypcyjny dla genów związanych ze stanem zapalnym. Regulowane są w ten sposób między innymi TNF α , białko chemotaktyczne monocytów (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP1), IL6, oraz syntazy kwasu hialuronowego 1, 2 i 3. Zmiany w ekspresji NF κ B w fazie pęcherzykowej wraz z nasileniem endometrozy świadczą o aktywacji zarówno szlaku kanonicznego, jak i niekanonicznego (Domino et al., 2020; Jasiński et al., 2021; Jasiński et al., 2022a; Jasiński et al., 2022b).

TNF α jest również jednym z możliwych aktywatorów szlaku kanonicznego NF κ B, którego aktywacja może stymulować produkcję MCP1 odpowiedzialnego za naciek makrofagów, będących źródłem TNF α . W ten sposób ekspresja obu w endometrium może wzajemnie nasilać (Jasiński et al., 2021). Transkrypcja RelA i NF κ B, powiązanych z kanoniczną aktywacją NF κ B, zwiększa się w aktywnej niszczącej endometrozie w fazie pęcherzykowej, a także nieaktywnej niszczącej w fazie lutealnej. W aktywnej niszczącej endometrozie stwierdzono również ujemną korelację pomiędzy transkrypcją tych czynników a transkrypcji dla ER w fazie pęcherzykowej. Za wzrost RelA może odpowiadać TNF α , z kolei skutkiem wzrostu RelA jest zwiększona produkcja kwasu hialuronowego (Jasiński et al., 2021; Jasiński et al., 2022).

Jednym z genów aktywowanych przez ten szlak jest gen dla MCP1, odpowiadającego za zwiększenie migracji monocytów i limfocytów T. Poza promocją

migracji komórek zapalnych, MCP1 zwiększa też produkcję IL6 oraz stymuluje podziały komórkowe. W badaniach dotyczących płuc stwierdzono profibrotyczne działanie MCP1 po zadziałaniu bodźca uszkodzającego (Moore et al., 2003). W endometriozie nie stwierdzono różnic w transkrypcji genu dla MCP1 względem prawidłowego endometrium, przy jednoczesnym spadku transkrypcji dla IL6. Uzyskane wyniki sugerują, że MCP1 w endometrium nie jest zaangażowana w regulację ekspresji IL6 (Domino et al., 2020). Wzrost transkrypcji genu dla MCP1 stwierdzono natomiast przy uwzględnieniu typu histologicznego zmian, w endometriozie nieaktywnej, niszczącej w fazie lutealnej cyklu (Jasiński et al., 2021).

Zwiększony naciek makrofagów w endometrium skorelowany jest z wyższą transkrypcją genów szlaku NFκB, dowodząc kluczowej roli tych komórek w regulacji środowiska cytokinowego. Nie stwierdzono różnic pomiędzy aktywnością szlaku, a intensywnością nacieku limfocytarnego i nacieku z komórek plazmatycznych, natomiast stwierdzono wzrost ekspresji w przypadku nacieku neutrofilowego (Byron et al., 2024; Jasiński et al., 2022b). Transkrypcja genów dla syntaz kwasu hialuronowego 1 i 3 zwiększa się w początkowym etapie włóknienia, a wraz z jego nasileniem obserwowany jest dalszy wzrost transkrypcji syntazy 3. Syntaza 2, odpowiedzialna za produkcję kwasu hialuronowego o wysokiej masie cząsteczkowej, utrzymuje się na podobnym poziomie, niezależnie od stwierdzanego stopnia zwyrodnienia endometrium. Warto zauważyć, że ekspresja syntazy 2 zwiększa się w niszczącej aktywnej endometriozie w fazie pęcherzykowej. Stąd prawdopodobnie w zwyrodniałym endometrium dochodzi do zwiększenia ilości kwasu hialuronowego o mniejszej masie, co może ułatwiać migrację komórek w obrębie ECM. Małocząsteczkowy kwas hialuronowy może mieć działanie prozapalne, antyapoptotyczne, a także stymulować podziały komórkowe i nasilać interakcje pomiędzy komórkami. Poziom ekspresji syntazy 3 i NFκB1 był podobny w poszczególnych kategoriach endometrozy, co może sugerować udział aktywacji elementów szlaku w zwiększeniu produkcji kwasu hialuronowego, podobnie jak w miofibroblastach z płuc (Domino et al., 2020; Jasiński et al., 2021; Jasiński et al., 2022a; Ohkawa et al., 1999). Pozytywna korelacja pomiędzy mRNA dla syntazy 2, a mRNA dla ER może świadczyć o większym udziale dużych cząsteczek kwasu hialuronowego w endometrium lepiej poddającej się regulacji hormonalnej (Domino et al., 2020; Jasiński et al., 2021; Jasiński et al., 2022a).

2.4.3.12. Regulacja ekspresji genów

W kategorii II endometrozy stwierdzono wzrost ekspresji genów biorących udział w stanie zapalnym, regulowaniu nacieku zapalnego w endometrium, migracji komórek zapalnych i produkcji cytokin, związanych przede wszystkim z makrofagami. Skutkiem obserwowanych zmian jest zwiększenie chemotaksji makrofagów oraz aktywacja limfocytów T, co skutkuje zwiększeniem produkcji cytokin w endometrium. W kategorii IIB endometrozy zwiększyła się ekspresja genów regulujących homeostazę tkanki łącznej, proliferację fibroblastów, a także związanych z apoptozą. Zmiany w transkrypcji genów związanych z apoptozą wynikają raczej ze zwyrodnienia gruczołów macicznych, jako że w innych badaniach dotyczących włóknienia wykazywano niższą podatność fibroblastów na apoptozę. Zmianie w kategorii IIB uległa również ekspresja genów związanych z mitochondriami i fosforylacją oksydacyjną. Z kolei w kategorii IIA zmianie uległy geny związane z komórkowym metabolizmem i transportem węglowodanów, tłuszczu i białek (Szósteck-Mioduchowska et al., 2023)

Transkrypcja mRNA dla heksokinazy 2 (ang. *hexokinase 2*, HK2), enzymu uczestniczącego w początkowym etapie glikolizy, zmniejszyła się w endometrozie o różnym stopniu nasilenia. Spadek ekspresji HK2 w mięśniu sercowym wiąże się z obumieraniem komórek, spadkiem angiogenezy i nasileniem włóknienia, z kolei we włóknieniu płuc HK2 nasila profibrotyczne działanie TGFβ. Pod wpływem TGFβ1 w hodowli fibroblastów pobranych z endometrium zaklasyfikowanym do kategorii I i IIA endometrozy doszło do zwiększenia transkrypcji dla HK2. Z kolei fibroblasty z endometrium kategorii IIB zareagowały w sposób odwrotny. Prawdopodobnie w przebiegu zwyrodnienia endometrium produkcja HK2 zmniejsza się, choć w początkowym etapie rozwoju zmian dochodzi do zwiększenia jej produkcji pod wpływem TGFβ1 (Szósteck-Mioduchowska et al., 2023).

TGFβ1 poza wcześniej opisanymi działaniami może również powodować zwiększanie lub zmniejszanie metylacji w różnych genach. W fibroblastach z endometrium klaczy jego dodatek w hodowli skutkuje wzrostem ekspresji metylotransferaza DNA 3 alfa (ang. *DNA methyltransferase 3 alpha*, DNMT3A). Zastosowanie 5-Aza-2'-deoksycytyny, modyfikatora epigenetycznego o działaniu demetylującym, skutecznie zahamował wzrost ekspresji kolagenu typu 1 i kolagenu typu 3 mediowany przez TGFβ1, co nie powstrzymało wzrostu transkrypcji genu dla αSMA. Po 48 godzinach inkubacji z 5-Aza-2'-deoksycytyną bez TGFβ1 zauważono

zmniejszenie transkrypcji DNMT3A, przy jednoczesnym braku zmian dla metylotransferazy DNA 1 (ang. *DNA methyltransferase 1*, DNMT1) i metylotransferazy DNA 3 beta (ang. *DNA methyltransferase 3 beta*, DNMT3B). Z kolei po 96 godzinach zaobserwowano odwrotny efekt działania na badane metylazy. Transkrypcja kolagenu typu 1 w pierwszych 48 godzinach zwiększyła się, natomiast transkrypcja mRNA spadła po 96 godzinach. Zwiększenie transkrypcji α SMA świadczy o demetylującym działaniu substancji w obrębie genu kodujące α SMA, ACTA2 umożliwiając wyższą produkcję aktyny (Alpoim-Moreira, 2023). Wraz z nasileniem endometrozy zaobserwowano wzrost metylacji wysp CpG w promotorze genu dla kolagenu typu 1, co jednak nie wiązało się ze zmianami w transkrypcji tego genu (Alpoim-Moreira et al., 2022b). Natomiast wraz z wiekiem kłaczy zwiększa się ekspresja metylaz DNA, powodujących spadek transkrypcji docelowych genów. Metylacja genów odpowiedzialnych za hamowanie procesu włóknienia może być przyczyną zwyrodnienia endometrium, jednak ze względu na szerokie działanie metylaz ich dokładny wpływ jest niepewny (Katila & Ferreira-Dias, 2022). Najwyższy poziom mRNA, niezależnie od zwyrodnienia endometrium, stwierdzono dla DNMT3A, której rola była również badana w przypadku włóknienia płuc u szczurów. Wraz z innymi metylazami, DNMT1 i DNMT3B, których transkrypcja zwiększa się u starszych kłaczy z endometrozą, może być ona odpowiedzialna za hamowanie ekspresji genów hamujących włóknienie, powodując zwiększone odkładanie włókien w ECM (Alpoim-Moreira et al., 2019; Skarzynski et al., 2020).

MikroRNA (miRNA) to krótkie, niekodujące jednoniciowe cząsteczki hamujące translację mRNA, a więc uczestniczą w posttranslacyjnej regulacji genów. Jeden typ miRNA może odpowiadać za regulację ekspresji różnych genów poprzez wiązanie z komplementarnym fragmentem mRNA, co powoduje jego degradację. Mogą być przekazywane między komórkami poprzez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Ich istotna rola została stwierdzona w procesach włóknienia dotyczących różnych narządów, między innymi poprzez regulowanie efektów działania TGF β 1, co zostało stwierdzone w badaniach dotyczących keratynocytów. W fibroblastach z endometrium stymulowanych lipopolisacharydem stwierdzono zmiany w ekspresji miRNA a ich udział w regulacji stanu zapalnego sugeruje również znacznie w patogenezie endometrozy. W fazie pęcherzykowej stwierdzono większą produkcję różnych miRNA w zależności od kategorii endometrozy, co może świadczyć o ich roli w regulacji genów związanych z włóknieniem. Mogą one wpływać na produkcję kolagenu,

fibronektyny, elastyny, lamininy, MMP, TIMP4 oraz cytokin i ich receptorów. Zidentyfikowano również miRNA wpływające na różnicowanie, proliferację, migrację i apoptozę komórek. Co ciekawe, w kategoriach IIB i III endometrozy zwiększyła się ekspresja miRNA regulujących ekspresję receptora oksytocynowego, prostaglandyn i syntazy tlenku azotu, co wskazuje na bezpośredni związek endometrozy i podatności kłaczy na gromadzenie się płynu w macicy (Wójtowicz et al., 2023). W fazie lutealnej stwierdzono natomiast wzrost ekspresji antyfibrotycznych miRNA stymulowany przez wyższą w tej fazie cyklu aktywność PGE2 (Wong et al., 2023). Opisane wyniki wskazują, że komunikacja między komórkami poprzez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i działanie miRNA jest perspektywnym kierunkiem badań nad patogenezą endometrozy.

2.4.4. Kierunek badań patogenezy endometrozy

2.4.4.1. Białko jądrowe Ki67

Ki67 jest białkiem jądrowym, wpływającym na przemieszczanie się chromosomów i utrzymanie wrzeciona podziałowego podczas podziałów komórkowych. Kodowane jest przez gen *MKI67*. Jako antygen, Ki67 wykorzystywane jest w roli markera tempa proliferacji komórek w tkankach, ponieważ jest obecne na każdym etapie cyklu komórkowego poza fazą spoczynkową. W przypadku nowotworów, Ki67 jest ważnym wskaźnikiem oceny klinicznego behawioru nowotworu, w którym wyższa ekspresja Ki67 świadczy o szybszym tempie wzrostu i większej inwazyjności. Ki67 może być również wykorzystany w ocenie procesów regeneracyjnych, związanych z podziałami komórkowymi i reorganizacją tkanek. W przypadku włóknienia podśluzówkowego jamy ustnej, wyższa ekspresja Ki67 świadczy o ostrzejszym przebiegu włóknienia i większym zasięgu tego procesu w głąb tkanek, co związane jest z aktywnością mitotyczną komórek zrębu (Kamala et al., 2022; You et al., 2023). W tym typie włóknienia ekspresja Ki67 jest pozytywnie skorelowana z gęstością naczyniową, wskazując na wyższy potencjał do dalszego zwiększania ilości tkanki łącznej. Ekspresja Ki67 jest również pozytywnie skorelowana z ekspresją α SMA, wskazując na związek antygeny z przekształcaniem komórek zrębu w miofibroblasty (Gadbail et al., 2018). W przypadku włóknienia płuc u myszy pozbawionych TIMP1, wzrost ekspresji Ki67 był związany ze znaczącym wzrostem proliferacji fibroblastów (Dong & Ma, 2016).

W endometrium klaczy ekspresję Ki67 stwierdza się w nabłonku powierzchniowym, nabłonku gruczołowym, komórkach zrębu i śródbłonku naczyń. Ekspresja Ki67 zmienia się w trakcie cyklu jajnikowego, osiągając szczyt we wczesnej fazie lutealnej. Jest ona skorelowana z ekspresją receptorów dla hormonów płciowych, rosnąc wraz ze wzrostem stężenia estrogenów w fazie pęcherzykowej. Wzrost ekspresji Ki67 ma związek z promitotycznym działaniem estrogenów oraz proliferacją komórek nabłonka gruczołowego, osiągającą najwyższy poziom tuż po owulacji. Z kolei proliferacja komórek zrębu osiąga najwyższy poziom nieco wcześniej, podczas fazy pęcherzykowej (Aupperle et al., 2000; Aupperle et al., 2003). Ekspresja Ki67 ma również związek z unaczynieniem endometrium. W modelu eksperymentalnym niedokrwienia endometrium, po przywróceniu perfuzji, stwierdzono wzrost transkrypcji mRNA dla Ki67 (Köhne et al., 2024).

W przypadku endometrozy ekspresja Ki67 w endometrium zmniejsza się w ogniskach włóknienia wraz ze zmianami ekspresji ER i PR. W badaniach dotyczących typów histologicznych endometrozy, stwierdzono niższą ekspresję Ki67 w fibroblastach w endometrozie nieaktywnej, co może wynikać z ich niewielkiej aktywności metabolicznej. Z kolei spadek ekspresji Ki67 stwierdzono w gruczołach macicznych jedynie w aktywnej niszczącej endometrozie, co wskazuje na największy wpływ tego typu endometrozy na funkcje gruczołów macicznych. Co więcej, domaciczne podanie komórek macierzystych skutkuje zdecydowanym wzrostem ekspresji Ki67 utrzymującym się przez kilka tygodni, co wskazuje na potencjał komórek macierzystych w stymulacji regeneracji endometrium (Aupperle et al., 2000; Hoffmann et al., 2009b; Mambelli et al., 2014).

2.4.4.2. Insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF1)

Insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. *insulin-like growth factor 1*, IGF1), kodowany przez gen *IGF1*, produkowany jest przede wszystkim w wątrobie, pod wpływem hormonu wzrostu. Poza wątrobą, IGF1 produkowane jest w wielu narządach, w których wywołuje efekt biologiczny na drodze auto- i parakrynej. Efekty biologiczne inicjuje interakcja IGF1 ze swoistym receptorem (ang. *insulin-like growth factor 1 receptor*, IGF1R) należącym do rodziny receptorów związanych z kinazą tyrozynową. W mniejszym stopniu IGF1 wykazuje powinowactwo do receptora dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (ang. *insulin-like growth factor 2 receptor*, IGF2R) i insuliny. W regulowaniu działania receptorowego biorą udział białka zdolne

do wiązania się z IGF1, które hamują jego działanie, ponieważ tylko wolna postać IGF1 może wiązać się z receptorem. Efekty działania IGF1 obejmują stymulację wzrostu, migracji i przeżywania komórek (Higashi et al., 2012; Kopchick et al., 2022).

Miejscowe podanie IGF1 w okolicy uszkodzonego ścięgna zwiększa produkcję kolagenu (Kopchick et al., 2022), a w okolicy uszkodzonego mięśnia stymuluje regenerację miocytów i prawidłową kompozycję cytoszkieletu (Forcina et al., 2019). IGF1 działa antagonistycznie do IL6, która zwiększa nasilenie zapalenia, stymuluje włóknienia i zmniejsza aktywność IGF1 (Forcina et al., 2019). U ludzi, podwyższona ekspresja IGF1R w fibroblastach występuje w przypadku nadmiernego rozwoju tkanki łącznej w bliznowcach (Kopchick et al., 2022). U szczurów, w przypadku uszkodzenia serca, stymulacja IGF1 zmniejsza podatność komórek mięśnia sercowego na apoptozę i wiąże się z mniejszym obszarem włóknienia mięśnia sercowego, sprzyjając zachowaniu funkcji narządu (Fan & Guan, 2016). W twardzinie układowej wyższe stężenie IGF1 w surowicy wiąże się z bardziej nasilonymi zmianami, zwłaszcza w skórze i płucach. W omawianych próbkach skóry stwierdzono dwukrotnie większą produkcję mRNA dla IGF1 niż w skórze prawidłowej (Hung et al., 2013). W uszkodzeniu wątroby IGF1 działa ochronnie na hepatocyty, pozytywnie wpływając na ich przeżywanie i utrzymanie funkcji. Co ciekawe, w hodowli *in vitro* komórek gwiaździstych wątroby, IGF1 stymuluje proliferację i produkcję kolagenu, natomiast *in vivo* powoduje apoptozę komórek gwiaździstych poprzez stymulację produkcji czynnika wzrostu hepatocytów (Mair et al., 2011). W nerkach, w wyniku długotrwałego działania czynnika uszkadzającego, dochodzi do naciekania tkanek przez monocyty, które różnicują się w makrofagi M2. Produkowane przez nie TGFβ1, IGF1 i płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor*, PDGF) powodują wzrost liczby miofibroblastów, co z kolei zwiększa depozycję kolagenu i skutkuje włóknieniem (Conway & Hughes, 2012).

IGF1 może powodować transformację fibroblastów w miofibroblasty, przy czym u ludzi efekt ten jest zależny od narządu docelowego. Pod wpływem IGF1, fibroblasty obecne w płucach zwiększają ekspresję αSMA i produkcję kolagenu typu 1, fibroblasty obecne w okrężnicy zwiększają ekspresję αSMA, natomiast fibroblasty obecne w rogówce nie zmieniają poziomu αSMA (Hung et al., 2013). Ponadto w rogówce stwierdzono antagonistyczne działanie TGFβ1 i IGF1, wykazując, że TGFβ1 stymuluje powstawanie miofibroblastów i nadmierną depozycję kolagenu, a IGF1 zapobiega tej transformacji. Jednocześnie IGF1 stymuluje różnicowanie fibroblastów o działaniu

regeneracyjnym, wykazujących ekspresję antygenu komórek grasicy 1 (ang. *thymus cell antigen 1*, Thy1) (Sarenac et al., 2016). W przypadku włóknienia płuc potwierdzono nasiloną produkcję IGF1 zarówno na poziomie finalnego produktu jak i mRNA. IGF1 zwiększał przeżywalność fibroblastów i w mniejszym stopniu również komórek nabłonkowych. Zablokowanie tego szlaku przekazywania skutkowało nasileniem apoptozy fibroblastów i regeneracją tkanek objętych zwłóknieniem (Hung et al., 2013). Zwiększenie transkrypcji i translacji IGF1 w fibroblastach płucnych zachodzi pod wpływem TGFβ1, a pomiędzy poziomami tych czynników w tkankach występuje dodatnia korelacja. Jednak współwystępowanie IGF1 i TGFβ1 nie powoduje bardziej nasilonej transformacji fibroblastów niż ma to miejsce pod wpływem samodzielnie działającego TGFβ1. Stwierdzono również, że IGF1 nie wpływa na produkcję TGFβ1. Natomiast współdziałanie obu czynników wzrostu jest kluczowe dla rozwoju włóknienia płuc (Hung et al., 2013; Hernandez et al., 2020).

Efekt działania IGF1 w przypadku płuc może być zależny od sztywności tkanek. W twardszych tkankach IGF1 nie zwiększa ekspresji αSMA, natomiast przy luźniejszym utkaniu ECM IGF1 powoduje zwiększenie ekspresji αSMA. Jednak zarówno w tkankach wykazujących zwarte jak i luźne utkanie ECM, IGF1 stymuluje wzrost produkcji kolagenu typu 1 i 3. Opisany efekt świadczy o transformującym działaniu IGF1 krótko po wystąpieniu bodźca uszkodzającego, natomiast na dalszym etapie włóknienia działanie dotyczy głównie hamowania apoptozy i stymulacji produkcji kolagenu (Hung et al., 2013).

2.4.4.3. Receptor α płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFRα)

PDGF aktywuje mechanizmy biologiczne poprzez wiązanie z dwoma receptorami (ang. *platelet derived growth factor receptor*, PDGFR), α i β, kodowanymi odpowiednio przez geny *PDGFRA* i *PDGFRB*. Receptory te są klasyfikowane jako receptory związane z kinazą tyrozynową, które występują w postaci monomerów. Pod wpływem przyłączenia ligandu monomery łączą się w homo– lub heterodimery, które wykazują aktywność biologiczną. Do tej pory poznano 4 rodzaje podjednostek PDGF: A, B, C i D, mogące tworzyć 5 form dimerów: AA, AB, BB, CC i DD. PDGFA i –B wydzielane są w aktywnej postaci, natomiast –C i –D w formie nieaktywnej, która wymaga aktywacji ze strony enzymów proteolitycznych. Bazowa aktywność PDGFR jest niewielka, a do jej zwiększenia dochodzi pod wpływem obecności ligandu. PDGFRα może wiązać się z PDGFAA, –AB, –BB, –CC, PDGFRαβ z PDGFAB, –BB

i –CC, z kolei PDGFR β z PDGFBB i –DD. Związanie ligandu prowadzi do aktywacji szlaku związanego z kinazą 3–fosfatydyloinozytolu (ang. *phosphoinositide 3–kinase*, PI3K) i inicjację efektu biologicznego (Trojanowska, 2008; Iwayama & Olson, 2013; Klinkhammer et al., 2018).

PDGFR występują przede wszystkim w komórkach pochodzenia mezenchymalnego, a ich ekspresja jest zwiększana przez cytokiny produkowane przez leukocyty (Trojanowska, 2008; Iwayama & Olson, 2013; Klinkhammer et al., 2018; Paolini et al., 2022). Aktywacja PDGFR α zapewnia przeżywanie rezerwy fibroblastów w tkance łącznej poprzez stymulację translacji, hamowanie apoptozy i stymulację podziałów komórkowych. U myszy, eksperymentalne blokowanie PDGFR skutkowało radykalnym zmniejszeniem liczby fibroblastów w mięśniu sercowym, wpływając na możliwości regeneracyjne (Cheng et al., 2024). PDGF, działający za pośrednictwem PDGFR, zmniejsza podatność na apoptozę oraz stymuluje migrację, proliferację i przeżywanie miofibroblastów. Kierunek działania PDGF zależy od jego stężenia. Co więcej, zachowanie komórek posiadających PDGFR α zależy od właściwości tkanek. Aktywacja PDGFR α może stymulować regenerację i przywracaniu funkcji tkanek, natomiast w mikrośrodowisku stymulującym procesy włóknienia aktywacja PDGFR α prowadzi do różnicowania komórek ukierunkowanego na produkcję składników ECM (Li & Wang, 2022). PDGFR α występuje w fibroblastach obecnych w mięśniach i skórze, które w przypadku uszkodzenia aktywują mechanizmy naprawcze w tym zwiększoną depozycję składników ECM (Iwayama & Olson, 2013). Również makrofagi obecne w płucach objętych włóknieniem wykazują wyższą ekspresję PDGFR α i β , a pod wpływem ich aktywacji produkują mediatory działające stymulujące na fibroblasty (Di et al., 2024). U ludzi, w badaniach dotyczących włóknienia stwierdzono produkcję autoprzeciwciał przeciwko PDGFR. Co ciekawe, wiązanie przeciwciała z PDGFR, podobnie jak w przypadku wiązania z ligandem, skutkowało jego aktywacją (Iwayama & Olson, 2013). Do aktywacji PDGFR α może również dochodzić pod wpływem działania innych niż PDGF czynników wzrostu, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). Ekspresja PDGFR α zwiększa się również pod wpływem TGF β , IL1 α , TNF α , czynnika wzrostu fibroblastów 2 (ang. *fibroblast growth factor 2*, FGF2), estrogenów i lipopolisacharydu (Paolini et al., 2022).

W przypadku włóknienia płuc, w miofibroblastach stwierdzono podwyższoną ekspresję PDGFR (Luzina et al., 2015). Również we włóknieniu wątroby i nerek

potwierdzono udział PDGF w stymulacji proliferacji komórek zrębu i przekształcenia w miofibroblasty (Klinkhammer et al., 2018). Zwiększenie produkcji PDGFA i PDGFC poprzez modyfikację genetyczną myszy skutkowało samoistnym włóknieniem wątroby ze zwiększoną produkcją α SMA i TGF β , a w przypadku PDGFC dodatkowo PDGFR α , PDGFR β , TIMP1 i -2 (Borkham-Kamphorst & Weiskirchen, 2016). Z kolei zablokowanie zarówno PDGFR α jak i PDGFR β powodowało zmniejszenie proliferacji i różnicowania miofibroblastów, co wiązało się ze zmniejszoną depozycją włókien ECM w przebiegu włóknienia wątroby, nerek, płuc oraz mięśnia sercowego (Klinkhammer et al., 2018).

W badaniach przeprowadzonych na modelu mysim stwierdzono zwiększenie ekspresji PDGFR α w przebiegu włóknienia wielonarządowego. Co ciekawe, w zmienionych tkankach nie stwierdzono podwyższonej ilości α SMA, co może wynikać z hamowania przez PDGF ekspresji genu odpowiedzialnego za jej produkcję. Brak fosforylowanej formy SMAD2, związanej z działaniem TGF β sugeruje, że w tym przypadku włóknienie odbywało się bez jego udziału. Uzyskane wyniki sugerują, że aktywacja PDGFR α może być wystarczającym bodźcem wyzwalającym włóknienie tkanek. W tych samych badaniach zwiększenie aktywności PDGFR β związane było z uogólnionymi zmianami zapalnymi, sugerując, że w przypadku twardziny układowej aktywacja obu typów receptorów wywołuje odmienne efekty biologiczne, które wspólnie skutkują uogólnionym włóknieniem (Iwayama & Olson, 2013; Luzina et al., 2015). W innym przypadku, pod wpływem TGF β doszło do różnicowania komórek mezenchymalnych i związanego z nim spadku ekspresji PDGFR α . Różnicujące się komórki wykazywały mniejszą aktywność mitotyczną oraz większą zdolność do produkcji i wydzielania składników ECM (Klinkhammer et al., 2018; Kang et al., 2024). Stąd hipoteza o ujemnym sprzężeniu, zakładająca, że pod wpływem TGF β dochodzi do różnicowania fibroblastów i zmniejszenia ekspresji PDGFR α na ich powierzchni, co skutkuje spadkiem wrażliwości fibroblastów na sygnały proliferacyjne i zachowaniem większej równowagi w depozycji ECM (Cheng et al., 2024). W twardzinie układowej komórki zrębu zwiększają ekspresję PDGFR α pod wpływem TGF β , przez co zwiększa się ich podatność na działanie PDGF stymulujące podziały komórkowe. W prawidłowych komórkach zrębu, ekspresja PDGFR α pozostaje bez zmian lub nieznacznie się zmniejsza. Pod wpływem PDGF, fibroblasty obecne w skórze zwiększają ekspresję receptora dla TGF β , co dodatkowo świadczy

o wzajemnej zależności między tymi czynnikami wzrostu i ich wspólnej roli w patogenezie włóknienia (Trojanowska, 2008).

2.4.4.4. Antygen komórek grasicy 1 (Thy1)

Białko powierzchniowe Thy1 kodowane przez gen *THY1* zostało opisane w grasicy jako marker dla populacji limfocytów. Jednak w kolejnych badaniach wykazano, że Thy1 występuje w wielu komórkach, takich jak fibroblasty, komórki zapalne, neurony i komórki nabłonkowe. Pomimo braku klasycznego oddziaływania ligand–receptor, Thy1 może wiązać się z wieloma cząsteczkami, między innymi integrzynami i proteoglikanami. Interakcja ta może dotyczyć otoczenia komórki, na której obecne jest Thy1, ale też cząsteczek występujących na powierzchni samej komórki. Stąd, cząsteczka wchodząca w interakcję z Thy1 uczestniczy w kontakcie komórek z białkami ECM, a także w interakcjach pomiędzy komórkami. Thy1 odgrywa rolę w modelowaniu elementów cytoszkieletu komórki, wpływając na formowanie się dendrytów w neuronach (Hagood, 2019; Liu et al., 2017). Thy1 jest obecne na powierzchni pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co poprzez wiązanie z integrzynami na powierzchni komórek umożliwia wchłanianie ich zawartości do wnętrza komórki. Pęcherzyki zawierające Thy1 są wydzielane przez fibroblasty pod wpływem bodźca zapalnego. W badaniach dotyczących nowotworów stwierdzano wysoką ekspresję Thy1, które odgrywa rolę w tworzeniu przerzutów, zwiększa ekspresję fibronektyny, a dodatkowo może wpływać na angiogenezę. Dodatkowo Thy1 bierze udział w interakcjach pomiędzy makrofagami, a komórkami nowotworowymi, a także powoduje wydzielanie TIMP1 przez neutrofile (Yang et al., 2020).

W fibroblastach, poprzez interakcję z ligandem Fas, Thy1 odpowiada za apoptozę, co w procesach naprawczych w tkankach odpowiada za ograniczenie obszaru włóknienia. U myszy pozbawionych Thy1 stwierdzono występowanie odpornych na apoptozę miofibroblastów w przypadku indukowanego włóknienia płuc (Liu et al., 2017). Z kolei w badaniach nad włóknieniem wątroby stwierdzono wpływ Thy1 na transformację fibroblastów w miofibroblasty, poprzez interakcję z TGFβ1, podczas gdy interakcje Thy1 z integrzynami hamowały proces w płucach omawianą transformację (Hagood, 2019; Yang et al., 2020). Również w przypadku fibroblastów w skórze, rogówce i miometrium, Thy1 umożliwiało transformację fibroblastów w miofibroblasty zachodzącą pod wpływem TGFβ1 (Saalbach & Andereg, 2019). Thy1 w fibroblastach bierze również udział w szlakach związanych z TGFβ1, αSMA

oraz NFκB, których udział stwierdzano w przebiegu endometrozy. Thy1 wpływa na proliferację i apoptozę fibroblastów, formowanie cytoszkieletu, migrację, różnicowanie i mechanotransdukcję fibroblastów, a także ich udział w zapaleniu i włóknieniu (Yang et al., 2020). Udział w mechanotransdukcji, a więc wpływie parametrów mechanicznych tkanki na fenotyp komórek, odbywa się poprzez interakcje Thy1 z integrzynami i proteoglikanami. W przypadku włóknienia płuc oraz czerniaków, deficyt Thy1 skutkuje zwiększoną aktywacją integrzyn, nawet w tkankach o bardziej luźnym utkaniu ECM, a w konsekwencji nasilaniem włóknienia (Fiore et al., 2018). W przypadku indukowanego włóknienia endometrium u owiec stwierdzono zwiększenie ekspresji Thy1 związaną ze zwiększoną migracją komórek (Chu et al., 2024).

Thy1 odgrywa również rolę w procesach różnicowania komórek mezenchymalnych, zarówno w kontekście specjalizacji jak i powracania komórek do pluripotencji. Wpływ ten jest bardzo złożony i prawdopodobnie zależny od kontekstu zmian zachodzących w tkance, jak i jej właściwości mechanicznych. Stąd można podejrzewać, że Thy1 może być ogniwem łączącym mechanotransdukcję, różnicowanie komórek oraz przekazywanie związane z TGFβ1 (Hagood, 2019).

3. Cel pracy i hipoteza badawcza

Cel pracy:

1. Ocena wpływu ekspresji *THY1*, *IGF1*, *PDGFRA* i *MKI67* na nasilenie endometrozy
2. Ocena wpływu ekspresji *THY1*, *IGF1*, *PDGFRA* i *MKI67* na występowanie zmian histopatologicznych w endometrium objętym endometrozą
3. Ocena wzajemnych interakcji między *THY1*, *IGF1*, *PDGFRA* i *MKI67* w patogenezie endometrozy
4. Ocena interakcji między *THY1*, *IGF1*, *PDGFRA* i *MKI67* a genami dla potwierdzonych markerów progresji endometrozy
5. Analiza zależności między zmianami histopatologicznymi w endometrium objętym endometrozą

Hipoteza badawcza:

Białka Thy1, IGF1, PDGFR α i Ki67 biorą udział w patogenezie endometrozy.

4. Materiały i metodyka badań

4.1. Materiał wykorzystany do badań

W badaniu wykorzystano materiał pobrany poubojowo w ubojni koni M.K.Z. w Rawiczu. Pobrano wycinki ściany macicy z 72 macic klaczy, po jednej próbce do badania histopatologicznego oraz badania molekularnego, spośród których na dalszym etapie obróbki materiału histologicznego wybrano 47 wycinków. Próbki zostały odrzucone przede wszystkim ze względu na intensywny naciek zapalny przy jednoczesnym braku lub niewielkim nasileniu zmian związanych z endometrozą. Wycinki pełnej grubości ściany macicy do badania histopatologicznego, wielkości ok. 1 x 1 cm, utrwalono w 4% roztworze formaldehydu zbuforowanym PBS, a następnie umieszczono w 75% roztworze alkoholu etylowego. Wycinki endometrium do badania molekularnego, wielkości ziarna pszenicy, umieszczono na czas transportu w pojemniku z ciekłym azotem, a następnie przechowywano w zamrażarce w temperaturze -80°C do czasu izolacji mRNA. Utrwalenie odpowiednio w formalinie i ciekłym azocie nastąpiło od razu po pobraniu wycinków narządu, w czasie poniżej godziny od uboju zwierzęcia. Fazę cyklu jajnikowego klaczy oceniono na podstawie makroskopowej oceny struktur obecnych na jajnikach. Fazę lutealną przypisano na podstawie obecności ciała żółtego lub ciała krwotocznego, a faza pęcherzykowa na podstawie braku ciała żółtego lub krwotocznego, przy jednoczesnej obecności struktur pęcherzykowych o średnicy minimum 20 mm.

4.2. Metodyka histologiczna

Fragment każdego pobranego wycinka ściany macicy umieszczono w kasetkach histologicznych, które następnie poddano odwodnieniu i wstępnemu przepojeniu parafiną w procesorze tkankowym. Wycinki zatopiono w parafinie w celu wykonania skrawków histologicznych. Z bloczków parafinowych uzyskano skrawki o grubości 4 µm z użyciem mikrotomu rotacyjnego. Następnie skrawki naniesiono na adhezyjne szkiełka mikroskopowe. Na każde szkiełko naniesiono po dwa skrawki uzyskane z różnych części bloczka parafinowego. Skrawki nanoszono w odległości co najmniej 40 µm od siebie.

Szkiełka odparafinowano w ksylenie, stosując dwa pojemniki z ksylenem w celu pełnego odparafinowania. W dalszej kolejności szkiełka uwodniono w roztworach alkoholu etylowego o zmniejszającym się stężeniu: 99%, 85%, 70%, 50%, a następnie w wodzie destylowanej. Uwodnione szkiełka umieszczono na około 1 minutę

w hematoksylinie Harrisa, wypłukano w wodzie i poddano różnicowaniu przez 5 sekund w 2% roztworze kwasu octowego. "Blueing" hematoksyliny wykonano z użyciem 0,2% roztworu amoniaku. Następnie szkiełka ponownie wypłukano w wodzie. Elementy kwasochłonne barwiono eozyną przez około 30–40 sekund. Po ponownym wypłukaniu wodą, szkiełka odwodniono w analogicznym szeregu alkoholi w odwrotnej kolejności. Pozostałości alkoholu w skrawkach zastąpiono ksylenem, a skrawki zaklejono szkiełkami nakrywkowymi z zastosowaniem medium DPX. Do oceny mikroskopowej szkiełek wykorzystano mikroskop świetlny Olympus BX43.

4.3. Ocena szkiełek według klasyfikacji KD

Preparaty histologiczne oceniono pod kątem występowania i nasilenia zwyrodnienia gruczołów macicznych i ilości włókien kolagenowych w ECM. Na tej podstawie zaklasyfikowano je do kategorii Kenney'a i Doiga: I, IIA, IIB i III. Oprócz standardowej klasyfikacji wydzielono dodatkową kategorię określoną jako I+. Kategoria I+ obejmowała preparaty, które ze względu na nasilenie zmian zostałyby zaklasyfikowane do kategorii I, jednak widoczne były w nich nieliczne zmiany świadczące o inicjacji zwyrodnienia endometrium. Dodatkową kategorię wydzielono w celu wychwycenia i lepszego zrozumienia zmian w ekspresji badanych genów w początkowym okresie zwyrodnienia endometrium.

Po wstępnej ocenie histologicznej do dalszej oceny histopatologicznej i badania ilościową reakcją łańcuchową polimerazy (ang. *real-time polymerase chain reaction*, qPCR) wybrano 47 próbek, w tym: 10 próbek z kategorii I (wykorzystywane w analizach jako grupa kontrolna, bez zmian zwyrodnieniowych i nacieku zapalnego), 7 próbek z kategorii I, z pojawiającymi się zmianami charakterystycznymi dla endometrozy (I+), 11 próbek z kategorii IIA, 9 próbek z kategorii IIB i 10 próbek z kategorii III.

4.4. Ocena parametrów histologicznych

Podstawowym kryterium przy tworzeniu grup badawczych była klasyfikacja Kenney'a i Doiga, dla której kryteria diagnostyczne opisano we wstępie pracy. Ze względu na nierównomierne występowanie zmian uwzględnionych w klasyfikacji KD, oprócz przypisania kategorii, według endometrium oceniono niezależnie według następujących kryteriów:

- zwyrodnienie gruczołów macicznych w endometrium oceniono w skali 0–2 (0 – brak zwyrodnienia lub skrajnie niski odsetek zmienionych gruczołów, 1 – ogniskowe zwyrodnienia gruczołów/grup gruczołów, większość gruczołów prawidłowa, 2 – nasilone zwyrodnienie dotyczące znaczącego odsetka gruczołów macicznych; na podstawie różnic morfologicznych komórek nabłonkowych, rozstrzeni gruczołów macicznych, nieciągłości nabłonka gruczołowego);
- ogniska włóknienia okołogruczołowego oceniono w skali dychotomicznej (0 – brak, 1 – obecne ogniska włóknienia okołogruczołowego; oceniane jako pogrubiona macierz zewnątrzkomórkowa zawierająca wielowarstwowo ułożone włókna kolagenowe ułożone koncentrycznie wokół gruczołów);
- aktywność fibroblastów określono na podstawie badań Hoffmann et al. (2009), poprzez ocenę ich morfologii w ogniskach włóknienia i oceniono w skali dychotomicznej (0 – nieaktywne, 1 – aktywne);
- niszczenie błony podstawnej gruczołów macicznych oceniono w skali dychotomicznej (0 – brak, 1 – niszczenie błony podstawnej);
- różnicowanie gruczołów macicznych przez hormony steroidowe względem przypisanej fazy cyklu oceniono w skali dychotomicznej (0 – prawidłowe różnicowanie nabłonka gruczołowego, 1 – zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego; oceniane na podstawie morfologii komórek, położenia i morfologii jądra komórkowego);
- cechy nabłonka powierzchniowego endometrium uwzględniające ocenę zwyrodnienia komórek nabłonkowych oceniono w skali dychotomicznej (0 – brak, 1 – obecne; na podstawie wakuolizacji cytoplazmy, obrzęku komórek, zauważalnej zmiany barwności),
- cechy nabłonka powierzchniowego endometrium uwzględniające ocenę ubytków nabłonka powierzchniowego oceniano w skali dychotomicznej (0 – brak, 1 – obecne);
- wysokość komórek nabłonka powierzchniowego mierzono jako średnią wartość uzyskana z 3 punktów pomiarowych (pomiaru wykonano z użyciem oprogramowania Olympus CellSens Standard);
- zmiany dotyczące naczyń krwionośnych w endometrium oceniano w odniesieniu do obecności rozstrzeni naczyń w skali dychotomicznej (0 – brak, 1 – obecna; na podstawie oceny średnicy naczyń krwionośnych zlokalizowanych w endometrium i błonie podśluzowej);

- zmiany dotyczące naczyń krwionośnych w endometrium oceniano w odniesieniu do obecności włóknienia okołonaczyniowe i przebudowa ściany naczyń w skali dychotomicznej (0 – brak, 1 – obecne; na podstawie grubości ściany i gromadzenia warstw włókien kolagenowych po zewnętrznej stronie ściany);
- nasilenie nacieku zapalnego oszacowano poprzez ocenę liczby wszystkich komórek zapalnych w endometrium (skala porządkowa, z uwzględnieniem możliwego niewielkiego nacieku limfocytarnego, 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, pojedyncze komórki zapalne w polu widzenia, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek zapalny). Analogiczną skalę przyjęto przy ocenie poszczególnych typów komórek zapalnych w endometrium – neutrofili, limfocytów, makrofagów i eozynofili, z uwzględnieniem różnic w możliwości występowania typów komórek w endometrium.

4.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy

4.5.1. Izolacja RNA

Fragmenty endometrium poddano homogenizacji mechanicznej w aparacie MagNA Lyser (Roche, Stany Zjednoczone) z użyciem kulek ceramicznych MagNA Lyser Green Beads (Roche, Szwajcaria) i jednofazowego roztworu fenolu i tiocyjaniny guanidyny (TRI Reagent, Molecular Research Center, Stany Zjednoczone). Następnie próbki zmieszano z chloroformem w celu rozdzielenia homogenatu na fazę wodną i organiczną. Fazę wodną, zawierającą RNA, przeniesiono do nowych, sterylnych probówek i poddano wytrąceniu. Kwas rybonukleinowy wytrącano za pomocą izopropanolu. Następnie pellet zawierający RNA poddano oczyszczaniu z wykorzystaniem alkoholu etylowego i wody wolnej od RNAz.

Próbki zawierające RNA poddano analizie ilości oraz analizie czystości kwasu rybonukleinowego z użyciem spektrofotometru (NanoDrop Lite, ThermoScientific, Stany Zjednoczone). Uzyskane próbki opisano i zamrożone w -80°C.

4.5.2. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

Jako geny referencyjne wykorzystano: gen kodujący podjednostkę A dehydrogenazy bursztynianowej (ang. *succinate dehydrogenase complex, subunit A gene, SDHA*) oraz gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene, GADPH*).

W celu wykonania ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *real-time polymerase chain reaction, qPCR*) i zbadania ekspresji genów *SDHA*, *GADPH*, *TGFB1*,

ACTA2, *MKI67*, *IGF1*, *PDGFRA*, *THY1*, *ESR1*, *PGR* w poszczególnych próbkach użyto zestawu TaqMan™ RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Thermofisher Scientific, Stany Zjednoczone) oraz sond TaqMan™: Ec03470487_m1 (*SDHA*), Ec03210916_gH (*GADPH*), Ec03468030_m1 (*TGFB1*), Ec07040967_m1 (*ACTA2*), Ec07039069_g1 (*MKI67*), Ec03468688_m1 (*IGF1*), Ec06993305_m1 (*PDGFRA*), Ec03470737_m1 (*THY1*), Ec03467534_m1 (*ESR1*), Ec03469694_s1 (*PGR*). Wykorzystane sondy znakowane 5(6)-karboksyluoresceiną (ang. *Fluorescein amidites*, FAM).

Badanie qPCR wykonano w termocyklerze z funkcją detekcji w czasie rzeczywistym (Light Cycler 480 II, Roche, Stany Zjednoczone). Dla każdego genu i próbki wykonano 3 powtórzenia w celu weryfikacji specyficzności reakcji. Proces qPCR i ocenę ekspresji badanych genów obejmował: odwrotną transkrypcję (ang. *reverse transcription*, Rt step) w temperaturze 48° C, aktywację polimerazy w 95° C przez 10 minut, denaturację (95° C 15 sekund), sekwencję 40 jednominutowych cykli przyłączania starterów w 60° C oraz detekcję sygnału. Do analizy wyników wykorzystano oprogramowania przypisanego do użytego termocyklera (Lightcycler 480 software 1.5.1.62).

4.5.3. Analiza względnej ekspresji mRNA

Geny *SDHA* i *GADPH*, oznaczone jako geny referencyjne, wykorzystano do obliczenia zmiany względnej ekspresji pozostałych badanych genów. Uzyskane wartości Ct poddano analizie z zastosowaniem metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$. W pierwszym kroku uśredniono wartości z powtórzeń poszczególnych genów. Następnie od wartości Ct badanych genów odjęto wartości uśrednionego Ct genów referencyjnych, dając wartość ΔCt . Dla uzyskanych w ten sposób wartości z próbek zaklasyfikowanych do kategorii I endometrozy (grupy kontrolnej) została średnia, którą w kolejnym kroku odjęto od wartości uzyskanych dla poszczególnych próbek ($\Delta\Delta Ct$). Ostateczny wynik uzyskano przez podniesienie 2 do potęgi $-\Delta\Delta Ct$. Uzyskane wyniki ilościowe reprezentowały krotność zmiany ekspresji badanych genów w próbkach reprezentujących kategorie I+, IIA, IIB i III endometrozy względem ekspresji badanych genów w grupie kontrolnej.

4.6. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano w programie IBM SPSS Statistics 29. Cele analizy statystycznej uwzględniały: a) testowanie różnic w ekspresji badanych genów

w poszczególnych kategoriach endometrozy KD; b) testowanie różnic w ekspresji badanych genów względem występowania poszczególnych zmian histopatologicznych związanych z morfologią tkanek i naciekiem zapalnym; c) ocenę korelacji pomiędzy ekspresjami badanych genów; d) określenie zależności pomiędzy cechami histopatologicznymi, a kategorią endometrozy KD; e) określenie zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych cech histopatologicznych w badanych skrawkach.

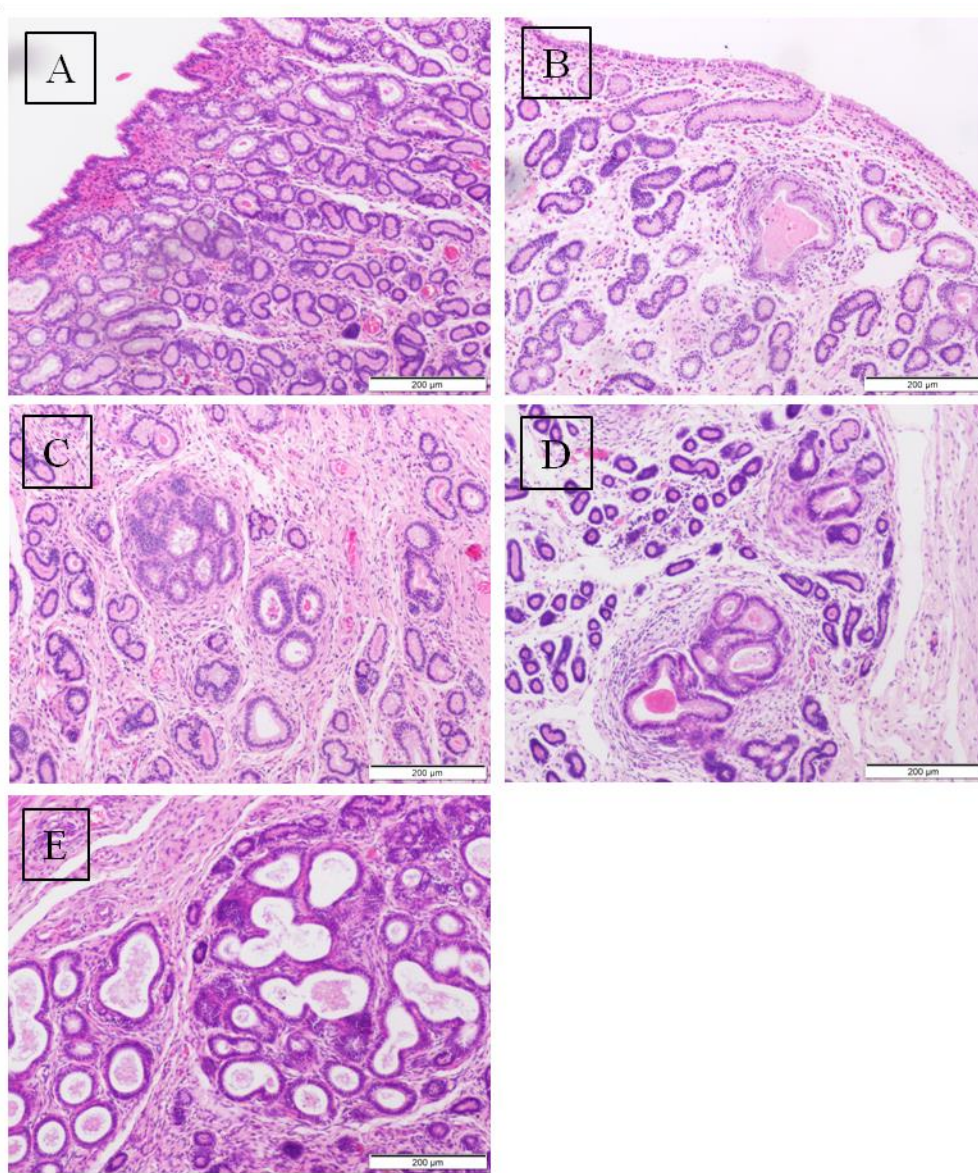
Dla danych ilościowych sprawdzono zgodność z rozkładem normalnym z wykorzystaniem testu Shapiro–Wilka. Ze względu na brak zgodności z rozkładem normalnym, w analizie statystycznej zastosowano testy nieparametryczne, a do opisu zmiennych ilościowych użyto wartości dla pierwszego kwartyła, mediany i trzeciego kwartyła (Q1, Me, Q3). Do porównania rozkładu zmiennej w dwóch grupach użyto testu Manna–Whitney'a. W przypadku porównania rozkładu w trzech i więcej grupach wykorzystano test Kruskalla–Wallisa. W przypadku braku różnic pomiędzy grupami przedstawiono wyniki dla wszystkich próbek łącznie.

W ocenie korelacji między ekspresjami badanych genów zastosowano współczynnik korelacji rho–Spearmana (ρ). W przypadku stwierdzenia istotnych statystycznie korelacji, wartości w zakresie $\pm 0,1$ – $0,29$ określono jako słabą korelację, $\pm 0,3$ – $0,59$ jako umiarkowaną korelację, $\pm 0,6$ – $0,79$ jako silną korelację, a $\pm 0,8$ – 1 jako bardzo silną korelację (Akoglu, 2018). W ocenie zależności pomiędzy dychotomicznymi cechami histopatologicznymi zastosowano współczynnik phi (ϕ). W przypadku stwierdzenia istotnych statystycznie korelacji, wartości w zakresie $\pm 0,1$ – $0,19$ określono jako słabą korelację, $\pm 0,2$ – $0,39$ jako umiarkowaną korelację, $\pm 0,4$ – $0,59$ jako silną korelację, a $\pm 0,6$ – 1 jako bardzo silną korelację (Rea & Parker, 2014). W ocenie zależności pomiędzy cechami histopatologicznymi, dla których przynajmniej jedna z cech była zmienną porządkową i przyjmowała więcej niż dwie wartości, zastosowano statystykę Tau–Kendalla (τ). W przypadku stwierdzenia istotnych statystycznie korelacji, wartości w zakresie $\pm 0,07$ – $0,2$ określono jako słabą korelację, $\pm 0,21$ – $0,42$ jako umiarkowaną korelację, $\pm 0,43$ – $0,6$ jako silną korelację, a $\pm 0,61$ – 1 jako bardzo silną korelację (Gilpin, 1993).

5. Przedstawienie i omówienie wyników

5.1. Statystyka opisowa zmiennych jakościowych

Wśród badanych wycinków błony śluzowej macicy klaczy 21% próbek zakwalifikowano do kategorii I endometrozy (rycina 1A), 15% próbek do kategorii I+ endometrozy (rycina 1B), 24% próbek do kategorii IIA endometrozy (rycina 1C), 19% próbek do kategorii IIB endometrozy (rycina 1D), a 21% próbek do kategorii III endometrozy (rycina 1E). Dystrybucję próbek w kolejnych kategoriach endometrozy zestawiono w tabeli 1.

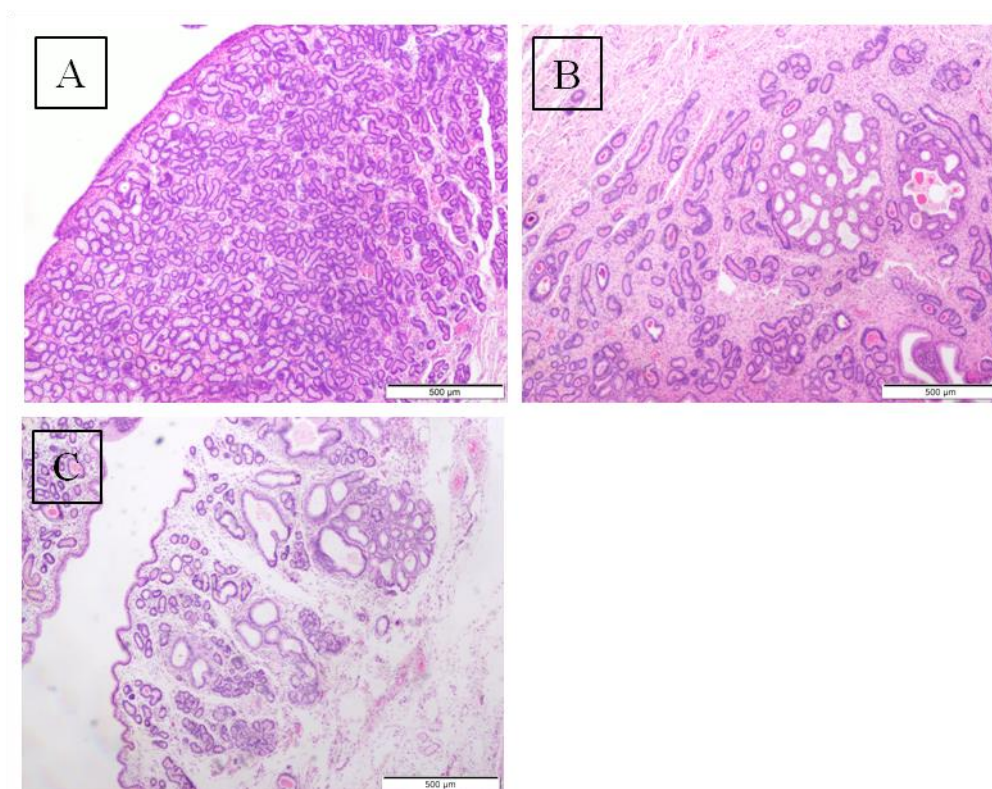


Rycina 1. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy klaczy ocenionej jako kategoria I (A), I+ (B), IIA (C), IIB (D) i III (E) zgodnie ze zmodyfikowaną klasyfikacją endometrozy Kenneya–Doiga. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ – 40 .

Tabela 1. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej n=47) próbek błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

Kategoria KD	N	%
I	10	21
I+	7	15
IIA	11	24
IIB	9	19
III	10	21

Zwyrodnienie gruczołów macicznych stwierdzono w 70% próbek, w tym ogniskowe zwyrodnienia gruczołów lub grup gruczołów w 51% próbek (rycina 2B) oraz nasilone zwyrodnienie dotyczące znaczącego odsetka gruczołów macicznych w 19% próbek (rycina 2C). Brak zwyrodnienia gruczołów macicznych stwierdzono w 30% próbek (rycina 2A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach reprezentujących nasilenie zwyrodnienia gruczołów macicznych zestawiono w tabeli 2.



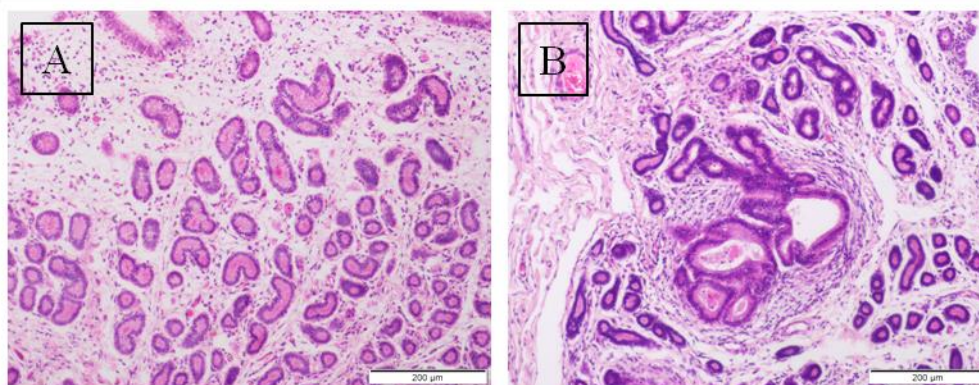
Rycina 2. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A), 1 (B) i 2 (C) w skali 0–2 nasilenia zwyrodnienia gruczołów macicznych zostało. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ –40.

Tabela 2. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach reprezentujących nasilenie zwyrodnienia gruczołów macicznych.

Zmienna	Skala	n	%
Zwyrodnienie gruczołów	0	14	30
	1	24	51
	2	9	19

Przypisy: nasilenie zwyrodnienia gruczołów macicznych zostało ocenione w skali 0–2 reprezentującej: 0 – brak zwyrodnienia, 1 – ogniskowe zwyrodnienie gruczołów/grup gruczołów, 2 – nasilone zwyrodnienie dotyczące znaczącego odsetka gruczołów macicznych.

Obecność ognisk włóknienia okołogruzołowego stwierdzono w 49% próbek (rycina 3B), a ich brak w 51% próbek (rycina 3A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach reprezentujących obecność ognisk włóknienia okołogruzołowego zestawiono w tabeli 3.



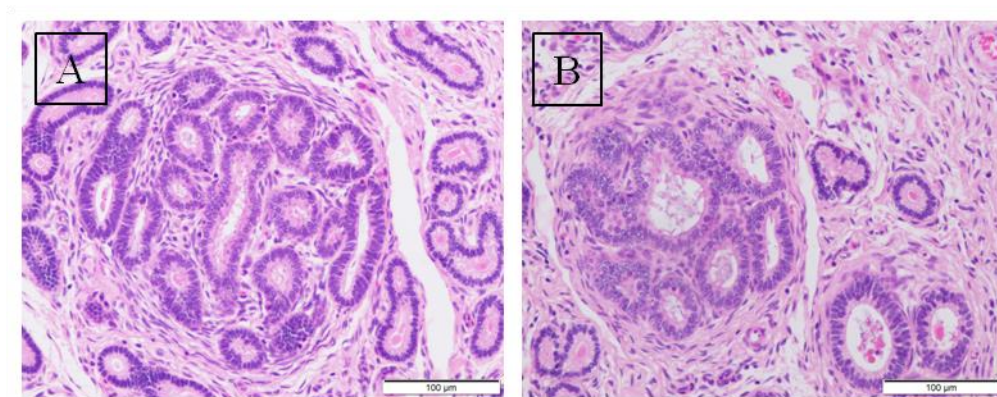
Rycina 3. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy klaczy ocenionej jako 0 (A) i 1 (B) w skali dychotomicznej obecności włóknienia okołogruzołowego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ –40.

Tabela 3. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących obecność ognisk włóknienia okołogruzołowego.

Zmienna	skala	n	%
Ogniska włóknienia okołogruzołowego	0	24	51
	1	23	49

Przypisy: nasilenie zwyrodnienie gruczołów macicznych zostało ocenione w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak włóknienia okołogruzołowego, 1 – obecność włóknienia okołogruzołowego.

Obecność aktywnych metabolicznie fibroblastów stwierdzono w 38% próbek (rycina 4B) podczas gdy obecność nieaktywnych metabolicznie fibroblastów stwierdzono w 62% próbek (rycina 4A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach reprezentujących aktywność fibroblastów zestawiono w tabeli 4.



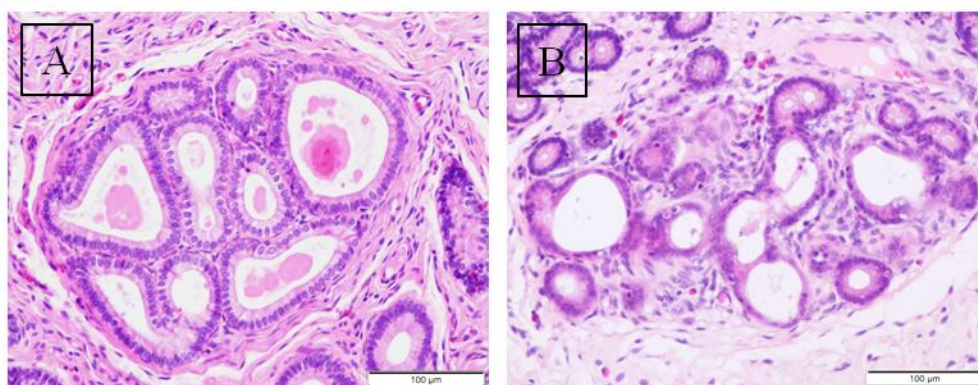
Rycina 4. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A) i 1 (B) w skali dychotomicznej aktywności fibroblastów. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4-40$.

Tabela 4. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach reprezentujących aktywność fibroblastów.

Zmienna	skala	n	%
Aktywność fibroblastów	0	29	62
	1	18	38

Przypisy: aktywność fibroblastów została oceniona w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak aktywności fibroblastów, 1 – aktywność fibroblastów.

Cechy niszczenia błony podstawnej gruczołów macicznych stwierdzono w 32% próbek (rycina 5B), a ciągłość błony podstawnej gruczołów macicznych w 68% próbek (rycina 5A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach reprezentujących niszczenie błony podstawnej gruczołów macicznych zestawiono w tabeli 5.



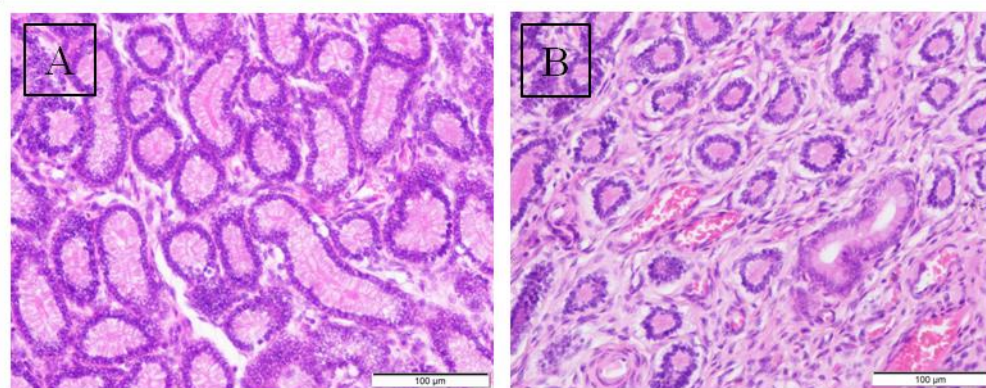
Rycina 5. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy klaczy ocenionej jako 0 (A) i 1 (B) w skali dychotomicznej niszczenia błony podstawnej gruczołów macicznych. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4-40$.

Tabela 5. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących niszczenie błony podstawnej gruczołów macicznych.

Zmienna	skala	n	%
Niszczenie błony podstawnej	0	32	68
	1	15	32

Przypisy: niszczenie błony podstawnej gruczołów macicznych zostało ocenione w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak niszczenia błony podstawnej, 1 – niszczenie błony podstawnej.

Zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego stwierdzono w 34% próbek (rycina 6B), a jego prawidłowe różnicowanie w 66% próbek (rycina 6A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach reprezentujących zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego zestawiono w tabeli 6.



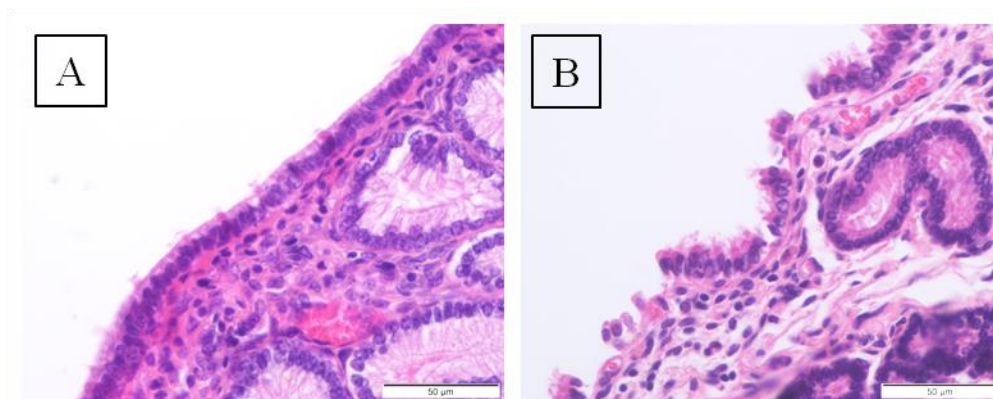
Rycina 6. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A) i 1 (B) w skali dychotomicznej zaburzenia różnicowania nabłonka gruczołowego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4-40$.

Tabela 6. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach reprezentujących zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego.

Zmienna	skala	n	%
Zaburzenie	0	31	66
różnicowania	1	16	34

Przypisy: zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego zostało ocenione w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – prawidłowe różnicowanie nabłonka gruczołowego, 1– zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego.

Ubytek nabłonka powierzchniowego stwierdzono w 30% próbek (rycina 7B) podczas gdy ciągłość nabłonka powierzchniowego stwierdzono w 70% próbek (rycina 7A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach opisujących obecność ubytków nabłonka powierzchniowego zestawiono w tabeli 7.



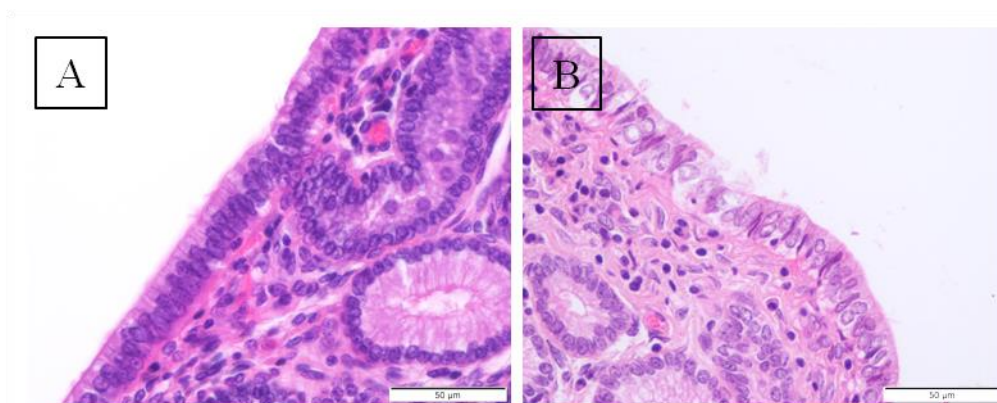
Rycina 7. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy klaczy ocenionej jako 0 (A) i 1 (B) w skali dychotomicznej ubytku nabłonka powierzchniowego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4-40$.

Tabela 7. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących ubytek nabłonka powierzchniowego.

Zmienna	skala	n	%
Ubytki nabłonka	0	33	70
powierzchniowego	1	14	30

Przypisy: ubytek nabłonka powierzchniowego został oceniony w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak ubytku, 1 – obecność ubytku.

Zwyrodnienie nabłonka powierzchniowego stwierdzono w 60% próbek (rycina 8B), a jego prawidłową budowę w 40% próbek (rycina 8A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach reprezentujących zwyrodnienie nabłonka powierzchniowego zestawiono w tabeli 8.



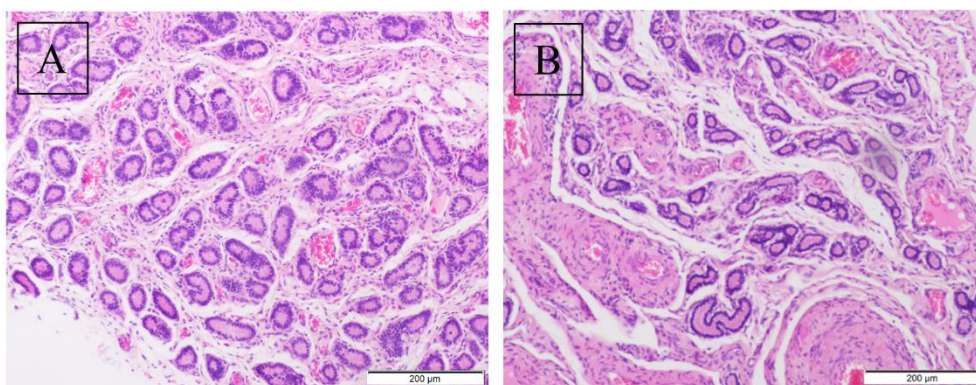
Rycina 8. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A) i 1 (B) w skali dychotomicznej zwyrodnienia nabłonka powierzchniowego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4-40$.

Tabela 8. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach reprezentujących zwyrodnienie nabłonka powierzchniowego.

Zmienna	skala	n	%
Zwyrodnienie nabłonka powierzchniowego	0	19	40
	1	28	60

Przypisy: zwyrodnienie nabłonka powierzchniowego zostało ocenione w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak zwyrodnienia, 1 – obecność zwyrodnienia.

Włóknienie okołonaczyniowe stwierdzono w 43% próbek (rycina 9B), a prawidłową strukturę przestrzeni okołonaczyniowych w 57% próbek (rycina 9A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach reprezentujących włóknienie okołonaczyniowe zestawiono w tabeli 9.



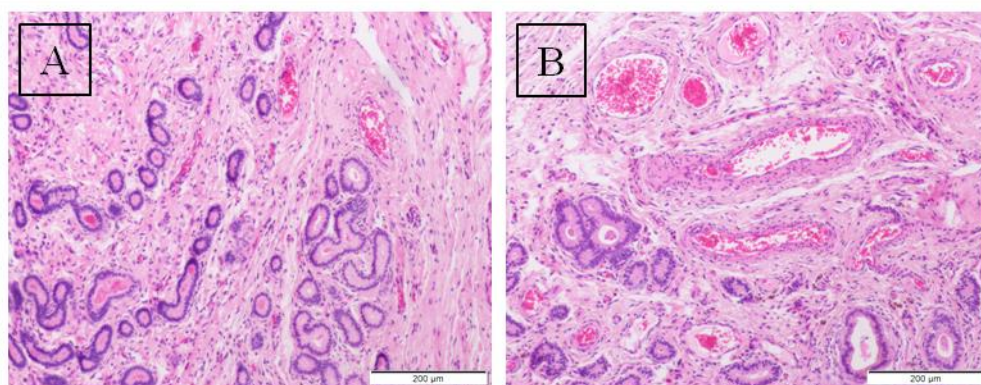
Rycina 9. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy klaczy ocenionej jako 0 (A) i 1 (B) w skali dychotomicznej włóknienia okołonaczyniowego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4-40$.

Tabela 9. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących włóknienie okołonaczyniowe.

Zmienna	skala	n	%
Włóknienie	0	27	57
okołonaczyniowe	1	20	43

Przypisy: włóknienie okołonaczyniowe zostało ocenione w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak włóknienia, 1 – obecność włóknienia.

Obecność rozstrzeni naczyń stwierdzono w 60% próbek (rycina 10B), a ich brak w 40% próbek (rycina 10A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach reprezentujących rozstrzeń naczyń zestawiono w tabeli 10.



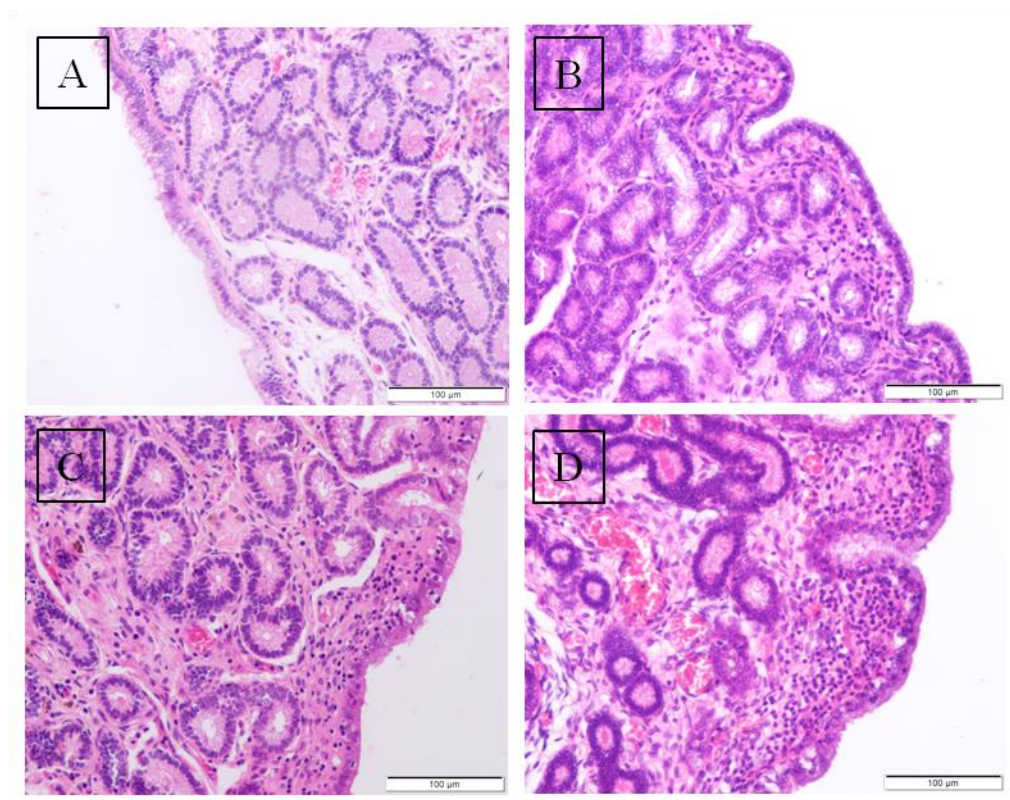
Rycina 10. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy klaczy ocenionej jako 0 (A) i 1 (B) w skali dychotomicznej rozstrzeni naczyń. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4-40$.

Tabela 10. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących rozstrzeń naczyń.

Zmienna	skala	n	%
Rozstrzeń naczyń	0	19	40
	1	28	60

Przypisy: rozstrzeń naczyń została oceniona w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak włóknienia, 1 – obecność włóknienia.

Obecność nacieku zapalnego stwierdzono w 85% próbek, w tym niewielki naciek w 34% próbek (rycina 11B), umiarkowany naciek w 36% próbek (rycina 11C) i silny naciek w 15% próbek (rycina 11D). Również w 15% próbek nie stwierdzono obecności nacieku zapalnego (rycina 11A). Dystrybucję próbek w kolejnych grupach nasilenie nacieku zapalnego zestawiono w tabeli 11.



Rycina 11. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A), 1 (B), 2 (C) i 3 (D) w skali 0–3 nasilenia nacieku zapalnego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ – 40 .

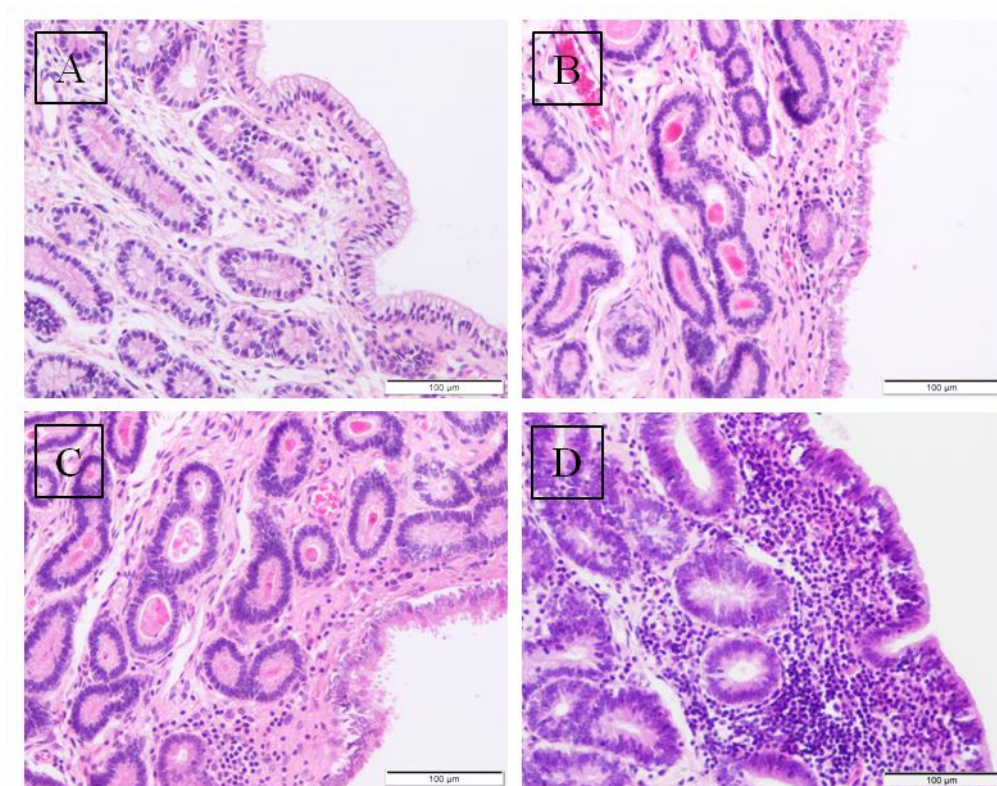
Tabela 11. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach nasilenie nacieku zapalnego.

Zmienna	skala	n	%
Nasilenie nacieku zapalnego	0	7	15
	1	16	34
	2	17	36
	3	7	15

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek.

Obecność limfocytarnego nacieku zapalnego stwierdzono w 85% próbek, w tym niewielki naciek limfocytarny w 30% próbek (rycina 12B), umiarkowany naciek limfocytarny w 40% próbek (rycina 12C) oraz silny naciek limfocytarny w 15% próbek (rycina 12D). W 15% próbek nie stwierdzono obecności limfocytarnego nacieku

zapalnego (rycina 12A). Dystrybucję omawianych próbek w kolejnych grupach zestawiono w tabeli 12.



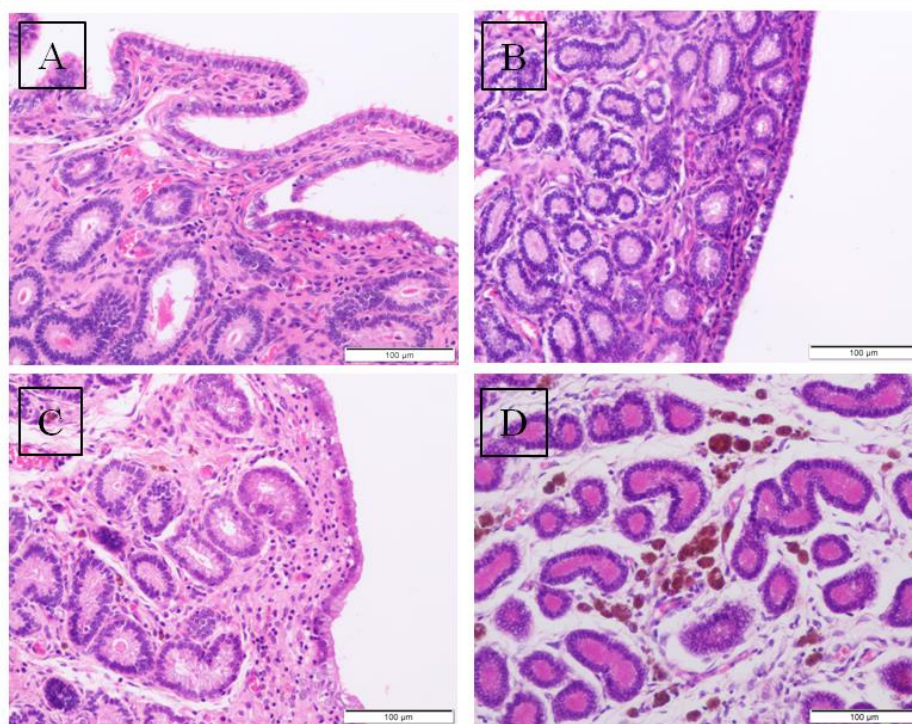
Rycina 12. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A), 1 (B), 2 (C) i 3 (D) w skali 0–3 nasilenia limfocytarnego nacieku zapalnego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ –40.

Tabela 12. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach nasilenie limfocytarnego nacieku zapalnego.

Zmienna	skala	n	%
	0	7	15
Nasilenie nacieku	1	14	30
zapalnego (limfocyty)	2	19	40
	3	7	15

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek.

Obecność makrofagowego nacieku zapalnego stwierdzono w 23% próbek, w tym niewielki naciek makrofagowy w 13% próbek (rycina 13B), umiarkowany naciek makrofagowy w 8% próbek (rycina 13C) i silny naciek makrofagowy w 2% próbek (rycina 13D). Natomiast w 77% próbek nie stwierdzono obecności makrofagów (rycina 13A). Dystrybucję omawianych próbek w kolejnych grupach zestawiono w tabeli 13.



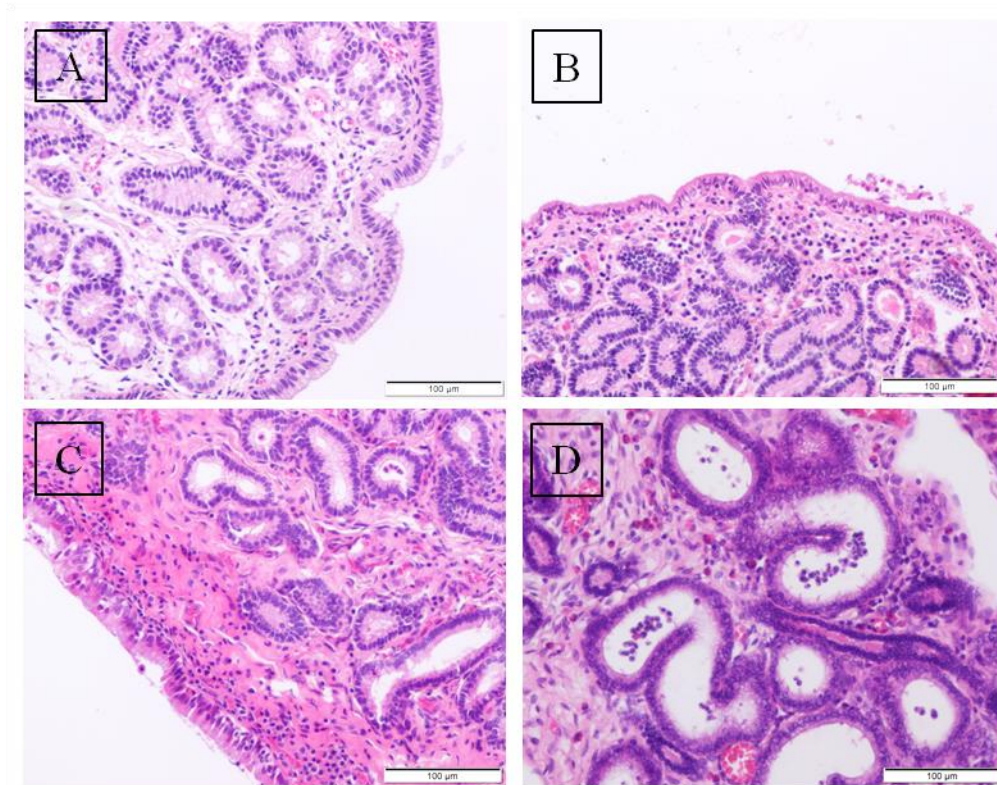
Rycina 13. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A), 1 (B), 2 (C) i 3 (D) w skali 0–3 nasilenia makrofagowego nacieku zapalnego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ –40.

Tabela 13. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach nasilenie makrofagowego nacieku zapalnego.

Zmienna	skala	n	%
Nasilenie nacieku zapalnego (makrofagi)	0	36	77
	1	6	13
	2	4	8
	3	1	2

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek.

Obecność neutrofilowego nacieku zapalnego również stwierdzono w 23% próbek, w tym niewielki naciek w 13% próbek (rycina 14B), umiarkowany naciek w 6% próbek (rycina 14C) i silny naciek w 4% próbek (rycina 14D). Również w 77% próbek nie stwierdzono obecności neutrofilów (rycina 14A). Dystrybucję omawianych próbek w kolejnych grupach zestawiono w tabeli 14.



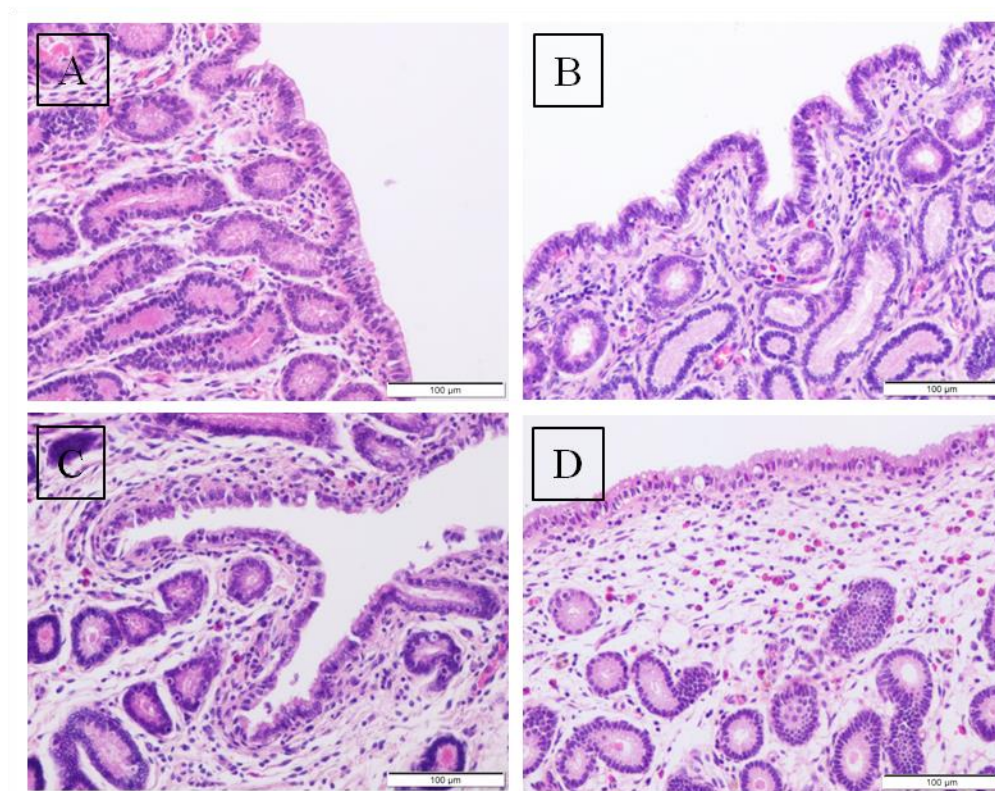
Rycina 14. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A), 1 (B), 2 (C) i 3 (D) w skali 0–3 nasilenia neutrofilowego nacieku zapalnego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ –40.

Tabela 14. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach nasilenie neutrofilowego nacieku zapalnego.

Zmienna	skala	n	%
	0	36	77
Nasilenie nacieku	1	6	13
zapalnego (neutrofile)	2	3	6
	3	2	4

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek.

Obecność eozynofilowego nacieku zapalnego stwierdzono w 28% próbek. Niewielki naciek eozynofilowy był obecny w 17% próbek (rycina 15B), umiarkowany naciek eozynofilowy w 6% próbek (rycina 15C), a silny naciek eozynofilowy w 4% próbek (rycina 15D). W 72% próbek nie stwierdzono obecności eozynofili (rycina 15A). Dystrybucję omawianych próbek w kolejnych grupach zestawiono w tabeli 15.



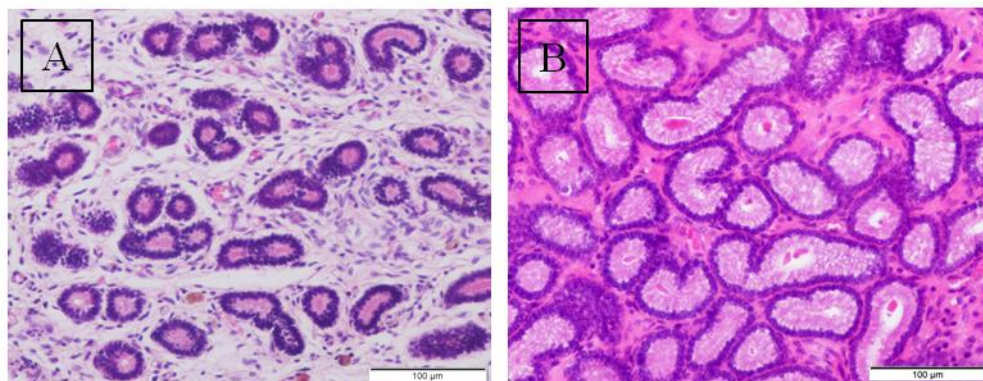
Rycina 15. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy kłaczy ocenionej jako 0 (A), 1 (B), 2 (C) i 3 (D) w skali 0–3 nasilenia eozynofilowego nacieku zapalnego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ –40.

Tabela 15. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach nasilenie eozynofilowego nacieku zapalnego.

Zmienna	skala	n	%
Nasilenie nacieku zapalnego (eozynofile)	0	34	72
	1	8	17
	2	3	6
	3	2	4

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek.

Badane wycinki błony śluzowej macicy klaczy pobrano odpowiednio w fazie pęcherzykowej cyklu jajnikowego w przypadku 43% próbek (rycina 16A) oraz w fazie lutealnej cyklu jajnikowego w przypadku 57% próbek (rycina 16B). Dystrybucję próbek względem faz cyklu zestawiono w tabeli 16.



Rycina 16. Obraz mikroskopowy błonie śluzowej macicy klaczy w fazie pęcherzykowej (A) i fazie lutealnej (B) cyklu jajnikowego. Barwienie HE. Mikroskop świetlny, powiększenie okularu $\times 10$; powiększenie obiektywu $\times 4$ – 40 .

Tabela 16. Dystrybucja (n, liczba próbek; % względem całkowitej $n=47$) próbek błonie śluzowej macicy klaczy pobranych w fazie pęcherzykowej i lutealnej cyklu jajnikowego.

Zmienna	skala	n	%
Faza cyklu	pęcherzykowa	20	43
	lutealna	27	57

Przypisy: faza cyklu jajnikowego oceniona w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – fazę pęcherzykową, 1 – fazę lutealną.

5.2. Statystyka opisowa zmiennych ilościowych w podziale na kategorie endometrozy

Porównując ekspresję mRNA badanych genów pomiędzy kolejnymi kategoriami endometrozy, stwierdzono istotnie wyższą ekspresję *TGFB1* w kategorii I+ i IIA niż I oraz III. Jednocześnie nie stwierdzono różnic w ekspresji *TGFB1* pomiędzy kategoriami I, IIB i III, kategoriami I+, IIA i IIB oraz IIA i III (tabela 17). Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji *ACTA2* (tabeli 18), *MKI67* (tabela 19), *IGF1* (tabela 20), *PDGFRA* (tabela 21). Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję *THY1* w kategorii IIA niż I oraz IIB. Jednocześnie nie stwierdzono różnic w ekspresji *THY1* pomiędzy kategoriami I, I+, IIB i III oraz I+, IIA i III (tabela 22). Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji *ESR1* (tabela 23) oraz *PGR* (tabela 24) pomiędzy kategoriami I, I+, IIA, IIB i III. Biorąc pod uwagę wysokość nabłonka powierzchniowego, nie stwierdzono różnic pomiędzy kategoriami endometrozy (tabela 25).

Tabela 17. Ekspresja mRNA *TGFB1* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

<i>TGFB1</i>	Q1	Me	Q3
I ^a			
I+ ^b	53,05	107,39	885,59
IIA ^{bc}	28,69	70,25	386,53
IIB ^{ab}	1,96	2,38	2,80
III ^{ac}	0,66	5,09	627,92
Łącznie	0,50	5,01	107,39
p	0,04		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

Tabela 18. Ekspresja mRNA *ACTA2* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

ACTA2	Q1	Me	Q3
I ^a			
I+ ^a	0,61	2,95	15,98
IIA ^a	6,57	31,91	195,47
IIB ^a	0,03	0,98	2,30
III ^a	1,39	2,93	15,65
Łącznie	0,61	2,95	23,32
p	0,17		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

Tabela 19. Ekspresja mRNA *MKI67* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

MKI67	Q1	Me	Q3
I ^a			
I+ ^a	1,54	5,83	8,03
IIA ^a	0,59	1,00	2,47
IIB ^a	0,22	0,49	2,21
III ^a	0,71	2,82	12,99
Łącznie	0,35	0,93	6,02
p	0,51		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

Tabela 20. Ekspresja mRNA *IGF1* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+

<i>IGF1</i>	Q1	Me	Q3
I ^a			
I+ ^a	0,97	1,21	1,95
IIA ^a	0,01	0,13	18,06
IIB ^a	0,03	0,26	0,47
III ^a	0,01	0,02	0,29
Łącznie	0,03	0,37	3,56
p	0,25		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

Tabela 21. Ekspresja mRNA *PDGFRA* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

<i>PDGFRA</i>	Q1	Me	Q3
I ^a			
I+ ^a	0,06	0,67	2,25
IIA ^a	0,03	0,44	3,25
IIB ^a	0,07	0,15	1,38
III ^a	0,52	1,62	4,29
Łącznie	0,09	0,74	3,12
p	0,73		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

Tabela 22. Ekspresja mRNA *THY1* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

THY1	Q1	Me	Q3
I ^a			
I+ ^{ab}	1,40	15,88	48,48
IIA ^b	12,12	170,38	419,40
IIB ^{ac}	0,10	1,09	3,15
III ^{ab}	1,84	19,2	46,67
Łącznie	nd	nd	nd
p	0,04		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym; nd – nie dotyczy.

Tabela 23. Ekspresja mRNA *ESR1* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

ESR1	Q1	Me	Q3
I ^a			
I+ ^a	1,02	2,93	4,93
IIA ^a	0,07	0,91	3,05
IIB ^a	0,22	0,41	1,11
III ^a	0,55	2,53	4,33
Łącznie	0,22	1,02	4,33
p	0,67		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

Tabela 24. Ekspresja mRNA *PGR* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

<i>PGR</i>	Q1	Me	Q3
I ^a			
I+ ^a	15,04	21,12	33,56
IIA ^a	1,06	11,45	29,91
IIB ^a	0,01	13,80	22,66
III ^a	0,80	6,12	18,95
Łącznie	0,95	6,30	22,93
p	0,31		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

Tabela 25. Wysokość nabłonka powierzchniowego (WNP) [μm] (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych kategoriach endometrozy klasyfikowanej wg. Kenneya–Doiga (KD) (kategorie I, IIA, IIB, i III) z uwzględnieniem dodatkowej kategorii I+.

WNP	Q1	Me	Q3
I ^a	11,0	14,5	16,5
I+ ^a	14,0	16,0	17,0
IIA ^a	11,5	14,0	14,0
IIB ^a	12,0	12,5	16,0
III ^a	12,0	17,0	20,0
Łącznie	12,0	14,0	17,0
p	0,27		

Przypisy: Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

5.3. Statystyka opisowa zmiennych ilościowych względem zmiennych jakościowych

Następnie przeprowadzono grupowanie zmiennych ilościowych względem grup wyznaczanych przez zmienne jakościowe, a następnie porównano ekspresję badanych genów oraz wysokość nabłonka powierzchniowego pomiędzy uzyskanymi grupami. W tabelach od 26 do 33 zestawiono różnice istotne statystycznie. Dla pozostałych grup, nie stwierdzono różnicy w wartościach zmiennych ilościowych.

W próbkach wykazujących cechy niszczenia błony podstawnej gruczołów macicznych stwierdzono istotnie wyższą ekspresję *TGFB1* i *THY1* niż w próbkach w których nie wykazano niszczenia (tabela 26).

Tabela 26. Ekspresja mRNA *TGFB1* i *THY1* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy kłaczy w kolejnych grupach reprezentujących niszczenie błony podstawnej gruczołów macicznych.

Geny	skala	Q1	Me	Q3
<i>TGFB1</i>	0 ^a	0,24	1,22	15,38
	1 ^b	36,53	244,57	672,53
	p	<0,01		
<i>THY1</i>	0 ^a	0,45	2,03	25,52
	1 ^b	7,78	31,62	194,52
	p	0,04		

Przypisy: niszczenie błony podstawnej gruczołów macicznych zostało ocenione w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak niszczenia błony podstawnej, 1 – niszczenie błony podstawnej. Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

W próbkach wykazujących cechy ubytków nabłonka powierzchniowego stwierdzono istotnie niższą ekspresję *MKI67* niż w próbkach o prawidłowym nabłonku powierzchniowym (tabela 27).

Tabela 27. Ekspresja mRNA *MKI67* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących ubytki nabłonka powierzchniowego.

Gen	skala	Q1	Me	Q3
<i>MKI67</i>	0 ^a	0,48	2,18	11,11
	1 ^b	0,20	0,48	0,59
	p	0,02		

Przypisy: ubytek nabłonka powierzchniowego został oceniony w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak ubytku, 1 – obecność ubytku. Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

W próbkach objętych naciekiem zapalnym (tabela 28) oraz objętych specyficznym naciekiem limfocytarnym (tabela 29) stwierdzono istotnie niższą ekspresję *IGF1* w przypadku silnego i umiarkowanego zapalenia niż w próbkach prawidłowych. Jednocześnie nie stwierdzono różnic pomiędzy niewielkim naciekiem oraz naciekiem umiarkowanym i silnym, jak również pomiędzy niewielkim naciekiem a próbkami prawidłowymi.

Tabela 28. Ekspresja mRNA *IGF1* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących nasilenie nacieku zapalnego.

Gen	skala	Q1	Me	Q3
<i>IGF1</i>	0 ^a	1,21	6,49	9,61
	1 ^{ab}	0,12	0,89	14,49
	2 ^b	0,02	0,1	0,39
	3 ^b	0,01	0,15	0,97
	p	0,04		

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek. Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

Tabela 29. Ekspresja mRNA *IGF1* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących nasilenie limfocytarnego nacieku zapalnego.

Gen	skala	Q1	Me	Q3
<i>IGF1</i>	0 ^a	9,51	9,61	13,84
	1 ^{ab}	0,23	0,89	5,28
	2 ^b	0,02	0,17	0,47
	3 ^b	0,01	0,03	0,97
	p	0,03		

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek. Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

W próbkach objętych neutrofilowym naciekiem zapalnym stwierdzono istotnie niższą ekspresję *IGF1* w przypadku niewielkiego i umiarkowanego zapalenia niż w próbkach prawidłowych. Jednocześnie nie stwierdzono różnic pomiędzy silnym naciekiem oraz naciekiem umiarkowanym i niewielkim, jak również pomiędzy silnym naciekiem a próbkami prawidłowymi (tabela 30).

Tabela 30. Ekspresja mRNA *IGF1* (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących nasilenie neutrofilowego nacieku zapalnego.

Gen	skala	Q1	Me	Q3
<i>IGF1</i>	0 ^a	0,12	0,56	6,99
	1 ^b	0,005	0,01	0,18
	2 ^b	0,004	0,006	0,008
	3 ^{ab}	0,006	0,14	0,29
	p	0,02		

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek. Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

W próbkach wykazujących zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego stwierdzono obecność istotnie wyższego nabłonka powierzchniowego niż w próbkach o prawidłowo zróżnicowanym nabłonku gruczołowym (tabela 31).

Tabela 31. Wysokość nabłonka powierzchniowego (WNP) [μm] (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego.

Cecha	skala	Q1	Me	Q3
WNP	0 ^a	11,0	14,0	16,5
	1 ^b	13,0	15,5	20,0
	p	0,03		

Przypisy: zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego zostało ocenione w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – prawidłowe różnicowanie nabłonka gruczołowego, 1 – zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego. Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

W próbkach wykazujących obecność rozstrzeni naczyń stwierdzono obecność istotnie wyższego nabłonka powierzchniowego niż w prawidłowych próbkach (tabela 32).

Tabela 32. Wysokość nabłonka powierzchniowego (WNP) [μm] (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących rozstrzeń naczyń.

Cecha	skala	Q1	Me	Q3
WNP	0 ^a	10,5	12,5	15,5
	1 ^b	13,5	17,0	17,5
	p	0,02		

Przypisy: rozstrzeń naczyń została oceniona w skali dychotomicznej reprezentującej: 0 – brak włóknienia, 1 – obecność włóknienia. Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

W próbkach objętych limfocytarnym naciekiem zapalnym stwierdzono również obecność istotnie wyższego nabłonka powierzchniowego w przypadku zapalenia

niewielkiego i silnego w porównaniu z zapaleniem umiarkowanym. Jednak nie stwierdzono różnicy pomiędzy żadnym z nasilen zapalenia, a nabłonkiem nie objętym procesem zapalnym (tabela 33).

Tabela 33. Wysokość nabłonka powierzchniowego (WNP) [μm] (Q1 i Q3 – 1 i 3 kwartył; Me, mediana) w błonie śluzowej macicy klaczy w kolejnych grupach reprezentujących nasilenie limfocytarnego nacieku zapalnego.

Gen	skala	Q1	Me	Q3
WNP	0 ^a	11,0	13,5	16,0
	1 ^{ab}	12,0	15,0	18,0
	2 ^{ac}	10,0	12,0	14,0
	3 ^{ab}	16,5	17,0	19,0
	p	0,009		

Przypisy: nasilenie nacieku zapalnego zostało ocenione w skali 0–3 reprezentującej: 0 – brak nacieku, 1 – niewielki naciek, 2 – umiarkowany naciek, 3 – silny naciek. Różnice istotne statystycznie dla $p < 0,05$ zaznaczono kolejnymi literami w indeksie górnym.

5.4. Korelacje międzyklasowe zmiennych ilościowych i zmiennych jakościowych

Następnie zbadano siłę i kierunek zależności pomiędzy wykazanymi różnicami. Stwierdzono umiarkowaną ujemną korelację pomiędzy ekspresją *IGF1* i nasileniem endometrozy, włóknieniem okołonaczyniowym oraz nasileniem nacieku zapalnego zarówno rozpatrywanym łącznie jak i specyficznym w odniesieniu do zapalenia limfocytarnego i neutrofilowego. Stwierdzono umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją *TGFB1* i niszczeniem błony podstawnej. Stwierdzono również umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy wysokością nabłonka powierzchniowego i zaburzeniem różnicowania nabłonka gruczołowego oraz obecnością rozstrzeni naczyń. Stwierdzono także umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją *MKI67* i obecnością ubytków w nabłonku powierzchniowym jak i ekspresją *THY1* i niszczeniem błony podstawnej gruczołów macicznych. Omawiane korelacje zestawiono w tabeli 34.

Tabela 34. Współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ) pomiędzy zmiennymi ilościowymi (ekspresją mRNA *TGFB1*, *ACTA2*, *MKI67*, *IGF1*, *PDGFRA*, *THY1*, *ESR1*, *PGR* oraz wysokością nabłonka powierzchniowego (WNP)) a zmiennymi jakościowymi (cechami histopatologicznymi) w błonie śluzowej macicy kłaczy niezależnie od kategorii endometrozy.

ρ ; p	<i>TGFB1</i>	<i>ACTA2</i>	<i>MKI67</i>	<i>IGF1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>THY1</i>	<i>ESR1</i>	<i>PGR</i>	WNP
Kategoria KD	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = -0,40$ $p=0,01$	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Zwyrodnienie gruczołów	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Ogniska włóknienia	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Aktywność fibroblastów	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Niszczenie błony podstawnej	$\rho = 0,54$ $p=0,007$	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = 0,31$ $p=0,04$	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Zaburzenie różnicowania	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = 0,32$ $p=0,03$
Ubytek nabłonka pow.	p>0,05	p>0,05	$\rho = -0,38$ $p=0,02$	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Zwyrodnienie nabłonka pow.	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Włóknienie okołonaczyniowe	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = -0,32$ $p=0,048$	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Rozstrzeń naczyń	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = 0,35$ $p=0,02$
Nasilenie nacieku zapalnego	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = -0,45$ $p=0,004$	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Limfocyty	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = -0,47$ $p=0,003$	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Makrofagi	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Neutrofile	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = -0,51$ $p<0,001$	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Eozynofile	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Faza cyklu	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

5.5 Korelacje wewnątrzklasowe zmiennych ilościowych

Następnie zbadano siłę i kierunek zależności pomiędzy zmiennymi wewnątrz klasy zmiennych ilościowych. Stwierdzono bardzo silną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją *THY1* i *ACTA2*, ekspresją *ESR1* i *MKI67* oraz ekspresją *ESR1* i *PDGFRA*. Stwierdzono również silną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją *PDGFRA* i *MKI67*, ekspresją *ESR1* i *ACTA2* oraz ekspresją *ESR1* i *THY1*. Z kolei umiarkowaną dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy ekspresją *MKI67* i *ACTA2*, ekspresją *PDGFRA* i *ACTA2* oraz ekspresją *PGR* i *ACTA2*; jak również ekspresją *MKI67* i *THY1*, ekspresją *PDGFRA* i *THY1* oraz ekspresją *PGR* i *THY1*. Omawiane korelacje zestawiono w tabeli 35.

Tabela 35. Współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ) pomiędzy ekspresją mRNA *TGFB1*, *ACTA2*, *MKI67*, *IGF1*, *PDGFRA*, *THY1*, *ESR1*, *PGR* oraz wysokością nabłonka powierzchniowego (WNP) w błonie śluzowej macicy kłaczy niezależnie od kategorii endometrozy.

ρ ; p	<i>TGFB1</i>	<i>ACTA2</i>	<i>MKI67</i>	<i>IGF1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>THY1</i>	<i>ESR1</i>	<i>PGR</i>	WNP
<i>TGFB1</i>	x								
<i>ACTA2</i>	p>0,05	x							
<i>MKI67</i>	p>0,05	$\rho = 0,55$ $p<0,001$	x						
<i>IGF1</i>	p>0,05	p>0,05	p>0,05	x					
<i>PDGFRA</i>	p>0,05	$\rho = 0,46$ $p=0,002$	$\rho = 0,86$ $p<0,001$	p>0,05	x				
<i>THY1</i>	p>0,05	$\rho = 0,86$ $p<0,001$	$\rho = 0,59$ $p<0,001$	p>0,05	$\rho = 0,49$ $p<0,001$	x			
<i>ESR1</i>	p>0,05	$\rho = 0,62$ $p<0,001$	$\rho = 0,86$ $p<0,001$	p>0,05	$\rho = 0,86$ $p<0,001$	$\rho = 0,65$ $p<0,001$	x		
<i>PGR</i>	p>0,05	$\rho = 0,33$ $p=0,048$	p>0,05	p>0,05	p>0,05	$\rho = 0,33$ $p=0,047$	p>0,05	x	
WNP	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	x

5.6 Korelacje wewnątrzklasowe zmiennych jakościowych

Następnie zbadano siłę i kierunek zależności pomiędzy zmiennymi wewnątrz klasy zmiennych jakościowych. Stwierdzono silną dodatnią korelację pomiędzy kategorią endometrozy i zwyrodnieniem gruczołów macicznych, obecnością ognisk

włóknienia okołogruzołowego, nasileniem nacieku zapalnego oraz nasileniem limfocytarnego nacieku zapalnego. Stwierdzono również umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy kategorią endometrozy i zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego oraz nasileniem neutrofilowego nacieku zapalnego; jak również słabą dodatnią korelację pomiędzy kategorią endometrozy i nasileniem eozynofilowego nacieku zapalnego.

Silną dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy zwyrodnieniem gruczołów macicznych i obecnością włóknienia okołogruzołowego; a także umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy zwyrodnieniem gruczołów macicznych i nasileniem nacieku zapalnego – zarówno ogólnym jak i limfocytarnym oraz neutrofilowym. Silną dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy obecnością włóknienia okołogruzołowego i nasileniem limfocytarnego nacieku zapalnego oraz umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy obecnością włóknienia okołogruzołowego i ubytkiem oraz zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego jak również nasileniem nacieku zapalnego i nasileniem neutrofilowego nacieku zapalnego. Stwierdzono umiarkowaną ujemną korelację pomiędzy aktywnością fibroblastów i nasileniem neutrofilowego nacieku zapalnego. Stwierdzono umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy zaburzeniem różnicowania nabłonka gruczołowego i obecnością rozstrzeni naczyń oraz makrofagowego nacieku zapalnego; jak również średnia ujemną korelację pomiędzy zaburzeniem różnicowania nabłonka gruczołowego i zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego oraz nasileniem neutrofilowego nacieku zapalnego. Silną dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy ubytkiem i zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego. Umiarkowaną dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego i nasileniem nacieku zapalnego, zarówno w ujęciu ogólnym jak i w specyficznym odniesieniu do nacieku limfocytarnego, makrofagowego i neutrofilowego. Umiarkowaną dodatnią korelację stwierdzono również pomiędzy obecnością rozstrzeni naczyń i nasileniem nacieku zapalnego, zarówno ogólnym jak i makrofagowym. Natomiast w odniesieniu do samego nasilenia nacieku zapalnego stwierdzono bardzo silną dodatnią korelację pomiędzy naciekiem ogólnym i limfocytarnym, umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy naciekiem ogólnym i neutrofilowym oraz słabą dodatnią korelację pomiędzy naciekiem ogólnym i makrofagowym oraz eozynofilowym; jak również naciekiem limfocytarnym i neutrofilowym, limfocytarnym i eozynofilowym oraz makrofagowym i eozynofilowym. Omawiane korelacje zestawiono w tabeli 36.

Tabela 36. Współczynnik korelacji tau c Kendalla (τ) lub phi Yula (ϕ) pomiędzy ekspresją kategorią endometrozy oraz cechami histopatologicznymi w błonie śluzowej macicy kłaczy.

τ / ϕ ; p	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)
(1) Kategoria KD	x															
(2) Zwyródnienie gruczołów	$\tau = 0,65$ $p < 0,001$	x														
(3) Ogniska włóknienia	$\tau = 0,72$ $p < 0,001$	$\tau = 0,77$ $p < 0,001$	x													
(4) Aktywność fibroblastów	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	x												
(5) Niszczenie błony podstawnej	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	x											
(6) Zaburzenie różnicowania	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	x										
(7) Ubytek nabłonka pow.	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\phi = 0,39$ $p = 0,008$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	x									
(8) Zwyródnienie nabłonka pow.	$\tau = 0,38$ $p = 0,02$	$p > 0,05$	$\phi = 0,37$ $p = 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\phi = -0,32$ $p = 0,03$	$\phi = 0,44$ $p = 0,002$	x								
(9) Włóknienie okołonaczyniowe	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	x							
(10) Rozstrzeń naczyń	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\phi = 0,32$ $p = 0,03$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	x						
(11) Nasilenie nacieku zapalnego	$\tau = 0,46$ $p < 0,001$	$\tau = 0,35$ $p < 0,001$	$\tau = 0,41$ $p = 0,004$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\tau = 0,39$ $p = 0,006$	$p > 0,05$	$\tau = 0,35$ $p = 0,01$	x					
(12) Limfocyty	$\tau = 0,43$ $p < 0,001$	$\tau = 0,30$ $p = 0,005$	$\tau = 0,47$ $p < 0,001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\tau = 0,46$ $p < 0,001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\tau = 0,71$ $p < 0,001$	x				
(13) Makrofagi	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\tau = 0,27$ $p = 0,04$	$p > 0,05$	$\tau = 0,22$ $p = 0,03$	$p > 0,05$	$\tau = 0,39$ $p = 0,002$	$\tau = 0,20$ $p = 0,02$	$p > 0,05$	x			
(14) Neutrofile	$\tau = 0,39$ $p < 0,001$	$\tau = 0,32$ $p < 0,001$	$\tau = 0,25$ $p = 0,04$	$\tau = -0,28$ $p = 0,004$	$p > 0,05$	$\tau = -0,23$ $p = 0,02$	$p > 0,05$	$\tau = 0,21$ $p = 0,047$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\tau = 0,33$ $p < 0,001$	$\tau = 0,20$ $p = 0,02$	$p > 0,05$	x		
(15) Eozynofile	$\tau = 0,20$ $p = 0,049$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$\tau = 0,19$ $p = 0,04$	$\tau = 0,19$ $p = 0,047$	$\tau = 0,18$ $p = 0,047$	$p > 0,05$	x	
(16) Faza cyklu	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	x

6. Dyskusja

6.1. Zmiana ekspresji *TGFB1* i *Thy1* względem nasilenia endometrozy

Pośród badanych genów, w zależności od przypisanej kategorii KD, stwierdzono istotne różnice w ekspresji *TGFB1* i *THY1* pomiędzy kategoriami endometrozy.

W kategoriach I+ i IIA, reprezentujących niewielkie zwyrodnienie, stwierdzono wyższą ekspresję *TGFB1* w porównaniu do prawidłowego endometrium. Natomiast w kategoriach IIB i III, reprezentujących umiarkowane i silne zwyrodnienie, stwierdzono ekspresję *TGFB1* na poziomie wykrywalnym w prawidłowym endometrium. Warto zauważyć, że TGFβ1 jest obecny w tkankach w formie nieaktywnej (Kim et al., 2018). Z tego względu zwiększenie produkcji TGFβ1, reprezentowane przez opisany wzrost ekspresji *TGFB1*, nie jest konieczne do rozpoczęcia i nasilenia włóknienia. Jednak produkcja TGFβ1 przez makrofagi zwiększa się pod wpływem bodźca zapalnego (Skarzynski et al., 2020). Stwierdzona wyższa ekspresja *TGFB1* w kategorii I+ i kategorii IIA świadczy o silniejszym aktywowaniu makrofagów na początkowym etapie zwyrodnienia endometrium. Pomimo, że nie stwierdzono różnic w ekspresji *TGFB1* w zależności od intensywności nacieku makrofagowego, wydaje się, że aktywacja makrofagów jest bardziej istotna dla wzrostu produkcji cytokin niż samo zwiększenie nacieku makrofagowego (Skarzynski et al., 2020; Szóstek–Mioduchowska et al., 2019). Dlatego niewielka liczba aktywnych makrofagów, mieszcząca się w granicach normy fizjologicznej dla prawidłowego endometrium bez cech przewlekłego stanu zapalnego (McKinnon et al., 2011; Oddsdóttir, 2007; Schöniger & Schoon, 2020), może być wystarczająca do efektywnej produkcji TGFβ1. Należy podkreślić, że w dodatkowo wydzielonej kategorii I+, reprezentującej słabo wyrażone, rozproszone zmiany histopatologiczne związane z endometrozą, stwierdzono najwyższą ekspresję *TGFB1*, co sugeruje rolę TGFβ1 jako czynnika inicjującego dalsze zmiany zwyrodnieniowe w endometrium. W kategorii IIA, reprezentującej niewielkie zwyrodnienie, stwierdzono również wyższą ekspresję *THY1* w porównaniu do prawidłowego endometrium. Natomiast w kategorii I+, reprezentującej inicjację włóknienia, oraz kategoriach IIB i III, reprezentujących progresję zmian, stwierdzono ekspresję *THY1* na poziomie stwierdzonym w prawidłowym endometrium. Uzyskane wyniki sugerują, że *Thy1*, podobnie jak TGFβ1, odgrywa większą rolę w inicjacji włóknienia endometrium w przebiegu endometrozy niż na późniejszym jej etapie. *Thy1* wpływa na interakcje komórek z integrzynami stymulując ich migrację w tkankach (Hagood, 2019). Z kolei integryny

biorą udział w aktywacji latentnego TGFβ1, obecnego w tkankach w formie nieaktywnej (Kim et al., 2018), oraz regulują aktywność receptorów błonowych (Hagood, 2019; Liu et al., 2017). W dotychczasowych badaniach stwierdzono większą ilość integryn w błonie komórkowej miofibroblastów (Beaven et al., 2022), stąd również w prezentowanych badaniach Thy1 może w zwiększać interakcje pomiędzy komórkami endometrium. Obserwowany wzrost ekspresji *THY1* może być również związany z nasilonymi interakcjami komórek endometrium z proteoglikanami zawartymi ECM. W dotychczasowych badaniach wykazano, że po miejscowym podaniu enrofloksacyny stwierdzono nasilenie procesu włóknienia w endometrium klaczy, co wiąże się ze zmianami w produkcji proteoglikanów w ECM (Rodriguez et al., 2012). Z tego względu, również w tych badaniach można łączyć wzrost ekspresji *THY1* ze zmianami dotyczącymi bezpostaciowych elementów ECM.

Ponadto brak korelacji pomiędzy ekspresją *TGFB1* i ekspresją *THY1* sugeruje niezależne działanie TGFβ1 i Thy1 w endometrium klaczy podczas inicjacji endometrozy.

6.2. Zmiany ekspresji *TGFB1* i *Thy1* względem zmian histopatologicznych w endometrium

Istotne różnice w ekspresji *TGFB1* i *THY1* stwierdzono również pomiędzy próbkami wykazującymi i nie wykazującymi cech niszczenia błony podstawnej gruczołów macicznych. Ekspresja zarówno *TGFB1* jak i *THY1* była istotnie wyższa w endometrozie niszczącej niż endometrozie nieniszczącej.

Wyższa ekspresja *TGFB1* w preparatach z zaobserwowanym niszczeniem błony podstawnej popiera hipotezę mówiącą o uszkodzeniu błony podstawnej jako inicjalnej zmianie w endometrozie (Klose & Schoon, 2016). W wyniku uszkodzenia błony podstawnej dochodzi do naciekania okolicy gruczołów macicznych przez makrofagi, które po aktywacji rozpoczynają produkcję cytokin, w tym TGFβ1 (Walter et al., 2001b; Hoffmann et al., 2009b; Skarzynski et al., 2020). Ponieważ nie stwierdzono różnic w intensywności nacieku makrofagowego pomiędzy endometrozą niszczącą i nieniszczącą oraz korelacji pomiędzy intensywnością nacieku makrofagowego a niszczeniem błony podstawnej nabłonka gruczołowego, można przypuszczać, że wzrost ekspresji *TGFB1* związany z niszczeniem błony podstawnej wynikał z aktywacji makrofagów (Skarzynski et al., 2020; Szóstek–Mioduchowska et al., 2019)

obecnych fizjologicznie w endometrium, a nie z przewlekłego stanu zapalnego (McKinnon et al., 2011; Oddsdóttir, 2007; Schöniger & Schoon, 2020).

Wyższa ekspresja *THY1* w preparatach z zaobserwowanym niszczeniem błony podstawnej może wynikać z obecności składników błony podstawnej w ECM, które zwiększają nasilenie interakcji między fibroblastami, leukocytami i ECM za pośrednictwem Thy1 (Yang et al., 2020). Jednak brak korelacji pomiędzy obecnością cech histopatologicznych niszczenia błony podstawnej a nasileniem nacieku zapalnego sugeruje, że interakcja ta odbywa się w zakresie aktywności leukocytów obecnych fizjologicznie w endometrium (McKinnon et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). Obserwowany wzrost ekspresji *THY1* może mieć związek z nasileniem przekaźnictwa między komórkami poprzez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Stąd, w okresie inicjacji zmian związanych z endometrozą i nasileniem wymiany pęcherzyków między komórkami obserwowany wzrost produkcji Thy1 jest uzasadniony (Yang et al., 2020). Uszkodzenie błony podstawnej nabłonka gruczołowego może też przyczyniać się do większego kontaktu między komórkami – nabłonkowymi i fibroblastami – a ECM, co wiąże się z nasilonymi interakcjami z integrynami i również może tłumaczyć uzyskane wyniki (Jasiński et al., 2022a). Z drugiej strony, zwiększenie produkcji Thy1 może być ochronną reakcją endometrium na zachodzące w nim pod wpływem TGFβ1 zmiany (Liu et al., 2017). W takim przypadku endometrium objęte bardziej nasilonym zwyrodnieniem zmniejszałoby zdolność do ograniczania włóknienia, co mogłoby odpowiadać za progresję zmian.

Wyższa ekspresja *THY1* w endometrozie niszczącej współwystępująca z wyższą ekspresją *TGFB1*, nie została poparta korelacją pomiędzy ekspresją *TGFB1* i ekspresją *THY1*, co sugeruje ich niezależną regulację w reakcji na uszkodzenie błony podstawnej. Jednak wykazane dodatnie korelacje pomiędzy obecnością niszczenia błony podstawnej nabłonka gruczołowego i ekspresją *THY1* oraz ekspresją *TGFB1* wskazują na ich istotną rolę w regulacji i/lub odpowiedzi na niszczenie nabłonka gruczołowego. Jednak wykazane korelacje i wzrost ekspresji *TGFB1* i *THY1* w endometrozie niszczącej nie wyjaśnia przyczyny uszkodzenia błony podstawnej nabłonka gruczołowego. Uszkodzenie błony podstawnej może być wynikiem działania komórek zapalnych lub zmian mechanicznych w endometrium poddawanych cyklicznej regulacji (Centeno et al., 2024; Mansour et al., 2003). Subpopulacja makrofagów M2, odpowiedzialna za produkcję TGFβ1, hamuje proces zapalny i stymuluje procesy regeneracyjne. Jednak

ich przekąźnictwo wydaje się silniej oddziaływać na komórki zrębu niż komórki nabłonka gruczołowego (Kim et al., 2018).

6.3. Regulacja ekspresji i rola TGFB1 i Thy1 w przebiegu endometrozy

Chociaż wpływ Thy1 na transformację fibroblastów w miofibroblasty nie jest jasny, stwierdzona bardzo silna dodatnią korelacja między ekspresją *THY1* a ekspresją *ACTA2* sugeruje, że poza Thy1 może być kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na fenotyp komórek zrębu w endometrium. Podwyższona ekspresja α SMA jest jedną z cech charakterystycznych endometrozy ze względu na obecność miofibroblastów i zwiększenie ilości elementów cytoszkieletu w komórkach nabłonkowych (Klose & Schoon, 2016; Szóstek–Mioduchowska et al., 2023). Jednak w omawianych badaniach nie stwierdzono różnic w ekspresji *ACTA2* w zależności od nasilenia endometrozy. Brak istotnych różnic może wynikać z ograniczeń protokołu doświadczenia, który zakładał pomiar ekspresji genów, w tym *ACTA2* kodującego α SMA (Gadbail et al., 2018). W zrealizowanym doświadczeniu nie była mierzona ilość α SMA obecnego w endometrium, a jedynie ekspresję genu, więc nie można wykluczyć, że badane próbki spełniały założenia dotyczące transformacji fibroblastów w miofibroblasty w przebiegu endometrozy (Klose & Schoon, 2016; Szóstek–Mioduchowska et al., 2023). Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę kontynuowania badań nad rolą Thy1 w regulacji transformacji fibroblastów na bardziej rozbudowanym modelu doświadczalnym. Chociaż Thy1 odgrywa rolę przede wszystkim w hamowaniu apoptozy, stwierdzono umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją *THY1* a ekspresją *MKI67*. Ponieważ Thy1 reguluje również różnicowanie komórek, obserwowana korelacja może wskazywać na zmniejszenie stopnia specjalizacji komórek, a co za tym idzie zwiększenie potencjału do podziałów komórkowych (Fiore et al., 2018; Hagood, 2019).

Umiarkowaną dodatnią korelację stwierdzono również między ekspresją *THY1* a ekspresją *PDGFRA*, co może wskazywać na współdziałanie Thy1 i aktywacji $PDGFR\alpha$ w utrzymaniu populacji fibroblastów. Populacja fibroblastów, utrzymywana za pośrednictwem aktywacji $PDGFR\alpha$ (Cheng et al., 2024), zależnego od Thy1 hamowania apoptozy i zależnej od Thy1 stymulacji proliferacji (Yang et al., 2020) może aktywnie deponować białka do ECM (Di et al., 2024). Z drugiej strony, biorąc pod uwagę dimeryzację *PDGFR* pod wpływem obecności ligandu (Klinkhammer et al., 2018) i interakcje Thy1 z integrynymi wpływającymi na konformację receptorów

blonowych (Hagood, 2019) można podejrzewać, że Thy1 współodpowiada za łączenie się monomerów PDGFR i aktywację szlaków związanego z aktywacją receptora.

Sugerowane ochronne działanie Thy1 w endometrium klaczy w początkowym etapie endometrozy wspiera silna dodatnia korelacja stwierdzona między ekspresją *THY1* i ekspresją *ESR1*. Wykazana zależność świadczy o utrzymaniu funkcjonalności i cyklicznej regulacji endometrium przy większej produkcji Thy1. Z drugiej strony, jako że wzrost ekspresji dotyczy początkowego etapu zwyrodnienia, odnotowana korelacja może być wynikiem większej ekspresji *THY1* w endometrium o zachowanej jeszcze strukturze. Estradiol może zwiększać stopień interakcji między komórkami zrębu a komórkami nabłonka gruczołowego, zwiększa też produkcję ER, stąd wykazana korelację można tłumaczyć wpływem estrogenów na integralność endometrium (Aupperle et al., 2000). We włóknieniu wątroby u ludzi estrogeny regulują działanie integryn poprzez zmniejszenie ekspresji ich genów (Nataraj et al., 2024). W endometrozie klaczy nie badano dotąd wpływu estrogenów na produkcję integryn. Dlatego uzyskane wyniki ostrożnie sugerują, że podobnie jak u ludzi również u klaczy estrogeny regulują działanie integryn w przebiegu włóknienia, a komórki endometrium dążąc do utrzymania stałego poziomu interakcji z integrynami, wobec zmniejszenia ilości integryn odpowiadają zwiększeniem produkcji Thy1 we wczesnym rozwoju choroby. W umiarkowanej i znacznej endometrozie zdolność komórek endometrium do produkcji Thy1 może być zaburzona, stąd brak podwyższonej ekspresji *THY1* wraz z progresją zmian.

Biorąc pod uwagę, że estrogeny stymulują również produkcję PR (Thompson et al., 2020), obserwowana umiarkowana dodatnia korelacja między ekspresją *THY1* a ekspresją *PGR* może wynikać z wzajemnej regulacji na linii estrogeny–progesteron. W dostępnej literaturze nie znaleziono bowiem danych wskazujących na potencjalną zależność pomiędzy Thy1 i progesteronem zarówno u koni jak i u innych gatunków, tak w endometrium jak i w innych narządach podlegających włóknieniu.

Brak korelacji pomiędzy badanymi markerami a ekspresją *TGFB1* może wskazywać na brak związku pomiędzy wzmożoną produkcją TGFβ1 a proliferacją, transformacją i przeżyciem rezerwy fibroblastów oraz wynikającą z aktywności fibroblastów przebudową ECM lub udziału aktywacji latentnego TGFβ1 w tych procesach (Kim et al., 2018). U ludzi wykazano, że TGFβ stymuluje produkcję innych czynników wzrostu nasilających włóknienie, w tym PDGF (Beaven et al., 2022). W związku z tym w endometrium klaczy, wobec zwiększonej ekspresji *TGFB1*

w umiarkowanej endometrozie, można oczekiwać również większej ilości PDGF. Brak korelacji pomiędzy ekspresją *TGFB1* a ekspresją *PDGFRA* nie wyklucza sugerowanych założeń, bowiem produkowane PDGF może wywoływać efekt biologiczny za pośrednictwem receptora PDGFR α występującego w endometrium w niezmienionej ilości. Efekt ten wydaje się być specyficzny gatunkowo, ponieważ u ludzi aktywacja PDGFR α skutkuje zmniejszeniem aktywności MMP1 (Kim et al., 2021), natomiast w endometrium klaczy TGF β 1 zwiększa produkcję MMP1 (Szóstek–Mioduchowska et al., 2020b). Ponadto w przypadku nasilonej endometrozy produkcja MMP1 jest niska (Centeno et al., 2024). Można więc przypuszczać, że spadek produkcji MMP1 w endometrium nie wynika tylko z potwierdzonego w badaniach działania PGF2 α (Szóstek–Mioduchowska et al., 2020c), ale również z aktywacji PDGFR α związanej ze stymulowanym przez TGF β 1 wzrostem produkcji PDGF. Aktywacja PDGFR α wiąże się również ze zwiększeniem ilości kwasu hialuronowego w gruczole mlekowym myszy i wzrostem ekspresji genu dla syntazy kwasu hialuronowego 1 w zlokalizowanych w nim fibroblastach (Hammer et al., 2017). W endometrium klaczy, w endometrozie o niewielkim nasileniu, stwierdzono aktywowany za pośrednictwem szlaku NF κ B wzrost ekspresji genu dla syntazy kwasu hialuronowego 1 (Jasiński et al., 2021; Jasiński et al., 2022a). Można przypuszczać, podobnie jak w przypadku MMP1, że aktywacja szlaku NF κ B zwiększająca ekspresję genu dla syntazy kwasu hialuronowego 1 wynika z aktywacji PDGFR α związanej ze stymulowanym przez TGF β 1 wzrostem produkcji PDGF.

Również brak korelacji pomiędzy ekspresją *TGFB1* a ekspresją *ESR1* i *PGR* może wynikać zarówno z niezależnej humoralnej i hormonalnej regulacji progresji endometrozy (Jasiński et al. 2022) jak i z ograniczeń protokołu doświadczenia. W ludzkich nowotworach, estrogeny hamują transformację fibroblastów w miofibroblasty oraz produkcję kolagenu poprzez hamowanie przekaźnictwa TGF β 1 związanego z SMAD2 (Jiang et al., 2015). U klaczy w przebiegu endometrozy można natomiast zakładać dwojaki kierunek zmian. Z jednej strony zwyrodnienie endometrium wiąże się ze spadkiem ekspresji ER α (Szóstek–Mioduchowska et al., 2022), natomiast z drugiej strony zmniejszenie efektu działania estrogenów może skutkować progresją włóknienia (Jiang et al., 2015). W obydwu przypadkach, uzyskane wyniki wskazują potrzebę dalszych badań nad rolą TGF β 1 i Thy1 w patogenezie endometrozy.

6.4. Zmiany ekspresji *MKI67* względem zmian histopatologicznych w endometrium

Ekspresja *MKI67* była istotnie niższa w endometrozie przebiegającej z ubytkami nabłonka powierzchniowego niż przy zachowanej jego ciągłości. W nabłonku o zaburzonej morfologii, związanej ze zwyrodnieniem komórek, ekspresja *Ki67* zmniejsza się (Dhaval, 2015). Wyniki te wspiera dodatkowo słaba ujemna korelacja wykazana pomiędzy ekspresją *MKI67* a obecnością ubytków nabłonka powierzchniowego. Uzyskane wyniki wskazują na niższą produkcję białka jądrowego *Ki67* w uszkodzonym nabłonku powierzchniowym i niższą zdolnością komórek do proliferacji (Köhne et al., 2024). W prawidłowym endometrium klaczy ekspresja *Ki67* w nabłonku powierzchniowym jest najniższa w fazie lutealnej cyklu jajnikowego (Gerstenberg et al., 1999). Prawdopodobnie możliwości regeneracyjne nabłonka w tej fazie cyklu są niższe, co wiąże się z większym ryzykiem wystąpienia bodźców uszkodzających w fazie pęcherzykowej cyklu (Schöniger et al., 2018). Uzyskane wyniki sugerują, że w dalszych badaniach nad niszczeniem nabłonka powierzchniowego w endometrium objętym zwyrodnieniem należy brać pod uwagę potencjalne zmniejszenie regeneracji nabłonka z uwzględnieniem faz cyklu jajnikowego. Badanie ekspresji *Ki67* w endometrium klaczy może być wykorzystane do oceny zdolności endometrium do regeneracji. Z drugiej strony, działanie czynnika uszkodzającego powodującego zwyrodnienie i obumieranie komórek nabłonka powierzchniowego może powodować zmniejszenie zdolności tych komórek do podziałów (Jischa et al., 2008).

6.5. Regulacja ekspresji i rola *Ki67* w przebiegu endometrozy

Umiarkowana dodatnia korelacja między ekspresją *MKI67* a ekspresją *ACTA2* może sugerować zwiększoną proliferację fibroblastów o większej ekspresji elementów cytoszkieletu. Chociaż nie stwierdzano wcześniej podobnej zależności w endometrium klaczy, podobne zjawisko ma miejsce w przypadku włóknienia podśluzówkowego jamy ustnej u ludzi, gdzie wykazano, że ekspresja *Ki67* jest dodatnio skorelowana z ekspresją α SMA (Kamala et al., 2022). Mimo że zmniejszona ekspresja *Ki67* w endometrium objętym endometrozą świadczy o postępującym zwyrodnieniu i mniejszej zdolności regeneracyjnej, powyższy wynik sugeruje stymulację podziałów i różnicowania fibroblastów pod wpływem czynników prozapalnych (Aupperle et al., 2000; Hoffmann et al., 2009b). W badaniach dotyczących przewlekłej choroby wątroby u koni podwyższona ekspresja *Ki67* w wystąpiła w zrębie objętym włóknieniem wraz z naciekiem limfocytarnym oraz należących do makrofagów komórkach Kupffera. Stąd

można również podejrzewać, że korelacja między ekspresją *MKI67* a ekspresją *ACTA2* może być wynikiem działania pobudzonych komórek zapalnych, których aktywność cytokinowa powoduje wzrost produkcji elementów cytoszkieletu przez komórki zrębu endometrium (Skarzynski et al., 2020; Verhoef et al., 2018).

Silna dodatnia korelacja między ekspresją *MKI67* a ekspresją *PDGFRA* sugeruje, że w omawianym przypadku wyższa ekspresja *Ki67* jest związana z fibroblastami (Iwayama & Olson, 2013). Taką interpretację wspiera dodatkowo omówiona w poprzednim podrozdziale niższa ekspresja *MKI67* w uszkodzonym nabłonku powierzchniowym oraz występowanie *PDGFR α* w komórkach zrębu (Klinkhammer et al., 2018). Stwierdzona korelacja wskazuje, że aktywacja *PDGFR α* w komórkach endometrium powoduje zwiększenie tempa proliferacji komórek posiadających badany receptor. W badaniach *in vitro* na ludzkich fibroblastach aktywacja *PDGFR α* nasila proliferację komórek zrębu przy wyższym stężeniu ligandu w tkankach (Iwayama & Olson, 2013; Klinkhammer et al., 2018). Stąd można się spodziewać, że również w endometrium objętym zwyrodnieniem zwiększa się produkcja *PDGF*, jednak weryfikacja tej teorii wymaga rozszerzenia badań molekularnych również na oznaczenia podjednostek ligandu. Wyższa ekspresja *PDGFR α* w raku gruczołu mlekowego u ludzi wiązana jest z większą złośliwością nowotworu. Jednym z odpowiedzialnych mechanizmów jest stymulacja proliferacji komórek nowotworowych po aktywacji receptora, o czym świadczy dodatnia korelacja w nowotworach między ekspresją *PDGFR α* a ekspresją *Ki67* (Weigel et al., 2013). Również u ludzi, w miocytach układu oddechowego i ścianie naczyń krwionośnych, *PDGFR α* stymuluje proliferację komórek zrębu i zwiększa ekspresję markerów z nią związanych (Ambhore et al., 2018). Uzyskane wyniki sugerują potrzebę kontynuacji dalszych badań nad związkiem pomiędzy *PDGFR* i proliferacją komórek w patogenezie endometrozy. Badania te powinny obejmować ocenę ilościową badanych receptorów i ligandów wykonaną oddzielnie dla komórek nabłonka powierzchniowego oraz zrębu endometrium.

Bardzo silną dodatnią korelację stwierdzono również między ekspresją *MKI67* a ekspresją *ESR1*. Uzyskane wyniki są zgodne z dotychczasowymi obserwacjami, ponieważ w endometrium klaczy stwierdzono współwystępowanie szczytu ekspresji *Ki67* i szczytów ekspresji receptorów dla hormonów steroidowych (Aupperle et al., 2000). Obserwowana zależność może wynikać z wpływu estrogenów na komórki nabłonka gruczołowego. W fazie pęcherzykowej, a więc w fazie dominacji estrogenów,

obserwuje się zwiększoną proliferację i rozplem gruczołów macicznych. W endometrium poddanym cyklicznej regulacji hormonalnej estrogeny działają promitotycznie, stymulując podziały komórkowe wiążące się z większą produkcją Ki67 (Hoffmann et al., 2009b; Schöniger & Schoon, 2020).

6.6. Zmiany ekspresji *IGF1* względem zmian histopatologicznych w endometrium

W odniesieniu do ekspresji *IGF1* stwierdzono istotne różnice pomiędzy próbkami reprezentującymi endometrium objętym umiarkowanym i silnym naciekiem zapalnym. Ekspresja *IGF1* była istotnie niższa w endometrium objętym naciekiem zapalnym niż przy braku zapalenia, w odniesieniu zarówno do całkowitego nacieku zapalnego jak i specyficznego do nacieku limfocytarnego i neutrofilowego. Uzyskane wyniki są wsparte umiarkowanymi ujemnymi korelacjami między ekspresją *IGF1* a nasileniem nacieku zapalnego również ocenianym globalnie jak i w odniesieniu do specyficznego nacieku limfocytarnego i neutrofilowego. Nie stwierdzono natomiast zarówno zmian w ekspresji *IGF1* jak i analogicznych korelacji w odniesieniu do nacieku makrofagowego i eozynofilowego. Uzyskane wyniki są zgodne z dotychczasowymi badaniami dotyczącymi niższej produkcji *IGF1* w tkankach objętych stanem zapalnym (Grzędzicka et al., 2023; Nederlof et al., 2022; Reidel et al., 2022). Pod wpływem cytokin prozapalnych zwiększa się produkcja białek wiążących *IGF1*, które hamują jego aktywność (Heemskerk et al., 1999). Dodatkowo, ekspresja *IGF1* może być wykorzystywana jako negatywny marker ostrej fazy zapalenia u koni (Grzędzicka et al., 2023).

W modelu uszkodzeniu wątroby u myszy deficyt *IGF1* wiązał się z większym naciekiem limfocytarnym, natomiast podanie egzogennej *IGF1* skutkowało zmniejszeniem nasilenia zapalenia limfocytarnego (Morales–Garza et al., 2017). Również w przypadku badań dotyczących zapalenia trzustki, zwiększenie produkcji *IGF1* wiązało się z ograniczeniem nacieku limfocytarnego poprzez hamowanie aktywności interferonu β (Casellas et al., 2006). Jednak w endometrium klaczy objętym endometrozą nie badano dotąd zależności pomiędzy ekspresją *IGF1* a nasileniem nacieku zapalnego, a prezentowane wyniki są pierwszym tego typu doniesieniem. Produkcję *IGF1* badano natomiast w endometrium klaczy w ciąży stwierdzając współwystępowanie zwiększonej produkcja *IGF1* oraz zwiększonej liczby limfocytów (Kalpokas et al., 2021). Jednak w ciąży środowisko cytokinowe endometrium jest inne niż w macicy nieciężarnej, a zwiększony naciek limfocytarny nie wiąże się

z przewlekłym stanem zapalnym (Camacho et al., 2020; McKinnon et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). Natomiast stwierdzona niższa ekspresja *IGF1* w endometrium z niewielkim i umiarkowanym naciekiem neutrofilowym może wynikać z toczącego się ostrego stanu zapalnego (McKinnon et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). Pod wpływem *IGF1* neutrofile przyjmują fenotyp związany z procesami regeneracyjnymi i hamowaniem nasilenia zapalenia, a zdolność takich neutrofilów do tworzenia NETs zmniejsza (Nederlof et al., 2022; Reidel et al., 2022). Stąd stwierdzony spadek ekspresji *IGF1* w endometrium z naciekiem neutrofilowym może sprzyjać prozapalnemu fenotypowi neutrofilów i uwalnianiu NETs, a więc również ekspozycji endometrium na enzymy z nimi związane (Nederlof et al., 2022; Reidel et al., 2022).

6.7. Regulacja ekspresji i rola *IGF1* w przebiegu endometrozy

Umiarkowana ujemna korelacja między ekspresją *IGF1* i nasileniem endometrozy może wskazywać na niższą zdolność regeneracyjną endometrium objętego zwyrodnieniem a co za tym idzie nasilający się charakter zmian związanych z endometrozą. U klaczy z endometrozą stwierdzono zwiększenie gęstości gruczołowej w endometrium w trakcie ciąży, co może wynikać ze zwiększonej produkcji *IGF1* w ciąży (Bracher et al., 1996; Kalpokas et al., 2021). Uzyskany wynik wskazuje na inne komórki docelowe dla działania *IGF1* w przypadku włóknienia endometrium niż w przypadku włóknienia płuc, w którym aktywność *IGF1* wiąże się z transformacją fibroblastów w miofibroblasty oraz zwiększeniem produkcji α SMA i kolagenu (Hung et al., 2013). Różnica ta może wynikać z większej sztywności endometrium, ponieważ utkanie zrębu narządu może wpływać na kierunek aktywności *IGF1* (Hung et al., 2013). W prezentowanych badaniach nie stwierdzono korelacji między ekspresją *IGF1* a ekspresją *ACTA2*, natomiast stwierdzono umiarkowaną ujemną korelację między ekspresją *IGF1*, a obecnością włóknienia okołonaczyniowego. Niższa produkcja *IGF1* przy występowaniu angiopatii może być związana z niższą regeneracją endometrium w wyniku spadku perfuzji. Uzyskane wyniki odnośnie *IGF1* mogą sugerować jego działanie ochronne przed zwyrodnieniem endometrium, podobnie jak ma to miejsce przy uszkodzeniu wątroby i serca (Fan & Guan, 2016; Mair et al., 2011). W wątrobie i sercu wzrost ekspresji *IGF1* wiąże się z podtrzymaniem funkcji odpowiednio hepatocytów i kardiomiocytów (Fan & Guan, 2016; Mair et al., 2011).

6.8. Rola α SMA i PDGFR α w przebiegu endometrozy

Poza omówionymi zależnościami stwierdzono również umiarkowaną dodatnią korelację między ekspresją *ACTA2* a ekspresją *PDGFRA*, która może być uzasadniona dwukierunkowo. Z jednej strony, aktywacja PDGFR α zmniejsza podatność komórek na apoptozę, stąd zwiększona przeżywalność miofibroblastów może wiązać się z produkcją przez nie α SMA (Cheng et al., 2024). W takiej sytuacji szlak sygnałowy PDGFR α nie wiązałby się bezpośrednio z nasilaniem ekspresji cytoszkieletu, podobnie jak w uogólnionym włóknieniu u myszy (Iwayama & Olson, 2013). Z drugiej zaś strony, pod wpływem aktywacji PDGFR α może dochodzić do zwiększenia produkcji α SMA, podobnie jak ma to miejsce we włóknieniu wątroby (Borkham-Kamphorst & Weiskirchen, 2016). W takiej sytuacji PDGFR α może brać udział w powstawaniu miofibroblastów. Uzyskany wynik jest jednak sprzeczny ze raportowanym w innych badaniach zmniejszeniem ekspresji PDGFR α po transformacji fibroblastów i zwiększeniu produkcji cytoszkieletu, co sugeruje, że w endometrozie PDGFR α może utrzymywać się w komórkach zrębu pomimo transformacji fibroblastów w miofibroblasty (Borkham-Kamphorst & Weiskirchen, 2016; Cheng et al., 2024; Luzina et al., 2015). Autokrynne przekazywanie związane z PDGFR α w raku gruczołu mlekowego u ludzi związane jest z transformacją nabłonkowo-mezenchymalną i nasileniem proliferacji komórek. Stąd kolejnym możliwym wytłumaczeniem zaobserwowanej korelacji jest zmiana fenotypu komórek nabłonkowych i zwiększenie przez nie produkcji α SMA (Kim et al., 2021). W modelu mysim, w badaniach dotyczących gruczołu mlekowego, stwierdzono nasilenie włóknienia śródmiąższowego, zwiększenie ilości fibronektyny i kolagenu oraz zwiększenie średnicy i długości włókien kolagenowych w wyniku aktywacji PDGFR α . W badaniach tych wykazano również zmniejszoną przepuszczalność tkanki łącznej dla wody oraz zwiększoną sztywność tkanki łącznej zrębu (Hammer et al., 2017; Horikawa et al., 2015). Przy analogicznym wpływie aktywacji PDGFR α w komórkach zrębu endometrium u klaczy zwiększenie produkcji składników cytoszkieletu może nastąpić w wyniku zmiany utkania tkanki łącznej i adaptacji komórek zrębu do zwiększonych sił mechanicznych działających na nie z zewnątrz. Do autokrynnej aktywacji PDGFR α może również dochodzić przy zwiększonej ilości cyklooksygenazy 2, co może wskazywać na uruchomienie tego szlaku przy jednocześnie zwiększonej produkcji PGF2 α , powodującej wzrost produkcji kolagenu przez fibroblasty w endometrium klaczy (Szóstek-Mioduchowska et al., 2020c; Timbergen et al., 2019).

Stwierdzona silna dodatnia korelacja między ekspresją *ACTA2* a ekspresją *ESR1* jest zaskakująca, jako że α SMA jest łączona z morfologicznymi i funkcjonalnymi zmianami w endometrium w przebiegu endometrozy (Mambelli et al., 2014), a ER α z podtrzymaniem prawidłowej funkcji endometrium (Szóstek–Mioduchowska et al., 2022). W innych narządach, w przebiegu procesów patologicznych związanych z włóknieniem tkanki łącznej i transformowaniem fibroblastów w miofibroblasty, receptorowe i pozareceptorowe działanie estrogenów wywołuje różne efekty biologiczne w zależności od badanej tkanki. Jednak niezależnie od narządu, aktywacja ER α w fibroblastach nasila ich migrację w ECM (Novotný et al., 2011). Natomiast stwierdzona umiarkowana dodatnia korelacja między ekspresją *ACTA2* a ekspresją *PGR* może być związana ze współregulacją ekspresji PR i ER α w komórkach endometrium (Hartt et al., 2005).

W badaniach dotyczących wątroby szczurów stwierdzono zapobiegający włóknieniu wpływ estrogenów, poprzez zmniejszenie transkrypcji kolagenu i TIMP1. Zneutralizowanie działania estrogenów skutkowało nasileniem włóknienia i wzrostem liczby komórek wykazujących ekspresję α SMA (Garate–Carrillo et al., 2020). W badaniach dotyczących fibroblastów obecnych w sercu u ludzi i szczurów, stwierdzono zmniejszenie produkcji kolagenu pod wpływem działania estrogenów (Garate–Carrillo et al., 2020; Zhou et al., 2007). Z kolei w modelu indukowanego włóknienia płuc u szczurów, wpływ estrogenów obejmował wzrost ekspresji kolagenu typu 1 i TGF β 1. W modelu tym, w miofibroblastach wykazujących ekspresję α SMA, obserwowano wzrost ekspresji ER α , a co za tym idzie zwiększenie podatności komórek zrębu płuc na działanie estrogenów (Elliot et al., 2019). Ponadto, w badaniach *in vitro* wykorzystujących ludzkie fibroblasty, stwierdzono wzrost produkcji i aktywności MMP9 pod wpływem działania estrogenów. Spowodowało to większą przebudowę ECM i zwiększenie możliwości migracji komórek w jej obrębie (Garate–Carrillo et al., 2020). W badaniach przeprowadzonych na ludzkich keratynocytach, aktywacja ER α powodowała nasilenie proliferacji komórek zrębu stymulowanej przez TGF β 1 (Novotný et al., 2011). W badaniach przeprowadzonych na fibroblastach z serca szczurów, estradiol powodował wzrost ekspresji genów kodujących MMP2 i MMP9 pozostając bez wpływu na aktywność tych enzymu. Przytoczone badania sugerują, że wydzielanie MMP do ECM jest prawdopodobnie poddane dodatkowej regulacji hormonalnej (Novotný et al., 2011). Z związku z wydatnym wpływem estrogenów na interakcje komórek ze składnikami ECM oraz funkcje fibroblastów warto rozważyć dalsze

badania nad wpływem estrogenów na proliferację, transformację i interakcje komórek zrębu i nabłonka w endometrium objętym endometrozą.

Stwierdzona bardzo silna dodatnia korelacja między ekspresją *PDGFRA* a ekspresją *ESR1* jest trudna do zinterpretowania, ze względu na nieliczne dane na temat wzajemnych zależności między receptorami i transkrypcją ich genów w dostępnej literaturze. Odnoszące się do tego publikacje sugerują, że ER α zlokalizowane poza jądrem komórkowym mogą aktywować PDGFR α (Brama et al., 2007; Gray et al., 1995). W komórkach nowotworowych gruczołu mlekowego u ludzi, stwierdzono aktywację PDGFR α pod wpływem kadmu poprzez mechanizm zależny od ER α (Brama et al., 2007). W badaniach dotyczących przepukliny u ludzi, w fibroblastach pobranych z mięśni brzucha stwierdzono współwystępującą wyższą ekspresję *PDGFRA* i *ESR1* wiązaną z nasileniem procesu włóknienia (Potluri et al. 2024). W kolejnych badaniach tej samej grupy wykazano również związek pomiędzy wzrostem stężenia estrogenów w tkance mięśniowej, a wzrostem ekspresji PDGFR α i ER α w fibroblastach (Potluri et al. 2022). Z kolei w komórkach nowotworowych gruczołu mlekowego u ludzi stwierdzono zahamowanie aktywacji PDGFR α , które skutkowało wzrostem ekspresji ER α i uwrażliwieniem nowotworu na terapię hormonalną (Kanzaki & Pietras, 2020; Pietras & Sjölund, 2024). Warto zwrócić uwagę, że szlaki sygnałowe kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK), przekaźnikami sygnałowymi i aktywatorami transkrypcji (STAT i PI3K) są wzbudzone zarówno po aktywacji PDGFR α , jak i ER α , co może wskazywać na ich synergistyczne działanie (Cignarella et al., 2022). Ponadto, pod wpływem estrogenów zwiększa się transkrypcja *PDGFA* w makrofagach (Shanker et al., 1995), jednak w tych badaniach nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją *PDGFA* a nasileniem nasieku makrofagowego. Może to sugerować, że potencjalna zależna od estrogenów transkrypcja *PDGFA* zachodzi w makrofagach rezydujących w endometrium kłaczy bez zwiększenia intensywności nacieku i cech zapalenia przewlekłego.

6.9. Regulacja hormonalna w przebiegu endometrozy

Pomimo licznych doniesień o zmniejszeniu ekspresji receptorów dla hormonów płciowych w endometrium objętym zwyrodnieniem (Hoffmann et al., 2009b; Schöniger & Schoon, 2020; Szóstek–Mioduchowska et al., 2022), w omawianych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji *ESR1* i *PGR* zarówno względem nasilenia

endometrozy jak i zmian histopatologicznych w endometrium. Z drugiej strony, Walter et al. (2001) zaproponowali, że zmiany ekspresji receptorów są zaburzeniem niezależnym od włóknienia endometrium. Chociaż wiek klaczy predysponuje zarówno do rozwoju endometrozy, jak i spadku ekspresji receptorów dla hormonów płciowych, zaburzenia różnicowania gruczołów macicznych wynikające z niewłaściwej podatności na działanie hormonów są zjawiskiem stwierdzanym niezależnie od endometrozy (Derisoud et al., 2021; Walter et al., 2001b). Potencjalne zmiany w ekspresji ER α i PR mogą być związane z mniejszą przepuszczalnością i niższym tempem dyfuzji cząsteczek w sztywniejszej tkance łącznej objętej włóknieniem. Jako że pod wpływem progesteronu ekspresja obu receptorów zmniejsza się, a w fizjologicznym anestrus w endometrium nieregulowanym przez hormony jajnikowe ekspresja receptorów jest wyższa niż w fazie lutealnej, zmniejszona dyfuzja progesteronu w zwłókniałym endometrium może w mniejszym stopniu hamować ekspresję omawianych receptorów (Aupperle et al., 2000; Hartt et al., 2005). Innym wyjaśnieniem braku istotnych różnic może być niewystarczająca liczba próbek w poszczególnych grupach oraz brak dodatkowej subklasyfikacji próbek w odniesieniu do fazy cyklu rujowego. Z tego względu uzasadnione jest prowadzenie dalszych badań na większej grupie klaczy zapewniającej wystarczająco silną reprezentację poszczególnych faz cyklu. Należy zauważyć, że większość badanych próbek była pobrana w fazie lutealnej cyklu jajnikowego, w której ma miejsce spodziewane hamowanie ekspresji ER α i PR przez progesteron. Uzyskane wyniki są więc w zgodności ze stwierdzeniem, że na regulację hormonalną endometrium wpływa również utkanie tkanki łącznej zrębu, zwłaszcza, że fibroblasty pełnią rolę pośredników w transporcie hormonów w kierunku komórek nabłonkowych (Aupperle et al., 2000).

6.10. Zmiany wysokość nabłonka powierzchniowego względem zmian histopatologicznych w endometrium

Kolejną analizowaną zmienną ilościową jest wysokość nabłonka powierzchniowego, dla której stwierdzono istotne różnice w pomiędzy próbkami reprezentującymi zaburzenia różnicowania nabłonka gruczołowego, rozstrzeń naczyń krwionośnych oraz nasilenie limfocytarnego nacieku zapalnego.

Obecność wyższego nabłonka powierzchniowego w preparatach ze stwierdzoną rozstrzenią naczyń krwionośnych może wynikać z przekrwienia biernego narządu i zwiększonego przedostawania się wody do tkanki łącznej. W takim przypadku, może

dochodzić do zmiany równowagi osmotycznej endometrium prowadzącej do zwiększenia objętości komórek (Warner et al., 2003). Wyższy nabłonek powierzchniowy stwierdzono u klaczy podatnych na gromadzenie się płynu w świetle macicy, a rozstrzeń naczyń krwionośnych może sprzyjać zwiększonemu przesiąkaniu do światła macicy (Herrera et al., 2018).

Obecność wyższego nabłonka powierzchniowego w preparatach objętych zaburzeniem różnicowania nabłonka gruczołowego może wskazywać na oddziaływanie przez przyczynę zaburzeń różnicowania na oba typy nabłoneków w endometrium. W takim przypadku wydaje się możliwe, że zaburzenie różnicowania może prowadzić nie tylko do zmniejszonej produkcji histotrofu, ale także możliwych problemów z maczynym rozpoznaniem ciąży (Schoon & Schoon, 2003). Komórki nabłonka powierzchniowego są wyższe w fazie pęcherzykowej, co może wskazywać, że odnotowane różnice mogą wynikać z większej reaktywności endometrium objętym zaburzeniami różnicowania lub naciekiem limfocytarnym (Lefranc & Allen, 2007). Kierunek ten wymaga jednak dalszych badań, podobnie jak współwystępowanie wzrostu wysokości nabłonka powierzchniowego wraz ze wzrostem nasilenia limfocytarnego nacieku zapalnego. Zwłaszcza że wykazane różnice, wsparte słabymi dodatkimi korelacjami między wysokością nabłonka powierzchniowego a rozstrzeńią naczyń krwionośnych oraz wysokością nabłonka powierzchniowego a zaburzeniem różnicowania nabłonka gruczołowego, nie zostały poparte istotnymi korelacjami z którymkolwiek z badanych genów.

6.11. Ocena zmian histopatologicznych w endometrium

Tradycyjna ocena skrawka histologicznych endometrium klaczy pod kątem endometrozy uwzględnia odsetek zmienionych gruczołów macicznych i skalę włóknienia ECM wokół gruczołów (Kenney, 1978; Schöniger & Schoon, 2020; Westendorf et al., 2022a). Jednak nie ma pełnej zgodności co do preferowanego miejsca pobrania biopsji endometrium. Najczęściej wybieranym miejscem do pobrania wycinków jest podstawa jednego z rogów macicy (Hanada et al., 2014; Lefranc & Allen, 2007; Snider et al., 2011), chociaż jednoznaczne stwierdzenie – czy zmiany histopatologiczne dotyczące miejsca pobrania wycinków w równym stopniu obejmują całość endometrium – nadal jest dyskutowane (Overbeck et al., 2013; Sikora et al., 2017; Snider et al., 2011).

Badanie wycinków pobranych z różnych lokalizacji w obrębie tej samej macicy wskazuje, że zmiany histopatologiczne charakterystyczne dla endometrozy bez rozróżnienia nasilenia są rozdystrybuowane bardziej równomiernie w całym endometrium u starszych klaczy (Hanada et al., 2014). Z drugiej strony, wraz z wiekiem klaczy spada zgodność oceny nasilenia zmian – przypisania kategorii KD – w dwóch wycinkach endometrium pobranych jednocześnie od tej samej klaczy (Sikora et al., 2017). Przy pobraniu dwóch wycinków endometrium od tej samej klaczy, zgodność w ocenie nasilenia endometrozy stwierdzono w połowie przypadków. Największe różnice dotyczyły i obecności rozstrzeni limfatycznych, wskazując na nierównomierną dystrybucję tych zmian w obrębie endometrium (Muderspach et al., 2024; Sikora et al., 2017). Stąd, przy ocenie pojedynczego wycinka endometrium, wiarygodność potwierdzenia występowania endometrozy rośnie wraz z wiekiem, natomiast wiarygodność oceny nasilenia zmian spada (Hanada et al., 2014; Katila & Ferreira-Dias, 2022; Muderspach et al., 2024). Dlatego zalecane jest, aby do oceny stanu endometrium i prognozowania płodności klaczy wykorzystywać dwa wycinki endometrium pobrane u podstawy obu rogów macicy (Muderspach et al., 2024).

Faza cyklu jajnikowego, w której pobierana jest próbka, również wpływa na wiarygodność postawionego rozpoznania. W fazie pęcherzykowej częściej przypisywane jest niższe nasilenie zmian niż w fazie lutealnej. Występujące wtedy nasilone włóknienie tkanki łącznej jest prawdopodobnie mylone z większym uwodnieniem tkanki i spadkiem gęstości gruczołów macicznych, które występują fizjologicznie w wyniku stymulacji estrogenowej (Annandale et al., 2018). Jednak w fazie pęcherzykowej zdolność reakcji endometrium na presję środowiskową związaną z potencjalną kontaminacją macicy i uszkodzeniem endometrium podczas pobierania wycinka jest większa niż w fazie lutealnej (Rojas et al., 2020; Snider et al., 2011). Z tego względu nie ma jednoznacznej rekomendacji dotyczącej fazy cyklu, w której pobierana jest biopsja endometrium, jednak każdorazowo powinna być ona uwzględniona podczas oceny histopatologicznej.

6.12. Ocena zmian histopatologicznych w endometrium względem kategorii endometrozy

Tradycyjna ocena histopatologiczna nasilenia endometrozy uwzględnia nie tylko odsetek zmienionych gruczołów macicznych i skalę okołogruczołowego włóknienia ECM, ale również bierze pod uwagę nasilenie stanu zapalnego (Kenney, 1978;

Schöniger & Schoon, 2020; Westendorf et al., 2022a). W badanych próbkach stwierdzono bardzo silną dodatnią korelację między kategorią KD a przypisanym zwyrodnieniem gruczołów macicznych jak również między kategorią KD a obecnością ognisk włóknienia okołogruczołowego. Uzyskane wyniki wskazują na właściwą ocenę obu cech histopatologicznych i przypisanie kategorii endometrozy zgodnie z tradycyjnymi kryteriami diagnostycznymi.

Stwierdzona umiarkowana dodatnia korelacja między kategorią KD a zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego jest zgodna z dotychczasowymi badaniami dotyczącymi słabszej kondycji komórek nabłonkowych w endometrium objętym endometrozą. Zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego może skutkować zubożeniem powierzchni komórek nabłonkowych pod kątem obecności wypustek cytoplazmatycznych (Ferreira–Dias et al., 1994).

Silne dodatnie korelacje między kategorią KD a intensywnością nacieku zapalnego, zarówno rozpatrywanego ogólnie jak i w odniesieniu do specyficznego nacieku limfocytarnego, może świadczyć o osłabieniu mechanizmów odporności w zwyrodniałym endometrium. Osłabienie kondycji nabłonka powierzchniowego i obniżenie jego potencjału regeneracyjnego może powodować osłabienie bariery mechanicznej tworzonej przez nabłonek powierzchniowy i zwiększoną migrację komórek zapalnych do endometrium pod wpływem bodźca uszkodzającego (Ferreira–Dias et al., 1994; Schöniger et al., 2018). Biorąc pod uwagę, że zarówno występowanie endometrozy (Schöniger & Schoon, 2020) jak i osłabienie mechanizmów związanych z miejscową odpornością macicy (Crociati et al., 2019) jest związane z wiekiem klaczy, można przyjąć, że obserwowane korelacje również są związane z wspólną przyczyną obu zjawisk. Obserwowane korelacje mogą również świadczyć o udziale komórek zapalnych w inicjowaniu zmian zwyrodnieniowych (Schöniger & Schoon, 2020; Skarzynski et al., 2020; Szóstek–Mioduchowska et al., 2022) oraz wskazywać na właściwe przypisanie kategorii endometrozy zgodnie z protokołem uwzględniającym nasilenie stanu zapalnego (Kenney, 1978; Schöniger & Schoon, 2020; Westendorf et al., 2022a). Zgodność ta jest dodatkowo wsparta przez wykazaną umiarkowaną dodatnią korelację między kategorią KD a nasileniem nacieku neutrofilowego, która również może mieć związek z większą predyspozycją starszych klaczy do stanów zapalnych macicy (Derisoud et al., 2021). Należy też zwrócić uwagę na możliwe uwalnianie przez komórki nacieku neutrofilowego NETs, które są potencjalnie związane z patogenezą endometrozy (Amaral et al., 2018; Rebordão et al., 2021). Ponadto stwierdzono słabą

dodatnią korelację między kategorią KD a nasileniem nacieku eozynofilowego. Chociaż rola eozynofili w endometrium nie jest dobrze poznana, stwierdzono większą liczbę eozynofili u klaczy z nieszczelnością warg sromowych (Derisoud et al., 2021; Schöniger & Schoon, 2020). Jednak zarówno endometrioza jak i nieszczelność sromu występują częściej u klaczy starszych, dlatego uzasadnione jest prowadzenie dalszych badań w celu określenia czy korelacja jest związana z przyczynowością, czy z koincydencją.

Natomiast brak korelacji między kategorią KD a obecnością zmian naczyniowych wydaje się potwierdzać niezależną patogenezę endometriozy oraz przebudowy naczyń krwionośnych endometrium nasilającej się w wyniku przebycia wcześniejszych ciąż (Esteller–Vico et al., 2015; Ferreira et al., 2015; Hanada et al., 2014).

6.13. Dynamika zmian histopatologicznych w endometrium w przebiegu endometriozy

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono bardzo silną dodatnią korelację pomiędzy obecnością zwyrodnienia gruczołów macicznych oraz ognisk włóknienia okołogruczołowego. Uzyskane wyniki sugerują, że stan gruczołów macicznych wynika z przebudowy otaczającej je ECM (Hoffmann et al., 2009b; Minkwitz et al., 2019).

Umiarkowane dodatnie korelacje stwierdzone między obecnością zwyrodnienia gruczołów macicznych a intensywnością nacieku zapalnego, w tym nacieku limfocytarnego i neutrofilowego, może wskazywać na większą podatność zwyrodniałego endometrium na stany zapalne. Może to wynikać z udziału wydzieliny gruczołów w oczyszczaniu macicy. Uzyskane wyniki mogą też świadczyć o udziale komórek zapalnych w tworzeniu środowiska ECM skutkującego zaburzeniem funkcji nabłonka gruczołowego (Skarzynski et al., 2020).

Podobnie silne i umiarkowane dodatnie korelacje stwierdzone między obecnością ognisk włóknienia okołogruczołowego a intensywnością nacieku zapalnego, w tym również nacieku limfocytarnego i neutrofilowego, sugerują sprzężenie włóknienia ECM i zwyrodnienia gruczołów macicznych (Hoffmann et al., 2009b; Minkwitz et al., 2019). Wskazuje to również na potencjalny udział zwiększonej liczby komórek zapalnych w stymulacji przebudowy ECM (Skarzynski et al., 2020).

Ponadto, stwierdzono umiarkowaną dodatnią korelację pomiędzy występowaniem ognisk włóknienia okołogruczołowego a zwyrodnieniem nabłonka

powierzchniowego. Uzyskane wyniki sugerują, że zmiany w ECM mogą upośledzać funkcję wszystkich komórek nabłonkowych w endometrium, zarówno w nabłonku powierzchniowym, jak i nabłonku gruczołowym. Obserwowana zależność może być związana ze zmniejszeniem transportu substancji odżywczych przez ECM objęte włóknieniem (Flores et al., 1995) lub zmianą stymulacji chemokinowej przez fibroblasty o zmienionym fenotypie (Aupperle et al., 2000; Szósteck-Mioduchowska et al., 2019).

Aktywność fibroblastów, związana z szybszym tempem metabolizmu i bardziej intensywną sekrecją (Lehmann et al., 2011), jest umiarkowanie ujemnie skorelowana z intensywnością nacieku neutrofilowego. Uzyskane wyniki mogą być związane ze zmianą aktywności komórek zrębu endometrium objętego ostrym stanem zapalnym. W tak zmienionym ECM dominuje sygnalizacja związana z zapaleniem, a enzymy uwalniane w NETs nie sprzyjają zmianie fenotypu fibroblastów w kierunku ich aktywacji (Byron et al., 2024; Chrysanthopoulou et al., 2014). Uzyskany wynik, wraz z wcześniejszymi doniesieniami o wyższej ekspresji receptorów dla hormonów płciowych w aktywnej endometriozy (Hoffmann et al., 2009b; Lehmann et al., 2011), sugerują konieczność prowadzenia dalszych badań nad rzeczywistym znaczeniem statusu metabolicznego fibroblastów w patogenezie endometriozy.

Umiarkowana dodatnia korelacja między zaburzeniami różnicowania nabłonka gruczołowego a obecnością rozstrzeni naczyń krwionośnych może wskazywać na związek między zmienioną perfuzją w endometrium, a funkcją gruczołów macicznych. Biorąc pod uwagę, że sygnały hormonalne docierają do gruczołów macicznych za pośrednictwem ECM (Aupperle et al., 2000; Lehmann et al., 2011), w endometrium objętym zaburzeniami perfuzji może dochodzić do zmniejszonej stymulacji hormonalnej gruczołów macicznych (Schoon & Schoon, 2003). Takie gruczoły maciczne otrzymują niewystarczającą ilość bodźców do równomiernego różnicowania co wpływa na desynchronizację poszczególnych gruczołów lub komórek w obrębie poszczególnych gruczołów (Bischofberger et al., 2019; Kabisch et al., 2019; Schoon & Schoon, 2003).

Umiarkowana dodatnia korelacja między zaburzeniem różnicowania nabłonka gruczołowego a intensywnością nacieku makrofagowego może wskazywać na udział osiadłych w endometrium makrofagów w różnicowaniu gruczołów macicznych. Biorąc ponownie pod uwagę, że sygnały hormonalne docierają do gruczołów macicznych za pośrednictwem ECM (Aupperle et al., 2000; Lehmann et al., 2011), aktywność

cytokinowa makrofagów może wpływać na komunikację między komórkami nabłonkowymi a komórkami obecnymi w ECM (Aupperle et al., 2000; Bischofberger et al., 2019).

Umiarkowana ujemna korelacja między zaburzeniami różnicowania gruczołów macicznych a intensywnością nacieku neutrofilowego może sugerować, że ostry stan zapalny nie wpływa na wydajność stymulacji hormonalnej gruczołów macicznych. Endometrium objęte ostrym zapaleniem, ze względu na większe uwodnienie spowodowane wzrostem przepuszczalności naczyń krwionośnych (LeBlanc & Causey, 2009) i działanie na ECM enzymów litycznych produkowanych przez neutrofile (Rebordão et al., 2018), może czasowo zwiększać przepuszczalność ECM dla cząsteczek sygnałowych, w tym hormonów płciowych.

Umiarkowana ujemna korelacja między zaburzeniem różnicowania gruczołów macicznych a zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego wydaje się trudniejsza do interpretacji i sugeruje potrzebę dalszych badań nad występowaniem zmian fenotypowych komórek nabłonkowych. Obserwowana zależność może mieć związek z obecnością nacieku neutrofilowego, którego intensywność jest również umiarkowanie dodatnio skorelowana ze zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego. Obecność nacieku neutrofilowego sprzyja osłabieniu struktury nabłonka powierzchniowego, bezpośrednio narażonego na działanie cytokin i enzymów produkowanych przez neutrofile (Ferreira–Dias et al., 1994; Schöniger & Schoon, 2020).

Ponadto umiarkowane dodatnie korelacje między zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego a intensywnością nacieku zapalnego, w tym nacieku makrofagowego, a także silna dodatnia korelacja między zwyrodnieniem nabłonka powierzchniowego a intensywnością nacieku limfocytarnego, mogą być również związana z ekspozycją komórek nabłonkowych na prozapalne środowisko cytokinowe. Należy zwrócić uwagę, że nabłonek powierzchniowy jest również najbardziej narażony na kontakt z patogenami lub czynnikami drażniącymi dostającymi się do macicy podczas krycia (Schöniger et al., 2018). Uszkodzenie nabłonka powierzchniowego może brać udział w stymulacji napływu komórek zapalnych do endometrium oraz regulacji stanu zapalnego poprzez rozpoznawanie patogenów pochodzących ze światła macicy (Dubrovskaya et al., 2019; Schöniger et al., 2018).

Umiarkowane dodatnie korelacje między rozstrzenią naczyń krwionośnych a intensywnością nacieku zapalnego, w tym nacieku makrofagowego, mogą być związane z charakterystycznym dla procesu zapalnego rozszerzeniem naczyń

krwionośnych. Z drugiej strony, zmniejszenie prędkości przepływu krwi przez rozszerzone naczynia krwionośne sprzyja zjawisku diapedezy (Wang et al., 2022). Z tego względu większa liczba komórek zapalnych, w tym makrofagów, migrujących do endometrium może być wynikiem ułatwionego opuszczenia łożyska naczyniowego. Należy mieć jednak na uwadze, że zwiększona liczba makrofagów, której towarzyszą cechy poszerzenia łożyska naczyniowego w endometrium, może mieć związek z niedawno przebytą ciążą. W części próbek stwierdzono występowanie licznych syderofagów, a więc makrofagów obładowanych hemosyderyną, które mogą być obecne w endometrium nawet do kilka miesięcy po porodzie (McKinnon et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). W takim przypadku rozstrzeń naczyń krwionośnych może wynikać z niecałkowitej adaptacyjnej przebudowy naczyń krwionośnych po niedawnej ciąży i stanowić pozostałość po zwiększeniu przepływu naczyniowego w ciężarnej macicy (Camacho et al., 2020; Esteller–Vico et al., 2015).

Natomiast silne, umiarkowane i słabe dodatnie korelacje między całościowo ocenianą intensywnością nacieku zapalnego a poszczególnymi typami nacieku składających wynikają z udziału poszczególnych leukocytów w tworzeniu nacieku zapalnego. Można w związku z tym stwierdzić, że w największym stopniu za stwierdzoną intensywność nacieku zapalnego odpowiadają limfocyty, w mniejszym stopniu neutrofile, a w najmniejszym makrofagi i eozynofile. Uzyskane wyniki są zgodne z dotychczasowymi badaniami, w których wykazano, że limfocyty są obecne w niewielkiej liczbie zarówno w zdrowym endometrium jak i stanowią dominującą populacją komórek zapalnych w ścianie w przebiegu *endometritis* (Christoffersen et al., 2012; Schöniger & Schoon, 2020; Skarzynski et al., 2020). Słabsza korelacja w przypadku neutrofili może mieć związek z faktem, że komórki te w stanach zapalnych przedostają się przede wszystkim do światła macicy i światła gruczołów macicznych, a standardowa obróbka histologiczna mogła spowodować ich wypłukanie. Słaba dodatnia korelacja między ogólnym naciekiem zapalnym a naciekiem z makrofagowym może wynikać z niewielkiej liczby makrofagów komórek w endometrium. Dodatkowo, do tej grupy komórek zaliczane są syderofagi, które niekoniecznie mają związek z toczącym się procesem zapalnym. Syderofagi pozostają w endometrium dość długo nie tylko po zakończeniu ciąży, ale również po zakończeniu regeneracji endometrium po przeżytym zapaleniu (McKinnon et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). Rola eozynofili w endometrium nie jest do końca poznana (Grimm et al., 2017), jednak w części preparatów komórki te występowały bardzo licznie.

W takich przypadkach intensywnemu naciekowi eozynofilowemu towarzyszył skąpy naciek złożony z pozostałych leukocytów, głównie limfocytów. Obserwację tą potwierdzają najniższa spośród omawianych korelacja z intensywnością nacieku zapalnego oraz słabe dodatnie korelacje między intensywnością nacieku eozynofilowego a intensywnością nacieku limfocytarnego i makrofagowego. Uwzględniając wzajemne relacje pomiędzy populacjami leukocytów można zauważyć również słabą dodatnią korelację między naciekiem limfocytarnym a neutrofilowym. Jednak komórki nacieku zapalnego oceniana przede wszystkim pod kątem endometrozy, stąd interakcje związane z samym stanem zapalnym pozostają poza zakresem bieżących badań.

6.14. Rekomendacje dla modyfikacji oceny zmian histopatologicznych w endometrium w przebiegu endometrozy

Badanie histopatologiczne wycinków endometrium klaczy zyskuje coraz większą przydatność ze względu na lepsze zrozumienie procesów zachodzących w endometrium i ich wpływu na morfologię komórek oraz właściwości ECM związane zarówno z fizjologiczną cyklicznością jak i rozwojem endometrozy (Schoon & Schoon 2003).

Pomimo pozornie prostych wytycznych dla klasyfikacji histopatologicznej wycinków endometrium klaczy, w praktyce przypisanie kategorii KD może sprawiać trudności. Występująca wcześniej niepłodność nie zawsze jest uwzględniana w opisie wycinka, pomimo podkreślania istotności tego aspektu przez twórców klasyfikacji (Kenney, 1978; Snider et al., 2011). Również kwestia przypisania wyższej kategorii KD z powodu współwystępowania stanu zapalnego nie jest jednoznacznie uznawana przez wszystkich patologów (Katila & Ferreira-Dias, 2022; Westendorf et al., 2022a). Dla klasyfikacji KD endometrozy dostępne jest jedno doświadczenie, w którym zbadano zgodność oceny próbek pomiędzy ośmioma patologami oraz zgodność oceny próbek przez tego samego patologa, ponieważ każda próbka były oceniane dwukrotnie (Westendorf et al., 2022b). Współczynnik korelacji międzyklasowej, mówiący o zgodności dwóch ocen tej samej próbki przez patologa, dla podobnych metod klasyfikacji histopatologicznej powinien mieć wartość wyższą niż 0,6 (McHugh, 2012). Natomiast dla klasyfikacji KD, współczynnik korelacji międzyklasowej wyniósł 0,55. Z kolei współczynnik zgodności ocen pomiędzy oceniającymi wyniósł 0,19, co świadczy o braku lub niskiej zgodności w ocenie próbek. Ważony współczynnik

zgodności, uwzględniający częściową zgodność przy przypisaniu do sąsiadujących kategorii wyniósł 0,36, co świadczy o umiarkowanej zgodności. Co więcej, dla patologów z różnych laboratoriów, współczynniki zgodności pomiędzy oceniającymi były jeszcze niższe (Westendorf et al., 2022b). Powyższe wyniki wskazują na bardzo znaczący wpływ ocenającego na przypisywaną kategorię endometrozy, a w związku z tym niską wiarygodność oceny. Co więcej, na uwagę zasługuje również potencjalna płodność przypisywana danej kategorii KD. O ile w kategorii I potwierdzana jest najwyższa płodność, a w kategorii III najniższa; o tyle w kategoriach pośrednich (IIA i IIB) przewidywana płodność rzadziej jest zgodna z rzeczywistością. Wskazuje na to największy wpływ ocenającego na przypisanie kategorii IIA i IIB (Westendorf et al., 2022b) oraz większa dynamikę zmian w przypadku kategorii pośrednich (McKinnon et al., 2011). Co więcej, podobnie jak w przypadku innych ilościowych systemów klasyfikacyjnych (McHugh, 2012), podczas oceny preparatów histologicznych pojawia się tendencja do przypisywania próbek do kategorii pośrednich. Natomiast płodność kłaczy wydaje się w większym stopniu zależeć od nowych wskaźników diagnostycznych niż od tradycyjnie ocenianych zmian histopatologicznych, a tendencja ta jest szczególnie wyraźna w kategoriach pośrednich.

Jednak zasadniczą wadą klasyfikacji KD jest problem nieuwzględnienia innych niż endometrozą patologii prowadzących do zmniejszonej płodności. Zaburzenie różnicowania nabłonka gruczołowego, będące wynikiem nieprawidłowej stymulacji ze strony hormonów płciowych, powoduje zmniejszenie liczby gruczołów macicznych efektywnie produkujących histotrof (Bischofberger et al., 2019). Problem ten w większym stopniu dotyczy kłaczy sportowych niż kłaczy użytkowanych rekreacyjnie lub utrzymywanych w celach produkcyjnych (Kilgenstein et al., 2015). Kłacze sportowe, niedługo po zakończeniu kariery sportowej, manifestują obniżoną płodność. Z czasem, ich wskaźniki płodności poprawiają się, chociaż ta obserwowana klinicznie zmiana nie znajduje potwierdzenia w wynikach oceny histopatologicznej endometrium. Bardziej nasilone zmiany, a co za tym idzie przypisanie wyższej kategorii KD, stwierdzano u kłaczy sportowych po większym odstępie czasowym od zakończenia użytkowania wyczynowego (Kilgenstein et al., 2015). Stąd wniosek, że klasyfikacja KD nie jest odpowiednia do oceny płodności kłaczy sportowych niedługo po zakończeniu użytkowania. Inne istotne zmiany pomijane w klasyfikacji KD obejmują angiopatie. Angiopatie występują u kłaczy wieloródek, powodując nie tylko zwiększenie ryzyka utraty ciąży, ale także urodzenia słabszego źrebięcia (Dubrovskaya et al., 2019; Esteller-

Vico et al., 2015; Ferreira et al., 2015). Z tego powodu opis diagnostyczny powinien uwzględniać charakterystykę naczyń krwionośnych w tym rozstrzeń naczyń, pogrubienie ściany i włóknienie okołonaczyniowe.

Z tego względu proponowane są różne sposoby zwiększenia obiektywizmu oceny histopatologicznej wycinków endometrium klaczy. Lefranc i Allen (2007) zaproponowali ocenę gęstości gruczołów macicznych, z uwzględnieniem odsetka prawidłowo zbudowanych gruczołów oraz gruczołów objętych endometrozą. Hoffmann et al. (2009b) zaproponowali włączenie informacji o typie histologicznym endometrozy do klasyfikacji KD. Różnicowanie aktywnej i nieaktywnej formy endometrozy wskazuje na dynamikę depozycji składników ECM, podczas gdy różnicowanie niszczącej i nieniszczącej formy endometrozy pozwala dokładniej ocenić stopień zachowanej przez klacz płodności. Jako kontynuację proponowanych modyfikacji tradycyjnej klasyfikacji KD, można zaproponować uwzględnienie w diagnostyce i opisie endometrium klaczy zmian histopatologicznych wykorzystanych w niniejszej pracy, a więc: morfologia i ewentualne ubytki nabłonka powierzchniowego, morfologia gruczołów macicznych, angiopatie, a także intensywność i charakter nacieku zapalnego. Zaproponowana modyfikacja uwzględnia wszystkie zaburzenia, zarówno struktury ECM jak i morfologii i liczby komórek tworzących endometrium, stwierdzane w preparatach histologicznym.

Ponadto uwzględnienie wpływu opisywanych zmian histopatologicznych na poszczególne aspekty związane z płodnością klaczy może znacząco poprawić zrozumienie procesów patologicznych zachodzących w endometrium przez lekarzy klinicystów. W tym celu wskazane jest ujednolicenie terminologii używanej przez diagnostów tak, aby stała się bardziej przejrzysta i informatywna dla klinicystów. Powyższa potrzeba wynika z faktu, że pełniejsze rozpoznanie stanu endometrium wymaga zarówno znajomości stanu klinicznego klaczy i wcześniej występujących problemów z płodności (a więc danych dostępnych dla lekarza klinicysty zajmującego się klaczą), jak również zakresu i zaawansowania zmian stwierdzanych w badaniu histopatologicznym (a więc danych dostępnych dla patologa). W ten sposób bardziej złożony komunikat formułowany przez patologa, wykraczający poza samo przypisanie kategorii KD, byłby jednocześnie bardziej przydatny dla klinicysty. Rekomendowany jednolity system diagnostyczny oceny stanu endometrium mógłby ułatwić podjęcie najlepszej w danej sytuacji decyzji odnośnie użytkowania klaczy i ewentualnego postępowania terapeutycznego.

7. Wnioski

1. Ekspresja *THY1* wzrasta w początkowym stadium endometrozy oraz zniszczeniu błony podstawnej, co sugeruje wpływ Thy1 na zwiększenie interakcji komórek z ECM i nasilenie przekazywania poprzez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.
2. Ekspresja *IGF1* jest ujemnie skorelowana z histopatologicznymi kryteriami oceny endometrozy oraz z nasileniem intensywności nacieku zapalnego, co świadczy o mniejszym wpływie IGF1 na endometrium objęte zwyrodnieniem i zahamowaniu procesów regeneracyjnych.
3. Ekspresja *PDGFRA* jest dodatnio skorelowana z ekspresją *ACTA2*, *MKI67*, *THY1* i *ESR1* co sugeruje udział przekazywania związanego z aktywacją PDGFR α w procesie różnicowania i aktywowania fibroblastów.
4. Ocena współwystępowania zmian histopatologicznych w endometrium objętym endometrozą może być przydatnym narzędziem diagnostycznym w ocenie progresji choroby.

Weryfikacja hipotezy badawczej:

Białka Thy1, IGF1 i PDGFR α biorą udział w patogenezie endometrozy, a ich specyficzna rola oraz interakcja z endometrium wymaga dalszych badań.

8. Literatura

1. Akoglu, H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 18(3), 91–93.
2. Allen, W. R., & Wilsher, S. (2009). A Review of Implantation and Early Placentation in the Mare. *Placenta*, 30(12), 1005–1015. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.09.007>
3. Alpoim-Moreira, J. (2023). *Mare endometrium fibrosis: Epigenetics and novel fibrosis markers*. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/27949>
4. Alpoim-Moreira, J., Fernandes, C., Pimenta, J., Bliebernicht, M., Rebordão, M. R., Castelo-Branco, P., Szóstek-Mioduchowska, A., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2022a). Metallopeptidases 2 and 9 genes epigenetically modulate equine endometrial fibrosis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.970003>
5. Alpoim-Moreira, J., Fernandes, C., Rebordão, M. R., Amaral, A., Pinto-Bravo, P., Bliebernicht, M., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2019). Collagens and DNA methyltransferases in mare endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(S3), 46–52. <https://doi.org/10.1111/rda.13515>
6. Alpoim-Moreira, J., Fernandes, C., Rebordão, M. R., Costa, A. L., Bliebernicht, M., Nunes, T., Szóstek-Mioduchowska, A., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2022b). Collagen Type III as a Possible Blood Biomarker of Fibrosis in Equine Endometrium. *Animals*, 12(14), 1854.
7. Alpoim-Moreira, J., Szóstek-Mioduchowska, A., Słyszewska, M., Rebordão, M. R., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2023). 5-Aza-2'-Deoxycytidine (5-Aza-dC, Decitabine) Inhibits Collagen Type I and III Expression in TGF- β 1-Treated Equine Endometrial Fibroblasts. *Animals*, 13(7), 1212.
8. Amaral, A., Cebola, N., Szóstek-Mioduchowska, A., Rebordão, M. R., Kordowitzki, P., Skarzynski, D., & Ferreira-Dias, G. (2023). Inhibition of Myeloperoxidase Pro-Fibrotic Effect by Noscapine in Equine Endometrium. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms24043593>
9. Amaral, A., Fernandes, C., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Baclawska, A., Rebordão, M. R., Aguiar-Silva, J., Pinto-Bravo, P., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2018). Elastase inhibition affects collagen transcription and prostaglandin secretion in mare endometrium during the estrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 53 Suppl 2, 66–69. <https://doi.org/10.1111/rda.13258>
10. Amaral, A., Fernandes, C., Morazzo, S., Rebordão, M. R., Szóstek-Mioduchowska, A., Lukasik, K., Gawronska-Kozak, B., Telo da Gama, L., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2020a). The Inhibition of Cathepsin G on

Endometrial Explants With Endometriosis in the Mare. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 582211. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.582211>

11. Amaral, A., Fernandes, C., Rebordão, M. R., Szóstek-Mioduchowska, A., Lukasik, K., Gawronska-Kozak, B., Telo da Gama, L., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2020b). The In Vitro Inhibitory Effect of Sivelestat on Elastase Induced Collagen and Metalloproteinase Expression in Equine Endometrium. *Animals*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ani10050863>
12. Amaral, A., Fernandes, C., Rebordão, M. R., Szóstek-Mioduchowska, A., Lukasik, K., Pinto-Bravo, P., Telo da Gama, L., Jan Skarzynski, D., & Ferreira-Dias, G. (2021). Myeloperoxidase inhibition decreases the expression of collagen and metalloproteinase in mare endometria under in vitro conditions. *Animals*, 11(1), 208.
13. Ambhore, N. S., Katragadda, R., Kalidhindi, R. S. R., Thompson, M. A., Pabelick, C. M., Prakash, Y. S., & Sathish, V. (2018). Estrogen receptor beta signaling inhibits PDGF induced human airway smooth muscle proliferation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 476, 37–47.
14. Aresu, L., Benali, S., Giannuzzi, D., Mantovani, R., Castagnaro, M., & Falomo, M. E. (2012). The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *Journal of Veterinary Science*, 13(2), 171–177. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.2.171>
15. Aupperle, H., Özgen, S., Schoon, H. -A., Schoon, D., Hoppen, H. -O., Sieme, H., & Tannapfel, A. (2000). Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Veterinary Journal*, 32(3), 228–232. <https://doi.org/10.2746/042516400776563554>
16. Aupperle, H., Steiger, K., Reischauer, A., & Schoon, H.-A. (2003). Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the physiological and pathological inactivity of the equine endometrium. *Pferdeheilkunde*, 19(6), 629–632.
17. Beaven, E., Kumar, R., Bhatt, H. N., Esquivel, S. V., & Nurunnabi, M. (2022). Myofibroblast specific targeting approaches to improve fibrosis treatment. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 58(98), 13556. <https://doi.org/10.1039/d2cc04825f>
18. Bischofberger, L., Szewczyk, K., & Schoon, H.-A. (2019). Unequal glandular differentiation of the equine endometrium—A separate endometrial alteration. *Pferdeheilkunde*, 35(4), 304–315.
19. Boerboom, D., Brown, K. A., Vaillancourt, D., Poitras, P., Goff, A. K., Watanabe, K., Doré, M., & Sirois, J. (2004). Expression of Key Prostaglandin Synthases in Equine Endometrium During Late Diestrus and Early Pregnancy.

- Biology of Reproduction*, 70(2), 391–399.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020800>
20. Borkham-Kamphorst, E., & Weiskirchen, R. (2016). The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 28, 53–61.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.10.002>
 21. Bracher, V., Mathias, S., & Allen, W. R. (1996). Influence of chronic degenerative endometritis (endometriosis) on placental development in the mare. *Equine Veterinary Journal*, 28(3), 180–188. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1996.tb03771.x>
 22. Bradecamp, E. A., Ahlschwede, S. A., & Cook, J. L. (2014). The effects of intra-uterine kerosene infusion on endometrial epithelial cilia concentration. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1(34), 134.
 23. Brama, M., Gnessi, L., Basciani, S., Cerulli, N., Politi, L., Spera, G., Mariani, S., Cherubini, S., d'Abusco, A. S., & Scandurra, R. (2007). Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ER α -dependent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1–2), 102–108.
 24. Byron, M., Lektion, J., Foster, R. A., Chenier, T., Wagner, B., & Diel de Amorim, M. (2024). Prostaglandin-related genes are differentially expressed in equine endometrium with different biopsy grade, degrees of inflammation, and fibrosis. *Theriogenology*, 227, 151–156.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.07.014>
 25. Camacho, C. A., Estradé, M. J., Cazales, N., Caballeros, J. E., Fiala-Rechsteiner, S. M., Neves, A. P., & Mattos, R. C. (2020). Histomorphometric and vascular changes in equine endometrium after the infusion of conceptus fragments. *Animal Reproduction*, 17, e20200006. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0006>
 26. Camozzato, G. C., Martinez, M. N., Bastos, H. B. A., Fiala-Rechsteiner, S., Meikle, A., Jobim, M. I. M., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. (2019). Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. *Theriogenology*, 123, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.018>
 27. Canisso, I. F., Segabinazzi, L. G. T. M., & Fedorka, C. E. (2020). Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares - a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1432.
<https://doi.org/10.3390/ijms21041432>
 28. Casellas, A., Salavert, A., Agudo, J., Ayuso, E., Jimenez, V., Moya, M., Munoz, S., Franckhauser, S., & Bosch, F. (2006). Expression of IGF-I in pancreatic

islets prevents lymphocytic infiltration and protects mice from type 1 diabetes. *Diabetes*, 55(12), 3246–3255.

29. Centeno, L. A. M., Bastos, H. B. A., Bueno, V. L. C., Trentin, J. M., Fiorenza, Mariani F., Panziera, W., Winter, G. H. Z., Kretzmann, N. A., Fiala-Rechsteiner, S., Mattos, R. C., & Rubin, M. I. B. (2024). Collagen and collagenases in mare's endometrium with endometriosis. *Theriogenology*, 230, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.08.031>
30. Cerveira-Pinto, M., Wójtowicz, A., Pires, M. A., Kordowitzki, P., Skarzynski, D., Ferreira-Dias, G., Szóstek-Mioduchowska, A., & Amaral, A. (2024). TLR-2 and TLR-4 mRNA expression in different grades of histopathological lesions of equine endometrium from follicular phase. *Reproduction in Domestic Animals*, 59(S3), e14657. <https://doi.org/10.1111/rda.14657>
31. Cheng, M. F., Abdullah, F. S., & Buechler, M. B. (2024). *Essential growth factor receptors for fibroblast homeostasis and activation: Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR), Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR), and Transforming Growth Factor β Receptor (TGF β R) [version 2; peer review: 2 approved]*.
32. Christoffersen, M., Woodward, E. M., Bojesen, A. M., Petersen, M. R., Squires, E. L., Lehn-Jensen, H., & Troedsson, M. H. T. (2012). Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology*, 78(5), 991–1004.
33. Chrysanthopoulou, A., Mitroulis, I., Apostolidou, E., Arelaki, S., Mikroulis, D., Konstantinidis, T., Sivridis, E., Koffa, M., Giatromanolaki, A., Boumpas, D. T., Ritis, K., & Kambas, K. (2014). Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *The Journal of Pathology*, 233(3), 294–307. <https://doi.org/10.1002/path.4359>
34. Chu, T., Cui, J., Sun, L., Zhang, X., Sun, L., Tong, J., Li, L., Xiao, Y., Xu, L., Zhang, L., & Song, Y. (2024). The disordered extracellular matrix landscape induced endometrial fibrosis of sheep: A multi-omics integrative analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 265, 130845. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130845>
35. Cignarella, A., Fadini, G. P., Bolego, C., Trevisi, L., Boscaro, C., Sanga, V., Seccia, T. M., Rosato, A., Rossi, G. P., & Barton, M. (2022). Clinical efficacy and safety of angiogenesis inhibitors: Sex differences and current challenges. *Cardiovascular Research*, 118(4), 988–1003. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab096>
36. Conway, B., & Hughes, J. (2012). Cellular orchestrators of renal fibrosis. *QJM: An International Journal of Medicine*, 105(7), 611–615.

37. Crociati, M., Capomaccio, S., Mandara, M. T., Stradaoli, G., Sylla, L., Monaci, M., & Cappelli, K. (2019). Different expression of Defensin-B gene in the endometrium of mares of different age during the breeding season. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 465. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2215-z>
38. De Witt, A. A., Fosgate, G. T., & Schulman, M. L. (2023). The association between the endometrial biopsy grade and selected epidemiological and reproductive variables in a population of subfertile mares. *Equine Veterinary Education*, 35(5). <https://doi.org/10.1111/eve.13722>
39. Derisoud, E., Auclair-Ronzaud, J., Palmer, E., Robles, M., & Chavatte-Palmer, P. (2021). Female age and parity in horses: How and why does it matter? *Reproduction, Fertility and Development*, 34(2), 52–116.
40. Dhaval, N. S. (2015). *A histopathological and immunohistochemical study of cutaneous nodular lesions and other surface swellings of Kenyan horses* [PhD Thesis]. <http://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/90205>
41. Di, X., Chen, J., Li, Y., Wang, M., Wei, J., Li, T., Liao, B., & Luo, D. (2024). Crosstalk between fibroblasts and immunocytes in fibrosis: From molecular mechanisms to clinical trials. *Clinical and Translational Medicine*, 14(1), e1545. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1545>
42. Domino, M., Jasinski, T., Kautz, E., Juszczuk-Kubiak, E., Ferreira-Dias, G., Zabielski, R., Sady, M., & Gajewski, Z. (2020). Expression of genes involved in the NF-κB-dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology*, 147, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.055>
43. Dong, J., & Ma, Q. (2016). Myofibroblasts and lung fibrosis induced by carbon nanotube exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0172-2>
44. Dubrovskaya, A. B., Lebedeva, L. F., & Schukis, K. A. (2019). Comparative histomorphological characteristics of the endometrium of young and aged mares in estrus and diestrus. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 341(1), 012067. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/341/1/012067>
45. Elliot, S., Periera-Simon, S., Xia, X., Catanuto, P., Rubio, G., Shahzeidi, S., El Salem, F., Shapiro, J., Briegel, K., Korach, K. S., & Glassberg, M. K. (2019). MicroRNA let-7 Downregulates Ligand-Independent Estrogen Receptor-mediated Male-Predominant Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(10), 1246–1257. <https://doi.org/10.1164/rccm.201903-0508OC>
46. Esteller-Vico, A., Liu, I. K. M., Vaughan, B., Steffey, E. P., & Brosnan, R. J. (2015). Effects of vascular elastosis on uterine blood flow and perfusion in

- anesthetized mares. *Theriogenology*, 83(6), 988–994.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.032>
47. Evans, T. J., Miller, M. A., Ganjam, V. K., Niswender, K. D., Eilersieck, M. R., Krause, W. J., & Youngquist, R. S. (1998). Morphometric analysis of endometrial periglandular fibrosis in mares. *American Journal of Veterinary Research*, 59(10), 1209–1214.
 48. Fan, Z., & Guan, J. (2016). Antifibrotic therapies to control cardiac fibrosis. *Biomaterials Research*, 20(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40824-016-0060-8>
 49. Ferreira, J. C., Canesin, H. S., Ignácio, F. S., Rocha, N. S., Pinto, C. R., & Meira, C. (2015). Effect of age and endometrial degenerative changes on uterine blood flow during early gestation in mares. *Theriogenology*, 84(7), 1123–1130. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.013>
 50. Ferreira-Dias, G., Nequin, L., & King, S. (1994). Morphologic characteristics of equine endometrium classified as Kenney categories I, II, and III, using light and scanning electron microscopy. *American Journal of Veterinary Research*, 55, 1060–1065. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1994.55.08.1060>
 51. Fiore, V. F., Wong, S. S., Tran, C., Tan, C., Xu, W., Sulchek, T., White, E. S., Hagood, J. S., & Barker, T. H. (2018). $\text{Av}\beta 3$ Integrin drives fibroblast contraction and strain stiffening of soft provisional matrix during progressive fibrosis. *JCI Insight*, 3(20), e97597, 97597. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97597>
 52. Flores, J., Rodríguez, A., Sánchez, J., Gómez-Cuétara, C., & Ramiro, F. (1995). Endometrosis in Mares: Incidence of Histopathological Alterations. *Reproduction in Domestic Animals*, 30(2), 61–65. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00606.x>
 53. Forcina, L., Miano, C., Scicchitano, B. M., & Musarò, A. (2019). Signals from the niche: Insights into the role of IGF-1 and IL-6 in modulating skeletal muscle fibrosis. *Cells*, 8(3), 232.
 54. Gadgil, A. R., Chaudhary, M., Sarode, S. C., Gondivkar, S., Tekade, S. A., Zade, P., Hande, A., Sarode, G. S., & Patil, S. (2018). Ki67, CD105, and α -SMA expression supports the transformation relevant dysplastic features in the atrophic epithelium of oral submucous fibrosis. *PLOS ONE*, 13(7), e0200171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200171>
 55. Gajos, K., Kozdrowski, R., Nowak, M., & Siemieniuch, M. J. (2015). Altered secretion of selected arachidonic acid metabolites during subclinical endometritis relative to estrous cycle stage and grade of fibrosis in mares. *Theriogenology*, 84(3), 457–466.
 56. Garate-Carrillo, A., Gonzalez, J., Ceballos, G., Ramirez-Sanchez, I., & Villarreal, F. (2020). Sex related differences in the pathogenesis of organ

- fibrosis. *Translational Research*, 222, 41–55.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.03.008>
57. Gerstenberg, C., Allen, W. R., & Stewart, F. (1999). Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. *Reproduction*, 117(1), 143–152.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170143>
 58. Gilpin, A. R. (1993). Table for Conversion of Kendall's Tau to Spearman's Rho Within the Context of Measures of Magnitude of Effect for Meta-Analysis. *Educational and Psychological Measurement*, 53(1), 87–92.
<https://doi.org/10.1177/0013164493053001007>
 59. Gray, K., Eitzman, B., Raszmann, K., Steed, T., Geboff, A., McLachlan, J., & Bidwell, M. (1995). Coordinate regulation by diethylstilbestrol of the platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) and-B chains and the PDGF receptor alpha- and beta-subunits in the mouse uterus and vagina: Potential mediators of estrogen action. *Endocrinology*, 136(5), 2325–2340.
 60. Grimm, A. L., Schoon, H. A., & Schöniger, S. (2017). *Histopathological features of endometritis eosinophilica in mares*.
 61. Grüniger, B., Schoon, H.-A., Schoon, D., Menger, S., & Klug, E. (1998). Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. *Journal of Comparative Pathology*, 119(3), 293–309.
 62. Grzędzicka, J., Dąbrowska, I., Kielbik, P., Perzyna, M., & Witkowska-Piłaszewicz, O. (2023). Are Proteins Such as MMP2, IGF1, IL-13, and IL-1ra Valuable as Markers of Fitness Status in Racehorses? A Pilot Study. *Agriculture*, 13(11), 2134.
 63. Hagood, J. S. (2019). Thy-1 as an integrator of diverse extracellular signals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 26.
 64. Hammer, A. M., Sizemore, G. M., Shukla, V. C., Avendano, A., Sizemore, S. T., Chang, J. J., Kladney, R. D., Cuitiño, M. C., Thies, K. A., Verfurth, Q., Chakravarti, A., Yee, L. D., Leone, G., Song, J. W., Ghadiali, S. N., & Ostrowski, M. C. (2017). Stromal PDGFR- α Activation Enhances Matrix Stiffness, Impedes Mammary Ductal Development, and Accelerates Tumor Growth. *Neoplasia*, 19(6), 496–508. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.04.004>
 65. Hanada, M., Maeda, Y., & Oikawa, M. (2014). Histopathological Characteristics of Endometriosis in Thoroughbred Mares in Japan: Results from 50 Necropsy Cases. *Journal of Equine Science*, 25(2), 45–52.
<https://doi.org/10.1294/jes.25.45>
 66. Hartt, L. S., Carling, S. J., Joyce, M. M., Johnson, G. A., Vanderwall, D. K., & Ott, T. L. (2005). Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction*, 130(2), 241–250.

67. Heemskerk, V. H., Daemen, M. A. R. C., & Buurman, W. A. (1999). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 10(1), 5–14. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(98\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(98)00022-7)
68. Hernandez, D. M., Kang, J.-H., Choudhury, M., Andrianifahanana, M., Yin, X., Limper, A. H., & Leof, E. B. (2020). IPF Pathogenesis is Dependent upon TGF β Induction of IGF-1. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(4), 5363. <https://doi.org/10.1096/fj.201901719RR>
69. Herrera, M., Herrera, J. M., Cantatore, S., Aguilar, J., Felipe, A., & Fumuso, E. (2018). Comparative histomorphological study of endometrium in mares. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 47(2), 153–158. <https://doi.org/10.1111/ahe.12335>
70. Higashi, Y., Sukhanov, S., Anwar, A., Shai, S.-Y., & Delafontaine, P. (2012). Aging, atherosclerosis, and IGF-1. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 67(6), 626–639.
71. Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., & Schoon, H.-A. (2009a). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium: Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology*, 71(2), 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.008>
72. Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., & Schoon, H.-A. (2009b). The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science*, 111(2), 261–278. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.019>
73. Horikawa, S., Ishii, Y., Hamashima, T., Yamamoto, S., Mori, H., Fujimori, T., Shen, J., Inoue, R., Nishizono, H., Itoh, H., Majima, M., Abraham, D., Miyawaki, T., & Sasahara, M. (2015). PDGFR α plays a crucial role in connective tissue remodeling. *Scientific Reports*, 5(1), 17948. <https://doi.org/10.1038/srep17948>
74. Hung, C. F., Rohani, M. G., Lee, S., Chen, P., & Schnapp, L. M. (2013). Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation. *Respiratory Research*, 14(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-102>
75. Hurtgen, J. P. (2006). Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology*, 66(3), 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.006>
76. Iwayama, T., & Olson, L. E. (2013). Involvement of PDGF in Fibrosis and Scleroderma: Recent Insights from Animal Models and Potential Therapeutic

- Opportunities. *Current Rheumatology Reports*, 15(2), 304. <https://doi.org/10.1007/s11926-012-0304-0>
- 77.Jasiński, T., Zdrojkowski, Ł., Ferreira-Dias, G., Kautz, E., Juszczuk-Kubiak, E., & Domino, M. (2022a). Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF-κB-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms23137360>
 - 78.Jasiński, T., Zdrojkowski, Ł., Kautz, E., Juszczuk-Kubiak, E., Ferreira-Dias, G., & Domino, M. (2021). Equine Endometrosis Pathological Features: Are They Dependent on NF-κB Signaling Pathway? *Animals*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ani11113151>
 - 79.Jasiński, T., Zdrojkowski, Ł., Kautz, E., Juszczuk-Kubiak, E., Ferreira-Dias, G., & Domino, M. (2022b). The NF-κB-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(6), 598–610. <https://doi.org/10.1111/rda.14099>
 - 80.Jiang, H.-S., Zhu, L.-L., Zhang, Z., Chen, H., Chen, Y., & Dai, Y.-T. (2015). Estradiol attenuates the TGF-β1-induced conversion of primary TAFs into myofibroblasts and inhibits collagen production and myofibroblast contraction by modulating the Smad and Rho/ROCK signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(3), 801–807. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2288>
 - 81.Jischa, S., Walter, I., Nowotny, N., Palm, F., Budik, S., Kolodziejek, J., & Aurich, C. (2008). Uterine involution and endometrial function in postpartum pony mares. *American Journal of Veterinary Research*, 69(11), 1525–1534.
 - 82.Kabisch, J., Klose, K., & Schoon, H.-A. (2019). Endometrial biopsies of old mares—What to expect?! *Pferdeheilkunde*, 35(3), 211–218. <https://doi.org/10.21836/PEM20190302>
 - 83.Kalpokas, I., Martínez, M. N., Cavestany, D., Perdigón, F., Mattos, R. C., & Meikle, A. (2021). Equine early pregnancy endocrine profiles and ipsilateral endometrial immune cell, gene expression and protein localisation response. *Reproduction, Fertility and Development*, 33(6), 410–426.
 - 84.Kamala, K. A., Kanetkar, S. R., Datkhile, K. D., & Sankethguddad, S. (2022). Expression of Ki67 Biomarker in Oral Submucous Fibrosis with Clinico-Pathological Correlations: A Prospective Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 23(1), 253. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.1.253>
 - 85.Kang, X., Zhao, K., Huang, Z., Fukada, S., Qi, X., & Miao, H. (2024). Pdgfra+ stromal cells, a key regulator for tissue homeostasis and dysfunction in distinct organs. *Genes & Diseases*, 101264.

- 86.Kanzaki, R., & Pietras, K. (2020). Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts: Opportunities for precision medicine. *Cancer Science*, 111(8), 2708–2717. <https://doi.org/10.1111/cas.14537>
- 87.Katila, T. (2012). The equine cervix: *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 28(1), 35–38. <https://doi.org/10.21836/PEM20120108>
- 88.Katila, T., & Ferreira-Dias, G. (2022). Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals*, 12(6), 779.
- 89.Kenney, R. M. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172(3), 241–262.
- 90.Kilgenstein, H. J., Schöniger, S., Schoon, D., & Schoon, H.-A. (2015). Microscopic examination of endometrial biopsies of retired sports mares: An explanation for the clinically observed subfertility? *Research in Veterinary Science*, 99, 171–179.
- 91.Kim, K. K., Sheppard, D., & Chapman, H. A. (2018). TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4), a022293. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022293>
- 92.Kim, S., You, D., Jeong, Y., Yoon, S. Y., Kim, S. A., & Lee, J. E. (2021). Inhibition of platelet-derived growth factor receptor synergistically increases the pharmacological effect of tamoxifen in estrogen receptor α positive breast cancer. *Oncology Letters*, 21(4), 294. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12555>
- 93.Klein, V., Müller, K., Schoon, H., Reilas, T., Rivera del Alamo, M., & Katila, T. (2016). Effects of Intrauterine Devices in Mares: A Histomorphological and Immunohistochemical Evaluation of the Endometrium. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(1), 98–104. <https://doi.org/10.1111/rda.12651>
- 94.Klinkhammer, B. M., Floege, J., & Boor, P. (2018). PDGF in organ fibrosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 62, 44–62. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.008>
- 95.Klose, K., & Schoon, H.-A. (2016). Periglandular inflammatory cells in the endometrium of the mare—A physiological defence mechanism which impacts on the development of endometrosis. *Pferdeheilkunde*, 32(1), 15–23.
- 96.Köhne, M., Diel, E., Packeiser, E.-M., Böttcher, D., Tönissen, A., Unruh, C., Goericke-Pesch, S., Ulrich, R., & Sieme, H. (2024). Analysis of gene and protein expression in the endometrium for validation of an *ex vivo* model of the equine uterus using PCR, digital and visual histopathology. *Theriogenology*, 221, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.03.015>

- 97.Kopchick, J. J., Basu, R., Berryman, D. E., Jorgensen, J. O. L., Johannsson, G., & Puri, V. (2022). Covert actions of growth hormone: Fibrosis, cardiovascular diseases and cancer. *Nature Reviews. Endocrinology*, 18(9), 558. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00702-6>
- 98.Kunzmann, S., Ottensmeier, B., Speer, C. P., & Fehrholz, M. (2018). Effect of progesterone on Smad signaling and TGF- β /Smad-regulated genes in lung epithelial cells. *PLoS One*, 13(7), e0200661.
- 99.LeBlanc, M., & Causey, R. (2009). Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(s3), 10–22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x>
- 100.Lefranc, A.-C., & Allen, W. R. (2007). Influence of breed and oestrous cycle on endometrial gland surface density in the mare. *Equine Veterinary Journal*, 39(6), 506–510. <https://doi.org/10.2746/042516407X235812>
- 101.Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Allen, W. R., Sieme, H., & Schoon, H.-A. (2011). Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology*, 76(7), 1326–1336. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.001>
- 102.Ley, W. B., Bowen, J. M., Sponenberg, D. P., & Lessard, P. N. (1989). Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: Effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology*, 32(2), 263–276.
- 103.Li, C., & Wang, B. (2022). Mesenchymal stem/stromal cells in progressive fibrogenic involvement and anti-fibrosis therapeutic properties. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 902677.
- 104.Liu, X., Wong, S. S., Taype, C. A., Kim, J., Shentu, T.-P., Espinoza, C. R., Finley, J. C., Bradley, J. E., Head, B. P., Patel, H. H., Mah, E. J., & Hagood, J. S. (2017). Thy-1 interaction with Fas in lipid rafts regulates fibroblast apoptosis and lung injury resolution. *Laboratory Investigation*, 97(3), 256–267. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.145>
- 105.Losinno, L., & Pietrani, M. S. (2023). The equine endometrium and its multiple connections, interrelationships and clinical effects in aged mares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 47(2), 249–256. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2023.039>
- 106.Lunelli, D., Cirio, S. M., Leite, S. C., Camargo, C. E., & Kozicki, L. E. (2013). *Collagen types in relation to expression of estradiol and progesterone receptors in equine endometrial fibrosis*. 2013. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.44078>
- 107.Luzina, I. G., Todd, N. W., Sundararajan, S., & Atamas, S. P. (2015). The cytokines of pulmonary fibrosis: Much learned, much more to learn. *Cytokine*, 74(1), 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.008>

108. Mahon, G. A. T., & Cunningham, E. P. (1982). Inbreeding and the inheritance of fertility in the thoroughbred mare. *Livestock Production Science*, 9(6), 743–754.
109. Mair, M., Blaas, L., Osterreicher, C. H., Casanova, E., & Eferl, R. (2011). JAK-STAT signaling in hepatic fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16(8), 2794–2811.
110. Mambelli, L. I., Mattos, R. C., Winter, G. H. Z., Madeiro, D. S., Morais, B. P., Malschitzky, E., Miglino, M. A., Kerkis, A., & Kerkis, I. (2014). Changes in Expression Pattern of Selected Endometrial Proteins following Mesenchymal Stem Cells Infusion in Mares with Endometriosis. *PLoS ONE*, 9(6), e97889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097889>
111. Mansour, G. D., Henry, M., & Ferreira, A. M. R. (2003). Immunohistochemical Study of Equine Endometrial Extracellular Matrix during the Oestrous Cycle. *Journal of Comparative Pathology*, 129(4), 316–319. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00048-3)
112. Masseno, A. P. B. (2012). Assessment of endometrial fibrosis and myofibroblasts in endometriosis active and inactive mares (Dissertation/Ph. D. thesis). *Botucatu: University Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho*.
113. McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: The kappa statistic. *Biochemia Medica*, 22(3), 276–282.
114. McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. (2011). *Equine reproduction*. John Wiley & Sons. <https://www.google.com/books?hl=pl&lr=&id=QPJQT6-g-YMC&oi=fnd&pg=PR34&dq=mckinnon+reproduction&ots=kmsFfk1Vly&sig=Sm-u6t8T3sTw3imRAEIsIIY7VdE>
115. Minkwitz, C., Schoon, H.-A., Zhang, Q., & Schöniger, S. (2019). Plasticity of endometrial epithelial and stromal cells—A new approach towards the pathogenesis of equine endometriosis. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(6), 835–845. <https://doi.org/10.1111/rda.13431>
116. Monteiro, R., Teixeira, D., & Calhau, C. (2014). Estrogen Signaling in Metabolic Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2014/615917>
117. Moore, B. B., Peters-Golden, M., Christensen, P. J., Lama, V., Kuziel, W. A., Paine, R., & Toews, G. B. (2003). Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE₂. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(2), L342–L349. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00168.2002>
118. Morales-Garza, L. A., Puche, J. E., Aguirre, G. A., Muñoz, Ú., García-Magariño, M., De La Garza, R. G., & Castilla-Cortazar, I. (2017). Experimental

- approach to IGF-1 therapy in CCl₄-induced acute liver damage in healthy controls and mice with partial IGF-1 deficiency. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1198-4>
119. Muderspach, N. D., Troedsson, M. H., Ferreira-Dias, G., Agerholm, J. S., & Christoffersen, M. (2024). Distribution of degenerative changes in the equine endometrium as observed in a single versus two biopsies. *Theriogenology*, 213, 52–58.
 120. Nataraj, K., Schonfeld, M., Rodriguez, A., & Tikhanovich, I. (2024). Protective role of 17 β -estradiol in alcohol-associated liver fibrosis is mediated by suppression of integrin signaling. *Hepatology Communications*, 8(5), e0428. <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000428>
 121. Nederlof, R., Reidel, S., Spychala, A., Gödecke, S., Heinen, A., Lautwein, T., Petzsch, P., Köhrer, K., & Gödecke, A. (2022). Insulin-like growth factor 1 attenuates the pro-inflammatory phenotype of neutrophils in myocardial infarction. *Frontiers in Immunology*, 13, 908023.
 122. Novotný, M., Vasilenko, T., Varinská, L., Smetana Jr, K., Szabo, P., Šarišský, M., Dvořánková, B., Mojžiš, J., Bobrov, N., Toporcerová, S., Sabol, F., Matthews, B. J. O., & Gál, P. (2011). ER- α agonist induces conversion of fibroblasts into myofibroblasts, while ER- β agonist increases ECM production and wound tensile strength of healing skin wounds in ovariectomised rats. *Experimental Dermatology*, 20(9), 703–708. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01284.x>
 123. Oddsdóttir, C. (2007). *Development of endometrial fibrosis in the mare: Factors involved in tissue remodelling and collagen deposition*.
 124. Ohkawa, T., Ueki, N., Taguchi, T., Shindo, Y., Adachi, M., Amuro, Y., Hada, T., & Higashino, K. (1999). Stimulation of hyaluronan synthesis by tumor necrosis factor- α is mediated by the p50/p65 NF- κ B complex in MRC-5 myofibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1448(3), 416–424.
 125. Overbeck, W., Jäger, K., Schoon, H.-A., & Witte, T. S. (2013). Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus—An in vitro study. *Theriogenology*, 79(9), 1262–1268.
 126. Paolini, C., Agarbati, S., Benfaremo, D., Mozzicafreddo, M., Svegliati, S., & Moroncini, G. (2022). PDGF/PDGFR: A possible molecular target in scleroderma fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3904.
 127. Pietras, K., & Sjölund, J. (2024). Cellular plasticity in the breast cancer ecosystem. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 129, 10.48101/ujms.v129.10629. <https://doi.org/10.48101/ujms.v129.10629>

128. Piotrowska-Tomala, K. K., Jonczyk, A. W., Skarzynski, D. J., & Szóstek-Mioduchowska, A. Z. (2020). Luteinizing hormone and ovarian steroids affect in vitro prostaglandin production in the equine myometrium and endometrium. *Theriogenology*, 153, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.039>
129. Podico, G., Canisso, I. F., Roady, P. J., Austin, S. M., Carossino, M., Balasuriya, U., Ellerbrock, R. E., Lima, F. S., Ferreira-Dias, G., & Douglas, R. H. (2020). Uterine responses and equine chorionic gonadotropin concentrations after two intrauterine infusions with kerosene post early fetal loss in mares. *Theriogenology*, 147, 202–210.
130. Potluri, T., Taylor, M. J., Stulberg, J. J., Lieber, R. L., Zhao, H., & Bulun, S. E. (2022). An estrogen-sensitive fibroblast population drives abdominal muscle fibrosis in an inguinal hernia mouse model. *JCI Insight*, 7(9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9090253/>
131. Potluri, T., You, T., Yin, P., Stulberg, J., Dai, Y., Escobar, D., & Zhao, H. (2024). Estrogen Signaling Modulation Prevents and Even Reverses Skeletal Muscle Fibrosis. *Physiology*, 39(S1), 736. <https://doi.org/10.1152/physiol.2024.39.S1.736>
132. Rea, L. M., & Parker, R. A. (2014). *Designing and conducting survey research: A comprehensive guide*. John Wiley & Sons. https://www.google.com/books?hl=pl&lr=&id=Ub8BBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=Designing+and+Conducting+Survey+Research:+A+Comprehensiv e+Guide&ots=izDs q1GquK&sig=vM7qHASniWN5K_26AP1z1-AAE4o
133. Rebordão, M., Galvão, A., Szóstek, A., Amaral, A., Mateus, L., Skarzynski, D., & Ferreira-Dias, G. (2014a). Physiopathologic Mechanisms Involved in Mare Endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 82–87. <https://doi.org/10.1111/rda.12397>
134. Rebordão, M. R., Amaral, A., Fernandes, C., Silva, E., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvão, A., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2021). Enzymes present in neutrophil extracellular traps may stimulate the fibrogenic PGF2 α pathway in the mare endometrium. *Animals*, 11(9), 2615.
135. Rebordão, M. R., Amaral, A., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvão, A., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2018). Constituents of neutrophil extracellular traps induce *in vitro* collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology*, 113, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.001>
136. Rebordão, M. R., Pereira, C., Galvão, A., Bravo, P. P., Szóstek, A., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2014b). What is new on the physiopathology of endometrosis in the mare. *Pferdeheilkunde*, 30, 15–18.

137. Reghini, M. F. S., Ramires Neto, C., Segabinazzi, L. G., Castro Chaves, M. M. B., Dell'Aqua, C. de P. F., Bussiere, M. C. C., Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2016). Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology*, 86(2), 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>
138. Reidel, S., Nederlof, R., Köhrer, K., Petzsch, P., & Gödecke, A. (2022). Insulin-like growth factor 1 induces a reparative neutrophil phenotype. *The FASEB Journal*, 36(S1). <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.R2840>
139. Rodriguez, J. S., Han, S., Nielsen, S., Pearson, L. K., Gay, J. M., & Tibary, A. (2012). Consequences of Intrauterine Enrofloxacin Infusion on Mare Endometrium. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.08.003>
140. Rojas, D., Cabezas, J., Ramírez, G., Saraiva, F., Lleretny, R.-A., & Castro, F. O. (2020). Complimentary diagnostic tools for endometriosis in biopsies of mares with clinical subfertility. *Acta Scientiae Veterinariae*, 48.
141. Saalbach, A., & Anderegg, U. (2019). Thy-1: More than a marker for mesenchymal stromal cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(6), 6689–6696. <https://doi.org/10.1096/fj.201802224R>
142. Sarenac, T., Trapecar, M., Gradisnik, L., Rupnik, M. S., & Pahor, D. (2016). Single-cell analysis reveals IGF-1 potentiation of inhibition of the TGF- β /Smad pathway of fibrosis in human keratocytes in vitro. *Scientific Reports*, 6(1), 34373. <https://doi.org/10.1038/srep34373>
143. Scarlet, D., Malama, E., Fischer, S., Knutti, B., & Bollwein, H. (2023). Relationship between Clinical Uterine Findings, Therapy, and Fertility in the Mare. *Veterinary Sciences*, 10(4), 259. <https://doi.org/10.3390/vetsci10040259>
144. Schöniger, S., Gräfe, H., & Schoon, H.-A. (2013). Beta-defensin is a component of the endometrial immune defence in the mare. *Pferdeheilkunde*, 29(3), 335–346.
145. Schöniger, S., Gräfe, H., & Schoon, H.-A. (2018). Innate immunity mechanisms of the equine endometrium – benefit or harm? *Pferdeheilkunde*, 34(1), 5–11. <https://doi.org/10.21836/PEM20180101>
146. Schöniger, S., & Schoon, H.-A. (2020). The healthy and diseased equine endometrium: A review of morphological features and molecular analyses. *Animals*, 10(4), 625.
147. Schoon, D., Schoon, H. A., & Klug, E. (1999). Angioses in the equine endometrium-pathogenesis and clinical correlations. *Pferdeheilkunde*, 15, 541–546.

- 148.Schoon, H. A., & Schoon, D. (2003). The Category I mare (Kenney and Doig)-expected foaling rate 80-90%-fact or fiction? *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 19(6), 698–701.
- 149.Shanker, G., Sorci-Thomas, M., & Adams, M. R. (1995). Estrogen modulates the inducible expression of platelet-derived growth factor mRNA by monocyte/macrophages. *Life Sciences*, 56(7), 499–507.
- 150.Sikora, M., Nowak, M., Rachenik, H., Wojtysiak, K., & Kozdrowski, R. (2017). Reliability of histopathological examination and immunohistochemistry of a single biopsy for evaluation of endometrial health in Icelandic mares. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 55(3), 168–175. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2017.0017>
- 151.Silva, E. S. M., Scoggin, K. E., Canisso, I. F., Troedsson, M. H. T., Squires, E. L., & Ball, B. A. (2014). Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 151(3–4), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.001>
- 152.Skarzynski, D. J., Szóstek-Mioduchowska, A. Z., Rebordão, M. R., Jalali, B. M., Piotrowska-Tomala, K. K., Leciejewska, N., Łazarczyk, M., & Ferreira-Dias, G. M. (2020). Neutrophils, monocytes and other immune components in the equine endometrium: Friends or foes? *Theriogenology*, 150, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.018>
- 153.Snider, T. A., Sepoy, C., & Holyoak, G. R. (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, 75(9), 1567–1581. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.013>
- 154.Szóstek, A. Z., Lukasik, K., Galvão, A. M., Ferreira-Dias, G. M., & Skarzynski, D. J. (2013). Impairment of the Interleukin System in Equine Endometrium During the Course of Endometrosis1. *Biology of Reproduction*, 89(4), 79, 1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109447>
- 155.Szóstek, A. Z., Siemieniuch, M. J., Lukasik, K., Galvão, A. M., Ferreira-Dias, G. M., & Skarzynski, D. J. (2012). mRNA transcription of *prostaglandin synthases* and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. *Theriogenology*, 78(4), 768–776. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.024>
- 156.Szóstek-Mioduchowska, A., Leciejewska, N., Zelmańska, B., Staszkievicz-Chodor, J., Ferreira-Dias, G., & Skarzynski, D. (2020a). Lysophosphatidic acid as a regulator of endometrial connective tissue growth factor and prostaglandin secretion during estrous cycle and endometrosis in the mare. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 343. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02562-6>

157. Szóstek-Mioduchowska, A., Słowińska, M., Pacewicz, J., Skarzynski, D. J., & Okuda, K. (2020b). Matrix metalloproteinase expression and modulation by transforming growth factor- β 1 in equine endometrosis. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58109-0>
158. Szóstek-Mioduchowska, A., Wójtowicz, A., Sadowska, A., Moza Jalali, B., Słyszewska, M., Łukasik, K., Gurgul, A., Szmatoła, T., Bugno-Poniewierska, M., Ferreira-Dias, G., & Skarzynski, D. J. (2023). Transcriptomic profiling of mare endometrium at different stages of endometrosis. *Scientific Reports*, 13(1), 16263. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43359-5>
159. Szóstek-Mioduchowska, A., Wójtowicz, A., Sadowska, A., & Skarżyński, D. (2022). The role of inflammatory mediators in the development of endometrosis in mare. *Medycyna Weterynaryjna*, 77(12), 6722–2022. <https://doi.org/10.21521/mw.6722>
160. Szóstek-Mioduchowska, A. Z., Baclawska, A., Okuda, K., & Skarzynski, D. J. (2018). The Effect of IL-6 on Metalloproteinase Expression in Endometrial Fibrosis (endometrosis) in Mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 158. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.05.194>
161. Szóstek-Mioduchowska, A. Z., Baclawska, A., Rebordão, M. R., Ferreira-Dias, G., & Skarzynski, D. J. (2020c). Prostaglandins effect on matrix metalloproteinases and collagen in mare endometrial fibroblasts. *Theriogenology*, 153, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.040>
162. Szóstek-Mioduchowska, A. Z., Lukasik, K., Skarzynski, D. J., & Okuda, K. (2019). Effect of transforming growth factor - β 1 on α -smooth muscle actin and collagen expression in equine endometrial fibroblasts. *Theriogenology*, 124, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.005>
163. Thompson, R. E., Premanandan, C., Pukazhenth, B. S., & Whitlock, B. K. (2020). A review of *in vivo* and *in vitro* studies of the mare endometrium. *Animal Reproduction Science*, 222, 106605. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106605>
164. Timmergen, M. J., Smits, R., Grünhagen, D. J., Verhoef, C., Sleijfer, S., & Wiemer, E. A. (2019). Activated signaling pathways and targeted therapies in desmoid-type fibromatosis: A literature review. *Frontiers in Oncology*, 9, 397.
165. Trojanowska, M. (2008). Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology*, 47(suppl_5), v2–v4.
166. Uliani, R. C., Conley, A. J., Corbin, C. J., Friso, A. M., Maciel, L. F. S., & Alvarenga, M. A. (2019). Anti-Müllerian hormone and ovarian aging in mares. *The Journal of Endocrinology*, 240(2), 147–156. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0391>

- 167.Verhoef, J. N. C., Allen, A. L., Harding, J. C. S., & Al-Dissi, A. N. (2018). Metallothionein Expression in Horses With Chronic Liver Disease and Its Correlation With Ki-67 Immunoreactivity. *Veterinary Pathology*, 55(5), 703–710. <https://doi.org/10.1177/0300985818777802>
- 168.Walter, I., Handler, J., Reifinger, M., & Aurich, C. (2001). Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction*, 121(4), 581–586. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210581>
- 169.Walter, I., Klein, M., Handler, J., Aurich, J. E., Reifinger, M., & Aurich, C. (2001). Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *American Journal of Veterinary Research*, 62(6), 840–845.
- 170.Wang, S., Wang, B., Shi, Y., Möller, T., Stegmeyer, R. I., Strilic, B., Li, T., Yuan, Z., Wang, C., & Wettschureck, N. (2022). Mechanosensation by endothelial PIEZO1 is required for leukocyte diapedesis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 140(3), 171–183.
- 171.Warner, R. R., Stone, K. J., & Boissy, Y. L. (2003). Hydration Disrupts Human Stratum Corneum Ultrastructure. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(2), 275–284. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12046.x>
- 172.Weigel, M. T., Banerjee, S., Arnedos, M., Salter, J., A'Hern, R., Dowsett, M., & Martin, L. A. (2013). Enhanced expression of the PDGFR/Abl signaling pathway in aromatase inhibitor-resistant breast cancer. *Annals of Oncology*, 24(1), 126–133. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds240>
- 173.Westendorf, J., Wobeser, B., & Epp, T. (2022a). IIB or not IIB, part 1: Retrospective evaluation of Kenney–Doig categorization of equine endometrial biopsies at a veterinary diagnostic laboratory and comparison with published reports. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34(2), 206–214.
- 174.Westendorf, J., Wobeser, B., & Epp, T. (2022b). IIB or not IIB, part 2: Assessing inter-rater and intra-rater repeatability of the Kenney–Doig scale in equine endometrial biopsy evaluation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34(2), 215–225. <https://doi.org/10.1177/10406387211062866>
- 175.Wójtowicz, A., Molcan, T., Lukasik, K., Żebrowska, E., Pawlina-Tyszko, K., Gurgul, A., Szmatoła, T., Bugno-Poniewierska, M., Ferreira-Dias, G., Skarzynski, D. J., & Szóstek-Mioduchowska, A. (2023). The potential role of miRNAs and regulation of their expression in the development of mare endometrial fibrosis. *Scientific Reports*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42149-3>
- 176.Wong, Y. S., Mançanares, A. C., Navarrete, F. I., Poblete, P. M., Méndez-Pérez, L., Ferreira-Dias, G. M. L., Rodriguez-Alvarez, L., & Castro, F. O.

- (2023). Mare stromal endometrial cells differentially modulate inflammation depending on oestrus cycle status: An in vitro study. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1271240. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1271240>
177. Yang, J., Zhan, X.-Z., Malola, J., Li, Z.-Y., Pawar, J. S., Zhang, H.-T., & Zha, Z.-G. (2020). The multiple roles of Thy-1 in cell differentiation and regeneration. *Differentiation*, 113, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2020.03.003>
178. You, J.-R., Chen, Y.-T., Hsieh, C.-Y., Chen, S.-Y., Lin, T.-Y., Shih, J.-S., Chen, G.-T., Feng, S.-W., Peng, T.-Y., & Wu, C.-Y. (2023). Exploring Possible Diagnostic Precancerous Biomarkers for Oral Submucous Fibrosis: A Narrative Review. *Cancers*, 15(19), 4812.
179. Zdrojkowski, Ł., Jasiński, T., Ferreira-Dias, G., Pawliński, B., & Domino, M. (2023). The role of NF-κB in endometrial diseases in humans and animals: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2901.
180. Zdrojkowski, Ł., Pawliński, B., Skierbiszevska, K., Jasiński, T., & Domino, M. (2024). Assessment of connective tissue in the equine uterus and cervix: Review of clinical impact and staining options. *Animals*, 14(1), 156.
181. Zhou, L., Shao, Y., Huang, Y., Yao, T., & Lu, L.-M. (2007). 17β-Estradiol inhibits angiotensin II-induced collagen synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts via modulating angiotensin II receptors. *European Journal of Pharmacology*, 567(3), 186–192.

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelnich Biblioteki SGGW.

.....

(czytelny podpis autora)