Lek. wet. Blanka Bukowska

Streszczenie pracy doktorskiej

„Endometrialna ekspresja cyklooksygenazy 2 oraz syntazy prostaglandyny F2α i prostaglandyny E u suk w różnych fazach cyklu płciowego oraz z podklinicznym *endometritis* i w różnym wieku”

Schorzenia macicy u suk są ważnym problemem zdrowotnym i rozrodczym, których etiopatogeneza, mimo wielu publikacji, nie jest jeszcze wyjaśniona. Dotyczy to zwłaszcza procesów patologicznych błony śluzowej przebiegających podklinicznie. Problematyka ta była dotychczas zbadana bardzo fragmentarycznie i wiele zależności takich jak wpływ poszczególnych faz cyklu płciowego i wieku suk na te procesy są nie do końca poznane.

Celem niniejszej rozprawy była kompleksowa ocena stanu *endometrium* w różnych fazach cyklu płciowego oraz u zwierząt w dwóch grupach wiekowych – powyżej i poniżej 5 lat. Ponadto ocenę taką przeprowadzano u zwierząt z histopatologicznie zdiagnozowanym subklinicznym *endometritis*.

Do badań użyto 48 zdrowych klinicznie suk będących w różnych fazach cyklu płciowego, wolnych od patologii macicy diagnozowanych ultrasonograficznie i makroskopowo. We wstępnym etapie badań, metodami klinicznymi (waginoskopia), cytologicznymi oraz poprzez określenie poziomu progesteronu diagnozowano fazę cyklu płciowego. Następnie zwierzęta przydzielano do 3 podstawowych grup badawczych, zgodnie ze stwierdzonymi u nich fazami cyklu: grupa I (n=16) – *anestrus*, grupa II (n=16) – *proestrus* + *estrus* i grupa III (n=16) – *metestrus*. Kolejno wszystkie zwierzęta poddawano *owariohysterektomii* (OVH) w celu uzyskania możliwości pobrania próbek tkanek *endometrium* do badań histopatologicznych, bakteriologicznych, cytologicznych (cytobrush) oraz biologii molekularnej. W ramach tych ostatnich ekspresję mRNA COX-2 (PTGS2), PGFS (PTGFS) i PGES (PTGES) określano metodą real-time PCR oraz immunolokalizację ich produktów białkowych w strukturach *endometrium* metodą IHC. W badaniach molekularnych uwzględniono enzymy uczestniczące w metabolizmie prostaglandyn ze względu na ich kluczową rolę w procesach zapalnych. Badania histopatologiczne, bakteriologiczne oraz cytologiczne wykonano klasycznymi metodami. Na podstawie badań histopatologicznych przeprowadzonych u suk wszystkich grup utworzono dodatkowe grupy zwierząt z podklinicznym *endometritis* (n=21) oraz z normalnym *endometrium* (n=21), porównując w nich

ekspresję ww. enzymów metabolizmu prostaglandyn. Podobnie całą populację zwierząt podzielono na 2 grupy wiekowe <5 lat (n=38) i ≥ 5 lat (n=10), dokonując takiego samego porównania.

Wszystkie wyniki uzyskane na podstawie tak przeprowadzonych badań analizowano statystycznie. Istotność różnic ekspresji wybranych genów w podziale na grupy doświadczalne została określona przy pomocy testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa. W celu określenia różnic między grupami *anestrus, proestrus/estrus* oraz *metestrus* zastosowano test post-hoc Mann-Whitney U. Istotność ekspresji genów w grupach *endometritis* lub z normalnym *endometrium* (END vs. NE) określano na podstawie analizy wariancji oraz przy pomocy testu Turkeya-Kramera i testu Duncana. Istotność ekspresji genów w grupach wiekowych (suki młodsze <5 vs. suki starsze ≥5) wyliczano testem istotności dla dwóch średnich (próby niezależne).

Badaniem histopatologicznym określono liczbę i odsetek suk dotkniętych podklinicznym *endometritis,* CEH oraz ze zdrowym e*ndometrium* w poszczególnych grupach badawczych, biorąc pod uwagę fazę cyklu płciowego oraz wiek badanych suk (suki młodsze <5 vs. suki starsze ≥5). Zwierzęta z różnymi typami *endometritis* potraktowano jako jedną grupę.

Wyniki badań cytologicznych wyliczano jako średnie ± SEM odsetków PMNs w poszczególnych grupach uwzględniając grupy poszczególnych faz cyklu płciowego, obecność histopatologicznego *endometritis* a także wiek badanych zwierząt (suki młodsze <5 vs. suki starsze ≥5).

Zarówno w badaniu histopatologicznym, jak i badaniu cytologicznym wartości analizowano statystycznie przy użyciu testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa. Obliczano także stopień korelacji między wynikami badań histopatologicznych i cytologicznych stosując test Cohena kappa.

Badania molekularne w grupach poszczególnych fazach cyklu, wykazały w nich różną ekspresję badanych czynników. Generalnie, w poszczególnych grupach badawczych nie obserwowano wzmożonej ekspresji mRNA PGFS, brak było także różnic statystycznie istotnych między grupami (w grupach badawczych I, II, III P=0.4, w grupach wiekowych P=0.943, oraz w porównaniu grup END vs. NE P=0.267). Wyjątek stanowiła jedynie grupa *anestrus*, w której obserwowano tendencję wzrostową PGFS. Różnice statystycznie istotne obserwowano natomiast w odniesieniu do ekspresji mRNA COX-2 i PGES. Ekspresja tych czynników była statystycznie istotnie wyższa zwłaszcza w grupie *anestrus* (dla COX-2 P=0.01; dla PGES P=0.017). Ponadto, wzmożoną w porównaniu do zwierząt z normalnym *endometrium*

statystycznie istotną ekspresję obu tych czynników stwierdzono u suk z *endometrtis* (dla COX-2 P=0.001; PGES P=0.002). Natomiast różnicy takiej nie obserwowano w grupach suk uwzględniających wiek zwierząt (dla COX-2 P=0.437; dla PGES P=0.718). Interpretacja tej części badań jest trudna, jednakże wydaje się, że ekspresję mRNA COX-2 i PGES u suk z *endometritis* można wiązać z lekkimi stanami zapalnymi, chociaż reakcja ta jest nietypowa, bowiem brak było wzmożonej ekspresji PGFS, opisywanej dotychczas u suk w przypadkach *pyometry*. Natomiast wzmożoną sekrecję obu tych czynników w *anestrus* może być pochodną procesów regeneracyjnych błony śluzowej macicy, które mają miejsce w tej fazie cyklu. Niska ekspresja PGFS i brak różnic między grupami badawczymi sugeruje natomiast, że u suk ten szlak metaboliczny prostaglandyn jest w *endometrium* suk mało aktywny. Jest to zbieżne ze znanym wcześniej faktem, że macica suk w cyklu nie produkuje luteolitycznej PGF2α.

Badania immunohistochemiczne wykazały, że głównym miejscem lokalizacji produktów czynników badanych met. real-time PCR był nabłonek wyścielający oraz gruczołowy *endometrium*, a także naczynia krwionośne. Intensywność reakcji barwnych była w dużym stopniu zbieżna z opisanymi powyżej okresami i grupami zwierząt z ekspresją mRNA.

Badania histopatologiczne wykazały, że u wielu suk, mimo braku zmian klinicznych i makroskopowych, błona śluzowa macicy ulega procesom patologicznym. Dominującą formą jest podkliniczne *endometritis* występujące jako histologiczne stany ostre i chroniczne. Patologię tę w zależności od fazy cyklu płciowego, stwierdzono u 33%-60% suk, przy czym jednak nie obserwowano statystycznie istotnej zależności od fazy cyklu (P>0.05). Inną obserwowaną patologią było CEH, jednakże nasilenie jego występowania było dużo niższe (6-25%). Obserwowano natomiast silny wpływ wieku badanych suk na częstotliwość występowania tych patologii. U suk w wieku poniżej 5 lat było ich (39%), dużo mniej niż u suk starszych. W grupie tej nie było w ogóle zwierząt ze zdrowym *endometrium*.

Badania cytologiczne, określające odsetek PMNs w wymazach endometrialnych dowiodły, że u suk w poszczególnych fazach cyklu ich obecność w błonie śluzowej jest generalnie niska, bo <2%. Nie wykazano także wpływu fazy cyklu płciowego oraz wieku suk na średnią odsetka PMNs (w podstawowych grupach wiekowych I, II, III P=0.056; w grupach wiekowych P=0.97). Fakt ten utrudnia znacznie praktyczną diagnostykę cytologiczną u tego gatunku. Natomiast statystycznie istotny wyższy odsetek PMNs znaleziono u grupy suk z *endometritis* w porównaniu do zwierząt bez tego schorzenia (2.05 % vs. 0.96%), jednakże generalnie korelacja między wynikami badań histopatologicznych (metoda referencyjna) i cytologicznych była niska (P=0.511). Wyniki te są trudne do interpretacji, jednakże wydaje się,

że w chwili obecnej nie stanowią one jeszcze podstawy do rekomendacji cytologii jako metody praktycznej do diagnozowania *endometritis* u suk.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

a. ekspresja mRNA COX-2 i PGES w *endometrium* suk w cyklu płciowym ma głównie miejsce w okresie *anestrus*, a także u zwierząt z podklinicznym *endometritis*. Natomiast zjawiska tego nie obserwowano w pozostałych fazach cyklu oraz u suk w różnych grupach wiekowych.
b. nabłonek wyścielający światło macicy oraz gruczołowy, a także naczynia krwionośne, były głównymi miejscami lokalizacji białkowych produktów mRNA *COX-2, PGFS* i *PGES*.
c. wydaje się, że w *endometrium* suk w fizjologicznych cyklach oraz z klinicznie, zdrową macicą ma głównie miejsce ekspresja szlaku metabolicznego PGE, natomiast ekspresja PGF2α jest mniej aktywna.
d. u suk klinicznie zdrowych oraz z makroskopowo prawidłowym *endometrium* będących w fizjologicznym cyklu występuje duży odsetek uteropatii, z dominującą obecnością histopatologicznego *endometritis* (35%-60%) i dużo mniejszą częstotliwością CEH (6%-25%). Wraz z wiekiem odsetek suk dotkniętych tymi schorzeniami wzrastał, natomiast faza cyklu płciowego nie miała wpływu na to zjawisko.
e. cytologiczna ocena *endometrium* metodą cytobrush nie pozwala na precyzyjne określenie jego stanu. Nie wykazano wysokiego stopnia korelacji między wynikami histopatologicznymi a odsetkiem PMNs w wymazach cytologicznych *endometrium* mimo, iż obserwowano statystycznie istotną różnicę między odsetkiem PMNs u suk z *endometritis* oraz ze zdrowym *endometrium*.