

Rola mediatorów stanu zapalnego w rozwoju endometrosis u klaczy

ANNA SZÓSTEK-MIODUCHOWSKA, ANNA WÓJTOWICZ,
AGNIESZKA SADOWSKA, DARIUSZ SKARŻYŃSKI

Zakład Immunologii i Patologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie,
ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Otrzymano 30.06.2022

Zaakceptowano 26.09.2022

Szóstek-Mioduchowska A., Wójtowicz A., Sadowska A., Skarżyński D.

Role of inflammatory mediators in the development of endometrosis in mare

Summary

Equine endometrosis is a chronic degenerative condition with progressive fibrosis that forms in the endometrial stroma and around the endometrial glands. Equine endometrosis causes histological changes and alterations in the secretory function of endometrial cells. These alterations lead to changes in the endometrium and early pregnancy dysfunction. Thus, this condition is one of the main causes of subfertility in mares, resulting in enormous economic losses to the horse-breeding industry. In general, fibrosis is characterized by excessive deposition of extracellular matrix (ECM) components. It destroys normal tissue architecture and compromises tissue function. The cellular and molecular events associated with the development of tissue fibrosis are complex and poorly understood. In recent years, research has been carried out on the involvement of immune cells and their products in the pathogenesis of endometrosis in mares. These studies focused mainly on the role of cytokines, such as transforming growth factor (TGF)- β 1, interleukin (IL) 6, IL-1 β , prostaglandin (PG), and components of neutrophil extracellular traps (NET), such as myeloperoxidase, cathepsin G, and elastase, in the most important processes associated with the development of endometrosis. The results showed that TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, and PGs act on myofibroblast differentiation, fibroblast proliferation, deposition of ECM protein, and expression of matrix metalloproteinases (MMPs), and their inhibitors. It suggests their involvement in processes associated with pathological endometrial remodeling. Moreover, the response of endometrial tissue to selected factors changes according to the stage of endometrosis. The action of inflammatory mediators on processes related to the development of fibrosis shows a connection between inflammation and endometrosis.

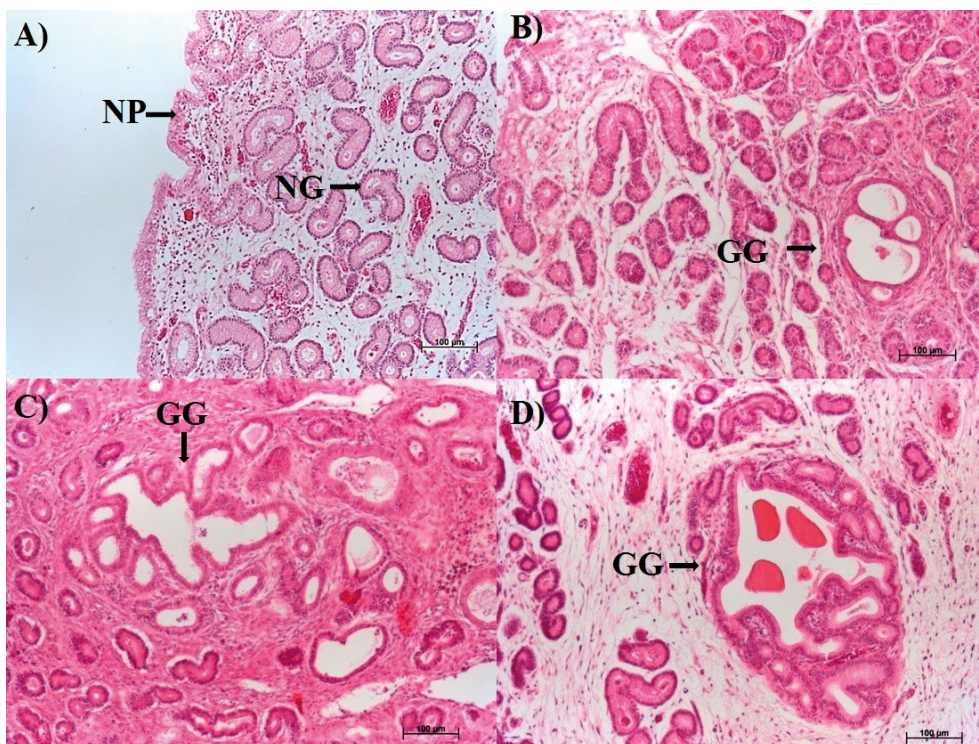
Keywords: endometrosis, mare, inflammatory mediators, fibrosis

Endometrosis

Choroby macicy znacząco wpływają na obniżenie płodności u klaczy, czego konsekwencją są duże straty ekonomiczne. Endometrosis charakteryzuje się włóknieniem zrębu błony śluzowej macicy wraz z obszarami wokół gruczołów macicznych (19, 29, 30). W przebiegu endometrosis dochodzi do zaburzeń różnicowania i proliferacji nabłonka gruczołowego prowadzących do powstawania tzw. gniazd gruczołowych, tworzenia się torbieli gruczołowych i limfatycznych, ubytków w nabłonku powierzchniowym oraz nacieku komórek układu odpornościowego, takich jak neutrofile, limfocyty T i B (19, 29, 30). Ponadto dochodzi do zaburzeń w czynnościach wydzielniczych komórek błony śluzowej macicy. Wyniki badań wskazują na zmiany w ekspresji białek, glikopeptydów, cytokin, receptorów steroidów jajnikowych oraz syntaz prostaglandyn (PG) w błonie śluzowej macicy u klaczy

z endometrosis, czego wynikiem są zaburzenia w funkcji błony śluzowej macicy i przebiegu wczesnej ciąży (9, 14, 25, 26, 34, 48, 49).

Diagnostyka występowania endometrosis u klaczy jest możliwa jedynie na podstawie oceny histologicznej błony śluzowej macicy. Stopień zaawansowania endometrosis ocenia się poprzez określenie stopnia nasilenia włóknienia około gruczołowego i zmian zapalnych wg systemu opracowanego przez Kenney i Doig (29). W zależności od stopnia nasilenia włóknienia błona śluzowa macicy może być sklasyfikowana jako kategoria I (prawidłowe *endometrium*, brak włóknienia), kategoria IIA (łagodne włóknienie), kategoria IIB (umiarkowane włóknienie) i kategoria III (zaawansowane włóknienie) (29) (ryc. 1). Wraz z rozwojem włóknienia obniża się płodność u klaczy. W kategorii I, IIA, IIB i III szanse na poczęcie zakończone porodem wynoszą, odpowiednio, około 80-90%, 50-80%,



Ryc. 1. Błona śluzowa macicy klaczy wg klasyfikacji Kenney i Doig (30): (A) kategoria I, (B) kategoria IIA, (C) kategoria IIB, (D) kategoria III

Objaśnienia: barwienie hematoksylina i eozyna. NP – nabłonek powierzchniowy, NG – nabłonek gruczołowy, GG – gniazdo gruczołowe

10-50% i 10%, co wskazuje skalę strat hodowlanych związanych z endometrosis (29), jednakże szacowanie potencjału rozrodczego klaczy nie może być oparte jedynie na mikroskopowej ocenie *endometrium*. Należy również uwzględnić: wiek klaczy, kondycję, ukształtowanie krocza, wyniki badania palpacyjnego i ultrasonograficznego macicy oraz nieprawidłowości w zakresie anatomii i funkcji szyjki macicy. Istotną rolę w szacowaniu potencjału rozrodczego klaczy mają wyniki cytologicznego i mikrobiologicznego badania *endometrium*.

Etiologia i patogenеза endometrosis pozostają niejasne. Do czynników wpływających na jej występowanie i rozwój należą wiek klaczy (15), powtarzające się stany zapalne (43), liczba przeżytych ciąży i porodów (54, 55) oraz problemy endokrynologiczne (45). Mimo że przez niemal cztery dekady zaproponowano szereg metod leczenia włóknienia błony śluzowej macicy klaczy, nadal brakuje skutecznej terapii. Łyżeczkowanie błony śluzowej macicy zmniejsza stopień zaawansowania endometrosis u 80% klaczy, u 60% zwiększa częstość występowania ciąży, jednakże rokowania są gorsze u starszych klaczy (44). Ze względu na właściwości lecznicze zaproponowano wykorzystanie dimetylosulfotlenku (DMSO) oraz kerozyny w leczeniu endometrosis (10, 35). Domaciczne podanie 10-30% roztworu DMSO zmniejszało ostry naciek zapalny i włóknienie okołogruzołowe u 30% klaczy, jednakże nie poprawiło wskaźników ciąży w porównaniu z grupą kontrolną (35). Z kolei płukanie macicy 250-500 ml kerozyny powodowało utrzymujący się 1-2 dni obrzęk

macicy, a następnie usuwanie zatrzymanych wydzielin, poprawiając wskaźniki płodności (10). Zastosowanie tej terapii przynosiło krótkotrwały efekt, gdyż połowa klaczy, które zaszły w ciążę po leczeniu kerozyną, roniła (2). Najnowsze wyniki badań wskazują, iż komórki macierzyste, dzięki swoim zdolnościom immunomodulującym mogą stanowić obiecującą metodę leczenia endometrosis (17, 37). Podanie do macicy komórek macierzystych moduluje profil ekspresji czynników biorących udział we włóknieniu oraz zwiększa proliferację komórek nabłonka gruczołowego (37).

Proces włóknienia tkanek

Włóknienie tkanek jest wynikiem przewlekłej reakcji zapalnej wywołanej szeregiem czynników, takich jak: powtarzające się infekcje, reakcje autoimmunologiczne i alergiczne, promieniowanie, substancje chemiczne lub bodźce mechaniczne (57). Czynniki te zapoczątkowują kaskadę procesów naprawczych w uszkodzonych tkankach w celu przywrócenia ich integralności. Proces naprawczy obejmuje fazę regeneracyjną, podczas której uszkodzone komórki są zastępowane komórkami tego samego typu, co nie pozostawia śladów uszkodzenia oraz rozrost tkanki łącznej włóknistej (fibroplazja) (57). Proces ten początkowo jest korzystny, jednak staje się patologiczny, gdy nie jest odpowiednio kontrolowany, co skutkuje znacznym odkładaniem się składników macierzy pozakomórkowej, a w konsekwencji prowadzi do zaburzeń prawidłowej struktury tkanki i upośledzenia jej funkcji (16). Do miejsca działania czynnika napływają komórki układu odpornościowego, takie jak granulocyty, makrofagi, limfocyty B i T oraz komórki tuczne. Komórki te są odpowiedzialne za produkcję i uwalnianie prozapalnych oraz przeciwzapalnych cytokin m.in. czynnika martwicy nowotworu- α (tumor necrosis factor α , TNF α) oraz transformującego czynnika wzrostu- β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1), które modułują odpowiedź zapalną, jak również wywierają wpływ na procesy związane z rozwojem włóknienia, takie jak aktywacja miofibroblastów, proliferacja i migracja fibroblastów, a także regulacja ekspresji i aktywacja metaloproteinaz macierzy (matrix metalloproteinases, MMP) (8, 57, 59). Metaloproteinazy macierzy to enzymy odpowiedzialne za przebudowę istniejącej macierzy pozakomórkowej, a ich tkankowe inhibitory (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP) odpo-

wiadają za regulację ich działania. Równowaga między ekspresją, aktywacją i hamowaniem metaloproteinaz ma kluczowe znaczenie w utrzymaniu homeostazy tkankowej. Metaloproteiny macierzy rozkładają wszystkie rodzaje białek ECM, ale aktywują również wiele czynników, takich jak cytokiny. Wykazano, że ekspresja MMP i TIMP w błonie śluzowej macicy kłaczy zmienia się w zależności od stadium zaawansowania endometrosis i fazy cyklu rujowego (53).

Postępujące odkładanie składników ECM zwiększa sztywność tkanki (46), zakłóca dyfuzję składników odżywczych i tlenu, powodując uszkodzenia komórek i aktywację miofibroblastów (36). Miofibroblasty, produkujące znaczne ilości kolagenu, należą do najważniejszych komórek regulujących proces włóknienia tkanek (24). Mogą one powstać z różnych typów komórek, głównie z fibroblastów, komórek nabłonka i śródbłonka w procesach określanych jako różnicowanie lub przemiana nabłonkowo/śródbłonkowo-mezenchymalna. Miofibroblasty charakteryzują się ekspresją *de novo* α -aktyny mięśni gładkich (α -smooth muscle actin, α -SMA), kurczliwością i opornością na apoptozę. Podczas prawidłowo przebiegających procesów naprawy tkanek miofibroblasty odgrywają ważną fizjologicznie rolę, przyczyniając się do przebudowy tkanki i przywrócenia jej integralności, jednakże ich nadmierne nagromadzenie i aktywacja powodują intensywną i niekontrolowaną produkcję ECM, co prowadzi do rozwoju i nasilenia procesu włóknienia (40). Obecność miofibroblastów w błonie śluzowej macicy u kłaczy z endometrosis ogranicza się głównie do obszarów okołogruzołowych (26, 37, 52). Na wczesnych etapach włóknienia pojedyncze miofibroblasty gromadzą się wokół nabłonka gruczołowego, co sugeruje ich rolę w patogenezie włóknienia (56). Wykazano również, że istnieje pozytywna zależność pomiędzy obecnością miofibroblastów w błonie śluzowej macicy kłaczy a stopniem zaawansowania włóknienia (52).

Występowanie stanów zapalnych macicy (*endometritis*) i endometrosis wydaje się ściśle ze sobą powiązane, jednakże molekularne mechanizmy leżące u podstaw rozwoju włóknienia jako konsekwencji stanów zapalnych nie zostały wystarczająco poznane (28). Celem niniejszego opracowania jest przybliżenie aktualnych poglądów na temat rozwoju endometrosis u kłaczy, w kontekście roli mediatorów zapalnych, i omówienie zagadnień leżących u podłoża zmian prowadzących do rozwoju włóknienia, a przez to do zaburzeń funkcji błony śluzowej macicy.

Rola mediatorów stanu zapalnego w rozwoju endometrosis

Włóknienie tkanek należy rozpatrywać jako konsekwencję działania wielu czynników i nakładających się procesów. Wyniki badań nad procesami związanymi z patogenezą włóknienia w różnych tkankach wykazują, że cytokiny uwalniane przez komórki układu

odpornościowego oraz inne czynniki o właściwościach zapalnych regulują proces włóknienia pośrednio poprzez przyciąganie komórek układu odpornościowego do miejsca zapalenia lub bezpośrednio oddziałując na sąsiadujące komórki. Regulacja odkładania białek ECM jest kluczowym procesem w wielu stanach fizjologicznych i patologicznych. Obejmuje ona aktywność mediatorów działających autokrynnie i parakrynnie, a także interakcje komórek z otaczającą macierzą pozakomórkową. Ściśle regulowana równowaga pomiędzy procesami syntezy i rozkładu białek ECM gwarantuje szybką i adaptacyjną odpowiedź komórkową w reakcji na zmiany biologiczne zachodzące w środowisku. Zaburzenia tej równowagi prowadzą do upośledzenia procesu naprawy tkanki, a następnie do rozwoju włóknienia.

Pełne zrozumienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw procesów inicjujących włóknienie błony śluzowej macicy stanowi istotny krok w opracowaniu skutecznej metody leczenia endometrosis. Badania własne pozwoliły poznać niektóre aspekty tego procesu, a pozostałe jeszcze niewiadome składają się do ich kontynuacji (50-54). W badaniach tych kluczowe jest poznanie wpływu mediatorów stanu zapalnego na różnicowanie miofibroblastów, proliferację fibroblastów oraz ekspresję białek ECM, oraz MMP i TIMP w komórkach błony śluzowej macicy kłaczy. Do tej pory działanie mediatorów stanu zapalnego, takich jak: TGF- β 1, interleukina 6 (IL-6) i IL-1 β , a także pochodnych kwasu arachidonowego: prostaglandyny E₂ (PGE₂) oraz F_{2 α} w patogenezie endometrosis nie było poznane.

Transformujący czynnik wzrostu- β 1 uważany jest za jeden z najsilniejszych czynników profibrotycznych (38). Prowadzone wcześniej badania wskazują, iż aktywność TGF- β 1 w błonie śluzowej macicy zwiększa się wraz z zaawansowaniem endometrosis u kłaczy (20). Cytokina ta indukuje różnicowanie miofibroblastów i proliferację fibroblastów oraz zwiększa ekspresję kolagenu typu I (COL1) i III (COL3) oraz fibronektyny (FN) w fibroblastach pochodzących z błony śluzowej macicy kłaczy hodowanych w warunkach *in vitro*, co sugeruje jej ważną rolę w procesie włóknienia (52). Wykazano również wpływ TGF- β 1 na ekspresję i aktywność MMP oraz TIMP zarówno w fibroblastach, jak i komórkach nabłonkowych błony śluzowej macicy kłaczy (53). Transformujący czynnik wzrostu- β 1 zwiększa uwalnianie MMP-1, -9, -13 i TIMP-1 z fibroblastów oraz komórek nabłonka w warunkach *in vitro*. Co więcej, zwiększa również aktywność żelatynolityczną pro-MMP-9 i zmniejsza uwalnianie MMP-3 przez fibroblasty, a także TIMP-2 przez komórki nabłonka w warunkach *in vitro*. Wyniki badań własnych wskazują, iż TGF- β 1 zwiększa różnicowanie miofibroblastów z fibroblastów oraz proliferację fibroblastów (52).

Kolejnymi czynnikami uwalnianymi przez makrofagi o istotnym znaczeniu w procesie włóknienia są IL-6

i IL-1 β . Interleukina 6 przyczynia się do chorób włóknieniowych tkanek i narządów, takich jak otrzewna lub serce (13, 18, 32). Z kolei IL-1 β jest jednym z ważnych czynników towarzyszących rozwojowi włóknienia wątroby (21), serca (12) czy płuc (22). Interleukina 6 zwiększa proliferację fibroblastów pochodzących z błony śluzowej macicy kłaczy w warunkach *in vitro* (47). Badania własne wykazały, że ekspresja IL-6 i IL-1 β oraz ich wpływ na ekspresję markerów charakterystycznych dla włóknienia w błonie śluzowej macicy różni się w zależności od stopnia zaawansowania włóknienia (48, 50). Wyniki badań uzyskane z hodowli tkankowych eksplantów błony śluzowej macicy kłaczy dowodzą, iż IL-6 jest silniejszym stymulatorem produkcji białek ECM w porównaniu do IL-1 β (50). Interleukina 6 zwiększa uwalnianie COL1, COL3 oraz FN zarówno w inkubowanych eksplantach pobranych z prawidłowej błony śluzowej macicy (kategoria I), jak i w błonie śluzowej macicy w przebiegu włóknienia, szczególnie w najbardziej zaawansowanym stadium. Interleukina 1 β zwiększa natomiast uwalnianie COL1 w inkubowanych eksplantach pobranych z prawidłowej błony śluzowej macicy (kategoria I) oraz najbardziej zaawansowanego stadium włóknienia (kategoria III). Ponadto IL-6 oraz IL-1 β wpływają na uwalnianie MMP i TIMP oraz ich ekspresję na poziomie genu. Interleukina 6 zwiększa uwalnianie MMP-2 i MMP-3 oraz zmniejsza uwalnianie MMP-9 w inkubowanych eksplantach pobranych z prawidłowej błony śluzowej macicy (kategoria I), a także zwiększa uwalnianie MMP-1, -2, -3, -9, -13 oraz TIMP-1 i -2 w najbardziej zaawansowanym stadium włóknienia (kategoria III). Natomiast IL-1 β zwiększa uwalnianie MMP-2, TIMP-1 i -2 w inkubowanych eksplantach pochodzących z prawidłowej błony śluzowej macicy (kategoria I) oraz zwiększa uwalnianie MMP-1, -9 i TIMP-2 w najbardziej zaawansowanym stadium włóknienia (kategoria III). Zmiany odpowiedzi tkanki na IL-6 oraz IL-1 β w zależności od stopnia zaawansowania wskazują na dużą dynamikę procesów, jakie zachodzą podczas włóknienia (50).

Kolejnymi interesującymi mediatorami stanu zapalnego, zwłaszcza w kontekście układu rozrodczego, wydają się PG. Stężenie PG oraz ekspresja genów syntazy prostaglandynowych w błonie śluzowej macicy kłaczy zmienia się w poszczególnych etapach włóknienia (49). Wyniki badań niezależnych grup badawczych wykazały, że PGE₂ hamuje fibrogenezę i działa jako czynnik przeciwwłóknieniowy w skórze i płucach u człowieka i gryzoni (31, 33, 61). W przeciwieństwie do PGE₂ wykazano, że PGF_{2 α} jest czynnikiem profibrotycznym i można ją powiązać z włóknieniem, m.in. płuc i skóry u ludzi i gryzoni (1, 27, 39). Prostaglandyna F_{2 α} zwiększa w sposób zależny od dawki i czasu działania produkcję COL1 poprzez wpływ na ekspresję genu *Colla1* w fibroblastach pochodzących z błony śluzowej macicy kłaczy hodowanych w warunkach *in vitro*

(51). Ponadto PGF_{2 α} zwiększa uwalnianie MMP-2, -13 i zmniejsza uwalnianie MMP-1 z fibroblastów. Z kolei w komórkach tych PGE₂ zwiększa uwalnianie MMP-2, -9 i zmniejsza uwalnianie MMP-13. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują więc, że PG oprócz ważnej roli w rozrodzie, mogą wywierać wpływ na ekspresję białek ECM oraz enzymów, które odgrywają główną rolę w przebudowie tkanek (51).

W badaniach dotyczących roli mediatorów stanu zapalnego w rozwoju endometrosis szczególną uwagę należy poświęcić neutrofilom. Komórki te są jednymi z pierwszych komórek układu odpornościowego, które pojawiają się w miejscu infekcji. Neutrofile do walki z patogenami, oprócz fagocytozy, wykorzystują neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe (neutrophil extra cellular traps, NET). Sieci te, złożone głównie z chromatyny i proteaz serynowych uwalnianych z ziarnistości neutrofilu, wiążą drobnoustroje (11). Prowadzone bardzo intensywnie w ostatnich latach badania *in vitro* wskazują, iż enzymy, które znajdują się wewnątrz ziarnistości neutrofilu, tj. mieloperoksydaza, elastaza oraz katepsyna G, wpływają na ekspresję białek ECM, MMP oraz TIMP w błonie śluzowej macicy kłaczy (5-7, 42). Najnowsze wyniki badań wykazały, że enzymy te mogą stymulować uwalnianie PGF_{2 α} z błony śluzowej macicy, która uznawana jest za czynnik profibrotyczny (41). Zahamowanie działania mieloperoksydazy, elastazy oraz katepsyny G może więc stać się obiecującym celem terapeutycznym, jednakże dalsze badania powinny być prowadzone w tym kierunku (5-7, 42).

Nowe obszary badań

Analiza bogatego i aktualnego piśmiennictwa, dotyczącego zarówno endometrosis u kłaczy, jak i włóknienia narządów u ludzi, sugeruje ważną rolę zmian epigenetycznych (3, 4), a także metabolizmu (23) w molekularnych mechanizmach leżących u podstaw włóknienia błony śluzowej macicy. U kłaczy wykazano, że wraz z zaawansowaniem endometrosis dochodzi do zaburzeń w korelacji ekspresji genów *COL* i metylotransferaz DNA (DNMT) (4), a także do hipermetylacji wysp CpG w obrębie genów *Mmp2* i *Mmp9* (3). Badania dotyczące roli komórek układu odpornościowego powinny być kontynuowane ze szczególnym naciskiem na rolę neutrofilu, makrofagów oraz limfocytów pomocniczych oraz na interakcje pomiędzy poszczególnymi cytokinami. Badania prowadzone u innych gatunków wskazują, iż makrofagi oraz limfocyty pomocnicze odgrywają ważną rolę w procesie włóknienia poprzez wpływ na różnicowanie miofibroblastów, rozkład i odkładanie składników ECM, apoptozę i proliferację fibroblastów oraz ekspresję MMP (58, 59).

Badania dotyczące roli mediatorów stanu zapalnego w patogenezie endometrosis u kłaczy poszerzają dotychczasową wiedzę na temat procesów zachodzących

podczas włóknienia tkanek i dowodzą związku między procesem zapalnym a powstawaniem włóknienia błony śluzowej macicy u kłaczy. W wyniku przewlekłych stanów zapalnych cytokiny uwalniane przez komórki układu odpornościowego, a także PG mogą wpływać na stan *endometrium* poprzez działanie na różnicowanie miofibroblastów, proliferację fibroblastów, ekspresję białek ECM oraz regulację ekspresji i aktywności MMP oraz TIMP. Co więcej, mając na uwadze liczne podobieństwa na poziomie komórkowym oraz molekularnym w procesach, które rozpoczynają oraz nasilają włóknienie w narządach i tkankach u różnych gatunków, badania nad rolą komórek układu odpornościowego w rozwoju włóknienia błony śluzowej macicy u kłaczy mogą w przyszłości przyczynić się do opracowania skutecznej terapii przeciwwłóknieniowej u zwierząt i ludzi.

Piśmiennictwo

- Aihara K., Handa T., Oga T., Watanabe K., Tanizawa K., Ikezoe K., Taguchi Y., Sato H., Chin K., Nagai S., Narumiya S., Wells A. U., Mishima M.: Clinical Relevance of Plasma Prostaglandin F_{2a} Metabolite Concentrations in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE* 2013; 8:e66017.
- Allen W. R.: Proceedings of the John P. Hughes international workshop on equine endometritis. *Equine Vet. J.* 1993, 25, 184-193.
- Alpoim-Moreira J., Fernandes C., Pimenta J., Bliedernicht M., Rebordão M. R., Castelo-Branco P., Szóstek-Mioduchowska A., Skarzynski D. J., Ferreira-Dias G.: Metalloproteinases 2 and 9 genes epigenetically modulate equine endometrial fibrosis. *Front. Vet. Sci.* 12 August 2022, doi: 10.3389/fvets.2022.97000.
- Alpoim-Moreira J., Fernandes C., Rebordão M. R., Amaral A., Pinto-Bravo P., Bliedernicht M., Skarzynski D. J., Ferreira-Dias G.: Collagens and DNA methyltransferases in mare endometrosis. *Reprod. Domest. Anim.* 2019, 54, 46-52.
- 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.: The Inhibition of Cathepsin G on Endometrial Explants With Endometrosis in the Mare. *Front Vet. Sci.* 2020, 7, 582211.
- Amaral A., Fernandes C., Rebordão M. R., Szóstek-Mioduchowska A., Lukasik K., Pinto-Bravo P., Telo da Gama L., Skarzynski D. J., Ferreira-Dias G.: Myeloperoxidase Inhibition Decreases the Expression of Collagen and Metalloproteinase in Mare Endometria under In Vitro Conditions. *Animals (Basel)* 2021, 11 (1), 208.
- Amaral A., Fernandes C., Szóstek-Mioduchowska A., Rebordão M. R., Skarzynski D. J., Ferreira-Dias G.: Noscapine Acts as a Protease Inhibitor of In Vitro Elastase-Induced Collagen Deposition in Equine Endometrium. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 5333.
- Atamas S. P.: Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci.* 2002, 72, 631-643.
- Aupperle H., Schoon D., Schoon H.-A.: Physiological and pathological expression of intermediate filaments in the equine endometrium. *Res. Vet. Sci.* 2004, 76, 249-255.
- Bracher V., Neuschaefer A., Allen W. R.: The effect of intrauterine infusion of kerosene on the endometrium of mares. *J. Reprod. Fert.* 1991, 706-707.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004, 303, 1532-1535.
- Bujak M., Dobaczewski M., Chatila K., Mendoza L. H., Li N., et al.: Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am. J. Pathol.* 2008, 173, 57-67.
- Cui W., Zhang H., Liu Z. L.: Interleukin-6 receptor blockade suppresses subretinal fibrosis in a mouse model. *Int. J. Ophthalmol.* 2014, 7, 194-197.
- Domino M., Jasinski T., Kautz E., Juszczuk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Zabielski R., Sady M., Gajewski Z.: Expression of genes involved in the NF- κ B-dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology* 2020, 147, 18-24.
- Ebert A., Schoon D., Schoon H.-A.: Age-related endometrial alterations in mares – biopsy findings of the last 20 years. *Leipziger Blaue Hefte*, 7th Leipzig Veterinary Congress, 8th International Conference on Equine Reproductive Medicine. Volume 2. Lehmanns Media GmbH, Berlin, Germany, 2014, s. 230-232.
- Eckes B., Zigrino P., Kessler D., Holtkötter O., Shephard P., Mauch C., Krieg T.: Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol.* 2000, 19, 325-332.
- Falomo M. E., Ferroni L., Tocco I., Gardin C., Zavan B.: Immunomodulatory Role of Adipose-Derived Stem Cells on Equine Endometriosis. *Biomed. Res. Int.* 2015, 2015, 141485.
- Fielding C. A., Jones G. W., McLoughlin R. M., McLeod L., Hammond V. J., Uceda J., Williams A. S., Lambie M., Foster T. L., Liao C. T., Rice C. M., Greenhill C. J., Colmont C. S., Hams E., Coles B., Kift-Morgan A., Newton Z., Craig K. J., Williams J. D., Williams G. T., Davies S. J., Humphreys I. R., O'Donnell V. B., Taylor P. R., Jenkins B. J., Topley N., Jones S. A.: Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity* 2014, 40, 40-50.
- Flores J. M., Rodriguez A., Sánchez J., Gómez-Cuétara C., Ramiro F.: Endometriosis in Mares: Incidence of Histopathological Alterations. *Reprod. Dom. Anim.* 1995, 30, 60-65.
- Ganjam V. K., Evans T. J.: Equine endometrial fibrosis correlates with 11 beta-HSD2, TGF-beta1 and ACE activities. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006, 248, 104-108.
- Gieling R. G., Wallace K., Han Y. P.: Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009, 296, G1324-31.
- Guo J., Gu N., Chen J., Shi T., Zhou Y., Rong Y., Zhou T., Yang W., Cui X., Chen W.: Neutralization of interleukin-1 beta attenuates silica-induced lung inflammation and fibrosis in C57BL/6 mice. *Arch. Toxicol.* 2013, 87, 1963-1973.
- Henderson J., O'Reilly S.: The emerging role of metabolism in fibrosis. *Trends Endocrinol. Metab.* 2021 Aug. 32 (8), 639-653, doi: 10.1016/j.tem.2021.05.003. Epub. 2021 May 20. PMID: 34024695.
- Hinz B., Phan S. H., Thannickal V. J., Galli A., Bochaton-Piallat M. L., Gabbiani G.: The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* 2007, 170, 1807-1816.
- Hoffmann C., Bazer F. W., Klug J., Aupperle H., Ellenberger C., Schoon H.-A.: Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology* 2009, 71, 264-274.
- Hoffmann C., Ellenberger C., Mattos R., Aupperle H., Dhein S., Stief B., Schoon H. A.: The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* 2009, 111, 261-278.
- Kanno Y., Kawashita E., Kokado A., Okada K., Ueshima S., Matsuo O., et al.: Alpha2-Antiplasmin Regulates the Development of dermal fibrosis in mice by Prostaglandin F_{2a} synthesis through adipose triglyceride Lipase/Calcium-independent phospholipase. *Arthritis Rheum.* 2013, 65, 492-502.
- Katila T., Ferreira-Dias G.: Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals (Basel)* 2022, 12 (6), 779.
- Kenney R. M.: Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978, 172, 241-262.
- Kenney R. M., Doig P. A.: Equine endometrial biopsy, [w:] Morrow D. A. (red.): *Current Therapy in Theriogenology* 2. Saunders W. B., Philadelphia 1986, 726-729.
- Kolodnick J. E., Peters-Golden M., Larios J., Toews G. B., Thannickal V. J., Moore B. B.: Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003, 29, 537-544.
- Kong X., Ma L., Ji Z., Dong Z., Zhang Z., Hou J., Zhang S., Ma L., Jiang L.: Pro-fibrotic effect of IL-6 via aortic adventitial fibroblasts indicates IL-6 as a treatment target in Takayasu arteritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2018, 36, 62-72.
- Lama V., Moore B. B., Christensen P., Toews G. B., Peters-Golden M.: Prostaglandin E2 synthesis and suppression of fibroblast proliferation by alveolar epithelial cells is cyclooxygenase-2-dependent. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002, 27, 752-758.
- Lehmann J., Ellenberger C., Hoffmann C., Bazer F. W., Klug J., Allen W. R.: Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology* 2011, 76, 1326-1336.
- Ley W. B., Bowen J. M., Sponenberg D. P., Lessard P. N.: Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology* 1989, 32, 263-276.
- Lokmic Z., Musyoka J., Hewitson T. D., Darby I. A.: Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2012, 296, 139-185.

37. Mambelli L. I., Mattos R. C., Winter G. H., Madeiro D. S., Morais B. P., Malschitzky E., Miglino M. A., Kerkis A., Kerkis I.: Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PLoS One*. 2014, 9, e97889.
38. Meng X. M., Nikolic-Paterson D. J., Lan H. Y.: TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2016, 12 (6), 325-338.
39. Oga T., Matsuoka T., Yao C., Nonomura K., Kitaoka S., Sakata D., et al.: Prostaglandin F2 α receptor signaling facilitates bleomycin induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor- β . *Nat. Med.* 2009, 15, 1426-1430.
40. Powell D. W., Mifflin R. C., Valentich J. D., Crowe S. E., Saada J. I., West A. B.: Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am. J. Physiol.* 1999, 277, C183-201.
41. 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.: Enzymes Present in Neutrophil Extracellular Traps May Stimulate the Fibrogenic PGF $_{2\alpha}$ Pathway in the Mare Endometrium. *Animals (Basel)* 2021, 11 (9), 2615.
42. Rebordão M. R., Amaral A., Lukasik K., Szóstek-Mioduchowska A., Pinto-Bravo P., Galvão A., Skarzynski D. J., Ferreira-Dias G.: Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology* 2018, 113, 8-18.
43. Reilas T., Rivera Del Alamo M. M., Liepina E., Yeste M., Katila T.: Effects on the equine endometrium of cervical occlusion after insemination. *Theriogenology* 2016 Mar 1, 85 (4), 617-624.
44. Ricketts S. W.: Endometrial curettage in the mare. *Equine Vet. J.* 1985, 17, 324-328.
45. Rossdale P. D., Ricketts S. W.: Events leading to conception, [w:] *Equine Studfarm Medicine*, 2nd Ed. Baillere Tindall, London 1980.
46. Santos A., Lagares D.: Matrix stiffness: the conductor of organ fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2018, 20, 2.
47. Szóstek A. Z., Galvão A. M., Hojo T., Okuda K., Skarzynski D. J.: Interleukins affect equine endometrial cell function: modulatory action of ovarian steroids. *Mediators Inflamm.* 2014, 208103.
48. Szóstek A. Z., Lukasik K., Galvão A. M., Ferreira-Dias G. M., Skarzynski D. J.: Impairment of the interleukin system in equine endometrium during the course of endometrosis. *Biol. Reprod.* 2013, 89, 79.
49. Szóstek A. Z., Siemieniuch M. J., Lukasik K., Galvão A. M., Ferreira-Dias G. M., Skarzynski D. J.: mRNA transcription of prostaglandin synthases and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. *Theriogenology* 2012, 78, 768-776.
50. Szóstek-Mioduchowska A., Baclawska A., Okuda K., Skarzynski D. J.: Effect of proinflammatory cytokines on endometrial collagen and metalloproteinase expression during the course of equine endometrosis. *Cytokine* 2019, 123, 154767.
51. Szóstek-Mioduchowska A., Baclawska A., Rebordão M., Ferreira-Dias G., Skarzynski D. J.: Prostaglandins effect on matrix metalloproteinase and collagen in mare endometrial fibroblasts. *Theriogenology* 2020, 153, 74-84.
52. Szóstek-Mioduchowska A., Lukasik K., Skarzynski D. J., Okuda K.: Effect of transforming growth factor- β 1 on α -smooth muscle actin and collagen expression in equine endometrial fibroblasts. *Theriogenology* 2019, 124, 9-17.
53. Szóstek-Mioduchowska A., Słowińska M., Pacewicz J., Skarzynski D. J., Okuda K.: Matrix metalloproteinase expression and modulation by transforming growth factor- β 1 in equine endometrosis. *Scientific Reports* 2020, 10, 1119.
54. Troedsson M. H. T.: Diseases of the uterus, [w:] Robinson N. D. (red.): *Current therapy in equine medicine*. W. B. Saunders, Philadelphia 1997, s. 517-123.
55. Van Camp S. D.: Uterine abnormalities, [w:] McKinnon A. O., Voss J. L., (red.): *Equine reproduction*. Lea&Febiger, Philadelphia 1993, s. 392-396.
56. Walter I., Handler J., Reifinger M., Aurich C.: Association of endometrios in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction* 2001, 121, 581-586.
57. Wynn T. A.: Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 2008, 214, 199-210.
58. Wynn T. A., Vannella K. M.: Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 2016, 44 (3), 450-462.
59. Zeisberg M., Kalluri R.: Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2013, 304, C216-25.
60. Zhang M., Zhang S.: T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Front Immunol.* 2020 Jun 26, 11, 1142.
61. Zhao J., Shu B., Chen L., Tang J., Zhang L., Xie J., Liu X., Xu Y., Qi S.: Prostaglandin E2 inhibits collagen synthesis in dermal fibroblasts and prevents hypertrophic scar formation in vivo. *Exp. Dermatol.* 2016, 25, 604-610.

Adres autora: dr hab. Anna Szóstek-Mioduchowska, ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn; e-mail: a.szostek-mioduchowska@pan.olsztyn.pl