

Ocena mikroskopowa wycinków błony śluzowej macicy klaczy – obraz struktury prawidłowej i chorobowej

MARIA KATKIEWICZ, MACIEJ WITKOWSKI, SYLWESTER ZAJĄC

Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

Katkiewicz M., Witkowski M., Zajac S.

Endometrial biopsy of mares: visualization of healthy and diseased structure

Summary

The aim of this work was to evaluate the structural changes seen in the endometrial biopsy of mares. Mares were selected for the examination in which the clinical disease or infertility were diagnosed. The research was done on 107 mares, of various race and age. The biopsy specimens were fixed in 10% formalin, paraffin embedded, and routinely stained with hematoxylin and eosin. Some specimens were histochemically stained with Alcian blue and periodic acid Schiff, likewise immunoperoxidase methods were used for the visualization estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors. The results of investigation included the following number of cases of specific diseases that were diagnosed: 19 – catarrhal inflammation; 3 – purulent inflammation; 24 – lymphocytic inflammation; 9 – eosinophilic inflammation, 40 – endometriosis; and 1 case of endometrial atrophy. In 11 cases no lesions were found. The endometrial biopsy is a recommended laboratory method for the exact diagnosis of mares' uterus health status.

Keywords: endometrium, mare, biopsy

Ocena histopatologiczna wycinków błony śluzowej macicy klaczy jest powszechnie stosowanym laboratoryjnym badaniem dodatkowym w diagnozowaniu przyczyn niepłodności klaczy. W Polsce pionierami badań w tej dziedzinie byli Żebracki i Preibisch (4). Jednak dopiero Kenney (1) w 1978 dokonał podziału zmian występujących w błonie śluzowej macicy klaczy z uwzględnieniem rokowania o możliwości zapłodnienia i wydania zdrowego potomstwa. Klasyfikacja zmian chorobowych wg Kenneya została udoskonalona przez Doiga (2) do dzisiaj obowiązuje w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Na podstawie wyników badań histopatologicznych stanu zdrowia macicy można z dużym prawdopodobieństwem określić płodność klaczy. Badanie biopsji macicy klaczy ma także zastosowanie w diagnozowaniu tych stanów zapalnych macicy, które często nie manifestują się klinicznie, a także pozwala na określenie efektów leczenia. Ocena obrazu mikroskopowego błony śluzowej macicy stanowi również doskonałą metodę w określaniu zmian spowodowanych zaburzeniami w regulacji hormonalnej oraz pozwala na wykrycie zaburzeń rozwojowych widocznych w komórkach macicy na poziomie molekularnym.

Celem przedstawionych badań było określenie przyczyn niepłodności klaczy, które nie zażrebiały się z nieznanymi przyczynami przez jeden lub więcej sezonów.

Materiał i metody

Badaniami objęto 107 klaczy hodowlanych pochodzących ze stadnin państwowych i hodowli prywatnych. Klacze należały do różnych ras i były w różnym wieku. Wszystkie zwierzęta używane do badań były kwalifikowane przez właścicieli jako klacze o obniżonej płodności i były niepłodne w okresie od jednego lub kilku sezonów.

Narządy rozrodcze klaczy badano klinicznie *per rectum* oraz metodą ultrasonograficzną. Po wykluczeniu ciąży, pobierano wycinki błony śluzowej macicy kleszczykami do biopsji firmy Chifa-Eskulap, według techniki opisanej przez Kenneya (1978) (1). Uzyskane wycinki błony śluzowej macicy utrwalano w buforowanej fosforanami 10% formalinie, a następnie zatapiano w parafinie. Skrawki parafinowe o grubości ok. 6 µm barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną (HE) oraz AB/PAS wg Mowry (1956) (3). Skrawki mikrotomowe o grubości ok. 3 µm naklejano na szkiełka pokryte poly-L-lizyną i barwiono metodą immunocytochemiczną immunoperoxydazową. Receptory dla estrogeny (ER) oznaczano za pomocą mysich anty ludzkich przeciwciał monoklonalnych IgG1, o numerze katalogowym 1344 firmy Immunotech. Receptory dla progesteronu (PR) oznaczano za pomocą mysich anty ludzkich przeciwciał monoklonalnych IgG2a, o numerze katalogowym 1408 firmy Immunotech. Jako kontroli pozytywnej używano wycinka guza pochodzącego z ludzkiego gruczołu sutkowego.

Wyniki i omówienie

W badaniu *per rectum* wykazano ruję u 27 klaczy, a podstawę tego rozpoznania stanowiła obecność pęcherzyków jajnikowych o średnicy przekraczającej 25 mm, oraz charakterystyczna budowa macicy o konsystencji wiotkiej i zwiększonej średnicy oraz charakterystycznym wyglądzie rozety w badaniu ultrasonograficznym. Budowa narządów rozrodczych pozostałych 80 klaczy była typowa dla fazy *diestrus*. Podczas badania przez prostnicę stwierdzano dobrze wyczuwalną macicę o kształcie cylindrycznym, a także silnie napiętą, jędrną szyjkę macicy. W jajnikach klaczy będących w fazie *diestrus* obserwowano obecność ciałek żółtych o różnej wielkości i zróżnicowanej echogenności, a także obecność drobnych pęcherzyków o średnicy nie większej niż 20 mm.

W budowie macicy 10 klaczy stwierdzono obecność zmian chorobowych, które objawiały się w 6 przypadkach powiększeniem średnicy narządu oraz obecnością hipoechogenego płynu w świetle narządu. Natomiast zmiany w macicy 4 klaczy manifestowały się powiększeniem średnicy narządu, obecnością hipoechogenego płynu w jamie macicy oraz pojedynczymi torbielami

Tab. 1. Wyniki badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej macicy

Charakter obserwowanych zmian	Liczba klaczy
Brak zmian	11
Zapalenie nieżytowe	19
Zapalenie ropne	3
Zapalenie limfocytarne	24
Zapalenia eozynofilowe	9
Endometrosis kategoria II a	16
Endometrosis kategoria II b	10
Endometrosis kategoria III	14
Zanik	1

w ścianie macicy, o średnicy od 5 do 10 mm. W ścianie macicy jednej klaczy stwierdzono występowanie licznych torbieli o średnicy dochodzących do 25 mm, a inne oceniane parametry narządu nie wykazywały zmian.

Wyniki badania histopatologicznego błony śluzowej macicy barwionych hematoksyliną i eozyną podano w tab. 1.

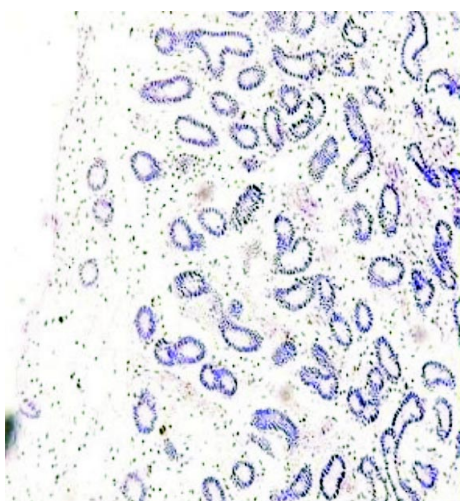
Struktura mikroskopowa błony śluzowej macicy zależna jest od

fazy cyklu płciowego. W fazie rujowej stwierdza się wysoki (do 50 μm) cylindryczny nabłonek powierzchniowy, zawierający wakuole cytoplazmatyczne. Obrzęk tkanki łącznej zrębu powoduje, iż poskręcane gruczoły maciczne wydają się niezbyt liczne. Pojedyncze odgałęzienia gruczołów, oddzielone na skutek wspomnianego obrzęku zrębu łącznotkankowego i równoczesnego szybkiego ich wzrostu mogą układać się w formie gniazd gruczołowych. Podczas rui w świetle naczyń krwionośnych macicy występuje tendencja do gromadzenia się i marginacji granulocytów obojętnochłonnych (PMN) (ryc. 1).

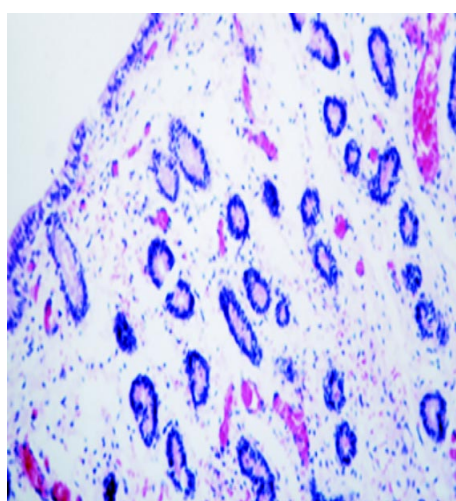
W fazie *diestrus* w błonie śluzowej macicy klaczy w obrazie mikroskopowym obserwuje się nabłonek powierzchniowy o kształcie cylindrycznym, którego wysokość nie przekracza 20 μm . Gęstość gruczołów macicznych optycznie wzrasta na skutek zmniejszonego obrzęku zrębu łącznotkankowego, a także realnego wzrostu gruczołów, które jednocześnie ulegają poskręcaniu (ryc. 2).

Zmiany zapalne błony śluzowej macicy można bardzo precyzyjnie diagnozować w badaniu histopatologicznym wycinków tego narządu. Zapalenia błony śluzowej macicy mogą mieć różny charakter, a mianowicie: zapalenie nieżytowe, zapalenie ropne, zapalenie limfocytarne i zapalenie eozynofilowe. Na ryc. 3. przedstawiono obraz *endometrium*, w którym widoczne jest zapalenie nieżytowe charakteryzujące się naciekiem komórek procesu zapalnego, takich jak liczne granulocyty obojętnochłonne oraz pojedyncze komórki plazmatyczne i limfocyty, a sporadycznie obserwuje się eozynofile. Nacieki granulocytarne zlokalizowane są głównie w zrębie łącznotkankowym pod nabłonkiem powierzchniowym i wokół naczyń krwionośnych. Bardzo charakterystycznym objawem nieżytego zapalenia błony śluzowej macicy jest obrzęk i przekrwienie *endometrium* (ryc. 3).

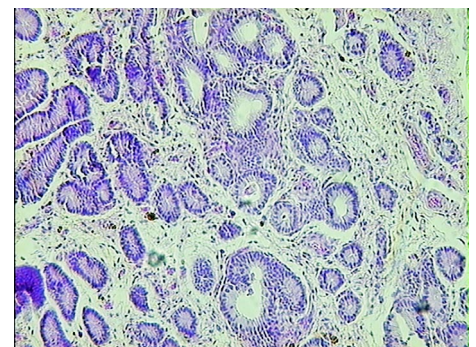
Zapalenie ropne *endometrium* cechuje przewaga granulocytów obojętnochłonnych w nacieku zapalnym. W obrazie histopatologicznym tego schorzenia stwierdza się również komórkowy nacieki zapalny złożony z nielicznych limfocytów i makrofagów, które często z powodu obładowania hemosyderyną określane są mianem syderocytów. Zazwyczaj nagromadzenie komórek procesu zapalnego występuje pod nabłonkiem powierzchniowym, wokół gruczołów macicznych i naczyń krwionośnych. Badanie histopatologiczne wycinków macicy informuje o występowaniu wczes-



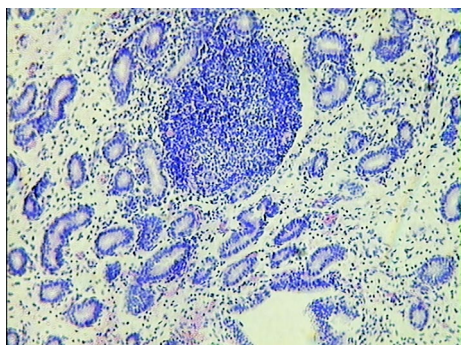
Ryc. 1. Prawidłowy obraz błony śluzowej macicy w rui. HE×20



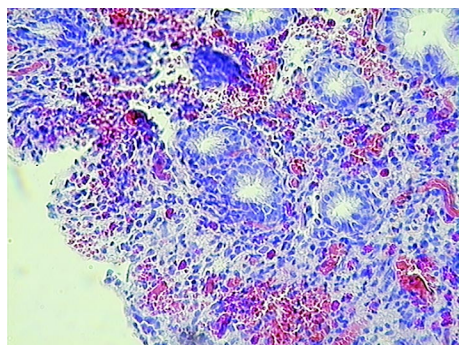
Ryc. 2. Prawidłowy obraz błony śluzowej macicy w *diestrus*. HE×20



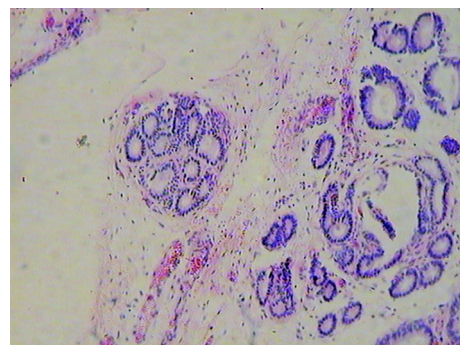
Ryc. 3. Ostre zapalenie błony śluzowej macicy. HE×20



Ryc. 4. Limfocytarne przewlekłe zapalenie błony śluzowej macicy, widoczna reaktywna grudka chłonna. HE×20



Ryc. 5. Zapalenie eozynofilowe błony śluzowej macicy. Widoczny obrzęk zrębu dużego stopnia. HE×40



Ryc. 6. Wycinek *endometrium* kategoria II a wg Kenneya

nej formy tego typu zapalenia, zanim pojawi się charakterystyczny ropny wyciek z pochwy. Zapalenie limfocytarne cechuje obecność nacieku limfocytarnego w zrębie *endometrium* (ryc. 4). Jest to zapalenie o przebiegu podostrym lub przewlekłym. Przy dłuższej trwającym procesie chorobowym dochodzi do tworzenia się nielicznych grudek chłonnych reaktywnych. Zazwyczaj z uwagi na małą liczbę grudek chłonnych i ograniczoną wielkość badanego wycinka raczej rzadko spotyka się w badanych wycinkach *endometrium*.

Przyczyna występowania zapalenia eozynofilowego błony śluzowej u kłaczy nie jest dokładnie poznana. Ten typ zapalenia charakteryzujący się dużą liczbą eozynofików w nacieku zapalnym jest dość często spotykany w *endometritis* u kłaczy (ryc. 5).

Zmiany strukturalne w błonie śluzowej macicy kłaczy obserwowane przy *endometrosis* charakteryzuje: występowanie postępującej, ogniskowej proliferacji gruczołów *endometrium*, skupionych w tzw. gniazda gruczołowe otoczone w miarę postępu choroby coraz większą liczbą warstw tkanki łącznej włóknistej. W obrębie tych gniazd gruczołowych pojawiają się torbiele gruczołowe. Równocześnie stopniowo spada liczba prawidłowych gruczołów błony śluzowej macicy. Następuje włóknienie zrębu *endometrium* z zaburzeniami w krążeniu chłonki, które manifestują się występowaniem rozstrzeni naczyń limfatycznych.

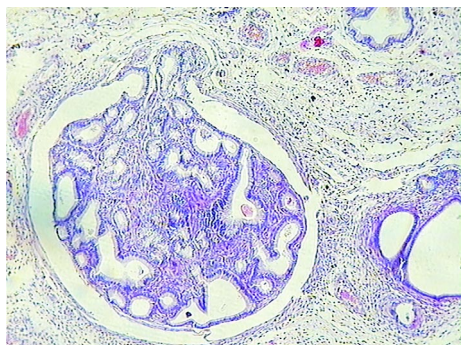
W zależności od stopnia nasilenia opisanych wyżej zmian strukturalnych w błonie śluzowej macicy, Ken-

ney i Doig podzielili *endometrosis* na cztery kategorie. Kategoria I to zdrowe kłacze. Kategoria II a to kłacze, u których pojawia się małego stopnia włóknienie zrębu łącznotkankowego, zlokalizowane wokół pojedynczych gałęzi gruczołów macicznych. Gniazd gruczołowych nie obserwuje się w 4 sąsiadujących polach widzenia mikroskopu. Odsetek zmienionych gruczołów waha się od 10% do 35% (ryc. 6). W przypadku kategorii II b w *endometrium* widoczne są w obrazie mikroskopowym 2-4 gniazda gruczołowe w czterech sąsiadujących ze sobą polach widzenia. Gniazda otoczone są 2-4 warstwami torebki włóknistej. Odsetek zmienionych gruczołów waha się od 35% do 60%. W zrębie łącznotkankowym występują liczne rozstrzenie naczyń limfatycznych (ryc. 7). Kategorię III charakteryzuje obecność nasilonego włóknienia okołogruczołowego. W czterech sąsiadujących ze sobą polach widzenia widocznych jest 5 lub więcej gniazd gruczołowych, otoczonych więcej niż 4 warstwami torebki włóknistej. Obserwuje się powyżej 60% zmienionych gruczołów. Rozstrzenie naczyń limfatycznych są liczne i mogą osiągać duże rozmiary, tworząc torbiele endometrialne (ryc. 8).

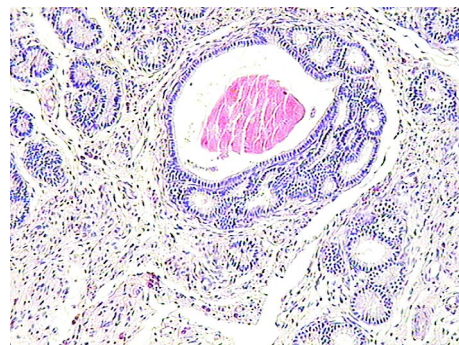
Wynik badania wycinków *endometrium* kłaczy w kierunku endometrozy stanowi cenną informację o stanie zdrowia macicy kłaczy. W celu uniknięcia błędów w interpretacji obrazu mikroskopowego struktury *endometrium*, która ulega zmianom cyklicznym – biopsję macicy należy wykonać w fazie *diestrus*.

Trzecią grupę zmian chorobowych pojawiających się

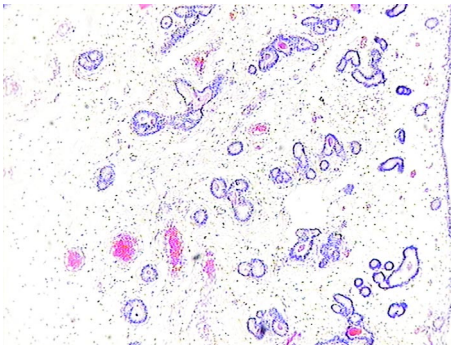
w macicy, których precyzyjną diagnozę uzyskuje się przy zastosowaniu badania histopatologicznego wycinków błony śluzowej, stanowią zmiany w budowie *endometrium* towarzyszące zaburzeniom hormonalnym. Struktura *endometrium* zmienia się w warunkach fizjologicznych w zależności od fazy cyklu płciowego, co stanowi efekt zmienności w stymulacji hormonalnej (8, 9). Komórki macicy odbierają bodźce hormonalne za pośrednictwem odpowiednich receptorów dla progesteronu i estrogenów. Wynikiem nieprawidłowości tej stymulacji jest zaburzenie homeostazy komórkowej w macicy. W *en-*



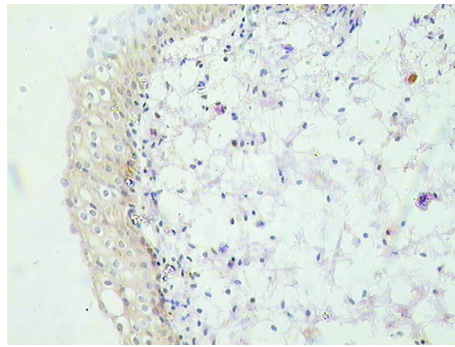
Ryc. 7. Ogniskowa proliferacja gruczołów *endometrium* oraz zmiany torbielowe w gruczołach. Rozstrzenie naczyń limfatycznych. Kat II b wg Kenneya. HE×10



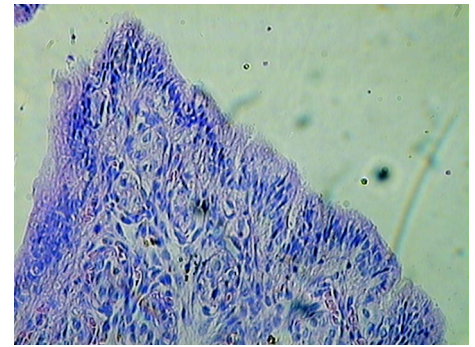
Ryc. 8. Zmiany w gruczołach i zrębie *endometrium* charakterystyczne dla kat III wg Kenneya. HE×10



Ryc. 9. Zanik gruczołów *endometrium*. HE×10



Ryc. 10. Negatywna ekspresja receptorów ER w wycinku błony śluzowej macicy klaczy z zaburzeniem rozwojowym macicy. IPOX×40



Ryc. 11. Rozrost *endometrium*. HE×20

dometrium klaczy zaburzenia hormonalne mogą manifestować się przez pojawienie się następujących zmian strukturalnych: zanik, rozrost, torbielowatość gruczołów, oraz hipersekrecja prowadząca do śluzomacicza.

Zanik *endometrium* cechuje znamienny spadek liczby gruczołów błony śluzowej oraz zmniejszenie wielkości komórek gruczołowych (ryc. 9). W przypadku rozpoznania zaniku błony śluzowej, bardzo ważne jest uwzględnienie w tym rozpoznaniu okresu spokoju jesiennie-zimowego (*anestrus*), w którym występuje fizjologiczny zanik *endometrium*. Podobnie u bardzo starych klaczy zanik ma charakter fizjologiczny związany ze zmianami starczymi (7). Badanie histopatologiczne wycinków błony śluzowej macicy klaczy pozwala także na stwierdzenie występowania niezwykle rzadko spotykanych zmian zanikowych w macicy, do których zalicza się genetycznie uwarunkowany defekt w budowie komórek macicy. Do tego typu zmian można zaliczyć brak receptorów jądrowych dla progesteronu i estrogenów w komórkach macicy. Badanie kliniczne klaczy, od której pochodzi przedstawiony preparat, nie wykazywało odchylenia w budowie anatomicznej narządu rozrodczego. Także badanie USG nie wykazało obecności zmian chorobowych. W rutynowym barwieniu HE wycinka *endometrium* stwierdzono zupełny brak gruczołów, a nabłonek powierzchniowy macicy był wielowarstwowy i podobny do nabłonka dolnych dróg rodnych. Badanie immunocytochemiczne wycinka *endometrium* wykazało całkowity brak ekspresji receptorów jądrowych dla ER i PR (ryc. 10). Opisany przypadek to zaburzenie rozwojowe w komórkach macicy obecne na poziomie molekularnym. Pomimo tego, że budowa anatomiczna macicy oceniana w badaniu klinicznym była prawidłowa, brak receptorów dla hormonów płciowych powodował wystąpienie zaburzeń strukturalnych, które można było stwierdzić wyłącznie na podstawie badania mikroskopowego narządu.

Rozrost gruczołów *endometrium* w warunkach fizjologicznych ma miejsce w okresie fazy proliferacji w fazie przedrujowej. Podobny efekt indukowania proliferacji wywierają estrogeny w warunkach patologicznego podwyższonego stężenia tych hormonów (6). Estrogeny posiadają także właściwość hamowania apoptozy, co w znacznym stopniu może upośledzać zachowanie ho-

meostazy komórkowej w macicy. Proliferacja błony śluzowej jest widoczna w preparacie mikroskopowym wycinka *endometrium* w postaci powstawania palczastych uwypukleń do światła macicy (ryc. 9). W wyniku utrzymywania się długotrwałych zaburzeń hormonalnych, obok proliferacji *endometrium* zwykle występuje nadmierne pobudzenie sekrecji śluzu macicznego, czego następstwem jest śluzomaciczne. W badaniu histopatologicznym *endometrium*, przy zastosowaniu metody barwienia histochemicznego AB/PAS można określić ilość i charakter wydzielanych glikozaminoglikanów.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że ocena histopatologiczna wycinków macicy klaczy stanowi bardzo cenną metodę w rozpoznawaniu chorób tego narządu. Postawienie prawidłowej diagnozy o przyczynach niepłodności badanych klaczy możliwe było dzięki ocenie mikroskopowej biopciatów. Celem niniejszej publikacji jest popularyzacja tej rzadko stosowanej metody badawczej, a stosunkowo łatwej do wykonania w praktyce lekarsko-weterynaryjnej przy diagnozowaniu przyczyn niepłodności u klaczy.

Piśmiennictwo

1. 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. Ass. 1978, 72, 241-262.
2. Kenney R. M., Doig P. A.: Equine endometrial biopsy. Current Therapy in Theriogenology T. 2. Saunders W. B., Philadelphia, Pa. 1986, 6, 726-729.
3. Mowry R. W.: Alcian blue technics for the histochemical study of acidic carbohydrates. J. Histochem. Cytochem. 1956, 4, 407-409.
4. Preibisch J.: Próby zastosowania badania histologicznego narządu rodnego klaczy do rozpoznawania schorzeń tego narządu. Medycyna Wet. 1961, 17, 257-265.
5. Ricketts S. W., Barrelet A.: A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK Thoroughbred mares over a 25 year period. Pferdeheilkunde 1997, 13, 525-530.
6. Schoon H. A., Scoon D., Klug E.: Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinischgynäkologischen Kontext. Pferdeheilkunde 1997, 13, 453-464.
7. Troedsson M. H. T.: Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. Pferdeheilkunde 1997, 13, 516-520.
8. Watson E. D., Skolnik S. B., Zanecovsky H. G.: Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. Theriogenology 1992, 38, 575-580.
9. Watson E. D.: The uterine immune system in mares resistant and susceptible to persistent endometritis. Pferdeheilkunde 1997, 13, 552.

Adres autora: prof. dr hab. Maria Katkiewicz, ul. Ebro 45, 01-490 Warszawa