

Endometrosis macicy klaczy – przyczynek do poznania patogenezy

MARIA KATKIEWICZ, ZDZISŁAW BORYCZKO, MACIEJ WITKOWSKI, SYLWESTER ZAJĄC

Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu Katedry Nauk Klinicznych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

Katkiewicz M., Boryczko Z., Witkowski M., Zajac S.

Endometrosis of the uterus in mares – a contribution to its pathogenesis

Summary

The aim of this work was to examine specimens from 56 mares subjected to endometrial biopsy. Special attention was paid to inflammatory cells and mast cells. It was found that endometritis eosinophila evolved into endometritis lymphocytaria. The development of endometrosis was accompanied by a slight increase in the relative number of mast cells in the interstitial tissue. At the same time, diffused eosinophils and variable numbers of lymphocytes and macrophages were present. These results may suggest that the primary inflammatory process in endometrium contributes to the secondary progressive interstitial fibrosis. The process of the activation of eosinophils, lymphocytes, mast cells and macrophages may result from hormonal disturbances and may reflect a pathological stimulation of these cells by estrogens through specific nuclear receptors.

Keywords: mare, endometrosis, pathogenesis

Endometrosis klaczy stanowi od dawna znany zespół zmian patologicznych, który rozwija się w błonie śluzowej macicy i w zaawansowanym stadium prowadzi do poważnych zaburzeń w rozrodcie. Mimo wieloletnich badań prowadzonych nad patogenezą tej choroby nie została ona do końca poznana. Badanie błony śluzowej macicy klaczy jest jedyną metodą rozpoznawania *endometrosis* i dlatego jest powszechnie stosowane w ocenie stanu zdrowia macicy używanych do rozrodu klaczy.

W wyniku badań własnych, zarówno bioptatów macicy klaczy, jak i innych gatunków zwierząt zauważono korelację w występowaniu pewnych typów zmian patologicznych w *endometrium* w powiązaniu z dynamiką rozwoju procesu chorobowego. Końcowym efektem tej, o ciągle nieustalonej etiopatogenezie, choroby jest proces włóknienia zrębu błony śluzowej, ścian naczyń krwionośnych, zaburzenia w homeostazie i różnicowaniu komórek gruczołów *endometrium*.

Jakkolwiek struktura obrazu zmian mikroskopowych w *endometrosis* klaczy jest odmienna w porównaniu do *endometriosis genitalia interna* występującej u krowy (5) – typ zmian patologicznych charakterystycznych dla obu tych procesów chorobowych jest bardzo podobny. Są to: proliferacja komórek zrębu z włóknieniem, zaburzenie w homeostazie komórek gruczołów *endometrium* wyrażone głównie w postaci niekontrolowanej proliferacji. U klaczy ulegające

rozrostowi komórki gruczołów *endometrium* układają się w tzw. gniazda gruczołowe, otoczone torebką włóknistą i są zlokalizowane w błonie śluzowej, natomiast u krów proliferacja ta następuje wzdłuż ścian naczyń krwionośnych w głąb ściany macicy, osiągając nawet błonę surowiczą (4).

Proliferacja komórek zrębu i włóknienie zrębu ma miejsce w wielu narządach mięsnych i w błonach śluzowych. Liczne czynniki chorobotwórcze, które indukują wystąpienie tych zmian patologicznych, są nieswoiste. Efektem ich działania są przewlekłe stany zapalne. W niniejszych badaniach podjęto się wykazania, że rozwój zmian chorobowych w macicy klaczy o charakterze *endometrosis* pozostaje w ścisłym związku z obecnością komórek nacieku zapalnego.

Materiał i metody

Badania wykonano na 56 wycinkach błony śluzowej macicy klaczy. Klacze były w różnym wieku, różnej rasy. Nadesłany materiał przesyłano do pracowni histopatologii w celu wykonania rutynowej oceny stanu zdrowia macicy. Wycinki utrwalano w 10% buforowanej formalinie, zatapio w parafinie. Skrawki parafinowe barwiono metodą rutynową hematoksyliną i eozyną oraz błękitem toluidyny dla uwidocznienia komórek tucznych. Dla określenia liczby względnej komórek tucznych komórki te liczone w warstwie błony śluzowej tuż pod nabłonkiem macicy w 10 polach powiększenia $\times 40$ obiektywu mikroskopu świetlnego. Z uzyskanych wartości obliczono średnią arytmetycz-

ną charakterystyczną dla danej kategorii *endometrosis*. W ocenie stopnia nasilenia włóknienia zrębu *endometrium* (liczba warstw torebki włóknistej wokół tzw. gniazd gruczołowych) posłużono się klasyfikacją wg Kenneya i Doiga.

Wyniki i omówienie

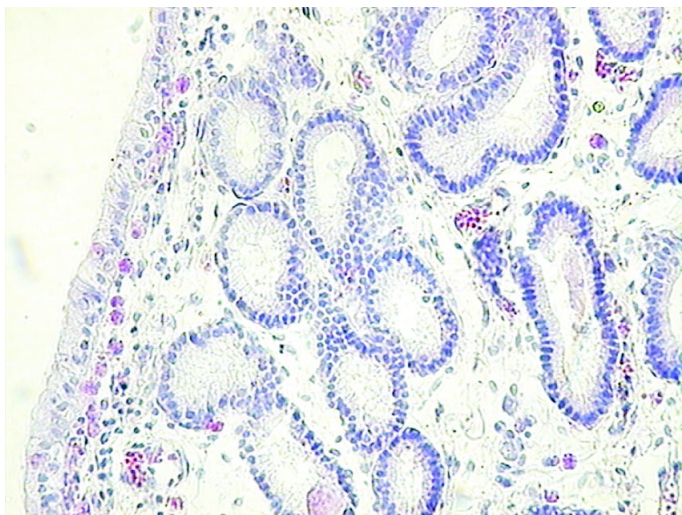
W tab. 1 przedstawiono wyniki badania mikroskopowego wycinków błony śluzowej macicy. W ocenie badanego materiału szczególną uwagę poświęcono określeniu liczebności i typu komórek nacieku zapalnego obecnych w zrębie *endometrium* w poszczególnych kategoriach *endometrosis*. W 3 przypadkach, kiedy biopaty pochodziły od tej samej klaczy, lecz pobrane były w odstępie 3-4-miesięcznym wykazano, że w pierwszym wycinku występował obfity naciek eozynofilowy, charakterystyczny dla *endometritis eosinophila* (ryc. 1), który następnie uległ znacznego stopnia redukcji i w drugim wycinku obserwowano zapalenie limfocytarne *endometrium* (ryc. 2). Eozynofile pozostawały w formie rozsianej w zrębie błony śluzowej. U tych klaczy, biorąc pod uwagę klasyfikację Kenneya, w drugim wycinku stwierdzano kategorię IIb z typowym włóknieniem zrębu i cechami proliferacji gruczołów oraz powiększeniem ich światła (ryc. 3).

U większości klaczy, u których stwierdzano *endometrosis* kategorii IIb, dominowały limfocytarne nacieki zapalne, ale były także rozsiane w zrębie eozynofile (ryc. 4). Rozsiane eozynofile obecne były we wszystkich badanych wycinkach macicy (poza zapaleniem eozynofilowym, gdzie dominowały w nacieku zapalnym). Liczebność eozynofili, podobnie jak limfocytów była osobniczo zróżnicowana (tab. 1).

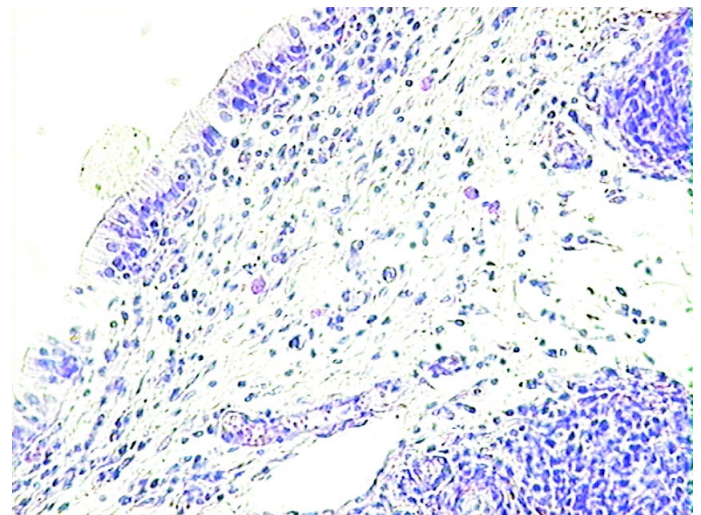
Tab. 1. Wyniki rutynowych badań histopatologicznych wycinków błony śluzowej macicy klaczy (n = 56)

Liczba klaczy	Kategoria wg Kenneya i Doiga	Liczba względna komórek tucznych	Eozynofile	Limfocyty	Makrofagi	Faza włóknienia
n = 7	I	0-4 (~2)	pojedyncze	pojedyncze	pojedyncze (n = 6) liczne (n = 1)	brak
n = 15	II a	2-8 (~3)	rozsiane (n = 11) zap. eozynofilowe (n = 4)	średnio liczne	liczne (n = 1) pojedyncze (n = 14)	zapoczątkowana
n = 31	II b	2-3 (~3)	rozsiane	liczne (n = 20) zap. limfocytarne (n = 11)	pojedyncze (n = 30) liczne (n = 1)	wokół gniazd w zębce pod nabłonkiem
n = 3	III	4-6 (~4)	liczne	liczne (n = 2) b. liczne (n = 1)	liczne (n = 2) b. liczne (n = 1)	j.w. zaawansowane z zanikiem gruczołów

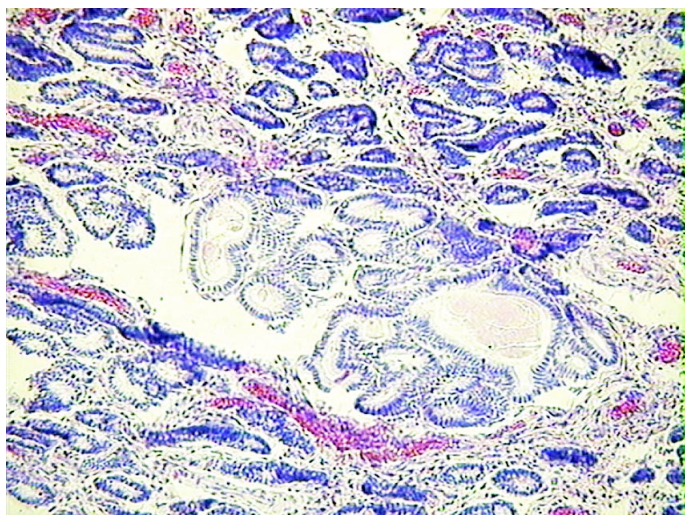
W tabeli 1 przedstawiono liczbę względną komórek tucznych stwierdzanych w powierzchniowej części *endometrium*. Jakkolwiek liczba komórek tucznych była wyraźnie zróżnicowana u poszczególnych klaczy, to jednak można zauważyć wzrost ich liczby skorelowany z stopniem nasilenia procesu włóknienia zrębu. U dwóch klaczy stwierdzono znaczny wzrost liczby komórek tucznych. W jednym przypadku średnia liczba względna komórek tucznych wynosiła 8 (klacz nr 59529). U tej klaczy obecne było zapalenie limfocytarne i rozsiane w zrębie eozynofile, z widocznym procesem włóknienia podnabłonkowego. W drugim przypadku (średnia liczba względna komórek tucznych wynosiła 6) była to klacz, u której równocześnie występowała eozynofilia błony śluzowej (ryc. 5) oraz *endometrosis* o cechach kategorii III wg Kenneya (klacz nr 753). Natomiast u większości badanych klaczy średnie wartości liczby względnej komórek tucz-



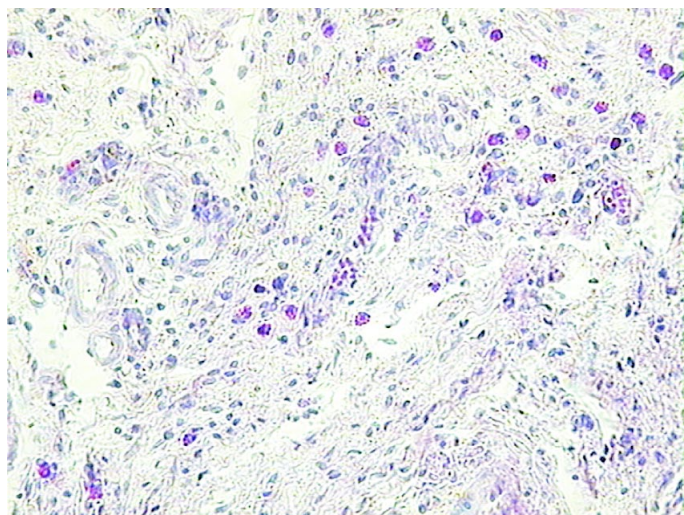
Ryc. 1. Zapalenie eozynofilowe (*endometritis eosinophila*) – biopat błony śluzowej macicy klaczy, widoczny obfity naciek eozynofilowy. HE × 40



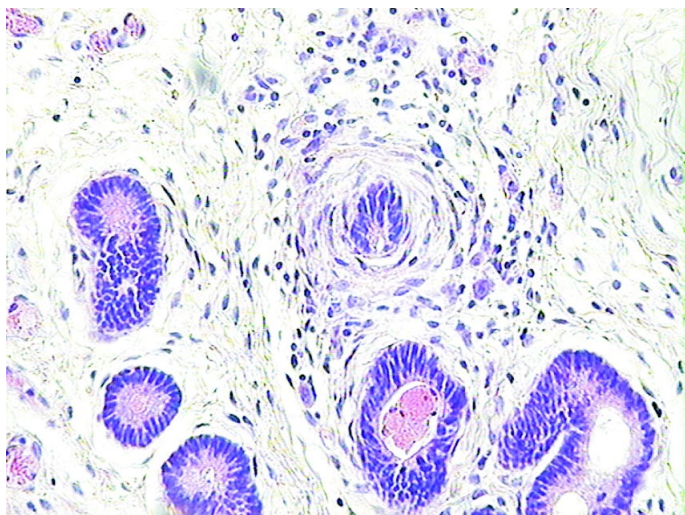
Ryc. 2. Zapalenie limfocytarne (*endometritis lymphocytaria*) – biopat błony śluzowej macicy klaczy, w zrębie obecne liczne limfocyty i rozsiane eozynofile. HE × 40



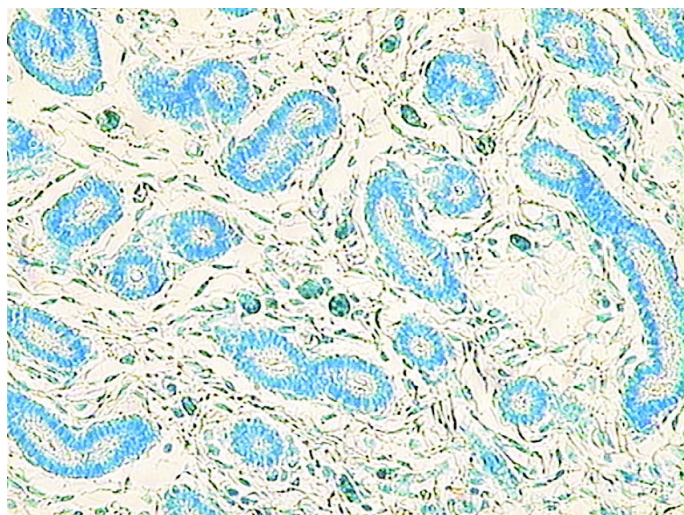
Ryc. 3. Faza początkowa włóknienia zrębu *endometrium* z cechami proliferacji gruczołów, powiększeniem ich światła i zapaleniem limfocytarnym – biopiat błony śluzowej macicy klaczy. HE $\times 20$



Ryc. 4. *Endometrosis* macicy klaczy, kategoria IIb, w zrębie widoczne rozsiane eozynofile. Biopiat błony śluzowej macicy klaczy. HE $\times 40$



Ryc. 5. Komórki tłuszczowe w zrębie *endometrium* – biopiat błony śluzowej macicy klaczy. Błękit toluidynny $\times 40$



Ryc. 6. Makrofagi w zrębie *endometrium* – biopiat błony śluzowej macicy klaczy. Błękit toluidynny $\times 40$

nych wynosiły od 2-4 komórek, lecz z wyraźnym wzrostem średnich wartości liczby względnej wraz z nasilaniem się procesu włóknienia *endometrium*.

Makrofagi stwierdzone w zrębie błony śluzowej macicy badanych klaczy były rozsiane lub skupione w ogniskach (ryc. 6). Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 1, liczebność makrofagów nie była bezpośrednio związana z procesem narastania zmian patologicznych w *endometrium* o charakterze *endometrosis*.

Dotychczas w patogenezie *endometrosis* klaczy podkreśla się znaczenie zaburzeń hormonalnych oraz występowanie zmian patologicznych w naczyniach krwionośnych. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań nie podważają roli zaburzeń hormonalnych w rozwoju zmian chorobowych w macicy, natomiast wskazują także na istotny udział w tym procesie komórek nacieku zapalnego. Każdy typ obecnych w zrębie *endometrium* komórek stanowiących wyraz aktywacji pro-

cesu zapalnego w błonie śluzowej macicy, to jest: eozynofile, limfocyty, komórki tłuszczowe i makrofagi posiadają receptory dla estrogenów. Fakt ten tłumaczy od dawna znany mechanizm interakcji między układami immunologicznym i endokrynowym.

Zapalenie eozynofilowe błony śluzowej macicy jest stosunkowo rzadko diagnozowane, co przypuszczalnie związane jest z tym, że ten typ procesu chorobowego jest krótkotrwały i przechodzi w zapalenie limfocytarne. Taką transformację typu zmian chorobowych stwierdzono w niniejszej pracy u trzech klaczy, które były badane dwukrotnie w odstępie kilku miesięcy.

Od dawna wiadomo, że w następstwie przewlekłego zapalenia limfocytarne dochodzi do włóknienia zrębu chorego narządu. Czy zmiany patologiczne zlokalizowane w zrębie błony śluzowej macicy charakterystyczne dla *endometrosis* są także inicjowane aktywacją procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy?

Zapalenie limfocytarne błony śluzowej macicy diagnozowane jest wówczas, gdy w komórkowym nacieku zapalnym dominują limfocyty. W badanych biopatach liczebność limfocytów była w znacznym stopniu zróżnicowana – od bardzo licznych do rozszanych w zrębie ogniskowych nacieków. Należy jednak podkreślić, że mimo przewagi limfocytów eozynofile, makrofagi i komórki tuczne były zawsze obecne w zrębie *endometrium*, w formie rozszanej lub ogniskowej. Komórki te stwierdzano w zrębie *endometrium*, niezależnie od stopnia zaawansowania *endometrosis*.

W badaniach nad patogenezą zmian chorobowych rozwijających się w macicy kobiet wykazano udział eozynofiliów, a w szczególności w powiązaniu ze stymulacją wywołaną przez estrogeny (7). Wyniki niniejszych badań wskazują także jednoznacznie na udział eozynofiliów w rozwoju *endometrosis* macicy klaczy. Od dawna wiadomo, że eozynofile są obecne zarówno w chorobach klaczy rozpoznawanych w badaniach histopatologicznych, jak również w wynikach badań cytologicznych wymazów pochwowych (9). Jednak rola tych komórek w patogenezie chorób narządów rozrodczych nie była bliżej poznana. Obecnie propaguje się interpretację roli eozynofiliów w patogenezie chorób macicy wynikającą z poznania mechanizmów regulacji funkcji tych komórek przez hormony jajnikowe. U kobiet chorych na *endometriosis* wykazano podwyższoną liczbę eozynofiliów w płynie otrzewnowym (3). Wyniki badań nad wpływem estrogenów i progesteronu na zachowanie się eozynofiliów w szyjce macicy szczurów wykazały, że estrogeny stymulują wzrost ich liczby, natomiast progesteron wywiera efekt hamujący (8). Także w rui eozynofile są najliczniejsze w błonie śluzowej macicy szczurów w porównaniu do innych faz cyklu (1). Eozynofile posiadają receptor dla estrogenów i to tłumaczy możliwość modulowania zachowania się tych komórek poprzez stymulację indukowaną przez te hormony. Mechanizm tego działania wprowadza nowy element w interpretacji etiologii zarówno zapalenia eozynofilowego błony śluzowej macicy klaczy, jak i udziału eozynofiliów w nacieku komórek zapalnych w zrębie *endometrium* w różnych fazach rozwoju *endometrosis*.

U koni eozynofilia w krwi obwodowej towarzyszy inwazji pasożytniczej, a także może występować przy idiopatycznych eozynofilowych chorobach skóry i płuc (2). W badanych wycinkach błony śluzowej macicy nie stwierdzano widocznych w obrazie mikroskopowym takich struktur, które nasuwałyby podejrzenie występowania czynników zakaźnych (grzyby, pierwotniaki) typowych dla wywoływania reakcji w postaci zapalenia eozynofilowego.

W wyniku przeprowadzonych badań błony śluzowej macicy, a także w oparciu o wyniki cytowanych badań nasuwa się wniosek, że u badanych klaczy obecny w różnym stopniu nasilenia naciek eozynofilowy stanowi wyraz stymulacji wywieranej przez estrogeny. W badaniach własnych biopatów macicy klaczy

pochodzących od hiperimmunizowanych klaczy, u których występowały zaawansowane zmiany o charakterze *endometrosis* wykazano znacznego stopnia wzrost ekspresji receptorów estrogenowych w jądrach komórek nabłonka gruczołowego (11). Biorąc pod uwagę rozwój *endometrosis* – chorobę związaną z podwyższoną stymulacją estrogenową – udział eozynofiliów może także być wyrazem działania tych hormonów.

Wyniki ostatnio opublikowanych badań wskazują, że (6) uwolnione z komórki ziarnistości eozynofiliów stanowią organelle posiadające receptory dla cytokin i innych mediatorów zapalenia. W związku z tym obecne w danej tkance eozynofile biorą aktywny udział w modulacji procesów zapalnych i immunologicznych. W badanych wycinkach macicy klaczy, we wszystkich fazach rozwoju *endometrosis* występowały eozynofile. Może to sugerować, że komórki te biorą także aktywny udział w rozwoju charakterystycznych dla *endometrosis* zmian chorobowych w macicy klaczy.

Drugim typem komórek, których rola w rozwoju *endometrosis* jest mało znana, są komórki tuczne. W ostatnim okresie ukazały się prace, w których wykazano udział tych komórek w przewlekłych procesach chorobowych cechujących się procesem włóknienia chorej tkanki, na przykład w stwardnieniu rozsianym. Wykazano, że w chorej tkance pobudzone komórki tuczne wydzielają liczne mediatory, jednak bez udziału procesu ich degranulacji (10). Komórki tuczne, podobnie jak eozynofile, limfocyty i makrofagi, posiadają swoiste receptory dla estrogenów. Stwierdzony w niniejszej pracy słaby wzrost liczby względnej komórek tucznych obecnych w zrębie *endometrium* był skorelowany z narastaniem zmian patologicznych o charakterze *endometrosis* (kategorie wg Kenneya). Może to wskazywać, że komórki te mają swój udział w stymulacji procesu włóknienia zrębu *endometrium*. Przypuszczalnie zmiany patologiczne zachodzące w zrębie *endometrium* warunkują rozwój innego typu zmian patologicznych w błonie śluzowej macicy obserwowanych w *endometrosis*. Na pierwszy plan wysuwają się zaburzenia w homeostazie komórek gruczołów wynikające z zaburzeń w regulacji hormonalnej, ale nie można wykluczyć także, że są efektem zaburzeń w otaczającym je mikrośrodowisku, czyli w zrębie błony śluzowej.

Podsumowując uzyskane wyniki badań można stwierdzić, że obecność w zrębie błony śluzowej macicy naciek eozynofilowy, limfocytów oraz proliferacja komórek tucznych są bezpośrednio związane z rozwojem zmian patologicznych charakterystycznych dla *endometrosis*. Dynamika zmian zachodzących w proporcjach i liczbie eozynofiliów, limfocytów i komórek tucznych może wskazywać na aktualną fazę rozwoju procesu chorobowego. Na podstawie wykonanych obserwacji można sugerować, że pierwotne zjawiska patologiczne prowadzące do rozwoju *endometrosis* mają miejsce w zrębie *endometrium* i są inicjowane zaburzeniami w stymulacji hormonalnej wyrażonymi

między innymi aktywacją komórek biorących udział w procesie zapalnym. Można podejrzewać, że ostre zapalenie eozynofilowe błony śluzowej macicy jest wyrazem tych zaburzeń. W celu potwierdzenia hipotezy, że zapalenie eozynofilowe błony śluzowej macicy stanowi wyraz pierwotnych zaburzeń chorobowych inicjujących proces rozwoju *endometrosis*, wskazane jest wykonanie dalszych badań na modelu eksperymentalnym.

Przedstawione wyniki badań *endometrium* stanowią oryginalny przyczynek do poznania patogenezy *endometrosis* macicy kłaczy.

Piśmiennictwo

1. *Beeson P. B.*: The eosinophil, [w:] Smith L. H. (ed.): Major Problems in Internal Medicine. Saunders W. B. Co. Philadelphia 1977, s. 46-49 i 154-157.
2. *Dietz O., Huskamp B.*: Praktyka kliniczna: Konie. Galaktyka, Łódź 2008.
3. *Eidukaite A., Tamosiunas V.*: Activity of eosinophils and immunoglobulin concentration in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Clin. Chem. Lab. Med. 2004, 42, 590-594.
4. *Katkiewicz M., Wierchoń., Boryczko Z.*: Adenomyosis macicy krów – ukryta przyczyna niepłodności? Medycyna Wet. 2005, 61, 1378-1381.
5. *Katkiewicz M., Witkowski M., Zajac S.*: Biopsja błony śluzowej macicy kłaczy – obraz struktury prawidłowej i chorobowej. Medycyna Wet. 2007, 63, 463-466.
6. *Neves J. S., Perez S. A. C., Spencer L. A., Melo R. C. N., Reynolds L., Ghiran I., Mahmudi-Azer S., Odemuyiwa S. O., Dworak W. S. P. M., Moqbel R., Weller P. F.*: Eosinophil granules function extracellularly as a receptor-mediated secretory organelles. PNAS on Line (Abstract), 2008, 105, 47, 18478-18483.
7. *Perez M. C., Furth E., Matzumura P. D., Lyttle C. R.*: Role of eosinophils in the uterine response to estrogen. Biol. Reprod. 1986, 54, 249-254.
8. *Ramos J. G., Varayoud J., Kass L., Rodrigues H., Munoz de Toro M., Montes G. S., Luque E.*: Estrogen and progesterone modulation of eosinophilic infiltration of the rat uterine cervix. Steroids 2000, 7, 404-414.
9. *Slusher S. H., Freeman K. P., Roszel J. F.*: Eosinophils in equine uterine cytology and histology specimens. JAVMA 1984, 184, 665-670.
10. *Theoharis C. Theoharides, Cochrane D. E.*: Critical role of mast cells in inflammatory disease and the effect of acute stress. J. Neuroimmunol. 2004, 146, 1-12.
11. *Zajac S., Katkiewicz M., Witkowski M., Boryczko Z., Pawlak M.*: Endometrosis u kłaczy. Medycyna Wet. 2008, 64, 257-261.

Adres autora: prof. dr Maria Katkiewicz, Katedra Nauk Klinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa