

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Tomasz Jasiński

Rola szlaku NF- κ B zależnego w patogenezie
wybranych chorób błony śluzowej macicy
klaczy

The role of the NF- κ B dependent pathway in the pathogenesis
of selected mare endometrial diseases

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem:

Dr hab. Małgorzaty Domino

Promotor pomocniczy: Dr hab. Bartosz Pawliński

Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2022

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu naukowego.

Data.....

Podpis promotora pracy.....

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu naukowego w wyższej uczelni.

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

Data.....

Podpis autora pracy.....

Badania finansowane ze środków przyznanych w ramach grantu: „Ocena procesu włóknienia błony śluzowej macicy kłaczy w przebiegu *endometrosis* na poziomie genowym”, NCN, DEC.2018/02/X/NZ4/00101, kierownik grantu: dr hab. Małgorzata Domino

Streszczenie

Rola szlaku NF- κ B zależnego w patogenezie wybranych chorób błony śluzowej macicy klaczy

Zapalenie błony śluzowej macicy i endometrioza są jednym z ważnych czynników prowadzących do upośledzenia zdolności rozrodczych klaczy. W zapaleniu błony śluzowej macicy zarówno naciek zapalny, jak i wytwarzanie cytokin prozapalnych są regulowane przez mechanizmy komórkowe i genowe, w tym szlak zależny od czynnika jądrowego- κ B (NF- κ B). W endometriozie powstawanie zwłóknienia okołogruczołowego jest związane z przewlekłym zapaleniem oraz odpowiedzią na liczne formy bodźców prozapalnych. Niniejsze badanie miało na celu ustalenie, czy ekspresja genów na poziomie mRNA dla białka chemotaktycznego monocytów-1 (*MCP-1*), interleukiny-6 (*IL-6*) i syntaz hialuronowych (*HAS*) może dzielić kanoniczne (*RelA/NF- κ B1*) i niekanoniczne (*NF- κ B2*) szlaki aktywacji zależne od NF- κ B i zmieniać się zależnie od kategorii i typów endometriozy oraz stanu zapalnego błony śluzowej. W badaniach uwzględniono fazy cyklu jajnikowego oraz ekspresję genów na poziomie mRNA dla receptorów estrogenowych (*ESR1*, *ESR2*) i progesteronowych (*PGR*). Próbkę błony śluzowej macicy, pobrane w fazie pęcherzykowej (FLP) i lutealnej (MLP), zostały sklasyfikowane histologicznie zgodnie z klasyfikacjami Kenney'a i Doiga (II, IIa, IIb, III) oraz Hoffmanna. Transkrypcję genów docelowych oceniano za pomocą qPCR. Transkrypcja *RelA* była wyższa w III, natomiast *NF- κ B1* i *NF- κ B2* także w IIa, a w IIb tylko w FLP. Transkrypcja *RelA* i *NF- κ B1* była wyższa w aktywnej-niszczącej endometriozie tylko w FLP. Transkrypcja genów podjednostek NF- κ B nie różniła się ani w zależności od intensywności, ani od rodzaju nacieku zapalnego. Stwierdzono różnice w transkrypcji *ESR1*, *ESR2* i *PGR* między FLP i MLP w poszczególnych kategoriach i typach endometriozy. Szlaki NF- κ B, kanoniczny i niekanoniczny mogą być zaangażowane w progresję endometriozy, zwłaszcza niszczącej. Jednak badane szlaki zapalenia błony śluzowej macicy nie są zależne od NF- κ B. Ponadto najważniejsze zmiany w ekspresji genów docelowych zaobserwowano tylko w FLP, co może sugerować hormonozależną aktywację szlaków włóknienia zależnych od NF- κ B i zostało potwierdzone przez wykazane rozregulowanie transkrypcji receptorów steroidowych w błonie śluzowej macicy. Na podstawie uzyskanych wyników można zasugerować różne szlaki sygnałowe dla rozwoju i progresji zapalenia błony śluzowej macicy i endometriozy u koni.

Słowa kluczowe: błona śluzowa macicy, zapalenie, endometrioza, włóknienie, rozród, koń

Summary

The role of the NF- κ B dependent pathway in the pathogenesis of selected mare endometrial diseases

Endometritis and endometriosis are important issues decreasing mares' fertility. In endometritis, both inflammatory infiltration and proinflammatory molecule production are regulated by various cellular and gene regulatory mechanisms, including the nuclear factor- κ B (NF- κ B-dependent pathway). In endometriosis, the formation of periglandular fibrosis seems to be linked to chronic endometritis and in a response to numerous forms of inflammatory stimuli. This study aimed to determine whether gene expression on mRNA level of monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*), interleukin-6 (*IL-6*), and hyaluronan synthases (*HASs*), may share the canonical (*RelA/NF- κ B1*) and noncanonical (*NF- κ B2*) NF- κ B dependent activation pathways, and would change in subsequent categories and types of endometriosis as well as the inflammatory infiltration. The estrous cycle phases and the gene expression on mRNA levels of estrogen (*ESR1*, *ESR2*) and progesterone (*PGR*) receptors were considered. Endometrial samples, collected in the follicular phase (FLP) and mid-luteal phase (MLP), were classified histologically following both Kenney's and Doig's (II, Ila, I Ib, III) and Hoffmann's classifications. The transcription of target genes was evaluated using qPCR. Transcription of *RelA* was higher in III, whereas *NF- κ B1* and *NF- κ B2* were also in Ila, and Ila and I Ib, only in FLP. Transcription of *RelA* and *NF- κ B1* was higher in an active destructive group only in FLP. Transcription of NF- κ B subunits genes did not differ with either inflammatory intensity or type of inflammatory infiltration. Differences in the transcription of *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* were noted between FLP and MLP in the specific categories and types of endometriosis. NF- κ B may be involved in the progression of equine endometriosis, especially destructive one, on both canonical and noncanonical pathways. Contrary, the studied pathway of the equine inflamed endometrium does not seem to be regulated by the NF- κ B pathway. Moreover, the most important changes in target genes expression were observed only in FLP, which may suggest a hormone-regulated activation of the NF- κ B-dependent fibrosis pathway, which was confirmed by the dysregulation of the transcription of endometrial steroid receptors with the degree of endometriosis. Based on the current results, separate signaling pathways for the development and progression of equine endometritis and endometriosis may also be suggested.

Key words: endometrium, endometritis, endometriosis, fibrosis, reproduction, horse

Spis treści

Streszczenie.....	7
Summary	9
1. Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	13
2. Wykaz skrótów	15
3. Wstęp	17
3.1. Zastosowanie biomarkerów w ocenie zapalenia błony śluzowej macicy i endometrozy. 17	
3.2. Zapalenie błony śluzowej macicy	19
3.3. Endometrioza	20
3.4. Rola steroidowych hormonów jajnikowych w regulacji wzrostu i różnicowania komórek błony śluzowej macicy.....	23
3.5. Rola czynnika jądrowego- κ B w regulacji zapalenia i włóknienia.....	25
3.6. Hipotezy badawcze	27
4. Cel pracy	29
5. Materiały i metody.....	31
5.1. Pobranie materiału biologicznego.....	31
5.2. Określenie fazy cyku jajnikowego.....	33
5.3. Badanie histopatologiczne błony śluzowej macicy kłaczy.....	33
5.4. Ocena transkrypcji badanych genów w błonie śluzowej macicy kłaczy	34
5.5. Analiza statystyczna.....	35
6. Wyniki i dyskusja	37
6.1. Transkrypcja <i>RelA</i> , <i>NF-κB1</i> , <i>NF-κB2</i> , <i>MCP-1</i> , <i>IL-6</i> i <i>HAS 1-3</i> w błonie śluzowej macicy kłaczy z zapaleniem	37
6.2. Transkrypcja <i>RelA</i> , <i>NF-κB1</i> , <i>NF-κB2</i> , <i>MCP-1</i> , <i>IL-6</i> i <i>HAS 1-3</i> w błonie śluzowej macicy kłaczy z endometrozą o różnym stopniu zaawansowania.....	42
6.3. Transkrypcja <i>RelA</i> , <i>NF-κB1</i> , <i>NF-κB2</i> , <i>MCP-1</i> , <i>IL-6</i> i <i>HAS 1-3</i> w błonie śluzowej macicy kłaczy z endometrozą o różnych typach histologicznych.....	47
6.4. Transkrypcja <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> i <i>PGR</i> w błonie śluzowej macicy kłaczy z endometrozą o różnym stopniu zaawansowania i różnych typach histologicznych w odniesieniu do transkrypcji <i>RelA</i> , <i>NF-κB1</i> , <i>NF-κB2</i> , <i>MCP-1</i> , <i>IL-6</i> i <i>HAS 1-3</i>	51
6.5. Podsumowanie	57
7. Wnioski.....	59
8. Piśmiennictwo.....	61
9. Załączniki.....	73
9.1. Artykuły naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	73
9.2. Oświadczenia współautorów	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

1. Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Badania zostały szczegółowo przedstawione w zbiorze powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z listy Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN):

1. Domino M., **Jasiński T.**, Kautz E., Juszcuk-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. (DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.055) (Punkty MNiSzW₂₀₂₀ = 140, IF₂₀₂₀ = 2,740).
2. **Jasiński T.**, Zdrojkowski Ł., Kautz E., Juszcuk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Domino M. Equine Endometrosis Pathological Features: Are They Dependent on NF- κ B Signaling Pathway? *Animals* 2021; 11, 3151. (DOI: 10.3390/ani11113151) (Punkty MEiN₂₀₂₁ = 100, IF₂₀₂₁ = 3,231).
3. **Jasiński T.**, Zdrojkowski Ł., Kautz E., Juszcuk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Domino M. The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals* 2022, 57, 598–610. (DOI: 10.1111/rda.14099) (Punkty MEiN₂₀₂₁ = 100, IF₂₀₂₁ = 1,858).
4. **Jasiński T.**, Zdrojkowski Ł., Ferreira-Dias G., Kautz E., Juszcuk-Kubiak E., Domino M. Molecular mechanism of equine endometrosis: the NF- κ B-dependent pathway underlies the ovarian steroid receptors' dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 7360. (DOI: 10.3390/ijms23137360) (Punkty MEiN₂₀₂₁ = 140, IF₂₀₂₁ = 6,208).

Sumaryczny IF wynosi 14,037.

Sumaryczna punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi: 480.

2. Wykaz skrótów

- AD (active-destructive) – endometroza aktywna-niszcząca
- AN (active-nondestructive) – endometroza aktywna-nieniszcząca
- cRel podjednostki cRel białek rodzina czynnika jądrowego- κ B
- ECM (extracellular matrix) – macierz zewnątrzkomórkowa
- ED (embryonic death) – zamieranie zarodków
- ELP (early-luteal phase) – wczesna faza lutealna
- ER (estrogen receptors) – receptory estrogenowe
- ER- α (estrogen receptor α) – receptor estrogenowy α
- ER- β (estrogen receptor β) – receptor estrogenowy β
- ESR1 gen kodujący receptor estrogenowy α
- ESR2 gen kodujący receptor estrogenowy β
- FLP (follicular phase) – faza pęcherzykowa
- HA (hyaluronic acid) – kwas hialuronowy
- HAS (hyaluronan synthase) – syntaza hialuronianu
- I (category I – healthy endometrium) – kategoria I – prawidłowa błona śluzowa macicy
- ID (inactive-destructive) – endometroza nieaktywna-niszcząca
- Ia (category Ia – mild endometriosis) – kategoria Ia – łagodna endometroza
- Ib (category Ib – moderate endometriosis) – kategoria Ib – umiarkowana endometroza
- III (category III – severe endometriosis) – kategoria III – ciężka endometroza
- IKK (κ B inhibitor kinase complex) – kompleks kinazy inhibitora κ B
- IKK β (kinase β of κ B inhibitor kinase complex) – kinaza β kompleks kinazy inhibitora κ B
- IKK α (kinase α of κ B inhibitor kinase complex) – kinaza α kompleks kinazy inhibitora κ B
- IL-6 (interleukin-6) – interleukina-6
- IN (inactive-nondestructive) – endometroza nieaktywna-nieniszcząca
- I κ B α (nuclear factor α of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor) – czynnik jądrowy α wzmacniacza genu lekkiego polipeptydu κ w inhibitorze limfocytów B
- MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) – tkanka limfatyczna związana z błoną śluzową
- MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) – białko chemoatraktantu monocytów-1
- MLP (mid-luteal phase) – środkowa faza lutealna
- NET (neutrophil extracellular trap) – zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilii

NF- κ B (nuclear factor- κ B) – czynnik jądrowy- κ B

NF- κ B1 podjednostki NF- κ B1 białek rodzina czynnika jądrowego- κ B

NF- κ B2 podjednostki NF- κ B2 białek rodzina czynnika jądrowego- κ B

PBIE (persistent breeding-induced endometritis) – przetrwałe postanówkowe zapalenie błony śluzowej macicy

PGR gen kodujący receptor progesteronowy

PMN (polymorphonuclear neutrophils) – neutrofile polimorfojądrowe

PR (progesterone receptor) – receptor progesteronowy

PR A (progesterone receptor isoform A) – izoforma A receptora progesteronowego

PR B (progesterone receptor isoform B) – izoforma B receptora progesteronowego

RelA podjednostki RelA białek rodzina czynnika jądrowego- κ B

RelB podjednostki RelB białek rodzina czynnika jądrowego- κ B

SC (stratum compactum) – warstwa zbita błony śluzowej macicy

SP (stratum spongiosum) – warstwa gąbczasta błony śluzowej macicy

TNF- α (tumor necrosis factor α) – czynnik martwicy nowotworu α

3. Wstęp

3.1. Zastosowanie biomarkerów w ocenie zapalenia błony śluzowej macicy i endometrozy

Błona śluzowa macicy (endometrium) odgrywa kluczową rolę w ochronie ściany macicy przed uszkodzeniem i zakażeniem (Christoffersen i Troedsson, 2017). Dlatego nawet w zdrowej błonie śluzowej, w zrębie błony śluzowej macicy jest obecny naciek zapalny występujący zarówno w postaci nielicznie rozmieszczonych komórek zapalnych jak i skupisk tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową (MALT, mucosa-associated lymphoid tissue) (Klose i Schoon, 2016). Błona śluzowa ogranicza presję środowiska zewnętrznego, która u klaczy jest większa w fazie pęcherzykowej (FLP, follicular phase) niż w fazie środkowej lutealnej (MLP, mid-luteal phase) cyklu jajnikowego. Ponadto presja środowiska zewnętrznego rośnie po inseminacji/kryciu, podczas i po porodzie, a nawet podczas wykonywania procedur diagnostycznych. Naciek zapalny błony śluzowej macicy, poza rolą immunologiczną, pełni funkcję regulacyjną względem fibroblastów oraz komórek nabłonkowych biorąc udział w patogenezie zarówno zapalenia błony śluzowej macicy jak i endometrozy (Skarzynski i wsp., 2020). Przewlekłe zapalenie błony śluzowej macicy wydaje się być powiązane z endometrozą w sposób parakryny (Atamas, 2002; Rebordao i wsp., 2019). W błonie śluzowej macicy objętej przewlekłym zapaleniem, liczne chemokiny, cytokiny i czynniki wzrostu mogą oddziaływać profibrotycznie na komórki zrębu, w tym fibroblasty i miofibroblasty, regulując odkładanie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, extracellular matrix) w tym kolagenu i kwasu hialuronowego (HA, hyaluronic acid), a co za tym idzie inicjując i nasilając włóknienie okołogruzołowe (Atamas, 2002; Rebordao i wsp., 2014a). Cząsteczki prozapalne, w tym białko chemotaktyczne monocytów-1 (MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1), interleukina 6 (IL-6, interleukin-6) i czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α , tumor necrosis factor α) (di Zerega i Campeau 2001; Atamas, 2002), aktywują szlak fibrogenyzy poprzez nasilenie odkładania ECM (Liu, 2011; Rebordao i wsp., 2019) oraz rekrutację i aktywację komórek zapalnych w błonie śluzowej macicy (Szóstek i wsp., 2011; Cortes-Araya i wsp., 2018). Spośród składników ECM, HA jest syntezowany przez trzy różne, ale spokrewnione enzymy transbłonowe, syntazy hialuronowe (HAS, hyaluronan synthases) 1-3 (Fouladi-Nashta i wsp., 2017), które produkują cząsteczki HA o różnych wielkościach, a co za tym idzie o różnych funkcjach biologicznych (Itano

i wsp., 1999; Stern, 2004). Zwiększona aktywność HAS może towarzyszyć reakcji zapalnej, niezależnie od przyczyny (Stuhlmeier, 2005).

Ostatnie badania dotyczące błony śluzowej macicy klaczy koncentrowały się na fizjologicznych (Aupperle i wsp., 2004; Da Costa i wsp., 2007; Skarzyński i wsp., 2020; Schöniger i Schoon, 2020) i patofizjologicznych (Hoffmann i wsp., 2009a; Rebordao i wsp., 2014a; Minkwitz i wsp., 2019; Szóstek-Mioduchowska i wsp., 2019; Szóstek-Mioduchowska i wsp., 2020) mechanizmach molekularnych zaangażowanych w zachowanie płodności klaczy. Wykazano, że w przebudowie zrębu błony śluzowej macicy istotną rolę odgrywa transformacja fibroblastów okołogruzołowych w miofibroblasty (Aupperle i wsp., 2004; Hoffmann i wsp., 2009b; Bischofberger i wsp., 2019; Minkwirz i wsp., 2019), asynchroniczne różnicowanie nabłonka gruczołowego (Stewart i wsp., 2000; Hoffmann i wsp., 2009a; Hoffmann i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011), brak odporności wrodzonej (Schöniger i wsp., 2016; Schöniger i wsp., 2018a; Schöniger i wsp., 2018b), zmiana składu ECM (Itano i wsp., 1999; Stern, 2004; Fouladi-Nashta i wsp., 2017) oraz aktywacja czynników prozapalnych i zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilii (NET, neutrophil extracellular trap) (Walter i wsp., 2005; Rodriguez i wsp., 2011; Rebordao i wsp., 2014a; Rebordao i wsp., 2018). Pomimo licznych nowych doniesień naukowych patogeneza nieropnego zapalenia błony śluzowej macicy i endometrozy pozostaje niewyjaśniona, a rutynowe protokoły leczenia wymagają dalszych badań (Mambelli i wsp., 2014; Amara i wsp., 2020; Schöniger i Schoon, 2020; Katila i wsp., 2022). Z tego względu poszukiwanie biomarkerów określających stopień zaawansowania wybranych chorób błony śluzowej macicy klaczy jest przedmiotem zainteresowania zespołów badawczych opracowujących protokoły prognostyczne lub predykcyjne przydatne w ocenie odpowiedzi na leczenie. Z pośród badanych dotąd biomarkerów na uwagę zasługują kalponina, wimentyna, desmina i aktyna mięśni gładkich wykorzystywane do oceny transformacji miofibroblastów (Aupperle i wsp., 2004; Hoffmann i wsp., 2009b; Bischofberger i wsp., 2019; Minkwirz i wsp., 2019); receptory estrogenowe (ER, estrogen receptors) i progesteronowe (PR, progesterone receptors), uteroglobina, uterokalina, kalbindyna i glikogen wykorzystywane do oceny asynchronicznego różnicowania nabłonka gruczołowego (Stewart i wsp., 2000; Hoffmann i wsp., 2009a; Hoffmann i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011); β -defenzyna i 2,3-dioksygenaza indoloaminy 1 wykorzystywane do oceny upośledzenia odporności wrodzonej (Schöniger i wsp., 2016; Schöniger i wsp., 2018a; Schöniger i wsp., 2018b); HAS wykorzystywana do oceny wytwarzania składników ECM o zróżnicowanych funkcjach biologicznych (Itano i wsp., 1999; Stern, 2004; Fouladi-Nashta i wsp., 2017); a także MCP-1,

IL-6 i TNF α wykorzystywane do oceny aktywacji szlaku fibrogenyzy poprzez działanie prozapalne na komórki zrębu (Walter i wsp., 2005; Rodriguez i wsp., 2011; Rebordao i wsp., 2014a; Rebordao i wsp., 2018; Domino i wsp., 2020). W niniejszej pracy omówiono rolę czynnika jądrowego- κ B (NF- κ B, nuclear factor- κ B), HAS 1-3, MCP-1, IL-6, ER i PR w patogenezie wybranych chorób błony śluzowej macicy kłaczy.

3.2. Zapalenie błony śluzowej macicy

Zapalenie błony śluzowej macicy (endometritis) rozwija się w wyniku zaburzenia funkcjonowania mechanizmów obronnych, których zadaniem jest eliminowanie z macicy antygenów, głównie bakterii i składników nasienia oraz czynników prozapalnych. Przewlekłe zapalenie jest jedną z najważniejszych przyczyn niepłodności występującą u kłaczy w każdym wieku (McKinnon i wsp., 2011). Chociaż u starszych kłaczy w wieku powyżej 12 lat, przewlekłe zapalenie macicy występuje częściej niż u kłaczy młodych, zazwyczaj jest ono wynikiem zaburzenia funkcjonowania mechanicznych barier chroniących macicę przed kontaminacją, w tym właściwego kątownia warg sromowych oraz szczelności szyjki macicy (Pascoe, 1979). Z kolei u kłaczy młodych, w wieku 3 - 5 lat, częściej obserwuje się przetrwałe postanówkowe zapalenie błony śluzowej macicy (PBIE, persistent breeding-induced endometritis) wynikające z nadmiernej lub przedłużonej reakcji zapalnej na wewnątrzmaciczną depozycję nasienia (Zent i Troedsson, 1998; Woodward i wsp., 2013). Przetrwale zapalenie błony śluzowej macicy zmniejsza płodność kłaczy poprzez bezpośrednie oddziaływanie na utrzymanie zarodka lub wzrost stężenia prostaglandyny F2 α a w konsekwencji przedwczesną luteolizę i zamieranie zarodków (ED, embrionic death) (Neely i wsp., 1979).

W prawidłowej macicy kłaczy, dojrzałe neutrofile (PMN, polymorphonuclear neutrophils) mogą być obecne w śluzie w świetle macicy tylko w FLP, ze względu na otwarcie szyjki macicy oraz możliwość kontaminacji bakteryjnej. W FLP, PMN można znaleźć w warstwie zbitej (SC, stratum compactum) oraz w świetle gruczołów błony śluzowej macicy (Overbeck i wsp., 2011). Ponadto ograniczony naciek zapalny innego typu, z przewagą limfocytów i makrofagów, jest obecna w błonie śluzowej macicy przez cały cykl jajnikowy. Poza FLP, najliczniejszymi komórkami zapalnymi w błonie śluzowej macicy są limfocyty, które występują w ECM oraz między komórkami nabłonka powierzchniowego (Watson i Thomson, 1996; Schöniger i Schoon, 2020). Makrofagi występują rzadziej, jednak

nadal ich obecność w zdrowej błonie śluzowej macicy jest możliwa. Jednak niezależnie od typu komórek zapalnych, większa ich liczba występuje w SC, tuż pod nabłonkiem powierzchniowym, niż w głębiej położonej warstwie gąbczastej (SP, stratum spongiosum) błony śluzowej macicy (Watson i Thomson, 1996; Oddsdóttir i wsp., 2008; Overbeck i wsp., 2011; Schöniger i Schoon, 2020).

Gdy liczba komórek zapalnych w błonie śluzowej macicy przekracza opisany powyżej zakres, w skrawkach mikroskopowych rozpoznaje się zapalenie błony śluzowej macicy (Morris i wsp., 2020). W ostrym postanówkowym zapaleniu błony śluzowej macicy znacznie wzrasta liczba PMN, podczas gdy w zapaleniu przewlekłym znacznie wzrasta liczba limfocytów. Z kolei makrofagi, regulujące nasilenie stanu zapalnego są obecne głównie w przewlekłym zapaleniu błony śluzowej macicy (Schöniger i Schoon, 2020; Skarzynski i wsp., 2020). Regulacja nasilenia stanu zapalnego odbywa się również za pośrednictwem cytokin, które biorą udział w aktywacji zapalenia oraz komunikacji między komórkami w ECM. Cytokiny mogą być wytwarzane przez komórki zapalne, fibroblasty i komórki nabłonkowe, zarówno w nabłonku gruczołowym jak i nabłonku powierzchniowym. Najważniejszymi cytokinami biorącymi udział w regulacji zapalenia błony śluzowej macicy są interleukiny 1 β , 6 i 10 oraz TNF- α , które modulują napływ określonych typów komórek zapalnych do światła i błony śluzowej macicy (Schöniger i Schoon, 2020; Skarzynski i wsp., 2020). Spośród wymienionych cytokin, IL-6 odgrywa dominującą rolę w odpowiedzi immunologicznej błony śluzowej macicy klaczy. IL-6 warunkuje prawidłową reakcję zapalną w przebiegu PBIE, odgrywa rolę w przejściu zapalenia ostrego w zapalenie przewlekłe oraz moduluje typ nacieku zapalnego (Woodward i wsp., 2013). Przejście zapalenia ostrego w zapalenie przewlekłe jest również promowane przez MCP-1, które odpowiada również za migrację komórek zapalnych, a tym samym nasilenie reakcji zapalnej (Xu i wsp., 2015).

3.3. Endometroza

Endometroza (endometriosis), jest przewlekłą chorobą błony śluzowej macicy o nieznaną wieloczynnikową etiologią, charakteryzującą się zwłóknieniem okołogruczołowym związanym z dysfunkcją nabłonka gruczołowego zajętych gruczołów macicznych. Ponieważ endometroza występuje częściej u starszych klaczy, w wieku powyżej 12 lat (Carnevale i Ginther, 1992; Hoffmann i wsp., 2009a), choroba ta jest ważnym problemem w długoletniej hodowli wartościowych koni, negatywnie wpływającym

na płodność klaczy. Wobec powszechnego występowania, endometroza jest istotną przyczyną poważnych strat finansowych w branży hodowli koni (Itano i wsp., 1999; Fouladi-Nashta i wsp., 2017).

Cechą charakterystyczną endometrozy, uchwytną w badaniu mikroskopowym, jest koncentryczne ułożenie komórek zrębu i/lub włókien kolagenowych wokół zajętych gruczołów macicznych, a badane wycinki błony śluzowej macicy mogą zawierać zarówno zdrowe jak i chore gruczoły. Endometroza może dotyczyć pojedynczego gruczołu lub wielu gruczołów, prowadząc do powstawania tzw. gniazd gruczołowych. Stopień zwłóknienia okołogruczołowego, oceniany jako łagodny, umiarkowany lub ciężki, określa się na podstawie liczby okołogruczołowych warstw komórek podścieliska oraz liczby gniazd gruczołów. Zlokalizowane okołogruczołowo komórki zrębu błony śluzowej macicy mogą wykazywać zróżnicowanie metaboliczne. Aktywne komórki zrębu charakteryzują się owalnym kształtem, bladą cytoplazmą i jajowatymi hipochromatycznymi jądrami, podczas gdy nieaktywne komórki zrębu mają kształt wrzeciona z wydłużonymi hiperchromatycznymi jądrami. Nabłonek gruczołowy gruczołów macicznych może wykazywać cechy uszkodzenia, w tym zmniejszenia wielkości i intensywności zabarwienia komórek oraz przerwania ciągłości blaszki podstawnej, lub pozostać nienaruszony (Kenney, 1978; Kenney i Doig 1986; Hoffmann i wsp., 2009b; Schöniger i Schoon, 2020). W początkowej fazie endometrozy okołogruczołowe komórki zrębu syntetyzują włókna kolagenowe i HA zwiększając depozycję ECM. Wraz z postępującym włóknieniem w ECM przeważają miofibroblasty i aktywne lub nieaktywne metabolicznie komórki zrębu bez cech syntezy kolagenu (Hoffmann i wsp., 2009a). W gruczołach macicznych objętych włóknieniem, nabłonek gruczołowy ulega nierównomiernemu różnicowaniu (Schoon i wsp., 2000), zaburzeniu aktywności enzymatycznej (Brunckhorst i wsp., 1991) oraz zaburzeniu produkcji glikokoniugatów (Walter i wsp., 2001). W późniejszej fazie endometrozy nadmierne odkładanie ECM w zrębie, a w szczególności wokół gruczołów macicznych, zaburza układ przestrzenny makrocząsteczek (Walter i wsp., 2005; Hoffmann i wsp., 2009b; Rodriguez i wsp., 2011; Rebordao i wsp., 2014a), stając się przyczyną poszerzenia zajętych gruczołów i nietypowego różnicowania nabłonka gruczołowego (Lehmann i wsp., 2011). Ponieważ prawidłowa funkcja gruczołów macicznych jest kluczowa dla odżywienia zarodka, wraz ze wzrostem nasilenia endometrozy wzrasta ryzyko ED (Kenney i Doig, 1986; Hoffmann i wsp., 2009b). Z tego względu w prognozie płodności klaczy starszych uwzględniono odsetki przeżywalności zarodków oraz utrzymania ciąży w odniesieniu do nasilenia endometrozy, zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Kenney'a i Doig'a (1986) wraz

z poprawkami Hoffmann'a i wsp. (2009b). Zaproponowana klasyfikacja próbek błony śluzowej macicy klaczy obejmuje cztery stopnie zaawansowania endometrozy: prawidłową błonę śluzową macicy (kategoria I, category I – healthy endometrium), łagodną endometrozę (kategoria IIa, category IIa – mild endometrosis), umiarkowaną endometrozę (kategoria IIb, category IIb – moderate endometrosis) i ciężką endometrozę (kategoria III, category III – severe endometrosis) (Kenney i Doig, 1986). Klasyfikacja ta uwzględnia odsetek zajętych gruczołów macicznych oraz liczbę warstw tkanki łącznej odłożonej okołogruczołowo (Fouladi-Nashta i wsp., 2017). Odnosi się również do ryzyka ED, wskazując na spadek szacunkowego wskaźnika wyźrebień klaczy obliczanego na podstawie liczby ciąży donoszonych i poród żywych źrebiąt w stosunku do całkowitej liczby ciąży potwierdzonych w badaniu ultrasonograficznym wykonywanym pomiędzy 14 a 36 dniem po kryciu/inseminacji. Zgodnie z badaniami Kenney'a i Doig'a (1986) z poprawkami Schoon'a i Schoon'a (1992) szacunkowego wskaźnika wyźrebień wynosi >80-90% dla kategorii I, 50-80% dla kategorii IIa, 10-50% dla kategorii IIb oraz <10% dla kategorii III (Kenney i Doig, 1986; Schoon i Schoon, 1992).

Druga klasyfikacja zaproponowana przez Hoffmann'a i wsp. (2009b) uwzględnia ocenę uszkodzenia komórek nabłonka gruczołowego i aktywność metaboliczną komórek zrębu okołogruczołowego (Kenney i Doig, 1986; Hoffmann i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011), jako podstawę do identyfikacji czterech typów histopatologicznych endometrozy: endometrozę nieaktywną-nieniszczącą (IN, inactive-nondestructive), nieaktywną-niszczącą (ID, inactive-destructive), aktywną-nieniszczącą (AN, active-nondestructive) i aktywną-niszczącą (AD, active-destructive) (Fouladi-Nashta i wsp., 2017). Zgodnie z opinią Schöniger'a i Schoon'a (2020), wymienione dwie klasyfikacje endometrozy wzajemnie się uzupełniają, a ich połączenie pozwala na lepsze opisanie procesów zachodzących w błonie śluzowej macicy objętej endometrozą. Przedstawiony opis aktualnego stanu błony śluzowej macicy, pozwala na bardziej trafną ocenę zaawansowania endometrozy, a co za tym idzie lepszą prognozę przyszłej płodności klaczy (Hoffmann i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011; Schöniger i Schoon, 2020).

3.4. Rola steroidowych hormonów jajnikowych w regulacji wzrostu i różnicowania komórek błony śluzowej macicy

Prawidłowa błona śluzowa macicy ulega cyklicznym zmianom w odpowiedzi na działanie jajnikowych hormonów steroidowych, estradiolu i progesteronu (Hoffmann i wsp., 2009b). Steroidy jajnikowe oddziałują na błonę śluzową macicy dwiema drogami, kanoniczną i niekanoniczną. Mechanizm niekanoniczny działa na poziomie błony komórkowej, podczas gdy mechanizm kanoniczny angażuje receptory jądrowe. Mechanizm niekanoniczny jest uznawany za niegenomowy szlak sygnalizacji. W mechanizmie tym jajnikowe hormony steroidowe wiążą się niespecyficznie z białkami zewnątrzkomórkowymi lub białkami błonowymi, powodując różnorodne efekty biologiczne. W mechanizmie kanonicznym, rozpoznawanym jako genomowy szlak sygnalizacji, steroidy jajnikowe wiążą się ze specyficznymi receptorami wewnątrzjądrowymi. Wiązania te powodują specyficzne efekty biologiczne, które uważane są za odpowiedzialne za cykliczne zmiany czynnościowe w błonie śluzowej macicy (Wilkenfeld i wsp., 2018). W mechanizmie kanonicznym estrogeny wiążą się z dwoma specyficznymi receptorami estrogenowymi: receptorem estrogenowym α (ER- α , estrogen receptor α) i receptorem estrogenowym β (ER- β , estrogen receptor β), kodowanymi odpowiednio przez dwa różne geny: *ESR1* (gen kodujący receptor estrogenowy α ; locus NM 001081772) i *ESR2* (gen kodujący receptor estrogenowy β ; locus XM 001915519) (Enmark i wsp., 1997; Silva i wsp., 2014). Z kolei progesteron posiada receptory progesteronowe o dwóch izoformach: izoformie A (PR A, progesterone receptor isoform A) i izoformie B (PR B, progesterone receptor isoform B), kodowane przez ten sam gen *PGR* (gen kodujący receptor progesteronowy; locus XM 001498494) (Mote i wsp., 2006; Silva i wsp., 2014).

W mechanizmie kanonicznym, zarówno estrogeny jak i progesteron przechodzą przez błonę komórkową i cytoplazmę i wiążą się ze specyficznymi receptorami jądrowymi (Watson i wsp., 1992) występującymi zarówno w komórkach nabłonka powierzchniowego, komórkach nabłonka gruczołowego jak i komórkach zrębu (Aupperle i wsp., 2000). Specyficzne wiązanie indukuje transkrypcję odpowiednich genów, regulując w ten sposób wzrost i różnicowanie komórek (DeFranco, 2002). Wiązanie estrogenów z ER- α , dominującym ER w błonie śluzowej macicy (Weihua i wsp., 2000), stymuluje proliferację komórkową zarówno komórek nabłonkowych jak i komórek zrębu oraz zwiększa ekspresję PR (Cunha i wsp., 2004; Silva i wsp., 2014; Schöniger i Schoon, 2020). Wiązanie estrogenów

z ER- β natomiast hamuje uterotroficzne działanie ER- α i zmniejsza ekspresję PR w komórkach nabłonka powierzchniowego (Weihua i wsp., 2000). Z kolei wiązanie progesteronu z PR A, dominującą izoformą w błonie śluzowej macicy (Mulac-Jericevic i wsp., 2003), hamuje indukowaną estrogenami proliferację nabłonka powierzchniowego i gruczołowego i zmniejsza ekspresję PR (Cunha i wsp., 2004; Schöniger i Schoon, 2020). Wiązanie progesteronu z PR B wywołuje podobny efekt biologiczny, z tą różnicą, że PR B występują głównie w gruczole mlekowym (Mulac-Jericevic i wsp., 2003). Można zauważyć, że obwodowe stężenie steroidów jajnikowych regulują nie tylko efekty biologiczne, ale także gęstość specyficznych receptorów (Watson i wsp., 1992; Aupperle i wsp., 2000; Hartt i wsp., 2005; Silva i wsp., 2014).

W prawidłowej błonie śluzowej macicy klaczy w FLP, wykazano wyższą niż w MLP ekspresję ER- α , ale nie ER- β (Hartt i wsp., 2005; Silva i wsp., 2014). Ekspresja PR, w zależności od źródeł nie różniła się (Silva i wsp., 2014) lub różniła się między fazami cyklu podobnie jak ekspresja ER- α (Hartt i wsp., 2005). Co więcej, liczebność zarówno ER i PR w błonie śluzowej macicy różniła się w zależności od typu komórek (Watson i wsp., 1992; Aupperle i wsp., 2000; Hartt i wsp., 2005; Silva i wsp., 2014). W nabłonku gruczołowym najwyższą ekspresję ER i PR obserwowano we wczesnej fazie lutealnej (ELP, early-luteal phase), a najniższą w MLP. Natomiast w komórkach zrębu ekspresja ER i PR stopniowo wzrastała od najniższej w ELP do najwyższego FLP w dniu owulacji (Aupperle i wsp., 2000). Tak więc proliferacja zrębu jest najsilniej wyrażana w FLP, a proliferacja nabłonka jest najsilniej wyrażana we ELP (Aupperle i wsp., 2000; Hartt i wsp., 2005; Silva i wsp., 2014). Różnice w liczebności ER i PR, zarówno te zależne od fazy cyklu jajnikowego jak i te zależne od typu komórek błony śluzowej macicy (Watson i wsp., 1992; Silva i wsp., 2014), leżą u podstaw hormonozależnych zmian morfologicznych i czynnościowych w błonie śluzowej macicy i wydają się być związane z przekazywaniem między komórkami nabłonka i zrębu (Cooke i wsp., 1997; Schöniger i Schoon, 2020).

W błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą, uszkodzenie błony podstawnej i zaburzenie interakcji pomiędzy zrębem a nabłonkiem gruczołowym (Lehmann i wsp., 20011) może powodować rozregulowanie wpływu steroidów jajnikowych na nabłonek gruczołowy, gdyż pośredniczy w tym otaczający zrąb (Hoffmann i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 20011). W przeciwieństwie do zdrowych gruczołów macicznych, w błonie śluzowej macicy z endometrozą wykazano niską ekspresję ER i PR (Brunckhorst i wsp., 1991; Aupperle i wsp., 2000; Hoffmann i wsp., 2009a; Hoffmann i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 20011). Ta związana z włóknieniem nieprawidłowa liczebność ER i PR, a także zmiany

w cytoszkielecie nabłonka gruczołowego i błonie podstawnej (Schoon i wsp., 2000; Hoffmann i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 20011) wydają się mieć związek ze zmianami składników histotrofowych w gruczołach macicznych, a tym samym zaburzeniem płodności (Hoffmann i wsp., 2009a; Hoffmann i wsp., 2009b; Schöniger i Schoon, 2020). Ze względu na hormonozależne różnicowanie komórek nabłonka gruczołowego, w patogenezie endometrozy bierze się pod uwagę niezależną kontrolę aktywności gruczołów macicznych ze strony steroidów jajnikowych oraz czynników pochodzenia zrębowego oddziałujących parakrynnie (Hoffmann i wsp., 2009a).

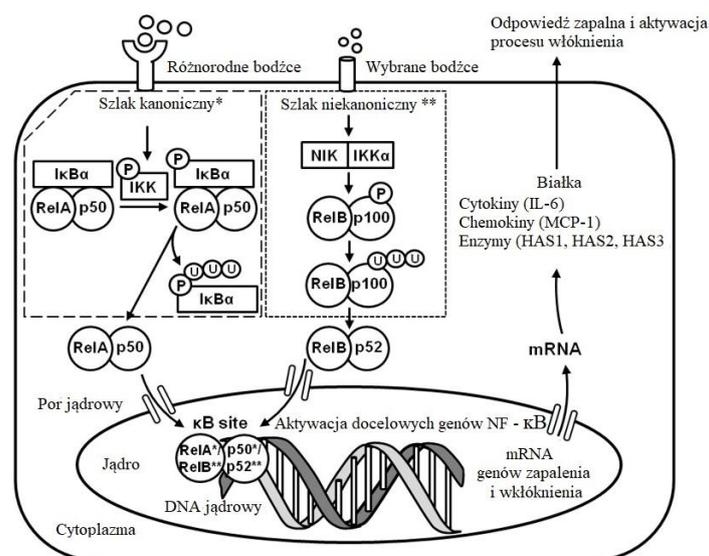
3.5. Rola czynnika jądrowego- κ B w regulacji zapalenia i włóknienia

W błonie śluzowej macicy klaczy, zarówno naciek zapalny jak i produkcja cytokin są modulowane przez różne mechanizmy regulacji komórkowej i genowej (Skarzynski i wsp., 2020). Jednym z takich mechanizmów jest szlak zależny od NF- κ B. NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym, który odgrywa kluczową rolę w wielu odpowiedziach komórkowych na zmiany środowiska zewnątrzkomórkowego (Lind i wsp., 2001; Umezawa, 2011; Celik i wsp., 2013; Ersahin i wsp., 2016; Luo i wsp., 2016; Sosińska i wsp., 2016; Sun i wsp., 2019). NF- κ B jest więc plejotropowym regulatorem transkrypcji kontrolującym ekspresję genów zaangażowanych w funkcje immunologiczne organizmu (May i Ghosh, 1998). Wykazano, że NF- κ B ulega konstytutywnej ekspresji w tkankach objętych zapaleniem (Lind i wsp., 2001; Umezawa, 2011) i włóknieniem (Sosińska i wsp., 2016; Sun i wsp., 2019) i może być związany z nawracającymi niepowodzeniami implantacji zarodków (Celik i wsp., 2013; Ersahin i wsp., 2016; Luo i wsp., 2016). Warto zauważyć, że u ludzi hamowanie szlaku NF- κ B jest jednym z najpopularniejszych kierunkiem rozwoju badań nad zapobieganiem i leczeniem chorób związanych z włóknieniem (Ahn i wsp., 2012; Alekseevna i wsp., 2017; Arjmand, 2020; Szóstek-Mioduchowska i wsp., 2020; Dejban i wsp., 2021).

Rodzina białek NF- κ B składa się z pięciu czynników transkrypcyjnych, które ze względu na różnice w budowie, funkcji i mechanizmie powstawania można podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa obejmuje białka: RelA (p65), RelB i cRel, natomiast druga grupa obejmuje białka: NF- κ B1 (p50/p105) i NF- κ B2 (p52/p100) (May i Ghosh, 1998; Lind i wsp., 2001). Białka RelA, RelB i cRel charakteryzują się obecnością sekwencji domeny aktywacji transkrypcji, dzięki czemu mogą aktywować transkrypcję cząsteczek DNA. Białka NF- κ B1 i NF- κ B2 są syntetyzowane jako białka prekursorowe. W wyniku proteolizy

powstają formy aktywne, odpowiednio p50 i p52. Białka te nie mają domen niezbędnych do aktywacji transkrypcji, jednak gdy tworzą dimery z białkami RelA, RelB i cRel stają się formami aktywnymi (May i Ghosh, 1998).

Aktywne formy białek rodziny NF- κ B działają jako regulatorowe białka transkrypcyjne usystematyzowane, zależnie od bodźców aktywujących i mechanizmów aktywacji (Umezawa, 2011), w dwa szlaki aktywacji: szlak kanoniczny i szlak niekanoniczny (Lind i wsp., 2001; Umezawa, 2011). Kanoniczny szlak aktywacji angażuje podjednostki RelA/NF- κ B1 i zależy głównie od kinazy β kompleksu kinazy inhibitora κ B (IKK, κ B inhibitor kinase complex). Kinaza β kompleksu kinazy inhibitora κ B (IKK β , kinase β of κ B inhibitor kinase complex) fosforyluje czynnik jądrowy α wzmacniacza genu lekkiego polipeptydu kappa w inhibitorze komórek B (IkB α , nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α), który ulega ubikwitynacji i degradacji, dzięki czemu wolne dimery p50/RelA i p50/c-Rel są transportowane z cytoplazmy do jądra komórkowego gdzie regulują transkrypcję określonych genów (Lind i wsp., 2001; Umezawa, 2011) (rycina 1). Niekanoniczny szlak aktywacji angażuje podjednostki RelB/NF- κ B2 i zależy od kinazy α kompleksu kinazy inhibitora κ B (IKK α , kinase α of κ B inhibitor kinase complex), części kompleksu IKK, która fosforyluje białko p100, będące częścią nadal nieaktywnego transkrypcyjnie dimeru p100/RelB. Fosforylowane białko p100 ulega ubikwitynacji, a koniec łańcucha białkowego ulega degradacji i powstaje białko p52. Aktywny dimer p52/RelB przenika z cytoplazmy do jądra komórkowego i wpływa na transkrypcję określonych genów (May i Ghosh, 1998; Lind i wsp., 2001) (rycina 1).



Rycina 1. Schemat kanonicznego (ramka lewa) i niekanonicznego (ramka prawa) szlaku aktywacji NF- κ B (Domino i wsp., 2020).

3.6. Hipotezy badawcze

Uważa się, że szlak NF- κ B jest kluczowy w rozwoju odpowiedzi immunologicznej, zarówno poprzez stymulowanie, jak i hamowanie ekspresji genów w różnych typach komórek. Jednak każda dysregulacja tego układu powoduje zaburzenia odpowiedzi immunologicznej. W różnych tkankach wykazano, że oba szlaki aktywacji NF- κ B modulują transkrypcję genów kodujących MCP-1 (Rovin i wsp., 1995; Viedt i wsp., 2002a; Viedt i wsp., 2002b), IL-6 (Viedt i wsp., 2002b; Son i wsp., 2008) oraz HAS (Ohkawa i wsp., 1999; Kao i wsp., 2006). MCP-1, będąca prozapalnym produktem aktywacji NF- κ B, bierze udział w rekrutacji i aktywacji komórek zapalnych (Szóstek i wsp., 2013; Cortes-Araya i wsp., 2018), a IL-6 pełni wiele funkcji regulacyjnych w zapaleniu błony śluzowej macicy kłaczy (Tripathi i Aggarwal, 2006). Podobnie syntazy hialuronowe (HAS 1, 2 i 3) zwiększają migrację i adhezję komórek zapalnych, wpływając na ich zwiększony naciek i modulując typ nacieku na wczesnym etapie zapalenia (Necas i wsp., 2008). Ponadto zapalenie błony śluzowej macicy poprzez wypływ regulatorów zapalenia (Aresu i wsp., 2012; Rebordao i wsp., 2014a; Rebordao i wsp., 2018; Skarzynski i wsp., 2020), w tym MCP-1, IL-6 i HAS (Aresu i wsp., 2012), odgrywają ważną rolę w patogenezie endometrozy. Wobec powyższego postawiłem następujące hipotezy badawcze:

1. zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF- κ B regulacja transkrypcji *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* aktywuje procesy zapalne w błonie śluzowej macicy kłaczy (Jasiński i wsp., 2022a);
2. zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF- κ B regulacja transkrypcji *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* aktywuje procesy zwyrodnieniowe w błonie śluzowej macicy kłaczy w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy (Domino i wsp., 2020);
3. zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF- κ B regulacja transkrypcji *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* aktywuje procesy zwyrodnieniowe w błonie śluzowej macicy kłaczy w zależności od typu histologicznego endometrozy (Jasiński i wsp., 2021);
4. zaburzenia morfologiczne i czynnościowe błony śluzowej macicy kłaczy o podłożu endokrynologicznym, wskazane jako jeden z mechanizmów endometrozy, mogą być powiązane ze szlakiem sygnalizacji NF- κ B (Jaskiński i wsp., 2022b).

4. Cel pracy

Niniejsze badania, opublikowane w jednotematycznym cyklu prac, miały na celu określenie czy transkrypcja *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy:

1. z zapaleniem w zależności od intensywności i rodzaju nacieku zapalnego (Jasiński i wsp., 2022a);
2. z endometrozą w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy (Domino i wsp., 2020);
3. z endometrozą w zależności od typu histologicznego endometrozy (Jasiński i wsp., 2021);
4. zależnie od transkrypcji *ESR1*, *ESR2* i *PGR* oraz czy transkrypcja *ESR1*, *ESR2* i *PGR* w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą zmienia się w zależności od stopnia zaawansowania i typu histologicznego endometrozy (Jasiński i wsp., 2022b).

5. Materiały i metody

5.1. Pobranie materiału biologicznego

Materiał biologiczny stanowiły wycinki błony śluzowej macicy i jajniki oraz próbki krwi pobrane poubojowo od klaczy ras gorącokrwistych w wieku od 3 do 25 lat. Materiał został pobrany w komercyjnej ubojni koni w Polsce. Pobranie materiału nie podlega przepisom o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych i dydaktycznych (ustawa krajowa: Dz. U. 2015 poz. 266 oraz dyrektywa UE: 2010-63-UE) i zgodnie z decyzją II Lokalnej Komisji Etyki ds. Doświadczeń na Zwierzętach SGGW w Warszawie z dnia 27 października 2021 r. nie wymagało zgody Komisji Etycznej. Próbkę pobrano w sezonie rozrodczym od kwietnia do września łącznie od 220 klaczy. Transkrypcję *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy klaczy z zapaleniem oznaczano w próbkach pobranych od 120 klaczy bez endometrozy (Tabela 1) zgodnie z metodyką szczegółowo opisaną w publikacji Jasiński i wsp., 2022a. Transkrypcję *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy klaczy z endometroza oznaczano w próbkach pobranych od 100 klaczy bez zapalenia błony śluzowej macicy (Tabela 2) zgodnie z metodyką szczegółowo opisaną w publikacjach Domino i wsp., 2020, Jasiński i wsp., 2021 oraz Jasiński i wsp., 2022b.

Tabela 1. Dystrybucja próbek błonie śluzowej macicy klaczy z zapaleniem (n=120) między nasileniem, a typem nacieku zapalnego.

	None	Łagodne	Umiarkowane	Ciężkie	Łącznie
Makrofagi		8	8	8	24
Neutrofile		8	8	8	24
Limfocyty		8	8	8	24
Mieszany		8	8	8	24
Łącznie	24	32	32	32	120/96

None (kontrola) – prawidłowa błona śluzowa macicy, łagodne – łagodne zapalenie błony śluzowej macicy, umiarkowane – umiarkowane zapalenie błony śluzowej macicy, ciężkie – zapalenie błony śluzowej macicy.

Tabela 2. Dystrybucja próbek błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą (n=100) między klasyfikacją Kenney'a i Doig'a (1986) określającą stopnie zaawansowania endometrozy, a klasyfikacją Hoffmann'a (2009b) określającą typu histologicznego endometrozy.

	C/I	Ia	Ib	III	Łącznie
IN		5	11	4	20
ID		10	5	5	20
AN		12	5	3	20
AD		3	9	8	20
Łącznie	20	30	30	20	100/80

kategoria I – prawidłowa błona śluzowa macicy, kategoria Ia – łagodna endometroza, kategoria Ib – umiarkowana endometroza, kategoria III – ciężka endometroza; C (kontrola) – prawidłowa błona śluzowa macicy, IN – nieaktywna-niszcząca endometroza, ID – aktywna-nieniszcząca endometroza, AN – aktywna-niszcząca endometroza, AD – aktywna-nieniszcząca endometroza.

Wycinki błony śluzowej macicy, o wymiarach nie mniejszych niż $10 \times 5 \times 5$ mm, zostały pobrane z miejsca połączenia trzonu i rogu macicy. Wycinki pobrano bezpośrednio po wytrzewieniu. Od każdej klaczy pobrano dwie próbki błony śluzowej macicy: jedną do badań histopatologicznych i jedną do badań molekularnych. Wycinki do badań histopatologicznych pobrano do probówek typu Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy) i utrwalono w 10% buforowanej formalinie (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Wycinki do badań molekularnych pobrano do wolnych od RNaz probówek typu Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy) i natychmiast po pobraniu zamrożono w ciekłym azocie. Jajniki pobrano do probówek typu Falcon (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy) i utrwalono w 0,9% roztworze NaCl (Polfa S.A., Lublin, Polska) o temperaturze $+4$ °C. Następnie próbki przetransportowano do laboratorium: próbki do badań histopatologicznych w temperaturze pokojowej, próbki błony śluzowej macicy do badań molekularnych w ciekłym azocie, jajniki w temperaturze $+4$ °C. Próbki błony śluzowej macicy do badań histopatologicznych utrwalono w formalinie przez 24 godziny a następnie przeniesiono do 70% alkoholu etylowego (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Próbki przechowywano tydzień w temperaturze pokojowej, a następnie zatopiono w parafinie (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) zgodnie ze standardowym protokołem utrwalania próbek histologicznych. Natomiast próbki do badań molekularnych przechowywano w temperaturze -80 °C. Jajniki poddano ocenie

makroskopowej bezpośrednio po przywiezieniu do laboratorium w celu oceny liczby i wielkości pęcherzyków jajnikowych i/lub ciałek żółtych oraz wykluczenia obecności patologii jajników.

Próbki krwi pobrano do suchych probówek (BD Vacutainer®, Plymouth, Wielka Brytania), przetransportowano do laboratorium w temperaturze +4 °C i odwirowano (2000 x G, 5 min). Surowicę, wolną od hemolizy, przeniesiono do probówek typu Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy) i przechowywano w temperaturze -20 °C.

5.2. Określenie fazy cyku jajnikowego

Fazy cyku jajnikowego określano na podstawie wyników badania makroskopowego jajników oraz stężenia jajnikowych hormonów steroidowych, 17 β-estradolu (E₂) i progesteronu (P₄) zgodnie z protokołem zaproponowanym przez da Costa i wsp. (2007). Stężenia E₂ i P₄ oznaczono z wykorzystaniem komercyjnych testów radioimmunologicznych o czułości 1,36 pg/ml (zakres krzywej 2,52 pg/ml do 22,8 pg/ml) dla E₂ (Estrus-Us-Ct, Cis Bioassays, Codolet, Francja) oraz o czułości 0,05 ng/ml (zakres krzywych od 0,12 ng/ml do 18,38 ng/ml) dla P₄ (KIP 1458; DIAsource ImmunoAssays SA, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgia). Próbki przypisano do grupy MLP i FLP w liczbie wskazanej w poszczególnych publikacjach (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021; Jasiński i wsp., 2022a; Jasiński i wsp., 2022b). Próbki przypisano do grupy MLP, gdy stężenia E₂ i P₄ w surowicy krwi wynosiły odpowiednio <4 pg/ml i >1 ng/ml; a na obu jajnikach nie wykazano obecności żadnego pęcherzyka jajnikowego o średnicy >35 mm, natomiast wykazano obecność co najmniej jednego ciała żółtego. Próbki przypisano do grupy FLP gdy stężenia E₂ i P₄ w surowicy krwi wynosiły odpowiednio >4 pg/ml i <1 ng/ml; a podczas oceny makroskopowej jajnika uwidoczniono obecność co najmniej jednego pęcherzyka jajnikowego o średnicy >35 mm oraz nie stwierdzono obecności ciała żółtego. Na żadnym z jajników nie stwierdzono makroskopowych cech patologii jajników.

5.3. Badanie histopatologiczne błony śluzowej macicy kłaczy

Zatopione w parafinie próbki błony śluzowej macicy pocięto mikrotomem obrotowym Leica RM2255 (Kawa-Ska, Zalesie Górne, Polska) na skrawki o grubości 6 μm. Skrawki umieszczono na silanizowanych szkiełkach podstawowych, a następnie poddano

odparafinowaniu i uwodniono w serii roztworów alkoholu i ksylenu (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Następnie próbki barwiono przy użyciu standardowego protokołu hematoksyliny-eozyna (HE) (hematoksylina, 3801520E, Leica, Buffalo Grove, IL, USA; eozyna, HT1103128; SigmaAldrich, Poznań, Polska) i zamknięto szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty barwione HE oceniano pod mikroskopem świetlnym (Olympus BX43, Warszawa, Polska, powiększenie 40×-1000×). Oceniono mikroskopowo obecność nacieku zapalnego oraz obecność i nasilenie cech mikroskopowych typowych dla endometrozy. W badaniach Domino i wsp. (2020), Jasiński i wsp. (2021) i Jasiński i wsp. (2022b) do izolacji RNA wybrano tylko próbki, które nie wykazały aktywnego stanu zapalnego w badaniu makroskopowym i nie wykazały nacieku zapalnego w badaniu histopatologicznym. Natomiast w badaniach Jasiński i wsp. (2022a) do izolacji RNA wybrano tylko próbki, które nie wykazały cech histologicznych typowych dla endometrozy. Kryteria klasyfikacji omówiono szczegółowo w poszczególnych publikacjach (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021; Jasiński i wsp., 2022a; Jasiński i wsp., 2022b).

5.4. Ocena transkrypcji badanych genów w błonie śluzowej macicy klaczy

Zamrożone w ciekłym azocie próbki błony śluzowej macicy rozdrobniono mechanicznie w środowisku ciekłego azotu. Następnie 50 mg każdej próbki homogenizowano w probówkach Lysing Matrix D (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) i ekstrahowano całkowite RNA przy użyciu zestawu High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Rotkreuz, Szwajcaria) zgodnie ze standardowym protokołem. Następnie przeprowadzono obróbkę DNAzą. Stężenie RNA oznaczano przy użyciu spektrofotometru DS-11 FX (DeNovix, Wilmington, DE, USA) przy stosunku absorbancji A260/280 i A260/230 około 2,0. Dalszą analizę przeprowadzono tylko w tych próbkach, w których zawartość RNA przekraczała 100 ng. Żadna z próbek nie została wykluczona z powodu niewystarczającej zawartości RNA. Amplifikację Real-time PCR (qPCR) przeprowadzono przy użyciu zestawu TaqMan™ RNAt0-CT™ 1-Step Kit (nr 4392938, ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA) i systemu Quant-Studio™ 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems, Wilmington, DE, USA). Zastosowano komercyjnie dostępne w testy ekspresji genów TaqMan specyficzne dla koni (nr 4448892 i 4441114, ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA). Startery specyficzne dla wybranych transkryptów *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS 1*, *HAS 2*, *HAS 3*, *ESR1*, *ESR2* i *PGR* zaprojektowano przy użyciu Primer-BLAST

(NCBI) i zestawiono w odpowiednich tabelach w poszczególnych publikacjach (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021; Jasiński i wsp., 2022a; Jasiński i wsp., 2022b). Poziom transkrypcji wybranych genów oceniano w odniesieniu do dwóch genów referencyjnych, GAPDH (Ec03210916_gH) i HPRT1 (Ec03470217_m1). Reakcja PCR w czasie rzeczywistym była przeprowadzona w objętości 10 ml i zawierała 15 ng całkowitego RNA, 5 ml TaqMan® RTPCR Mix (2x), 0,25 ml TaqMan® RT Enzyme Mix (40x), 0,5 ml sondy TaqMan i oba startery PCR (ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA) dla każdego badanego genu. Protokół PCR obejmował cztery etapy: odwrotną transkrypcję (15 min w temperaturze 48°C), aktywację enzymu (10 min w temperaturze 95°C), 40 cykli denaturacji (15 s w temperaturze 95°C) i hybrydyzację/wydłużenie (1 min w temperaturze 60 °C). Każdą próbkę badano w dwóch powtórzeniach. Surowe dane transkrypcji genów znormalizowano przy użyciu średniej geometrycznej mRNA wykrytego z dwóch genów referencyjnych. Półilościową ocenę ekspresji genu docelowego przeprowadzono w porównawczej metodzie CT (metoda $\Delta\Delta CT$), gdzie ekspresję genu docelowego w próbkach kategorii I/grupy C uznano za wartość kontrolną ΔCt .

5.5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Uzyskaną bazę danych prezentowano jako serie danych zmian poziomu transkrypcji ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) badanych genów dla każdej badanej kategorii endometrozy (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2022b), typu histopatologicznego endometrozy (Jasiński i wsp., 2021; Jasiński i wsp., 2022b) oraz nasilenia i typu nacieku zapalnego (Jasiński i wsp., 2022a). Każdą serie danych testowano niezależnie w kierunku zgodności rozkładu danych z rozkładem normalnym za pomocą testu Shapiro-Wilka.

W przypadku porównywania dwóch serii danych (FLP, MLP), dane o rozkładzie zgodnym z rozkładem normalnym porównywano przy użyciu niesparowanego testu t-studenta z korektą Welcha, podczas gdy parę danych z których co najmniej jedna seria danych prezentowała rozkład niezgodny z rozkładem normalny porównywano z wykorzystaniem testu Manna-Whitney'a. Dla obu testów ustalono poziom istotności $p < 0,05$.

W przypadku porównywania więcej niż dwóch serii danych (stopień zaawansowania endometrozy, typy histologiczne endometrozy, intensywność nacieku zapalnego, typ nacieku zapalnego), dane o rozkładzie zgodnym z rozkładem normalnym porównywano przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji popartej testem wielokrotnych powtórzeń Tukey'a, podczas gdy serie danych z których co najmniej jedna seria danych prezentowała rozkład niezgodny z rozkładem normalny porównywano z wykorzystaniem testu Kruskala–Wallisa popartego testem wielokrotnych porównań Dunna. Dla obu testów ustalono poziom istotności $p < 0,05$.

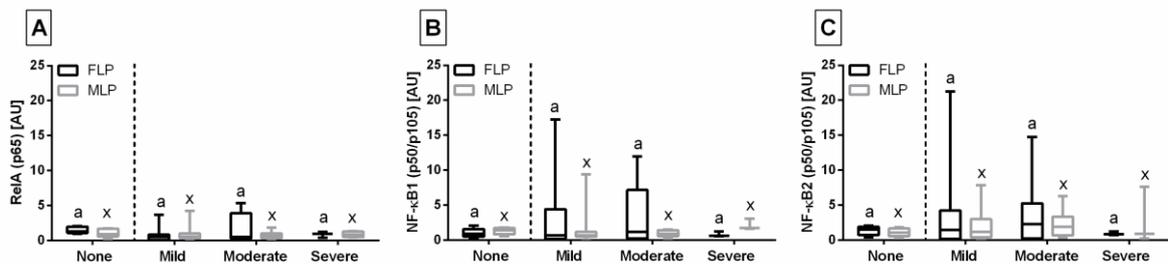
Szczegółowy opis przeprowadzonej analizy danych, w tym wykorzystanie dodatkowych testów i porównań dla poszczególnych serii danych, przedstawiono w poszczególnych publikacjach (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021; Jasiński i wsp., 2022a; Jasiński i wsp., 2022b).

6. Wyniki i dyskusja

6.1. Transkrypcja *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy klaczy z zapaleniem

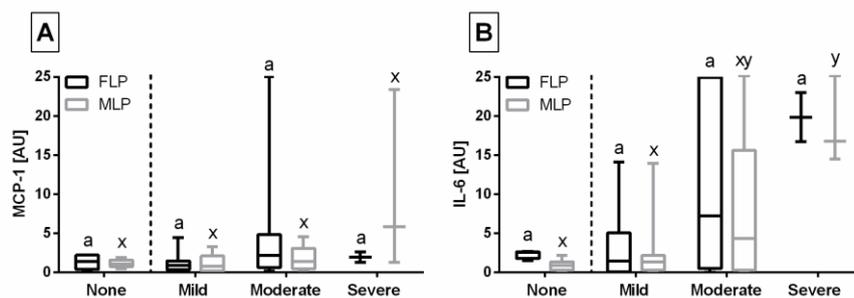
W dotychczasowych badaniach wykazano, że szlak NF-κB zależny bierze udział w patogenezie endometrozy (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021). Wykazano, że aktywacja szlaku kanonicznego może być związana z zahamowaniem transkrypcji *IL-6* i pobudzeniem transkrypcji *MCP-1*, *HAS 1*, *HAS 2* lub *HAS 3* zależnie od stopnia zaawansowania endometrozy (*IL-6*, *HAS 1*, *HAS 3*) jak i występowania niszczącego typu histologicznego endometrozy (*MCP-1*, *HAS 2*). Zmiany te były wykazane w FLP cyklu jajnikowego. Należy zwrócić uwagę na fakt, że wycinki błony śluzowej macicy klaczy użyte w poprzednich badaniach (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021) nie wykazywały cech makroskopowych i mikroskopowych zapalenia. Dlatego warto zwrócić uwagę, że badane geny zaangażowane w patogenezę endometrozy są zasadniczo ważne w rozwoju zapalenia (Christoffersen i Troedsson, 2017; Woodward i wsp., 2013; Marth i wsp., 2018; Skarżyński i wsp., 2020; Morris i wsp., 2020; Hedia i wsp., 2021). Ponieważ wpływ stanu zapalnego na rozwój endometrozy jest przedmiotem wielu badań (Aresu i wsp., 2012; Rebordao i wsp., 2014a; Rebordao i wsp., 2014b; Klose i Schoon, 2016; Rebordao i wsp., 2018; Schöniger i Schoon, 2020; Skarżyński i wsp., 2020), ocena transkrypcji badanych genów jest istotna również w kontekście zapalenia błony śluzowej macicy, a uwzględnienie typu i nasilenia stanu zapalnego powinny dać wgląd w rolę szlaku NF-κB zależnego w regulacji cytokin modulujących stan zapalny błony śluzowej macicy.

W niniejszych badaniach nie stwierdzono różnic w poziomie transkrypcji *RelA* (rycina 2A), *NF-κB1* (rycina 2B) oraz *NF-κB2* (rycina 2B) pomiędzy prawidłową błoną śluzową macicy a błoną śluzową objętą procesem zapalnym, zarówno w odniesieniu do nasilenia stanu zapalnego (rycina 2) jak również typu nacieku zapalnego (Jasiński i wsp., 2022a). Nie stwierdzono również zmian w poziomie transkrypcji *RelA*, *NF-κB1* oraz *NF-κB2* pomiędzy próbkami pobranymi w FLP oraz MLP, zarówno w odniesieniu do nasilenia stanu zapalnego (rycina 2) jak również typu nacieku zapalnego (Jasiński i wsp., 2022a). Uzyskane wyniki mogą sugerować niezależny od NF-κB szlak aktywacji procesów patologicznych zachodzących w błonie śluzowej macicy w przebiegu zapalenia, a więc odmienny do stwierdzonego w przypadku endometrozy.



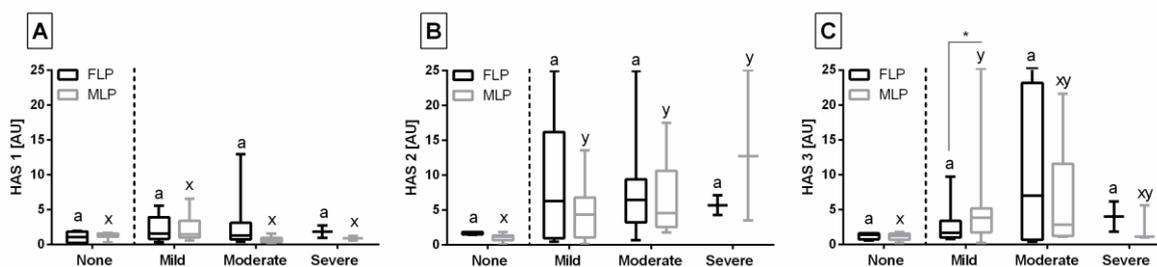
Rycina 2. Poziomy transkrypcji *RelA* (A), *NF-κB1* (B) oraz *NF-κB2* (C) w błonie śluzowej macicy kłaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od intensywności zapalenia jako łagodne zapalenie (mild), umiarkowane zapalenie (moderate) lub ciężkie zapalenie (severe). Grupa None przedstawia próbkki kontrolne. Linia przerywana oddziela próbkki kontrolne i próbkki objęte zapaleniem. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$.

Wzrost transkrypcji *MCP-1* w umiarkowanym i ciężkim nacieku jest obecny jedynie w odniesieniu do całej populacji próbek (Jasiński i wsp., 2022a) nie zaś po podziale na grupy pobrane w różnych fazach cyklu jajnikowego (rycina 3A). Obserwowany wzrost transkrypcji *MCP-1* może sugerować funkcję podtrzymującą, a nie inicjującą *MCP-1* w obserwowanym procesie zapalnym. Co więcej najwyższą transkrypcję *MCP-1* stwierdzono w przypadku nacieku z przewagą makrofagów. Chociaż *MCP-1* jest produkowany przez makrofagi, zwiększa również ich dalszą migrację do tkanki co może uzasadniać obserwowane różnice. Uzyskane wyniki mogą również potwierdzić główną funkcję regulacyjną makrofagów, polegającą na produkcji i uwalnianiu cytokin prozapalnych (Arici i wsp., 1999; Fumuso i wsp., 2003; Yadav i wsp., 2010). Co ciekawe, w poprzednich badaniach wykazano brak wzrostu transkrypcji *MCP-1* w błonie śluzowej macicy objętej endometrozą (Domino i wsp., 2020), z wyjątkiem nieaktywnej-niszczącej endometrozy w FLP (Jasiński i wsp., 2021). Chociaż transkrypcja *MCP-1* może być zależna od szlaku NF-κB, w niniejszym badaniu nie wykazano zgodnych poziomów transkryptów białek z rodziny NF-κB oraz *MCP-1*. Uzyskane wyniki mogą sugerować odmienną rolę *MCP-1* w patogenezie zapalenia błony śluzowej macicy (Yadav i wsp., 2010) i endometrozy (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021) u kłaczy.



Rycina 3. Poziomy transkrypcji *MCP-1* (A) oraz *IL-6* (B) w błonie śluzowej macicy kłaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od intensywności zapalenia jako łagodne zapalenie (mild), umiarkowane zapalenie (moderate) lub ciężkie zapalenie (severe). Grupa None przedstawia próbki kontrolne. Linia przerywana oddziela próbki kontrolne i próbki objęte zapaleniem. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$.

W niniejszych badaniach wykazano wzrost transkrypcji *IL-6* wraz ze wzrostem nasilenia stanu zapalnego (Jasiński i wsp., 2022a), co jest zgodne z najnowszymi badaniami. *IL-6* jest bowiem uznana za jedną z najważniejszych cytokin w patogenezie zapalenia błony śluzowej macicy kłaczy (Fumuso i wsp., 2003; Woodward i wsp., 2013; Christoffersen i Troedsson, 2017; Skarżyński i wsp., 2020). Stwierdzono ponadto wzrost transkrypcji *IL-6* w przypadku nacieku makrofagów i nacieku mieszanego, co jest zgodne z dotychczasowymi obserwacjami wskazującymi, że makrofagi są głównym źródłem *IL-6* w błonie śluzowej macicy objętej zapaleniem (Arici i wsp., 1999; Yadav i wsp., 2010). U kłaczy podatnych na PBIE stwierdzono przedłużoną produkcję i wydzielanie *IL-6* związane z nadmierną i przedłużoną aktywnością makrofagów (Christoffersen i wsp., 2012; Tanaka i wsp., 2014; Christoffersen i Troedsson, 2017; Morris i wsp., 2020; Skarżyński i wsp., 2020). Jednak podobny wzrost transkrypcji *IL-6*, obserwowany w błonie śluzowej macicy objętej zapaleniem, nie był stwierdzony w przebiegu endometrozy (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021). Może to sugerować, że funkcja biologiczna *IL-6* w błonie śluzowej macicy jest ograniczona do procesu zapalnego i nie wpływa na inicjację i rozwój okołogruczolewego włóknienia ECM.



Rycina 4. Poziomy transkrypcji *HAS1* (A), *HAS2* (B) oraz *HAS3* (C) w błonie śluzowej macicy klaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od intensywności zapalenia jako łagodne zapalenie (mild), umiarkowane zapalenie (moderate) lub ciężkie zapalenie (severe). Grupa None przedstawia próbki kontrolne. Linia przerywana oddziela próbki kontrolne i próbki objęte zapaleniem. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$. Gwiazdki wskazują różnice między fazami cyklu jajnikowego (* $p < 0,05$).

W niniejszych badaniach stwierdzono brak różnic w transkrypcji *HAS 1* w zależności od występowania, nasilenia i typu nacieku zapalnego (rycina 4A). Uzyskane wyniki sugerują, że enzym ten może nie być zaangażowany w migrację i adhezję komórek w błonie śluzowej macicy objętej zapaleniem. Jednocześnie, wraz ze wzrostem intensywności zapalenia, stwierdzono wzrost transkrypcji *HAS 2* (rycina 4B) i *HAS 3* (rycina 4C) we wszystkich badanych typach nacieku zapalnego. W przypadku obu genów wzrost poziomu transkryptów był najniższy w przypadku nacieku PMN. Uzyskane wyniki wskazują, że wiązanie CD44, będącego receptorem HA, z jego ligandem zachodzi podczas migracji limfocytów T i monocytów. HA o małej masie cząsteczkowej może działać prozapalnie, zwiększając produkcję cytokin (Kessler i wsp., 2008). Jest to zgodne z uzyskanymi wynikami, sugerującymi rolę HAS w migracji leukocytów do błony śluzowej macicy klaczy. W poprzednich badaniach wykazano wyższą transkrypcję *HAS 1* w błonie śluzowej macicy z endometrozją w początkowym stadium zaawansowania choroby, podczas gdy transkrypcja *HAS 3* była wyższa we wszystkich stopniach zaawansowania endometrozy w porównaniu z prawidłową błoną śluzową macicy (Domino i wsp., 2020). Co więcej, nie stwierdzono różnic w poziomie transkrypcji *HAS 2* w prawidłowej i objętej endometrozją błonie śluzowej macicy, z wyjątkiem aktywnego-niszczącego typu histologicznego endometrozy w FLP

(Jasiński i wsp., 2021). Uzyskane wyniki wskazują na odmienne zaangażowanie poszczególnych HAS w patogenezę zapalenia błony śluzowej macicy i endometrozy.

Uzyskane wyniki wskazują na brak udziału szlaków NF- κ B w regulacji migracji komórek zapalnych w błonie śluzowej macicy kłaczy. Wzrost transkrypcji badanych cytokin i enzymów nie jest zgodny z wynikami dotyczącymi podjednostek NF- κ B. Jest to ważne odkrycie, sugerujące, że synteza MCP-1, IL-6 i HAS w błonie śluzowej macicy kłaczy objętej zapaleniem nie jest regulowana przez szlak NF- κ B-zależny. Odmienne mechanizmy aktywacji transkrypcji tych samych cytokin w różnych procesach patologicznych w błonie śluzowej macicy mogą wskazywać na istnienie specyficznego szlaku regulującego nasilenie i typ endometrozy, ale nie zapalenia błony śluzowej macicy kłaczy. Uzyskane wyniki sugerują, że ocena transkrypcji białek z rodziny NF- κ B w błonie śluzowej macicy może w przyszłości stać się swoistym markerem degeneracji i zwłóknienia błony śluzowej w przebiegu endometrozy, który może okazać się przydatny w diagnostyce i prognostyce nasilenia procesu zwyrodnieniowego. Uzyskane wyniki są szczególnie istotne z punktu widzenia oczyszczania macicy po kryciu lub sztucznej inseminacji. Ograniczona w intensywności i czasie, ale obecna infiltracja komórek zapalnych umożliwia przygotowanie środowiska wewnątrzmacicznego do przyjęcia i utrzymania zarodka (Fumuso i wsp., 2003; Christoffersen i wsp., 2012; Skarżyński i wsp., 2020), co jest upośledzone u kłaczy podatnych na PBIE. Z tego względu potencjalne wykorzystanie inhibitorów NF- κ B do hamowania odkładania ECM (Tong i wsp., 2015; Caon i wsp., 2017; Chung i wsp., 2019) w błonie śluzowej macicy objętej endometrozą, może pozostać bez wpływu na prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego macicy, które jest kluczowe dla utrzymania płodności kłaczy, poprzez umożliwienie fizjologicznego oczyszczania macicy oraz regulację produkcji i uwalniania hormonów i cytokin w błonie śluzowej macicy (Skarzynski i wsp., 2020).

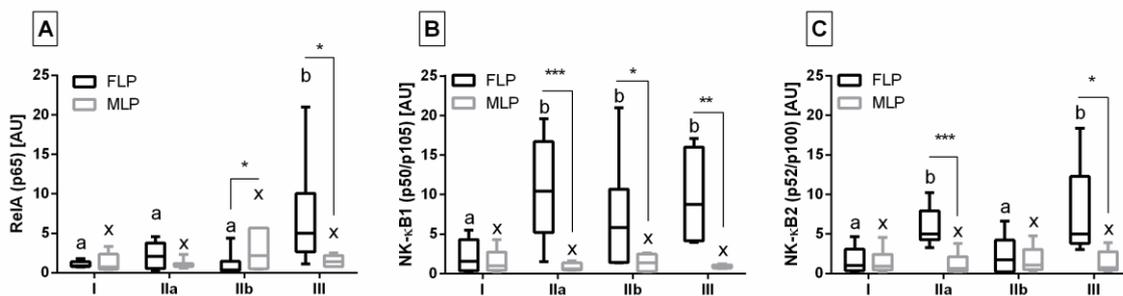
Ekspresja genów *RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy kłaczy z zapaleniem opisana jest w szczegółach w publikacji Jasiński i wsp. (2022a).

6.2. Transkrypcja *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy klaczy z endometriozą o różnym stopniu zaawansowania

Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, temat udziału szlaku zależnego od NF-κB w rozwoju endometriozy u klaczy został po raz pierwszy poruszony w publikacji Domino i wsp. (2020). Niezależnie od szeroko zakrojonych badań nad endometriozą u klaczy, mechanizm fizjopatologiczny związany z procesem włóknienia pozostaje nadal nieznanym (Rebordao i wsp., 2014a). Badania Rebordao i wsp. (2017, 2018, 2019) rzuciły nowe światło na aktywację endometriozy za pośrednictwem sygnałów generowanych na powierzchni komórek błony śluzowej macicy, potencjalną zdolność NET do indukowania zapalenia błony śluzowej macicy, do nasilania włóknienia okołogruzołowego (Rebordao i wsp., 2014a; Amaral i wsp., 2018; Rebordao i wsp., 2019) oraz na potencjalną rolę prostaglandyny E2 w hamowaniu włóknienia błony śluzowej macicy klaczy (Rebordao i wsp., 2017; Rebordao i wsp., 2019). Zarówno NET jak i prostaglandyny E2 są zaangażowane w reakcję zapalną indukowaną uszkodzeniem błony śluzowej macicy w odpowiedzi na obecność patogennych drobnoustrojów lub nasienia (Woodwar i wsp., 2013; Cadario, 2014; Amaral i wsp., 2018). W reakcji tej dochodzi do zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych i nacieku PMN do światła gruczołów, SC, i zrębu błony śluzowej macicy (Rebordao i wsp., 2014b; Rebordao i wsp., 2018). Ta i inne szybkie i skuteczne reakcje na zmiany w środowisku macicy wymagają zaangażowania szlaków sygnałowych, spośród których najważniejszym jest synteza nowych białek w odpowiedzi na zmianę wzorca transkrypcji genów (May i Ghosh, 1998). Taką rolę w wielu tkankach objętych zapaleniem (Lind i wsp., 2001; Umezawa, 2011) lub zwłóknieniem (Sosińska i wsp., 2016; Sun i wsp., 2019), pełni szlak sygnałowy zależny od NF-κB. Kanoniczny szlak aktywacji NF-κB jest zaangażowany głównie we wrodzoną odpowiedź immunologiczną i regulację nasilenia stanu zapalnego, podczas gdy niekanoniczny szlak aktywacji NF-κB bierze udział w dojrzewaniu, utrzymaniu i modulowaniu funkcji limfocytów B w mechanizmach nabytej odpowiedzi immunologicznej oraz w chorobach autoimmunologicznych (Umezawa, 2011).

W niniejszej pracy stwierdzono cechy aktywacji szlaków kanonicznego (*RelA/NF-κB1*) i niekanonicznego (*NF-κB2*) w przypadku łagodnej endometriozy (kategoria IIa). Jednak pełna aktywacja wydaje się następować w przypadku ciężkiej endometriozy (kategoria III), gdy poziom transkrypcji obu heterodimerów w szlakach kanonicznym i niekanonicznym jest najwyższy (rycina 5). Opisane zmiany we wzorze transkrypcji białek

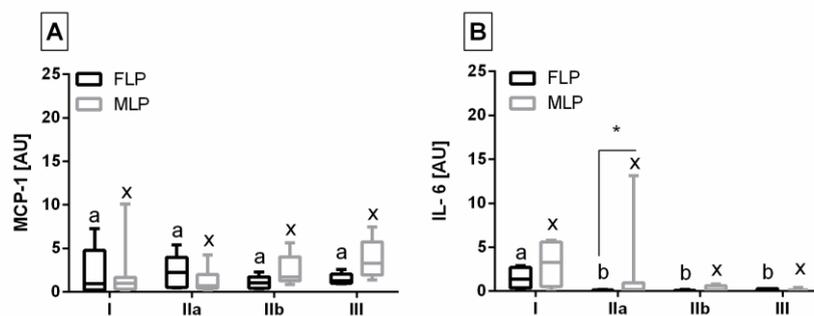
rodziny NF- κ B stwierdzono tylko w FLP, co sugeruje zależny od jajnikowych hormonów steroidowych szlak zwłóknienia błony śluzowej macicy kłaczy. Zarówno odpowiedzi ECM błony śluzowej macicy na poszczególne proteazy NET, jak i upośledzenie wytwarzania prostaglandyny E2 mogą odgrywać rolę w okołogruczołowym odkładaniu włókien tkanki łącznej (Rebordao i wsp., 2019), zależnie od fazy cyklu jajnikowego i silniej w FLP (rycina 5). Rebordao i wsp. (2019) wykazali, że błona śluzowa macicy w FLP może być bardziej podatna na włóknienie w odpowiedzi na działanie bodźców profibrotycznych, ze względu na zmniejszoną zdolność do syntezy mediatorów antyfibrotycznych.



Rycina 5. Poziomy transkrypcji *RelA* (A), *NF- κ B1* (B) oraz *NF- κ B2* (C) w błonie śluzowej macicy kłaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy do kategorii I, kategorii IIa, kategorii IIb lub kategorii III. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$. Gwiazdki wskazują różnice między fazami cyklu jajnikowego (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

Spośród badanych indukowalnych transkrypcji genów docelowych zależnych od NF- κ B, transkrypcja *MCP-1* wydaje się mieć mniejsze znaczenie w patogenezie endometrozy niż transkrypcja *IL-6* (rycina 6). Ponieważ MCP-1 jest mediatorem profibrotycznym w przypadku uszkodzenia komórek nabłonka płuc (Moor i wsp., 2003), można zasugerować odmienny szlak fibrogenyzy w płucach i macicy. MCP-1 wykazuje najsilniejsze działanie chemotaktyczne wobec monocytów i limfocytów T (Rollins, 1996), promuje migrację monocytów obwodowych do miejsca objętego zapaleniem oraz indukuje dalszą chemotaksję i rekrutację monocytów (Viedt i wsp., 2002b). Poza wpływem na monocyty, MCP-1 aktywuje dwa różne szlaki sygnałowe w ścianie naczyń krwionośnych: pierwszy prowadzący do uwolnienia prozapalnej cytokiny IL-6 oraz drugi prowadzący

do odpowiedzi proliferacyjnej (Viedt i wsp., 2002a; Viedt i wsp., 2002b). Brak różnic w poziomie transkrypcji *MCP-1* (rycina 6A) i jednocześnie obniżenie poziomu transkrypcji *IL-6* w próbkach objętych zwłóknieniem (kategorie IIa, IIb, III) w stosunku do prawidłowej błony śluzowej macicy (rycina 6B), sugeruje niezależny od MCP-1 szlak działania IL-6. Zmniejszenie poziomu transkrypcji *IL-6* może być związane z aktywacją niekanonicznego szlaku NF- κ B, istotnego w przypadku łagodnego zwłóknienia. IL-6 reguluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych i innych cytokin (Ikeda i wsp., 1993; Viedt i wsp., 2002b), potencjalnie nasilając reakcję zapalną oraz stymuluje limfocyty T. Limfocyty T mogą wspólnie z PMN brać udział w aktywacji NET (Fuchs i wsp., 2007; Rebordao i wsp., 2019), które mogą przyczyniać się do progresji endometrozy (Chrysanthopoulou i wsp., 2014; Rebordao i wsp., 2014a). Z drugiej strony, zmniejszona transkrypcja *IL-6*, a co za tym idzie zmniejszona produkcja IL-6 może ograniczać stan zapalny błony śluzowej macicy. Na uwagę zasługuje fakt, że zmniejszoną transkrypcję *IL-6* stwierdzono również w błonie śluzowej kłaczy podatnych na PBIE (Woodwar i wsp., 2013), jednak rola IL-6 w patogenezie endometrozy wymaga dalszych badań.

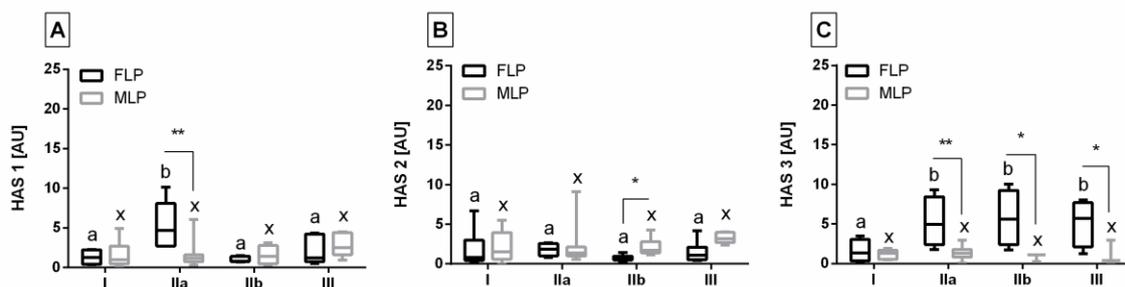


Rycina 6. Poziomy transkrypcji *MCP-1* (A) oraz *IL-6* (B) w błonie śluzowej macicy kłaczy w FLP i MLP. Próbkę błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy do kategorii I, kategorii IIa, kategorii IIb lub kategorii III. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$. Gwiazdki wskazują różnice między fazami cyklu jajnikowego (* $p < 0,05$).

Różnice w poziomie transkrypcji *HAS 1* i *HAS 3* obserwowane w FLP w błonie śluzowej macicy z łagodną endometrozą (kategoria IIa) sugerują, że szlaki aktywacji *HAS 1* (rycina 7A) i *HAS 3* (rycina 7C) mogą modulować fibrogenzę poprzez zmiany

w proporcjach składników ECM. Zwiększona synteza i degradacja składników ECM jest charakterystyczna dla przewlekłego zapalenia błony śluzowej macicy i włóknienia (Ohkawa i wsp., 1990).

W zdrowej błonie śluzowej macicy głównym składnikiem ECM jest kolagen typu III, który w miarę nasilania się endometrozy jest stopniowo zastępowany przez kolagen typu I (Rebordao i wsp., 2018). Również HA, będący główną makrocząsteczką ECM, podlega dynamicznej regulacji podczas stanu zapalnego (Ohkawa i wsp., 1990). Pomimo obserwowanej początkowo zwiększonej transkrypcji zarówno HAS 1 i HAS 3 w kategorii IIa endometrozy, różnice w kategoriach IIb i III wykazano jedynie dla transkrypcji HAS 3. Jednocześnie nie stwierdzono różnic w poziomie transkrypcji HAS 2 w zależności zarówno od stopnia zaawansowania endometrozy jak i fazy cyklu jajnikowego (rycina 7B). HAS 2 promuje syntezę HA o wyższej masie cząsteczkowej niż HAS 1 (w zakresie $>2 \times 10^6$ Da) (Itano i wsp., 1999), natomiast HAS 3 promuje syntezę HA o niskiej masie cząsteczkowej ($1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Da) (Fouladi-Nashta i wsp., 2017). W umiarkowanej i ciężkiej endometrozie można podejrzewać akumulację lekkiego HA, jednak rzeczywista produkcja HA o określonej masie cząsteczkowej wymaga dalszych badań na poziomie białkowym. Na tym etapie badań można jedynie zasugerować, że zwiększona synteza HA o niskiej masie cząsteczkowej powoduje zmiany w składzie makrocząsteczkowym ECM, co może prowadzić do utraty odporności błony śluzowej macicy na rozciąganie, jak ma to miejsce podczas porodu (Akgul i wsp., 2014). Biologiczna rola HA o niskiej masie cząsteczkowej wiąże się z efektami prozapalnymi, angiogennymi i antyapoptotycznymi, ułatwiającymi interakcję komórka-komórka, proliferację komórek i sygnalizację za pośrednictwem receptorów HA (Matou-Nasri i wsp., 2009; Fouladi-Nashta i wsp., 2017), dlatego rola HA w patogenezie endometrozy wymaga dalszych badań. W niniejszych badaniach wykazano wzrost poziomu transkrypcji *HAS 3* i *NF-κB1* w równoważnych kategoriach endometrozy w tej samej fazie cyklu jajnikowego, co może sugerować wspólny szlak regulacyjny. Jakkolwiek zaobserwowana koincydencja wymaga dalszych badań, jest ona zgodna z wynikami badań prowadzonych na ludzkich miofibroblastach płucnych, w których wykryto znaczny wzrost produkcji HA o niskiej masie cząsteczkowej w wyniku zwiększonej aktywności *HAS 3* aktywowanej przez szlak kanoniczny NF-κB (Ohkawa i wsp., 1990).

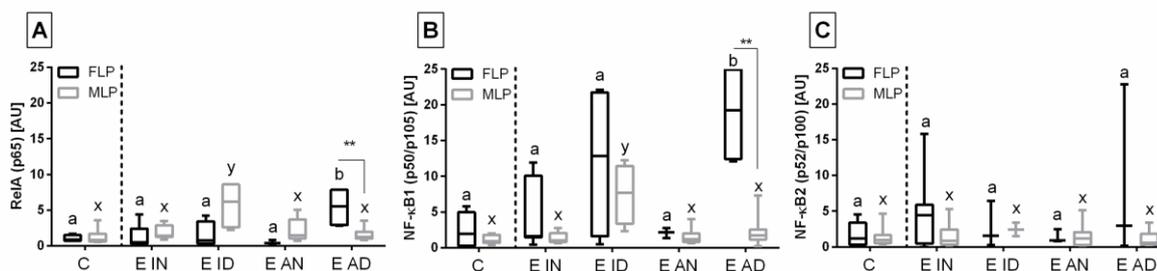


Rycina 7. Poziomy transkrypcji *HAS1* (A), *HAS2* (B) oraz *HAS3* (C) w błonie śluzowej macicy klaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy do kategorii I, kategorii IIa, kategorii IIb lub kategorii III. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$. Gwiazdki wskazują różnice między fazami cyklu jajnikowego (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Ekspresja genów *RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą o różnym stopniu zaawansowania opisana jest w szczegółach w publikacji Domino i wsp. (2020).

6.3. Transkrypcja *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą o różnych typach histologicznych

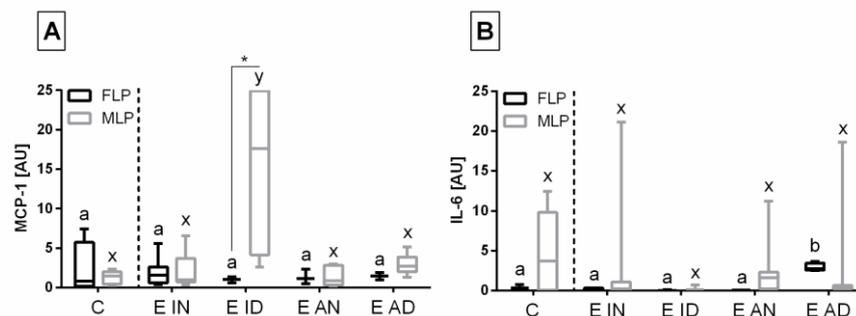
W niniejszej pracy stwierdzono istotne różnice w transkrypcji kilku genów, *RelA* (rycina 8A), *NF-κB1* (rycina 8B), *MCP-1* (rycina 9A), *IL-6* (rycina 9B) i *HAS 2* (rycina 10B), w próbkach błony śluzowej objętej niszczącą endometrozą (AD, ID). W dotychczasowych badaniach ten typ endometrozy wykazywał cechy większej modyfikacji ECM niż nieniszcząca endometroza (AN, IN), zwłaszcza w zakresie wzrostu ekspresji proteoglikanów, fibronektyny i lamininy (Kenney i Doig, 1986; Hoffmann i wsp., 2009b). Na podstawie uzyskanych wyników można ostrożnie sugerować, że w tym specyficznym, niszczącym typie endometrozy obserwowane poważne zmiany ECM, takie jak okołogruzołowe włóknienie zrębu, mogą być związane z aktywacją szlaku NF-κB-zależnego. Warto zwrócić uwagę na fakt, że niszcząca endometroza zmniejsza płodność klaczy w większym stopniu niż nieniszcząca, dlatego w przyszłych badaniach należy wziąć pod uwagę aktywację szlaku NF-κB zależnego jako czynnik ograniczający możliwości utrzymania ciąży (Kenney i Doig, 1986).



Rycina 8. Poziomy transkrypcji *RelA* (A), *NF-κB1* (B) oraz *NF-κB2* (C) w błonie śluzowej macicy klaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od typu histologicznego endometrozy do typu IN, typu ID, typu AN lub typu AD. Grupa C przedstawia próbki kontrolne. Linia przerywana oddziela próbki kontrolne i próbki z endometrozą. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$. Gwiazdki wskazują różnice między fazami cyklu jajnikowego (** $p < 0,01$).

W poprzednich badaniach (Domino i wsp., 2020) wykazano cechy aktywacji szlaków kanonicznego (*RelA*, *NF-κB1*) i niekanonicznego (*NF-κB2*) w próbkach błony śluzowej

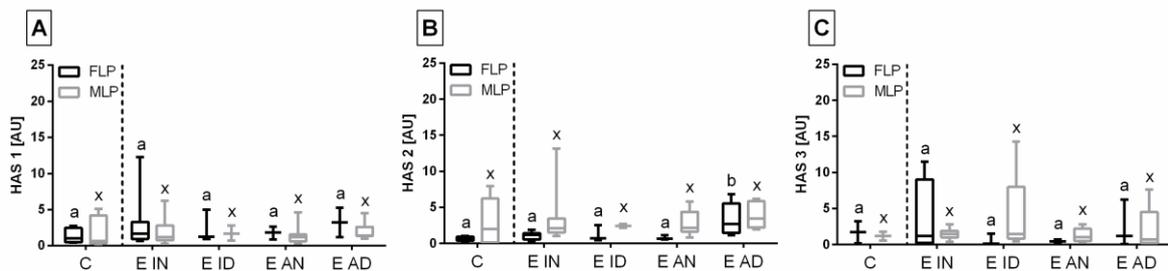
macicy pobranych w FLP. Transkrypcja *RelA*, *NF-κB1* i *NF-κB2* rosła wraz ze stopniem zaawansowania endometrozy. Jednak biorąc pod uwagę również typy histologiczne endometrozy, główne różnice w transkrypcji badanych genów dotyczyły kanonicznego szlaku aktywacji (rycina 8A i 8B). W dotychczasowych badaniach wykazano, że szlak ten jest koaktywowany przez $TNF\alpha$, biorący udział w patogenezie endometrozy i indukujący przemianę fibroblastów w miofibroblasty (Brasier, 2010; Szóstek-Mioduchowski i wsp., 2020). Zwiększona ekspresja $TNF\alpha$ w błonie śluzowej macicy może być związana ze wzrostem ekspresji białek rodziny NF-κB. Zaobserwowano ponadto koincydencję cech aktywacji kanonicznego szlaku NF-κB oraz zwiększonej transkrypcji *MCP-1* (rycina 9A), silnego czynnika zwiększającego infiltrację monocytów. Co ciekawe, monocyty są głównymi producentami $TNF\alpha$ (Brasier, 2010), zatem mechanizm ten może działać w cyklu sprzężenia zwrotnego dodatniego.



Rycina 9. Poziomy transkrypcji *MCP-1* (A) oraz *IL-6* (B) w błonie śluzowej macicy kłaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od typu histologicznego endometrozy do typu IN, typu ID, typu AN lub typu AD. Grupa C przedstawia próbki kontrolne. Linia przerywana oddziela próbki kontrolne i próbki z endometrozą. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$. Gwiazdki wskazują różnice między fazami cyklu jajnikowego (* $p < 0,05$).

Wzrost poziomu transkrypcji *RelA* odnotowano w E AD w FLP i w E ID w MLP (rycina 8A), podobnie jak wzrost poziomu transkrypcji *NF-κB1* (rycina 8B). Ponadto stwierdzono wzrost poziomu transkrypcji *MCP-1* w E ID w MLP (rycina 9A) oraz wzrost poziomu transkrypcji *IL-6* w E AD w FLP (rycina 9B), co sugeruje, że regulacja transkrypcji tych genów jest zależna nie tylko od typu histologicznego endometrozy, ale także od fazy cyklu jajnikowego. Biorąc pod uwagę stopień zaawansowania endometrozy, poziom

transkrypcji *IL-6* był istotnie niższy w FLP w próbkach objętych endometrozją niż w prawidłowej błonie śluzowej macicy (Domino i wsp., 2020). Wyniki uzyskane zarówno w odniesieniu do stopnia zaawansowania endometrozy jak i typu histologicznego, sugerują, że zmiany transkrypcji badanych genów indukowane przez szlak kanoniczny NF- κ B są zależne od cyklu jajnikowego. Uzyskane wyniki mogą również sugerować, że aktywność metaboliczna fibroblastów w błonie śluzowej macicy kłaczy może zależeć od wrażliwości tkanki na działanie steroidów jajnikowych oraz stężenia obwodowego kluczowych hormonów. Biorąc pod uwagę nieprawidłową ekspresję ER i PR w błonie śluzowej macicy z endometrozją (Kenney i Doig, 1986; Hoffmann i wsp., 2009b; Schöniger i Schoon, 2020), hormonozależna regulacja aktywacji szlaków NF- κ B zależnych w przebiegu endometrozy wymaga dalszych badań.



Rycina 10. Poziomy transkrypcji *HAS1* (A), *HAS2* (B) oraz *HAS3* (C) w błonie śluzowej macicy kłaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od typu histologicznego endometrozy do typu IN, typu ID, typu AN lub typu AD. Grupa C przedstawia próbki kontrolne. Linia przerywana oddziela próbki kontrolne i próbki z endometrozją. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$.

Wśród syntaz hialuronianu, jedynie w odniesieniu do transkrypcji *HAS 2* stwierdzono istotne różnice zależne od typu histologicznego endometrozy. Stwierdzono wzrost poziomu ekspresji *HAS 2* w E AD w FLP (rycina 10B), oraz wzrost transkrypcji *RelA* (rycina 8A). Obserwowana koincydencja sugeruje związek między *HAS 2* i *RelA* biorący udział w patogenezie endometrozy. W dotychczasowych badaniach uwzględniających stopień zaawansowania endometrozy, wykazano wzrost poziomu transkrypcji *HAS 3* w próbkach błony śluzowej pobranych w FLP (Domino i wsp., 2020). Różnica w transkrypcji omawianych genów tylko w FLP po raz kolejny wskazuje na rolę steroidowych hormonów

jajnikowych w patogenezie endometrozy (Rebordao i wsp., 2018). Ponadto Ohkawa i wsp. (1999) wykazali, że RelA pośredniczy w syntezie HA przez fibroblasty po stymulacji ze strony TNF α . Można więc ostrożnie sugerować, że podobny mechanizm ma miejsce w przypadku aktywnej-niszczącej endometrozy, jednak hipoteza ta wymaga dalszych badań z uwzględnieniem transkrypcji TNF α .

Ponieważ NF- κ B stymuluje odkładanie ECM w różnych tkankach (May i Ghosh, 1998; Lind i wsp., 2001; Brasier, 2010; Umezawa, 2011; Ahn i wsp., 2012; Sosińska i wsp., 2016), można ostrożnie zasugerować, że ilościowa ocena poziomu transkrypcji *RelA*, *NF- κ B1* i *MCP-1* może być w przyszłości wykorzystana do oceny stopnia nasilenia oraz typu histologicznego endometrozy. Podobne próby kwantyfikacyjne przeprowadzono dotychczas z umiarkowanym powodzeniem z wykorzystaniem następujących biomarkerów: uterokaliny, uteroferryny, uteroglobiny i kalbindyny (Hoffmann i wsp., 2009a). Uzyskane wyniki mogą być pomocne w klasyfikacji endometrozy oraz w klinicznym prognozowaniu rozwoju choroby. Niezbędne są jednak dalsze badania nad powtarzalnością oznaczeń, możliwościami kwantyfikacyjnymi oraz oceną zmian gruczołów błony śluzowej macicy i okołogruzołowego włóknienia zrębu w odniesieniu do aktywacji szlaku kanonicznego NF- κ B. Ponieważ w niniejszych oraz poprzednich (Domino i wsp., 2020) badaniach wykazano i potwierdzono cechy aktywacji szlaku NF- κ B w przebiegu endometrozy, zasadna jest kontynuacja badań nad potencjalnymi możliwościami zahamowania rozwoju choroby. Należy zwrócić uwagę, że inhibitory NF- κ B są z powodzeniem wykorzystywane w hamowaniu odkładania się ECM w tkankach (Tong i wsp., 2015; Caon i wsp., 2017; Chung i wsp., 2019), co mogłoby znaleźć zastosowanie praktyczne w leczeniu endometrozy kłaczy.

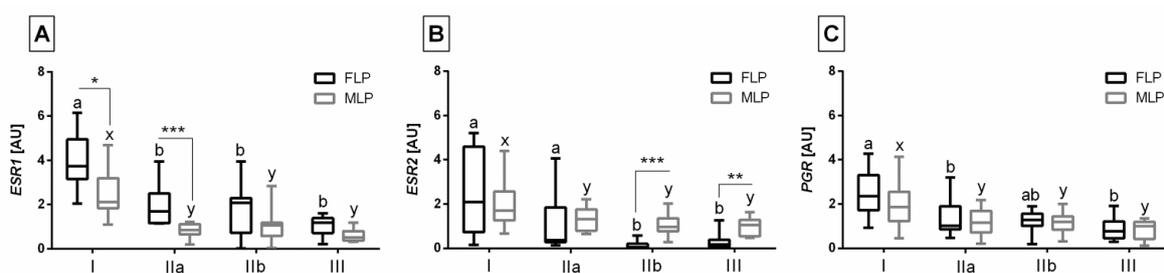
Ekspresja genów *RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy kłaczy z endometrozą o różnych typach histologicznych opisana jest w szczegółach w publikacji Jasiński i wsp. (2021).

6.4. Transkrypcja *ESR1*, *ESR2* i *PGR* w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą o różnym stopniu zaawansowania i różnych typach histologicznych w odniesieniu do transkrypcji *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3*

W porównaniu z prawidłową błoną śluzową macicy, stwierdzono spadek poziomu transkrypcji *ESR1* (rycina 11A), *ESR2* (rycina 11B) i *PGR* (rycina 11C) wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania endometrozy, chociaż dla *ESR2* spadek ten rozpoczął się od kategorii IIb. Uzyskane wyniki dotyczące *ESR1* i *PGR* są zgodne z ustaleniami Hoffmana i wsp. (2009b), którzy opisali spadek ekspresji białek dla jajnikowych receptorów steroidowych w przebiegu endometrozy oraz z badaniami Lehmana i wsp. (2011), którzy wykazali zmniejszenie intensywności barwienia ER- α i PR w komórkach zrębu obecnych w obszarach zwłóknienia okołogruzołowego. Biorąc pod uwagę typy histologiczne endometrozy, stwierdzono niższy poziom transkrypcji *ESR1* (rycina 12A), *ESR2* (rycina 12B) i *PGR* (rycina 12C) w nieaktywnym i aktywnym typie niszczącej endometrozy w porównaniu ze zdrową błoną śluzową macicy. Co więcej, nie stwierdzono różnic w poziomie transkrypcji *ESR1* w nieaktywnym i aktywnym typie nieniszczącej endometrozy, co jest zgodne z wcześniejszymi ustaleniami dotyczącymi włóknienia zrębu błony śluzowej macicy klaczy (Hoffman i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011). W dotychczasowych badaniach stwierdzono wzrost ekspresji ER- α i PR w aktywnym-nieniszczącym typie endometrozy, jedynie w nabłonku gruczołowym, a nie w komórkach zrębu (Hoffman i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011).

Mając na uwadze domniemany wpływ endometrozy na ekspresję ER- α (Hoffman i wsp., 2009b), wyniki uzyskane w niniejszym badaniu sugerują związek między niszczącą endometrozą a transkrypcją zarówno *ESR1*, jak i *ESR2*. Jednak dokładna kinetyka i chronologia zdarzeń w patogenezie włóknienia okołogruzołowego i zaburzeniach ekspresji jajnikowych receptorów steroidowych w błonie śluzowej macicy klaczy pozostaje nieznana. Warto zauważyć, że poczynione obserwacje są zgodne z badaniami Hoffman'a i wsp. (2009b), w których najpoważniejszy spadek ekspresji ER- α i PR zaobserwowano w przebiegu niszczącej endometrozy. Należy zwrócić uwagę na fakt, że zarówno zespół Hoffman'a (2009b) jak i Lehmann'a (2011) nie badał ekspresji ER- β . Dlatego też zgodnie z moją najlepszą wiedzą niniejsza praca (Jasiński i wsp., 2022b) jest pierwszym doniesieniem omawiającym poziom transkrypcji *ESR2* w błonie śluzowej macicy klaczy w zależności od stopnia zaawansowania i typów histologicznych endometrozy. Chociaż

w dotychczasowych badaniach (Hoffman i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011) wykonywano badania immunohistochemiczne, w niniejszej pracy oceniano jedynie poziom transkrypcji wybranych genów. Ponieważ transkrypty tylko częściowo wyjaśniają zmiany stężenia białek obecne w tkance (De Sousa i wsp., 2009), a produkcja i degradacja mRNA i białek może być regulowana na wielu etapach biosyntezy białek (Vogel i Marcotte, 2013), część różnic między ekspresją tkankową i molekularną można uzasadnić potencjalną regulacją potranskrypcyjną.



Rycina 11. Poziomy transkrypcji *ESR1* (A), *ESR2* (B) oraz *PGR* (C) w błonie śluzowej macicy klaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy do kategorii I, kategorii IIa, kategorii IIb lub kategorii III. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$. Gwiazdki wskazują różnice między fazami cyklu jajnikowego (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

Należy zwrócić uwagę, że czynnościowa morfologia błony śluzowej macicy, dotycząca proliferacji i sekrecji, jest zgodna z FLP i MLP cyklu jajnikowego (Schoon i Schoon, 1992; Schöniger i Schoon, 2020). Dlatego zarówno w przypadku zdrowej błony śluzowej macicy (Watson i wsp., 1992; Da Costa i wsp., 2009) jak i z endometrozą, proliferację i apoptozę komórek należy rozpatrywać w dwóch fazach: proliferacji zrębu w FLP i proliferacji nabłonków w MLP. Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, poziomy transkrypcji jajnikowych receptorów steroidowych w poszczególnych kategoriach i typach histologicznych endometrozy nie zostały dotychczas porównane pomiędzy fazami cyklu jajnikowego.

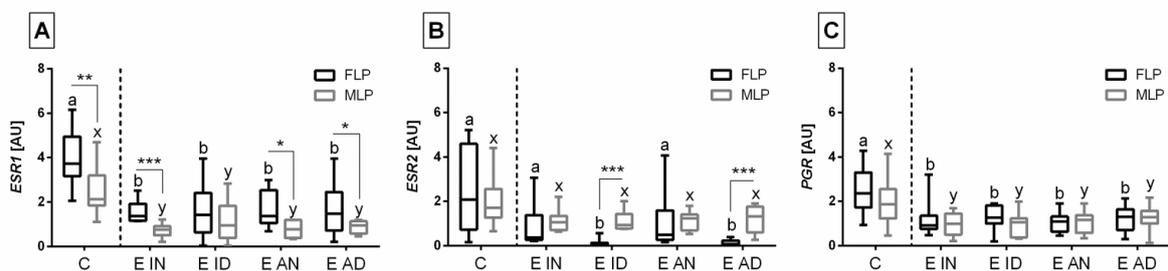
W prawidłowej błonie śluzowej macicy transkrypcja *ESR1* (rycina 11A i 12A) była wyższa w FLP niż w MLP w przeciwieństwie do transkrypcji *ESR2* (rycina 11B i 12B) i *PGR* (rycina 11C i 12C), która była podobna w obu fazach. Chociaż transkrypcja *ESR1*

obserwowana w tym badaniu jest zgodna z doniesieniami Silva i wsp. (2014) oraz Hartt'a i wsp. (2005), poziom transkrypcji *PGR* jest częściowo odmienny. W części dotychczasowych badań wykazano wyższą transkrypcję *PGR* w FLP niż w MLP (McDowell i wsp., 1999; Hartt i wsp., 2005; Gebhardt i wsp., 2012), w innych nie stwierdzono przytaczanych różnic (Silva i wsp., 2014). Uzyskane wyniki dotyczące transkrypcji *ESR2* są zbieżne z doniesieniem Silvy i wsp. (2014), które jest jednym z nielicznych badań omawiającym zależność pomiędzy cyklem jajnikowym a transkrypcją *ESR2* w błonie śluzowej macicy kłaczy. Przytaczane rozbieżności w dotychczasowych i aktualnych wynikach można tłumaczyć różnicami w zastosowanej metodyce badawczej (McDowell i wsp., 1999; Hartt i wsp. 2005; Honnens i wsp., 2011; Gebhardt i wsp., 2012; Silva i wsp., 2014), z pośród których metodyka Silvy i wsp. (2014) była najbardziej zbliżona do tej wykorzystanej w niniejszej pracy.

W porównaniu do prawidłowej błony śluzowej macicy, stwierdzono spadek poziomów transkrypcji *ESR1* (rycina 11A), *ESR2* (rycina 11B) i *PGR* (rycina 11C) wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania endometrozy w obydwu badanych fazach cyklu jajnikowego. Jedyne dwa wyjątki dotyczyły poziomu transkrypcji *ESR2* w kategorii IIa i poziomu transkrypcji *PGR* w kategorii IIb w FLP dla której to fazy nie stwierdzono różnic w poziomach transkrypcji badanych genów pomiędzy kategorią I, a wskazaną. Ponadto różnice w poziomie transkrypcji *ESR1* między FLP i MLP, istotne w prawidłowej błonie śluzowej macicy (Hartt i wsp. 2005; Silva i wsp., 2014) i w przebiegu łagodnej endometrozy, stały się nieistotne w przebiegu umiarkowanej i ciężkiej endometrozy. Można ostrożnie zasugerować, że w prawidłowej błonie śluzowej macicy kłaczy, transkrypcja receptorów dla steroidowych hormonów jajnikowych jest zwiększana przez estradiol i zmniejszana przez progesteron (Watson i wsp., 1992; Aupperle i wsp., 2000; Hartt i wsp., 2005) i podatna na dysregulację w przebiegu endometrozy.

Biorąc pod uwagę badane typy histologiczne endometrozy w FLP i MLP, stwierdzono niższy poziom transkrypcji *ESR1* (rycina 12A) i *PGR* (rycina 12C) we wszystkich typach histopatologicznych endometrozy w porównaniu ze zdrową błoną śluzową macicy w obydwu badanych fazach cyklu jajnikowego. Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami Hoffman'a i wsp. (2009b) oraz wynikami immunohistochemicznymi uzyskanymi przez Lehamna'a i wsp. (2011) w komórkach zrębu. Różnice w transkrypcji *ESR1* między FLP i MLP, wykrywalne w prawidłowej błonie śluzowej macicy były nadal istotne zarówno w obydwu aktywnych typach endometrozy oraz nieaktywnym-nieniszczącym typie endometrozy, w przeciwieństwie do nieaktywnej-niszczącej endometrozy. Brak różnic w poziomie

transkrypcji *PGR* zarówno w prawidłowej jak i jakościowo zmienionej błonie śluzowej macicy może potwierdzać wcześniejszą hipotezę, że dysregulacja funkcji błony śluzowej macicy w patogenezie endometrozy jest zależna od ER, a nie od PR (Hoffman i wsp., 2009b). Co ciekawe, wykazano niższy poziom transkrypcji *ESR2* w FLP niż w MLP w obydwu niszczących typach endometrozy (rycina 12B), czego nie obserwowano w grupie kontrolnej ani w żadnym innym badanym typie histopatologicznym. Można zauważyć, że aktywacja ER- α i ER- β ma przeciwny wpływ na transkrypcję genów (Paech i wsp., 1997). Tak więc ER- β może ograniczać funkcje ER, ponieważ ER- β wykazuje aktywność hamującą względem transkrypcji ER- α (Hall i wsp., 1999) poprzez tworzenie heterodimerów z ER- α (Cowley i wsp., 1997; Pettersson i wsp., 1997). Można więc sugerować, że estrogeny wydzielane podczas FLP oddziałują zarówno na ER- α , jak i ER- β , powodując klasyczne działanie uterotroficzne zależne od ER- α i działanie hamujące ER- α zależne od ER- β (Weihua i wsp., 2000). W obydwu niszczących typach endometrozy, gdy transkrypcja *ESR2* jest istotnie niska, aktywność hamująca zależna od ER- β może być zmniejszona i pomimo braku wzrostu transkrypcji *ESR1*, końcowe działanie uterotroficzne zależne od ER- α może być nasilone.



Rycina 12. Poziomy transkrypcji *ESR1* (A), *ESR2* (B) oraz *PGR* (C) w błonie śluzowej macicy klaczy w FLP i MLP. Próbkki błony śluzowej macicy zostały sklasyfikowane w zależności od typu histologicznego endometrozy do typu IN, typu ID, typu AN lub typu AD. Grupa C przedstawia próbkki kontrolne. Linia przerywana oddziela próbkki kontrolne i próbkki z endometrozą. Wykresy pudełkowe reprezentują dolny kwartył, medianę i górny kwartył, podczas gdy wąsy reprezentują wartości minimalne i maksymalne. Małe litery wskazują na różnice między kategoriami endometrozy dla $p < 0,05$. Gwiazdki wskazują różnice między fazami cyklu jajnikowego (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

Na podstawie wcześniejszych (Aupperle i wsp., 2000) i niniejszych wyników można stwierdzić, że w obydwu niszczących typach endometrozy liczebność ER- α w podścielisku błony śluzowej macicy jest najwyższa w FLP. Przy podobnych fizjologicznych stężeniach estrogenów obwodowych charakterystycznych dla FLP, błona śluzowa macicy z wyższą ekspresją ER- α manifestuje silniejszy efekt tkankowy w postaci zależnej od estrogenów proliferacji komórkowej (Lubahn i wsp., 1993; Cunha i wsp., 2004). Taka aktywacja może wpływać na nadmierne różnicowanie zrębu i indukować interakcje zrąb-nabłonek (Aupperle i wsp., 2000), które są zaburzone w niszczącej endometrozie. W zdrowej błonie śluzowej macicy zrąb pośredniczy we wpływie steroidów jajnikowych na nabłonek gruczołowy (Pierro i wsp., 2001; Lehmann i wsp., 2011). W prawidłowej błonie śluzowej macicy nienaruszona błona podstawna nabłonka gruczołowego zapewnia złożoną interakcję parakrynną między nabłonkiem a leżącym poniżej zrębem (Arnold i wsp., 2001; Hoffman i wsp., 2009b). Ciągłość błony podstawnej hamuje bezpośrednią interakcję między komórkami zrębu, komórkami nabłonka gruczołowego i ECM. W niszczącej endometrozie, dochodzi do uszkodzenia błony podstawnej nabłonka gruczołowego (Klymkowsky i wsp., 1989; Hoffman i wsp., 2009a; Hoffman i wsp., 2009b) co pozwala na bezpośredni kontakt pomiędzy integrzynami powierzchni komórek nabłonka i składnikami ECM oraz między komórkami zrębu i nabłonka (Hoffman i wsp., 2009b). Dlatego też w niszczącej endometrozie, zmieniona ekspresja ER- α i PR w komórkach nabłonkowych (Hoffman i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011) oraz obniżona transkrypcja *ESR2* może mieć kluczowe znaczenie dla integralności blaszki podstawnej, prowadząc do zwyrodnienia ECM, rozszerzenia gruczołów macicznych i asynchronicznego różnicowania zajętych gruczołów (Hoffman i wsp., 2009b; Lehmann i wsp., 2011). Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu potwierdzają hipotezę Hoffman'a i wsp. (2009b) o zaawansowanym zróżnicowaniu komórek zrębu w ogniskach zwłóknienia. Hoffman i wsp. (2009b) sugeruje, że błona śluzowa macicy staje się niezależna od regulacji hormonalnej w cyklu jajnikowym, podczas gdy niniejsze badanie wskazuje, że asynchroniczne różnicowanie błony śluzowej macicy może być nadal zależne od cyklu jajnikowego i może też być spowodowane dysregulacją funkcji ER związaną z upośledzeniem aktywności ER- α i ER- β .

W badaniu Rebordao i wsp. (2018) zasugerowano, że patogeneza endometrozy może być związana z cyklem jajnikowym. Hipoteza ta została poparta wynikami poprzednich badań, w których wykazano hormonozależne różnice w transkrypcji genów szlaku NF- κ B w kolejnych stopniach zaawansowania (Domino i wsp., 2020) i typach histologicznych (Jasiński i wsp., 2021) endometrozy. Ponieważ NF- κ B stymuluje odkładanie ECM w różnych

tkankach (May i Ghosh, 1998; Brasier, 2010; Umezawa, 2011; Ahn i wsp., 2012; Sosińska i wsp., 2016) i pośredniczy w syntezie HA przez fibroblasty (Ohkawa i wsp., 1999), aktywacja cząsteczek prozapalnych zależna od szlaku NF- κ B może odgrywać istotną rolę w inicjacji i progresji włóknienia okołogruzołowego oraz zmianach interakcji między komórkami nabłonka gruczołowego a składnikami ECM (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021). Ponieważ w błonie śluzowej macicy kłaczy z endometrozją stwierdzono większą modyfikację ECM, zwłaszcza wzrost ekspresji proteoglikanów, fibronektyny i lamininy, zależącą bardziej od typu histopatologicznego niż stopnia zaawansowania endometrozy (Kenney i Doig, 1986; Hoffman i wsp., 2009b), Hoffman'a i wsp. (2009b) zasugerowałem aktywną przebudowę ECM w FLP. Koncepcja Hoffman'a i wsp. (2009b) jest zgodna z wynikami uzyskanymi w poprzednich badaniach zgodnie z którymi, tylko w FLP transkrypcje *RelA*, *NF- κ B1*, *IL-6* i *HAS2* były wyższe w aktywnym-niszczącym typie endometrozy niż w grupie kontrolnej (Domino i wsp., 2020). Korelacje wykazane w niniejszym badaniu (Jasiński i wsp., 2022a) potwierdzają hipotezę, że kanoniczny szlak NF- κ B zależny pośredniczy w patogenezie endometrozy zależnie od fazy cyklu jajnikowego (Domino i wsp., 2020; Jasiński i wsp., 2021), jednak kierunek zależności i kolokalizacja odpowiednich białek efektorowych w tkance wymagają dalszych badań.

Można jednak zasugerować, że aktywność metaboliczna fibroblastów w błonie śluzowej macicy kłaczy z endometrozją może również zależeć od dysregulacji pod wpływem steroidowych hormonów jajnikowych. Dlatego dalsze prace nad ustaleniem przydatności klinicznej inhibitorów NF- κ B w hamowaniu odkładania się ECM w tkankach (Schoon i Schoon, 1992; Tong i wsp., 2015; Caon i wsp., 2017; Chung i wsp., 2019) w tym błonie śluzowej macicy kłaczy, wymagają badań uwzględniających cykliczną zmienność i potencjalną dysregulację ze strony steroidów jajnikowych.

Ekspresja genów *ESR1*, *ESR2* i *PGR* w błonie śluzowej macicy kłaczy z endometrozją o różnym stopniu zaawansowania i różnych typach histologicznych w odniesieniu do ekspresji genów *RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* opisana jest w szczegółach w publikacji Jasiński i wsp. (2022b).

6.5. Podsumowanie

Podsumowując wyniki uzyskane w niniejszych badaniach opublikowanych w jednotematycznym cyklu prac należy stwierdzić że:

1. Transkrypcja *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2* i *HAS 1* nie zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy z zapaleniem w zależności od intensywności i rodzaju nacieku zapalnego. W błonie śluzowej macicy klaczy transkrypcja *MCP-1* i *IL-6* wzrastała wraz z nasileniem zapalenia, zwłaszcza w przypadku dominacji makrofagów w nacieku zapalnym. Wśród syntaz hialuronianu transkrypcja *HAS 2* i *HAS 3* wzrasta wraz z nasileniem zapalenia, prawdopodobnie zwiększając migrację i adhezję komórek zapalnych. Jednak produkcja *MCP-1*, *IL-6*, *HAS 2* i *HAS 3* nie jest regulowana przez szlak zależny od NF-κB, co sugeruje, że szlak ten nie jest zaangażowany w regulację zapalenia błony śluzowej macicy (Jasiński i wsp., 2022a).

2. Transkrypcja *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *IL-6* i *HAS 1-3* zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrią w zależności od stopnia zaawansowania endometrii co wskazuje na zaangażowanie szlaków zależnych od NF-κB w patogenezę endometrii. Aktywacja szlaków, zarówno kanonicznych jak i niekanonicznych, prowadzi do zmniejszenia transkrypcji *IL-6* i zwiększenia transkrypcji *HAS 1* i *HAS 3*, co może stymulować proliferację fibroblastów i nasilać sekrecję komponentów ECM z fibroblastów. Najistotniejsze zmiany transkrypcji genów docelowych zaobserwowano jedynie w fazie pęcherzykowej cyklu jajnikowego, co sugeruje hormonozależną aktywację badanych szlaku włóknienia (Domino i wsp., 2020).

3. Transkrypcja *RelA*, *NF-κB1*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 2* zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrią w zależności od typu histologicznego endometrii potwierdzając zaangażowanie szlaków zależnych od NF-κB w patogenezę endometrii. Aktywacja szlaku kanonicznego NF-κB wzrasta w obydwóch typach niszczącej endometrii, co wskazuje udział NF-κB w regulacji odkładania ECM i niszczenia błony podstawnej nabłonka gruczołowego. Transkrypcja *MCP-1* wzrasta w fazie pęcherzykowej w nieaktywnej-niszczącej endometrii, podczas gdy transkrypcja *IL-6* i *HAS 2* wzrasta w fazie środkowej

lutealnej w aktywnej-niszczącej endometriozy, co potwierdza hormonozależną aktywację badanych szlaku włóknienia (Jasiński i wsp., 2021).

4. Transkrypcja *ESR1*, *ESR2* i *PGR* zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą w zależności od stopnia zaawansowania oraz typu histologicznego endometriozy. Transkrypcja *ESR1* jest niższa w błonie śluzowej macicy z niszczącą i nieniszczącą endometrozą niż w zdrowej błonie śluzowej lecz nie spada wraz ze stopniem zaawansowania choroby. Transkrypcja *ESR2* i *PGR* jest niższa w błonie śluzowej macicy z niszczącą endometrozą niż w zdrowej błonie śluzowej lecz również nie spada wraz ze stopniem zaawansowania choroby. Transkrypcja *ESR1* i *ESR2* różni się pomiędzy fazą pęcherzykową i fazą środkową lutealną w poszczególnych kategoriach i typach histopatologicznych endometriozy co wskazuje na większy udział dysregulacji zależna od ER- α i ER- β niż desregulacje zależna od PR w patogenezie endometriozy (Jasiński i wsp., 2022b).

5. Transkrypcja *ESR1*, *ESR2* i *PGR* koreluje z transkrypcją *RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 1-3* w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą w zależności od stopnia zaawansowania oraz typu histologicznego endometriozy. Zarówno w fazie pęcherzykowej jak i fazie środkowej lutealnej wykazano umiarkowane i silne korelacje między transkrypcją *ESR1*, *ESR2* i *PGR* oraz *RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS 1*, *HAS 2* i *HAS 3*, zwłaszcza w obydwóch typach niszczącej endometriozy. Tym samym wykazano hormonozależną aktywację endometriozy, silniejszą w przypadku niszczącej endometriozy, w której pośredniczy kanoniczny szlak zależny od NF- κ B. Jednak szczegółowa zależność i kolokalizacja odpowiednich białek w błonie śluzowej macicy wymagają dalszych badań (Jasiński i wsp., 2022b).

7. Wnioski

1. Szlak zależny od NF- κ B nie jest zaangażowany w aktywując procesy zapalne w błonie śluzowej macicy kłaczy, którego nasilenie i rodzaj nacieku zapalnego regulują MCP-1, IL-6 i HAS 2-3 (Jasiński i wsp., 2022a);
2. Szlak kanoniczny i niekanoniczny zależny od NF- κ B jest zaangażowany w regulację stopnia zaawansowania endometrozy, poprzez hamowanie transkrypcji *IL-6* i nasilenie transkrypcji *HAS 1* i *HAS 3* (Domino i wsp., 2020);
3. Szlak kanoniczny zależny od NF- κ B jest zaangażowany w regulację typu histologicznego endometrozy, poprzez nasilenie transkrypcji *MCP-1*, *IL-6* i *HAS 2* odpowiednio w aktywnej- i nieaktywnej-niszczącej endometrozie (Jasiński i wsp., 2021);
4. Szlak kanoniczny i niekanoniczny zależny od NF- κ B bierze udział w hormonozależnej aktywacji endometrozy, silniej związanej z dysregulacją ER- α i ER- β niż dysregulacją PR. Wykazana hormonozależna aktywacja jest silniejsza w niszczącej endometrozie, w której patogenezie pośredniczy kanoniczny szlak zależny od NF- κ B, niż w nieniszczącej endometrozie (Jasiński i wsp., 2022b).

8. Piśmiennictwo

1. Ahn, B.N.; Song, M.H.; Kim, J.H.; Kim, K.H.; Park, K.K.; Choi, Y.S. Intra-peritoneal NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide decreases postoperative intra-abdominal adhesion. *Korean J. Obstet. Gynecol.* 2012, 55, 244–249.
2. Akgul, Y.; Word, R.A.; Ensign, L.M.; Yamaguchi, Y.; Lydon, J.; Hanes, J.; Mahendroo, M. Hyaluronan in cervical epithelia protects against infection-mediated preterm birth. *J. Clin. Invest.* 2014, 124, 5481e9.
3. Alekseevna, R.V.; Pavlovich, D.A.; Evgenievich, B.Y.; Viktorovich, N.S. Nuclear factor kappa B as a potential target for pharmacological correction endothelium-associated pathology. *Res. Res. Pharm.* 2017, 3, 114–124.
4. Amaral A.; Fernandes C.; Lukasik K.; Szóstek-Mioduchowska A.; Baclawska A.; Rebordao M.R.; Aguiar-Silva J.; Pinto-Bravo P.; Skarzynski D.J.; Ferreira-Dias G. Elastase inhibition affects collagen transcription and prostaglandin secretion in mare endometrium during the estrous cycle. *Reprod. Domest. Anim.* 2018, 53(S2), 66e9.
5. Aresu, L.; Benali, S.; Giannuzzi, D.; Mantovani, R.; Castagnaro, M.; Falomo, M.E. The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *J. of Vet. Sci.* 2012, 13, 171–177.
6. Arici, A.; Senturk, L. M.; Seli, E.; Bahtiyar, M.O.; Kim, G. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biol. Rep.* 1999, 61, 85–90.
7. Arjmand, M.H. The association between visceral adiposity with systemic inflammation, oxidative stress, and risk of post-surgical adhesion. *Arch. Physiol. Biochem.* 2020, 6, 1–6.
8. Arnold, J.T.; Kaufman, D.G.; Seppala, M.; Lessey, B.A. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: A new co-culture model. *Hum. Reprod.* 2001, 16, 836–845.
9. Atamas, S. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci.* 2002, 72, 631e43.
10. Aupperle, H.; Özgen, S.; Schoon, H.A.; Schoon, D.; Hoppen, H.O.; Sieme, H.; Tannapfel, A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Vet. J.* 2000, 32, 228–232.
11. 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.

12. Bischofberger, L.; Szewczyk, K.; Schoon, H.A. Unequal glandular differentiation of the equine endometrium—A separate endometrial alteration? *Pferdeheilkunde* 2019, 35, 304–315.
13. Brasier, A.R. The nuclear factor-kB–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* 2010, 86, 211–218.
14. Brunckhorst, D.; Schoon, H.A.; Bader, H.; Sieme, H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertilitat* 1991, 7, 44–51.
15. Cadario, M.E. Revisiting the diagnosis and the treatment options for an old problem: chronic and post-breeding endometritis in the mare. *Practitioner* 2014, 1, 21e5.
16. Caon, I.; Bartolini, B.; Moretto, P.; Parnigoni, A.; Carava, E.; Vitale, D.L.; Alaniz, L.; Viola, M.; Karousou, E.; De Luca, G.; et al. Sirtuin 1 reduces hyaluronan synthase 2 expression by inhibiting nuclear translocation of NF-kB and expression of the long-noncoding RNA HAS2–AS1. *J. Biol. Chem.* 2017, 295, 3485–3496.
17. Carnevale, E.M.; Ginther, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology* 1992, 37(5), 1101e15.
18. Celik, O.; Celik, E.; Turkcuoglu, I.; Yilmaz, E.; Ulas, M.; Simsek, Y.; Karaer, A.; Celik, N.; Aydin, N.E.; Ozerol, I.; Unlu, C. Surgical removal of endometrioma decreases the NF-kB1 (p50/105) and NF-kB p65 (Rel A) expression in the eutopic endometrium during the implantation window. *Reprod. Sci.* 2013, 20(7), 762e70.
19. Christoffersen, M.; Troedsson, M.H.T. Inflammation and fertility in the mare. *Reprod. Domest. Anim.* 2017, 52, 14–20.
20. Christoffersen, M.; Woodward, E.; Bojesen, A.M., Jacobsen; S., Petersen; M.R.; Troedsson, M.H.; Lehn-Jensen, H. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Vet. Res.* 2012, 8, 1–14.
21. 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. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J. Pathol.* 2014, 233, 294e307.
22. Chung, S.; Son, M.; Kim, M.; Koh, E.S.; Shin, S.J.; Park, C.W.; Kim, S.; Kim, H.S. Inhibition of p300/CBP-associated factor attenuates renal tubulointerstitial fibrosis through modulation of NF-kB and Nrf2. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1554.

23. Cooke, P.S.; Buchanan, D.L.; Young, P.; Setiawan, T.; Brody, J.; Korach, K.S.; Taylor, J.; Lubahn, D.B.; Cunha, G.R. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 6535–6540.
24. Cortes-Araya, Y.; Amilon, K.; Rink, B.E.; Black, G.; Lisowski, Z.; Donadeu, F.X.; Esteves, C.L. Comparison of antibacterial and immunological properties of mesenchymal stem/stromal cells from equine bone marrow, endometrium, and adipose tissue. *Stem. Cell. Dev.* 2018, 27(21), 1518e25.
25. Cowley, S.M.; Hoare, S.; Mosselman, S.; Parker, M.G. Estrogen Receptors α and β Form Heterodimers on DNA. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 19858–19862.
26. Cunha, G.R.; Cooke, P.S.; Kurita, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch. Histol. Cytol.* 2004, 67, 417–434.
27. Da Costa, R.R.; Ferreira-Dias, G.; Mateus, L.; Korzekwa, A.; Andronowska, A.; Platek, R.; Skarzynski, D.J. Endometrial nitric oxide production and nitric oxide synthases in the equine endometrium: Relationship with microvascular density during the estrous cycle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2007, 32, 287–302.
28. De Sousa Abreu, R.; Penalva, L.O.; Marcotte, E.; Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* 2009, 5, 1512–1526.
29. DeFranco, D.B. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol. Endocrinol.* 2002, 16, 1449–1455.
30. Dejban, P.; Nikravangolsefid, N.; Chamanara, M.; Dehpour, A.; Rashidian, A. The role of medicinal products in the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD) through inhibition of TLR4/NF-kappaB pathway. *Phytother. Res.* 2021, 35, 835–845.
31. di Zerega, G.S. Campeau, J.D. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum. Reprod. Update* 2001, 7, 547e55.
32. Domino, M.; Jasiński, 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.
33. Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjöld, M.; Gustafsson, J.A. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1997, 82, 4258–4265.
34. Ersahin, A.; Acet, M.; Acet, T.; Yavuz, Y. Disturbed endometrial NF- κ B expression in women with recurrent implantation failure. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2016, 20(24), 5037e40.

35. Fouladi-Nashta, A.A.; Raheem, K.A.; Marei, W.F.; Ghafari, F.; Hartshorne, G.M. Regulation and roles of the hyaluronan system in mammalian reproduction. *Reproduction* 2017, 153(2), R43e58.
36. Fuchs, T.A.; Abed, U.; Goosmann, C.; Hurwitz, R.; Schulze, I.; Wahn, V.; Weinrauch, Y.; Brinkmann, V.; Zychlinsky, A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell. Biol.* 2007, 176:231e41.
37. Fumuso, E.; Giguère, S.; Wade, J.; Rogan, D.; Videla-Dorna, I.; Bowden, R.A. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003, 96, 31–41.
38. Gebhardt, S.; Merkl, M.; Herbach, N.; Wanke, R.; Handler, J.; Bauersachs, S. Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium. *Biol. Reprod.* 2012, 87, 1–13.
39. Hall, J.M.; McDonnell, D.P. The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology* 1999, 140, 5566–5578.
40. Hartt, L.S.; Carling, S.J.; Joyce, M.M.; Johnson, G.A.; Vanderwall, D.K.; Ott, T.L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction* 2005, 130, 241–250.
41. Hedia, M.; Ibrahim, S.; Mahmoud, K.; Ahmed, Y.; Ismail, S.; El-Belely, M. Hemodynamic changes in cytokines, chemokines, acute phase proteins and prostaglandins in mares with subclinical endometritis. *Theriogenology* 2021, 171, 38–43.
42. 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* 2009a, 71, 264e74.
43. Hoffmann, C.; Ellenberger, C.; Mattos, R.C.; Aupperle, H.; Dhein, S.; Stief, B.; Schoon, H.A. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* 2009b, 111, 261e78.
44. Honnens, A.; Weisser, S.; Welter, H.; Einspanier, R.; Bollwein, H. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrus cycle in mares. *J. Reprod. Develop.* 2011, 57, 43–48.

45. Ikeda, U.; Ikeda, M.; Seino, Y.; Takahashi, M.; Kasahara, T.; Kano, S.; Shimada, K. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat vascular smooth muscle cells by pro-inflammatory cytokines. *Atherosclerosis* 1993, 104, 61e8.
46. Itano, N.; Sawai, T.; Yoshida, M.; Lenas, P.; Yamada, Y.; Imagawa, M.; Shinomura, T.; Hamaguchi, M.; Yoshida, Y.; Ohnuki, Y.; Miyauchi, S.; Spicer, A.P.; McDonald, J.A.; Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 25085e92.
47. Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Ferreira-Dias, G.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Domino M. Molecular mechanism of equine endometrosis: the NF- κ B-dependent pathway underlies the ovarian steroid receptors' dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 2022b, 23, 7360.
48. Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino M. Equine Endometrosis Pathological Features: Are They Dependent on NF- κ B Signaling Pathway? *Animals* 2021, 11, 3151.
49. Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino M. The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reprod. Domest. Anim.* 2022a, 57, 598–610.
50. Kao J.J. The NF-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate blocks IL-1beta induced hyaluronan synthase 1 (HAS1) mRNA transcription, pointing at NFkappaB dependence of the gene HAS1. *Exp. Gerontol.* 2006, 41(6), 641e7.
51. Katila, T.; Ferreira-Dias, G. Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals* 2022, 12, 779.
52. Kenney RM, Doig PA. Equine endometrial biopsy. In: *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment, and prevention of reproductive diseases in small and large animals*. Philadelphia: WB Saunders; 1986. p. 723e9.
53. Kenney R.M. Cyclic and pathological changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978, 72, 241e62.
54. Kessler, S.; Rho, H.; West, G.; Fiocchi, C.; Drazba, J.; De La Motte, C. Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clin. Transl. Sci.* 2008, 1, 57–61.
55. Klose, K., Schoon, H.A. Periglandular inflammatory cells in the endometrium of the mare—A physiological defence mechanism which impacts on the development of endometrosis. *Pferdeheilkunde* 2016, 32, 15–23.
56. Klymkowsky, M.W.; Bachant, J.B.; Domingo, A. Functions of intermediate filaments. *Cell Motil. Cytoskeleton* 1989, 14, 309–331.

57. Lehmann, J.; Ellenberger, C.; Hoffmann, C.; Bazer, F.W.; Klug, J.; Allen, W.R.; Sieme, H.; Schoon, H.A. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology* 2011, 76, 1326–1336.
58. Lind, D.S.; Hochwald, S.N.; Malaty, J.; Rekkas, S.; Hebig, P.; Mishra, G.; Moldawer, L.L. Copeland 3rd EM, Mackay S. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 2001, 130(2), 363e9.
59. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2011, 7, 684e96
60. Lubahn, D.B.; Moyer, J.S.; Golding, T.S.; Couse, J.F.; Korach, K.S.; Smithies, O. Alteration of reproduction function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 11162–11166.
61. Luo, L.; Li, D.H.; Li, X.P.; Zhang, S.C.; Yan, C.F.; Wu, J.F.; Qi, Y.H.; Zhao, J. Polymorphisms in the nuclear factor kappa B gene association with recurrent embryo implantation failure. *Genet. Mol. Res.* 2016, 15(2).
62. 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. Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PLoS ONE* 2014, 9, e97889.
63. Marth, C.D.; Firestone, S.M.; Hanlon, D.; Glenton, L.Y.; Browning, G.F.; Young, N.D.; Krekeler, N. Innate immune genes in persistent mating-induced endometritis in horses. *Reprod. Fertil. Dev.* 30, 533–545.
64. Matou-Nasri, S.; Gaffney, J.; Kumar, S.; Slevin, A. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and g-adducin. *Int. J. Oncol.* 2009, 35, 761e73.
65. May, M.J.; Ghosh, S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today* 1998, 19(2), 80e8.
66. McDowell, K.J.; Adams, M.H.; Adam, C.Y.; Simpson, K.S. Changes in equine endometrial oestrogen receptor and progesterone receptor mRNAs during the oestrus cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J. Reprod. Fertil.* 1999, 117, 135–142.
67. McKinnon, A.O. *Equine Reproduction, Second Edition*. Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner c_ 2011 Blackwell Publishing Ltd.

68. Minkwitz, C.; Schoon, H.A.; Zhang, Q.; Schöniger, S. Plasticity of endometrial epithelial and stromal cells-A new approach towards the pathogenesis of equine endometrosis. *Reprod. Dom. Anim.* 2019, 54, 835–845.
69. Moore, B.B.; Peters-Golden, M.; Christensen, P.J.; Lama, V.; Kuziel, W.A.; Paine 3rd, R.; Toews G.B. Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2003, 284, L342e9.
70. Morris, L.H.; McCue, P.M.; Aurich, C. Equine endometritis: A review of challenges and new approaches. *Reproduction* 2020, 160, R95–R110.
71. Mote, P.A.; Arnett-Mansfield, R.L.; Gava, N.; Defazio, A.; Mulac-Jericevic, B.; Conneely, O.M.; Clarke, C.L. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrus cycle. *Endocrinology* 2006, 147, 5503–5512.
72. Mulac-Jericevic, B.; Lydon, J.P.; Demayo, F.J.; Conneely, O.M. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 9744–9749.
73. Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha)* 2008, 53, 397–411.
74. Neely, D.P.; Kindahl, H.; Stabenfeldt, G.H.; Edqvist, L.E.; Hughes, J.P. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1979, 27, 181–9.
75. Oddsdóttir, C.; Smith, S.; Watson, E.D. Leukocyte distribution in the equine endometrium as a response to acute induced endometritis. *Pferdeheilkunde* 2008, 24, 66–70.
76. Ohkawa, T.; Ueki, N.; Taguchi, T.; Shindo, Y.; Adachi, M.; Amuro, Y.; Hada, T.; Higashino, K. Stimulation of hyaluronan synthesis by tumor necrosis factor α is mediated by the p50/p65 NF-kappa B complex in MRC-5 myofibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta* 1999, 1448(3), 416e24.
77. Overbeck, W.; Witte, T.S.; Heuwieser, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology* 2011, 75, 1311–1318.
78. Paech, K.; Webb, P.; Nisson, S.; Gustafsson, J.-Å.; Kushner, P.J.; Scanlan, S. Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER α and ER β at AP1 Sites. *Science* 1997, 177, 1508–1510.
79. Pascoe, R.R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1979, 27, 299–305.

80. Pettersson, K.; Grandien, K.; Kuiper, G.G.J.M.; Gustafsson, J.-Å. Mouse Estrogen Receptor β Forms Estrogen Response Element- Binding Heterodimers with Estrogen Receptor α . *Mol. Endocrinol.* 1997, 11, 1486–1496.
81. Pierro, E.; Minici, F.; Alesiani, O.; Miceli, F.; Proto, C.; Screpanti, I.; Lanzone, A. Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium. *Biol. Reprod.* 2001, 64, 831–838.
82. Rebordao, M.R.; Amaral, A.; Lukasik, K.; Szostek-Mioduchowska, A.; Pinto-Bravo, P.; Galvao, A.; Skarzynski, D.J.; Ferreira-Dias, G. Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology* 2018, 113, 8e18.
83. Rebordao, M.R.; Amaral, A.; Lukasik, K.; Szóstek-Mioduchowska, A.; Pinto-Bravo, P.; Galvao, A.; Skarzynski, D.J.; Ferreira-Dias, G. Impairment of the antifibrotic prostaglandin E2 pathway may influence neutrophil extracellular traps-induced fibrosis in the mare endometrium. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2019, 67, 1e10.
84. Rebordao, M.R.; Carneiro, C.; Alexandre-Pires, G.; Brito, P.; Pereira, C.; Nunes, T.; Galvao, A.; Leitao, A.; Vilela, C.; Ferreira-Dias, G. Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *J. Reprod. Immunol.* 2014b, 106, 41e9.
85. Rebordao, M.R.; Galvao, A.; Pinto-Bravo, P.; Pinheiro, J.; Gamboa, S.; Silva, E.; Mateus, L.; Ferreira-Dias, G. Endometrial prostaglandin synthases, ovarian steroids, and oxytocin receptors in mares with oxytocin-induced luteal maintenance. *Theriogenology* 2017, 87, 193e204.
86. Rebordao, M.R.; Galvao, A.; Szóstek, A.; Amaral, A.; Mateus, L.; Skarzynski, D.J.; Ferreira-Dias, G. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reprod. Domest. Anim.* 2014a, 49(S4), 82e7.
87. Rodriguez, H.I.; Stewart, A.J.; Wolfe, D.F.; Caldwell, F.J.; Harrie, M.; Whitley, E.M. Immunolocalization of the hyaluronan receptor CD44 in the reproductive tract of the mare. *Theriogenology* 2011, 75, 276e86.
88. Rollins, B.J. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* 1996, 2, 198e204.
89. Rovin, B.H.; Dickerson, J.A.; Tan, L.C.; Hebert, C.A. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1995, 48(4), 1263e71.

90. Schöniger, S.; Böttcher, D.; Theuß, T.; Gräfe, H.; Schoon, H.A. New insights into the innate immune defences of the equine endometrium: In situ and in vitro expression pattern of beta-defensin. *Pferdeheilkunde* 2016, 32, 4–14.
91. Schöniger, S.; Gräfe, H.; Richter, F.; Schoon, H.A. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 as transcript and protein in the healthy and diseased equine endometrium. *Res. Vet. Sci.* 2018a, 118, 278–287.
92. Schöniger, S.; Gräfe, H.; Schoon, H.A. Innate immunity mechanisms of the equine endometrium—Benefit or harm? *Pferdeheilkunde* 2018b, 34, 5–11.
93. Schöniger, S.; Schoon, H.A. The healthy and diseased equine endometrium: A review of morphological features and molecular analyses. *Animals* 2020, 10, 625.
94. Schoon, H.-A.; Schoon, D.; Klug, E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde* 1992, 8, 355–362.
95. Schoon, H.-A.; Wiegandt, I.; Schoon, D.; Aupperle, H.; Bartmann, C.-P. Functional disturbances in the endometrium of barren mares: A histological and immunohistological study. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2000, 56, 381–391.
96. Silva, E.S.M.; Scoggin, K.E.; Canisso, I.F.; Troedsson, M.H.T.; Squires, E.L.; Ball, B.A. Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 2014, 151, 169–181.
97. 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. Neutrophils, monocytes and other immune components in the equine endometrium: Friends or foes? *Theriogenology* 2020, 150, 150–157.
98. Son, Y.H.; Jeong, Y.T.; Lee, K.A.; Choi, K.H.; Kim, S.M.; Rhim, B.Y.; Kim, K. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2008, 51(1), 71e7.
99. Sosińska, P.; Baum, E.; Maćkowiak, B.; Staniszewski, R.; Jasiński, T.; Umezawa, K.; Bręborowicz, A. Inhibition of NF-kappaB with Dehydroxymethylepoxyquinomicin modifies the function of human peritoneal mesothelial cells. *Am. J. Transl. Res.* 2016, 8(12), 5756e65.
100. Stern, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur. J. Cell. Biol.* 2004, 83, 317e25.
101. Stewart, F.; Gerstenberg, C.; Suire, S.; Allen, W.R. Immunolocalization of a novel protein (P19) in the endometrium of fertile and subfertile mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2000, 56, 593–599.

102. Stuhlmeier, K.M. Effects of leflunomide on hyaluronan synthases (HAS): NF- κ B-independent suppression of IL-1-induced HAS1 transcription by leflunomide. *J. Immunol.* 2005, 174(11), 7376e82.
103. Sun, L.; Zhang, S.; Chang, Q.; Tan, J. Establishment and comparison of different intrauterine adhesion modelling procedures in rats. *Reprod. Fertil. Dev.* 2019.
104. Szóstek, A.Z.; Lukasik, K.; Galvao, A.M.; Ferreira-Dias, G.M.; Skarzynski, D.J. Impairment of the interleukin system in equine endometrium during the course of endometriosis. *Biol. Reprod.* 2013, 79, 1e13.
105. Szóstek-Mioduchowska, A.; Słowińska, M.; Pacewicz, J.; Skarzynski, D.J.; Okuda, K. Matrix metalloproteinase expression and modulation by transforming growth factor-1 in equine endometriosis. *Sci. Rep.* 2020, 10, 1119.
106. Szóstek-Mioduchowska, A.Z.; Lukasik, K.; Skarzynski, D.J.; Okuda, K. Effect of transforming growth factor-1 on α -smooth muscle actin and collagen expression in equine endometrial fibroblasts. *Theriogenology* 2019, 124, 9–17.
107. Tong, W.; Geng, Y.; Huang, Y.; Shi, Y.; Xiang, S.; Zhang, N.; Qin, L.; Shi, Q.; Chen, Q.; Dai, K.; et al. In vivo identification and induction of articular cartilage stem cells by inhibiting NF- κ B signaling in osteoarthritis. *Stem Cells* 2015, 33, 3125–3137.
108. Tripathi, P.; Aggarwal, A. NF- κ B transcription factor: A key player in the generation of immune response. *Curr. Sci.* 2006, 90, 519–531.
109. Umezawa, K. Possible role of peritoneal NF- κ B in peripheral inflammation and cancer: lessons from the inhibitor DHMEQ. *Biomed. Pharmacother.* 2011, 65(4), 252e9.
110. Viedt, C.; Dechend, R.; Fei, J.; Hansch, G.M.; Kreuzer, J.; Orth, S.R. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor- κ B and activating protein-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002a, 13(6), 1534e47.
111. Viedt, C.; Vogel, J.; Athanasiou, T.; Shen, W.; Orth, S.R.; Kübler, W.; Kreuzer, J. Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor- κ B and activator protein-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002b, 22(6), 914e20.
112. Vogel, C.; Marcotte, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 2012, 13, 227–232.
113. Walter, I.; Handler, J.; Miller, I.; Aurich, C. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometriosis. *Histol. Histopathol.* 2005, 20, 1105e13.

114. Walter, I.; Klein, M.; Handler, J.; Aurich, J.E.; Reifinger, M.; Aurich, C. Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *Am. J. Vet. Res.* 2001, 62, 840–845.

115. Watson, E.D.; Thomson, S.R.M. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Vet. J.* 1996, 28, 106–110.

116. Watson, E.D.; Skolnik, S.B.; Zanecosky, H.G. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology* 1992, 38, 575–580.

117. Weihua, Z.; Saji, S.; Makine, S.; Cheng, G.; Jensen, E.V.; Warner, M.; Gustafsson, J.A. Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 5936–5941.

118. Wilkenfeld, S.R.; Lin, C.; Frigo, D.E. Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions. *Steroids* 2018, 133, 2–7.

119. Woodward, E.M.; Christoffersen, M.; Campos, J.; Betancourt, A.; Horohov, D.; Scoggin, K.E.; Squires, E.L.; Troedsson, M.H. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction* 2013, 145, 289e96.

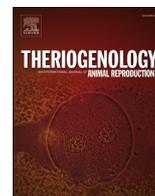
120. Xu, D.; Xiong, H.; Xiao, Z.; He, J.; Liao, Q.; Xue, L.; Wang, N.; Yang, Q. Uterine cytokine profile in a rat model of endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2015, 73, 214–220.

121. Yadav, A.; Saini, V.; Arora, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clin. Chim. Acta* 2010, 411, 1570–1579.

122. Zent, W.W.; Troedsson, M.H.T. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 1998; pp. 64–5.

9. Załączniki

9.1. Artykuły naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej



Expression of genes involved in the NF- κ B-dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium

Malgorzata Domino^a, Tomasz Jasinski^a, Ewa Kautz^a, Edyta Juszcuk-Kubiak^a, Graça Ferreira-Dias^b, Romuald Zabielski^a, Maria Sady^a, Zdzisław Gajewski^{a,*}

^a Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Veterinary Research Centre and Center for Biomedical Research, Warsaw University of Life Sciences (WULS – SGGW), Warsaw, Poland

^b Department of Morphology and Function, CIISA- Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Lisbon, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2019

Received in revised form

29 December 2019

Accepted 28 January 2020

Available online 29 January 2020

Keywords:

NF- κ B

Endometrosis

Fibrosis

Endometrium

Mare

HAS

IL-6

ABSTRACT

Equine endometrosis is a multifactorial chronic degenerative condition, considered to be one of a major causes of equine infertility. The formation of periglandular fibrosis seems to be linked to chronic inflammation of the mare endometrium in a paracrine way and in a response to numerous forms of inflammatory stimuli elicit the net deposition of extracellular matrix (ECM) around the endometrial glands and stroma. We hypothesized some of these stimuli, such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), and hyaluronan synthases (HASs), may share the nuclear factor- κ B (NF- κ B) dependent activation pathway. This study aimed to determine whether mRNA expression of MCP-1, IL-6, HASs, and proteins of canonical (RelA/NK- κ B1) and noncanonical (NK- κ B2) signaling pathways for NF- κ B would change in subsequent categories of endometrosis during the estrous cycle. The expression of selected genes was established in mare endometrium (n = 80; Kenney and Doig categories I, IIA, IIB, III), obtained in the follicular phase (FLP) and mid-luteal phase (MLP). The high expression of RelA mRNA was observed in III, whereas of NK- κ B1 and NK- κ B2 also in IIA, and IIA and IIB, respectively. The expression of MCP-1 mRNA occurred constantly, regardless of the category, whereas IL-6 mRNA was low in IIA, IIB, and III. The expression of HAS 1 was high in IIA and HAS 3 in IIA, IIB, and III. All those changes were observed in FLP, but not MLP. Our results suggest that NF- κ B may be involved in progression of the chronic degenerative condition of the mare endometrium, on both canonical and noncanonical pathways. The most important changes in target genes expression were observed only in FLP, which may suggest the hormone-dependent activation of the NF- κ B-dependent fibrosis pathway.

© 2020 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Endometrosis, a chronic degenerative condition of unknown etiology, is a common cause of infertility in older mares, over the age of 12 years [1,2]. This degenerative disease of the endometrium is characterized by the formation of periglandular fibrosis, that leads to destruction of tissue architecture and impairment of endometrial function [3–5]. At the initial stage of endometrosis, stromal cells synthesize collagen fibers and differentiate into myofibroblasts, responsible for the extracellular matrix (ECM) deposition [5]. The excessive deposition of ECM around the

endometrial glands and stroma results in disturbance of active participation of tridimensional structure of complex macromolecules in cell functions [5–8]. Hyaluronic acid (HA), one of the components of ECM, is synthesized by three different, but related transmembrane enzymes, named hyaluronan synthases (HAS 1–3) [9], which produce different size HAS with diverse biological functions [10,11]. Increased expression of HAS is often associated with inflammatory reactions, irrespective of its cause [12]. Moreover, chronic inflammation of mare endometrium seems to be linked to fibrosis in a paracrine way [13,14]. In inflamed tissues, an intricate network of pro-fibrotic chemokines, cytokines, and growth factors interacts with ECM, fibroblasts and other cells, to regulate collagen and HA deposition and tissue fibrosis [8,15]. Pro-inflammatory molecules, including monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor α

* Corresponding author.

E-mail address: zgajewski@supermedia.pl (Z. Gajewski).

(TNF- α) [15,16], act on cells resided in ECM and activate the fibrogenesis pathway [14,17]. Changes in the expression of IL-6 and their receptors in mare endometrium were noted in the different degrees of fibrosis and/or inflammation [18]. Moreover, the expression of immunomodulatory genes, including MCP-1 and IL-6, was demonstrated in the mesenchymal stem cells isolated from equine endometrium. These cytokines are suggested to contribute in recruitment and activation of immune cells in endometritis [19].

Recently, several investigators have demonstrated the nuclear factor- κ B (NF- κ B) as a transcription factor that plays a pivotal role in many cellular responses to environmental changes [20–26]. We hypothesized that the NF- κ B-dependent activation pathway can be shared by MCP-1, IL-6, and HASs in equine endometrium (Fig. 1). NF- κ B is constitutively expressed in several tissues in the cases of inflammation [20,21] and fibrosis [22,23], and may be associated with the recurrent implantation failures [24–26]. Because inflammation seems to be linked to fibrosis, NF- κ B may be involved in progression of the chronic degenerative condition of mare endometrium. NF- κ B is a pleiotropic transcriptional regulator that controls the expression of genes involved in immune and inflammatory functions [27]. The family of ubiquitous NF- κ B proteins includes c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50/p105), and NF- κ B2 (p52/p100) [21,27], however, among the heterodimeric or homodimeric complexes, NF- κ B is classically composed predominantly of p50 (NF- κ B1) and RelA (RelA) subunits [21]. There are canonical and non-canonical signaling pathways for NF- κ B activation [20]. In the canonical pathway, extracellular signals activate NF- κ B1, phosphorylates I κ B α by the IKK enzyme, which results in rapid ubiquitination of the I κ B α and subsequent proteolysis by the corresponding proteasome. Before activation, NF- κ B exists in an inactive form in the cytoplasm, bound to inhibitory protein I κ B α [21]. In case of the noncanonical pathway, the inhibitory protein

p100 is degraded into an active component (p52) when the activating signal comes. The activation starts from phosphorylation of NIK kinase and activation of IKK α kinase, which results in phosphorylation of the p100 precursor protein. This protein is ubiquitinated, resulting in degradation of the C-end of the peptide chain on the proteasome [20]. Proteasome-dependent degradation of I κ B α or C-end of p100 causes translocation of released NF- κ B to the nucleus, where it initiates expression of numerous genes [20,21,27], including MCP-1 [28–30], IL-6 [30,31], and HAS [32,33].

The purpose of this study was to determine whether the expression of genes involved in the NF- κ B-dependent pathway participate in development of endometriosis. Current scientific literature is lacking proper investigation of endometrial NF- κ B expression in mares with chronic degenerative fibrosis. This study aims to detect whether the expression of RelA, NF- κ B1, NF- κ B2, MCP-1, IL-6, and HAS 1–3 genes change in endometrium of mares affected by endometriosis. An additional attempt of this investigation was to determine the influence of different phases of the estrous cycle on the gene expression patterns.

2. Materials and methods

2.1. Tissue collections

In the present study, 80 mares of Polish warmblood breeds, aged from 4 to 25 years, were used. Uteri, ovaries, and blood samples were collected post-mortem from cyclic mares during the reproductive season, from April to September. Mares were in healthy physical condition (body condition score (BCS): 3 to 7; in nine-point scoring system), as determined by an official veterinary inspection in a commercial slaughterhouse. Management and slaughter of the mares were performed following European (Council Regulation

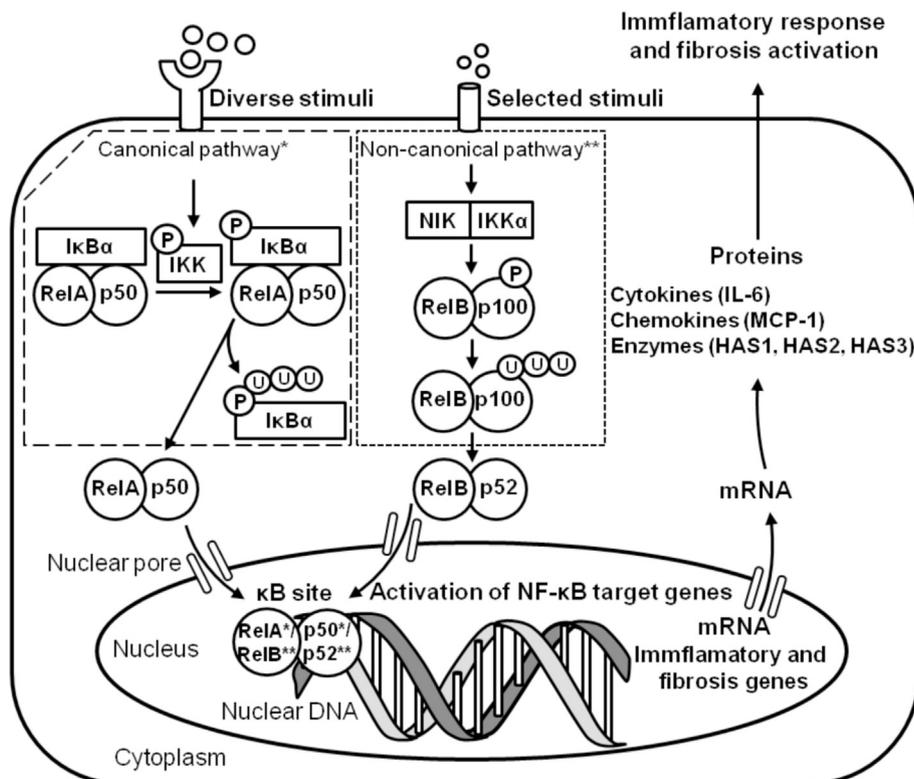


Fig. 1. Schematic view of the canonical (dashed line frame) and non-canonical (dotted line frame) NF- κ B activation pathways. Free heterodimers RelA/p50 or RelB/p52 enter the cell nucleus, where they initiate transcription of specific genes.

(EC No 1099/2009) and Polish (Regulation (MARD) Dz.U. 2004 nr 205 poz. 2102) welfare mandates. Each mare's estrous cycle phase was determined in laboratory conditions after returning from the slaughterhouse, based on plasma progesterone (P_4) concentration and macroscopic assessment of ovarian structures. The concentration of P_4 was determined by commercial radioimmunoassay with intra-assay coefficient of variation <5.6% and inter-assay coefficient of variation <8.8% (KIP 1458; DIALsource ImmunoAssays SA, Belgium). Mares were considered as being in the mid-luteal phases (MLP), when P_4 concentrations were >1 ng/mL, macroscopic examination of the ovary determined none of the follicles were >35 mm in diameter and at least one corpus luteum was present on one of the ovaries. The follicular phase (FLP) was characterized by P_4 concentration of <1 ng/mL, the presence of a follicle >35 mm in diameter, and lack of the corpus luteum on the ovary [34]. Endometrial samples collection was performed in the slaughterhouse, immediately after the slaughter. The uterine bodies and horns were opened, and the appearance of the mucosa was noted, with special attention to increased mucus production and significantly altered color of the surface epithelium. Endometrial samples that were chosen for RNA isolation did not appear actively inflamed in the macroscopic examination and did not reveal any inflammatory cell infiltration in the histopathological examination. Samples that did not fulfil the criteria were excluded from the study. Specimens for the molecular analysis were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Tissue samples for histopathological examination were fixed in 10% neutral phosphate-buffered formalin at $4\text{ }^\circ\text{C}$, for 24 h; moved to 70% ethanol for one week and embedded in paraffin equivalent for standard histological staining procedures. Microtome sections, cut in $5\text{ }\mu\text{m}$, were mounted on glass slides, deparaffinized and rehydrated in a series of immersions in xylene and decreasing concentrations of ethanol. Samples were stained with HE (hematoxylin, 3801520E, Leica, United States; eosin, HT1103128; Sigma–Aldrich, Poland), using standard protocol and mounted under Canadian balsam resin for histological evaluation. All reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich, Poland), unless otherwise indicated.

2.2. Histopathological analysis of mare endometrium

Light microscopic evaluation (Olympus BX43, Poland) of HE-stained endometrial slides was used to assess the presence of inflammation and appearance or severity of pathological degenerative changes. Endometrial samples were classified, as belonging to category I, IIA, IIB, or III, according to the degree of inflammation and/or fibrosis [4]. Healthy endometrial tissue was classified as category I (FLP: $n = 10$; MLP: $n = 10$), while categories IIA (FLP: $n = 10$; MLP: $n = 10$), IIB (FLP: $n = 10$; MLP: $n = 10$) and III (FLP: $n = 10$; MLP: $n = 10$) correspond to mild, moderate and severe fibrosis, respectively.

2.3. RNA isolation

Endometrial samples of similar size ($\sim 5 \times 15\text{ mm}$) were mechanically disrupted with a sterile mortar and pestle in a liquid nitrogen environment and 50 mg of each sample was homogenized, using Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, United States). Total RNA was extracted from tissue samples using High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Switzerland), according to the manufacturer's protocol, after which a DNase treatment was performed. The RNA concentration was determined with use of DS-11 FX spectrophotometer (DeNovix, United States). Only samples containing more than 100 ng RNA with absorbance ratios A260/280 and A260/230 of approximately 2.0 were used for further analyses.

2.4. Real-time PCR analysis

Real-time PCR amplification was done using a TaqMan™ RNA-to-CT™ 1-Step Kit (ThermoFisher, United States) and a QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, United States). TaqMan probes, oligonucleotide primers used for gene expression analysis, are presented in Table 1. Real-time PCR (reaction volume 10 μl) included: 15 ng of total RNA, 5 μl of TaqMan® RT-PCR Mix (2X), 0.25 μl of TaqMan® RT Enzyme Mix (40X), 0.5 μl of TaqMan probe and both PCR primers (ThermoFisher, United States) for each gene of interest. The fast PCR protocol had a reverse-transcription step (15 min at $48\text{ }^\circ\text{C}$), an enzyme activation step (10 min at $95\text{ }^\circ\text{C}$) followed by 40 cycles of denaturation (15 s at $95\text{ }^\circ\text{C}$) and an annealing/extension step (1 min at $60\text{ }^\circ\text{C}$). Each experiment was subjected to three biological duplicates. Raw results were normalized, relative to the geometric mean of mRNA detected from two reference genes. The semi-quantitation of the target gene expression was performed using two independent endogenous reference genes (*GAPDH*, *HPRT1*) in a comparative CT method ($\Delta\Delta\text{CT}$ method), where the target gene expression in the samples of category I was considered as ΔCt Control Value. The efficiencies of the PCR assays were established by a CT slope method assuring $\sim 100\%$ reaction efficiency. Selected PCR products were sent for sequencing (ThermoFisher, United States). The following equine-specific TaqMan Gene Expression Assays are commercially available and purchased from ThermoFisher (ThermoFisher, United States). Primers, 6-carboxyfluorescein (6-FAM) and 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)-labeled TaqMan probes, provided by ThermoFisher, are listed in Table 1.

2.5. Statistical analysis

Univariate marginal distributions of Expression Fold Change ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) of the RT-PCR data were tested independently for each category of endometrial samples using a univariate Kolmogorov-Smirnov test. The comparison of data, showing normal distribution, was assessed by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparisons test or Unpaired *t*-test with Welch's correction. The non-Gaussian data was evaluated by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test or Mann Whitney test. One-way ANOVA and Kruskal-Wallis tests were performed to compare the levels of target genes in endometrial samples of category I, IIA, IIB, and III, whereas Unpaired *t*-test with Welch's correction and Mann Whitney test were used to distinguish changes between estrous cycle phases. Numerical data are presented as the mean \pm SD. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism6 software (GraphPad Software Inc., United States). The significance level was established as $P < 0.05$.

3. Results

Expression levels of mRNA of the several genes (as listed in Table 1) in endometrial samples was determined by rtPCR. Samples from mares exhibiting endometrosis of type IIA, IIB and III were compared to healthy (category I) endometrial samples. Expression of all of the selected genes was detectable and measurable in tissue samples used in the study.

3.1. Endometrial category and the NF- κ B-dependent pathway of the fibrosis

The influence of endometrial group type (I, IIA, IIB vs III) on the subsequent levels of regulation in the NF- κ B-dependent pathway was evaluated. These analyses were performed by comparing the

Table 1
List of primers and TaqMan probes used for the qRT-PCR analysis.

Gene	TaqMan Assay ID/primers/probe	Amplicon length (bp)
RelA (p65)	Bt03253757_m1	59
NK- κ 1 (p105/p50)	Bt03243456_m1	107
NK- κ 2 (p100/p52)	Bt03272792_g1	101
MCP-1 (CCL2)	Ec03468496_m1	66
IL-6	Ec03468680_m1	117
HAS1	F:GCCTATCAGGAACAACCTCC R: TAGCCATGCTGAGCATC P: ACAACCAGAAGTTCCTGGGCCACCCAC	124
HAS2	Ec03467769_m1	63
HAS3	Bt04298490_m1	73
GAPDH	Ec03210916_gH	118
HPRT1	Ec03470217_m1	84

expression of each target gene independently in the same phase of the estrous cycle (FLP or MLP).

In the MLP of the estrous cycle, no differences in endometrial RelA (Fig. 2A), NK- κ 1 (Fig. 2B), and NK- κ 2 (Fig. 2C) mRNA expression were noted in subsequent categories of endometrosis. In the FLP, significantly higher expression of RelA mRNA was observed only in cases of severe fibrosis ($P = 0.012$; Fig. 2A), whereas higher expressions of NK- κ 2 ($P = 0.011$; Fig. 2C) was observed also in cases of mild fibrosis, and NK- κ 1 ($P = 0.043$; Fig. 2B) in all three categories of fibrosis severity. The expression of MCP-1 mRNA was constant, regardless of the category of endometrosis (Fig. 3A). The level of IL-6 mRNA was lower in samples exhibiting all three fibrosis severity categories, in comparison to healthy endometrium in the FLP ($P = 0.014$; Fig. 3B). The exception was the MLP ($P = 0.063$; Fig. 3B), where no differences in the IL-6 mRNA level between control and fibrosis samples were noted. Also, no differences between endometrial categories in the MLP in HAS 1, HAS 2 and HAS 3 mRNA expression levels were observed (Fig. 4). Similarly, in the FLP, HAS 2 mRNA expression level did not change throughout the groups in significant manner. The expression between fibrosis categories differed, however. For example, in the FLP cases, higher expression of HAS 1 mRNA ($P = 0.020$; Fig. 4A) occurred in IIA category than in other endometrial categories, as well as higher expression of HAS 3 mRNA ($P = 0.022$; Fig. 4C) were noted in types IIA, IIB and III compared to healthy endometrium samples.

3.2. Estrous cycle phase and the NF- κ B-dependent pathway of the fibrosis

The influence of different phases of the mare's estrous cycle (FLP vs MLP) on the subsequent levels of regulation in the NF- κ B-dependent pathway were also analyzed. This investigation was done by comparing each target gene independently within the

same endometria types (I, IIA, IIB or III).

The differences in expression of NK- κ 1 mRNAs between phases of the estrous cycle were significant in category IIB ($P = 0.037$) and III ($P = 0.030$) for RelA; IIA ($P < 0.0001$), IIB ($P = 0.014$), and III ($P = 0.009$) for NK- κ 1; as well as IIA ($P < 0.0001$) and III ($P = 0.016$) for NK- κ 2 (Fig. 2). No differences between phases of the estrus cycle in all endometrial categories on MCP-1 mRNA (Fig. 3A) or IL-6 mRNA expression (Fig. 3A) were observed, except lower ($P = 0.030$) IL-6 mRNA expression in the FLP than in the MLP in type IIA tissues. When comparing FLP with MLP in healthy endometria, no differences were detected in HAS 1, HAS 2 or HAS 3 mRNA levels (Fig. 4). Likewise, no differences in expression of mRNA of HAS 1 in type IIB and III and HAS 2 in type IIA and III was determined. However, higher expression of target genes in the FLP than in the MLP was demonstrated for HAS 1 mRNA only in cases of mild fibrosis ($P = 0.003$; Fig. 4A) and for HAS 3 mRNA, from mild to severe fibrosis ($P < 0.05$; Fig. 4C). Beside that, HAS 2 mRNA was expressed at a very low level in the IIA group in the FLP ($P = 0.032$; Fig. 4B).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report that relates to participation of the NF- κ B-dependent pathway in development of equine endometrosis. Regardless of the extensive research on mare endometrosis, the physiopathological mechanism involved in fibrosis development remains unknown [8]. Research by the Rebordão team (2017, 2018, 2019) has shed a new light on how signals generated on the cell surface lead to activation of endometrosis [14,35,36]. Recently, the protective role of prostaglandin E2 (PGE2) against fibrosis of the mare's endometrium was proposed [14,35] and the potential ability of neutrophil extracellular traps (NETs) competence to induce damage and inflammation of endometrium, and to contribute in fibrosis development was evidenced [8,36,37].

Both the PGE2 pathway and NETs response in the mare endometrium are involved in the inflammatory response, which is induced by damage within the mare uterus [37–39]. The presence of pathogenic microorganisms or semen stimulates *in loco* production of PGE2 and increases vascular permeability that enables polymorphonuclear neutrophils (PMN) infiltration into the uterine lumen [36,40]. This and other rapid and effective responses to changes in the uterine environment require signaling pathway involvement. One of the most common responses to the action of signaling molecules is synthesis of new proteins through alteration of the gene expression pattern [27]. Relatively few transcription factors, that regulate inducible gene expression, can be targeted by many distinct signal transduction pathways, among which we investigated the NF- κ B-dependent pathway. The canonical pathway of NF- κ B activation is mainly expressed in natural immune

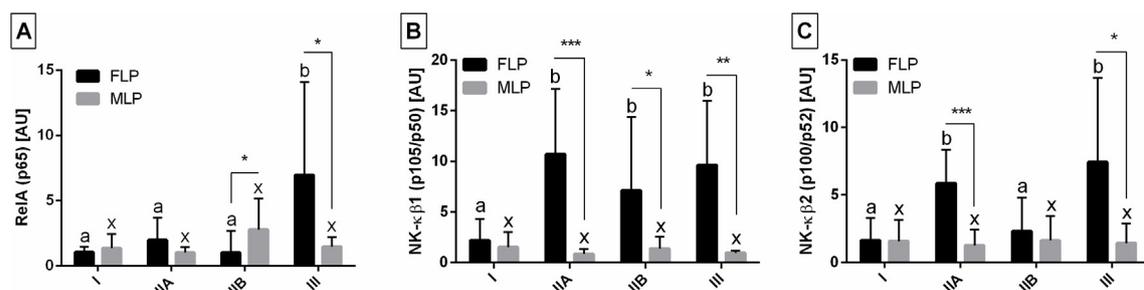


Fig. 2. RelA (p65) (A), NK- κ 1 (p105/p50) (B), and NK- κ 2 (p100/p52) genes expression in mare endometrium in follicular - FLP ($n = 40$) and mid-luteal - MLP ($n = 40$) phases. The endometrial samples classified to category I ($n = 20$), IIA ($n = 20$), IIB ($n = 20$), and III ($n = 20$) of endometrosis. Bars represent mean \pm SD. Significant differences between categories are depicted by consecutive letters (a, b, x; for $P < 0.05$). Asterisks indicate significant differences between phases of estrous cycle (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

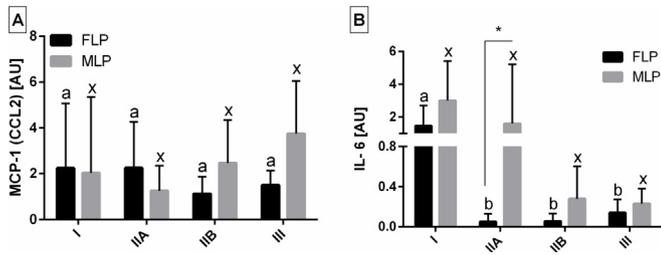


Fig. 3. CCL2 (MCP-1) (A) and IL-6 (B) genes expression in mare endometrium in follicular - FLP (n = 40) and mid-luteal - MLP (n = 40) phases. The endometrial samples classified to category I (n = 20), IIA (n = 20), IIB (n = 20), and III (n = 20) of endometriosis. Bars represent mean \pm SD. Significant differences between categories are depicted by letters (a, b, x; for $P < 0.05$). Asterisks indicate significant differences between phases of estrous cycle (* $P < 0.05$).

response and inflammation process, while the noncanonical one is contributing to B-lymphocyte maturation development, maintenance and function, and linked to autoimmune diseases [20].

We have demonstrated features of canonical (NF- κ B1) and noncanonical (NF- κ B2) pathways activation in case of mild fibrosis (category IIA), however, full activation appears to occur in cases of severe fibrosis (category III), where the expression of mRNA of both heterodimers in canonical (RelA and NF- κ B1) and NF- κ B2 in non-canonical pathways increased. All of described changes in expression pattern were observed only in the follicular phase of the estrous cycle, which may suggest a hormone-dependent pathway leading to fibrosis. Both endometrial collagen responses to each specific NETs proteases and impaired production of PGE₂, or of its receptor EP₂, might play a role in endometrial collagen deposition, due to the suppression of their antifibrotic capacity [14], which is also dependent on the estrous cycle and, accordingly, occurred strongly in FLP. Rebordao et al. (2019) evidenced, that an FLP endometrium may be more prone to fibrosis development in the presence of a profibrotic stimulus, because of a diminished capacity to synthesize antifibrotic mediator.

Among the NF- κ B dependent inducible expressions of the target genes, which were taken into account in this experiment, the expression of MCP-1 mRNA appears to be of least importance in the pathogenesis of equine endometriosis. Since MCP-1 was recognized as a profibrotic mediator in case of an injury of lung epithelial cells [41], it may suggest slightly different fibrogenesis triggering pattern in lungs and uterus. MCP-1 is a prototype of the C-C chemokine β subfamily, and exhibits its most potent chemotactic activity towards monocytes and T lymphocytes [42]. MCP-1 promotes migration and infiltration of circulating monocytes to the inflammation site and induces further monocyte chemotaxis and recruitment [30]. Apart from its effect on monocytes, MCP-1 activates two different signaling pathways in the vessel wall: the first leading to release of the proinflammatory cytokine IL-6, and the second leading to the proliferative response [29,30]. The lack of the

differences in MCP-1 mRNA expression and a simultaneous decrease in IL-6 mRNA expression level in case of fibrosis (categories IIA, IIB, III), suggests an MCP-1 independent pathway of IL-6 action. Downregulation of IL-6 mRNA transcription may depend on non-canonical NF- κ B pathways, also activated in case of mild fibrosis, however, further research is needed. IL-6 regulates the expression of adhesion molecules and other cytokines [30,43], which potentially enhances the inflammatory reaction. Stimulation of lymphocytes by IL-6 may also be important, due to activation of T lymphocytes, which may interact with PMN engagement in the extracellular killing mechanism of NETs [14,44]. While NETs components may contribute to disease progression towards fibrosis [8,45], reduced production of IL-6 may cause inflammatory reduction. Likewise, lower mRNA expression of IL-6 was detected in susceptible to persistent breeding-induced endometritis mares, which also includes animals with endometriosis [38]. In an FLP endometrium with mild pathologic alterations (category IIA), HAS 1 and HAS 3 pathways might modulate fibrogenesis through changes in the proportions of ECM components. Increased synthesis and degradation of components of ECM are changes characteristic to chronic inflammation and tissue fibrosis [32]. In a healthy equine endometrium, the major component of ECM is interstitial collagen III, which is gradually replaced by collagen I in line with increasing endometrial fibrotic changes [36]. Also, hyaluronan acid was considered as a major macromolecular component of ECM that undergoes dynamic regulation during inflammation [32]. Despite initial increased expression of both HAS1 and HAS3 mRNA in type IIA fibrosis, the following changes into types IIB and III were significantly marked only by further HAS3 mRNA expression increase. The expression of HAS 2 mRNA remained fairly constant and independent from classification of fibrosis and/or the phase of the estrus cycle. HAS 2 gene promotes synthesis of the HA of higher molecular weight than HAS 1 (in range of $>2 \times 10^6$ Da) [10], whereas HAS 3 gene synthesizes HA of low-molecular-weight (1×10^5 – 1×10^6 Da) [9]. In moderate and severe fibrosis, the accumulation of light HA may be suspected to occur, however, the real production of HA with a specific weight determination requires further investigation on the protein level. Increased synthesis of low-molecular-weight HA triggers alterations in the macromolecules of ECM, which may lead to a loss of traction resistance, just like it does during labor [46]. The biological role of low-molecular-weight HA is associated with pro-inflammatory, angiogenic and anti-apoptotic effects, facilitating cell-to-cell interaction, cell proliferation and HA-receptor mediated signaling [9,47].

In our study, the expression level of HAS3 and NF- κ B1 mRNA was determined to be similarly elevated in equivalent endometrial categories and estrus cycle phases, which indicates a possible regulatory pathway. The specific pathway system is yet to be determined, which requires further investigation. Our results are in agreement with other scientific research conducted on human lung myofibroblasts, in which a significant increase of HA production via HAS activity was detected as a consequence of activation of the

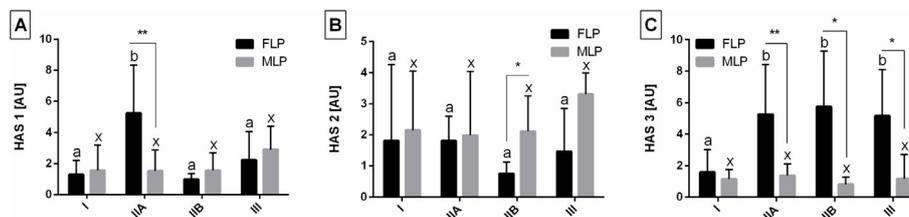


Fig. 4. HAS 1 (A), HAS 2 (B), and HAS 3 genes expression in mare endometrium in follicular - FLP (n = 40) and mid-luteal - MLP (n = 40) phases. The endometrial samples classified to category I (n = 20), IIA (n = 20), IIB (n = 20), and III (n = 20) of endometriosis. Bars represent mean \pm SD. Significant differences between categories are depicted by consecutive letters (a, b, x; for $P < 0.05$). Asterisks indicate significant differences between phases of estrous cycle (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

p50/p65 NF- κ B complex [32].

5. Conclusion

Our results suggest that the NF- κ B-dependent pathway may be involved in the pathogenesis of equine endometrosis. Activation of both canonical and noncanonical pathways may lead to down-regulation of IL-6 transcription and activation of HAS 1 and 3, which may increase ECM component secretion from fibroblasts and stimulation of fibroblast proliferation. However, this hypothesis needs further confirmation via *in vitro* trials. The most statistically significant changes in target genes expression were observed only in the follicular phase of the estrous cycle, which may suggest a hormone-dependent activation of the NF- κ B-dependent fibrosis pathway.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

CRediT authorship contribution statement

Malgorzata Domino: Writing - original draft, Conceptualization, Investigation, Methodology, Project administration, Formal analysis, Funding acquisition. **Tomasz Jasinski:** Writing - original draft, Conceptualization. **Ewa Kautz:** Formal analysis. **Edyta Juszczuk-Kubiak:** Formal analysis. **Graça Ferreira-Dias:** Writing - review & editing, Supervision. **Romuald Zabielski:** Writing - review & editing, Supervision. **Maria Sady:** Formal analysis, Funding acquisition. **Zdzislaw Gajewski:** Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Acknowledgements

The study was supported by the National Science Centre, Poland, "Miniatura 2" Project, No. 2018/02/X/NZ4/00101. This work was conducted in the Veterinary Research Centre (WCB) and the Center for Biomedical Research (CBB), supported by EFRR RPO WM 2007–2013 Poland.

References

- [1] Hoffmann C, Bazer FW, Klug J, Aupperle H, Ellenberger C, Schoon HA. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology* 2009;71:264–74. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.008>.
- [2] Carnevale EM, Ginther OJ. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology* 1992;37(5):1101–15. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(92\)90108-4](https://doi.org/10.1016/0093-691x(92)90108-4).
- [3] Kenney RM. Cyclic and pathological changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc* 1978;172:241–62.
- [4] Kenney RM, Doig PA. Equine endometrial biopsy. In: *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment, and prevention of reproductive diseases in small and large animals*. Philadelphia: WB Saunders; 1986. p. 723–9.
- [5] Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos RC, Aupperle H, Dhein S, Stief B, Schoon HA. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci* 2009;111:261–78. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.019>.
- [6] Walter I, Handler J, Miller I, Aurich C. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometrosis. *Histol Histopathol* 2005;20:1105–13. <https://doi.org/10.14670/HH-20.1105>.
- [7] Rodriguez HI, Stewart AJ, Wolfe DF, Caldwell FJ, Harrie M, Whitley EM. Immunolocalization of the hyaluronan receptor CD44 in the reproductive tract of the mare. *Theriogenology* 2011;75:276–86. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.014>.
- [8] Rebordão MR, Galvão A, Szóstek A, Amaral A, Mateus L, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reprod Domest Anim* 2014;49(Suppl. 4):82–7. <https://doi.org/10.1111/rda.12397>.
- [9] Fouladi-Nashta AA, Raheem KA, Marei WF, Ghafari F, Hartshorne GM. Regulation and roles of the hyaluronan system in mammalian reproduction. *Reproduction* 2017;153(2):R43–58. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0240>.
- [10] Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999;274:25085–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.25085>.
- [11] Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* 2004;83:317–25. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00392>.
- [12] Stuhlmeier KM. Effects of leflunomide on hyaluronan synthases (HAS): NF- κ B-independent suppression of IL-1-induced HAS1 transcription by leflunomide. *J Immunol* 2005;174(11):7376–82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7376>.
- [13] Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;304:C216–25. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00328.2012>.
- [14] Rebordão MR, Amaral A, Lukasik K, Szóstek-Mioduchowska A, Pinto-Bravo P, Galvão A, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. Impairment of the antifibrotic prostaglandin E2 pathway may influence neutrophil extracellular trap-induced fibrosis in the mare endometrium. *Domest Anim Endocrinol* 2019;67:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.10.004>.
- [15] Atamas S. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci* 2002;72:631–43. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02299-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02299-3).
- [16] diZerega GS, Campeau JD. Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. *Hum Reprod Update* 2001;7:547–55. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.6.547>.
- [17] Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:684–96. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.149>.
- [18] Szóstek AZ, Lukasik K, Galvão AM, Ferreira-Dias GM, Skarzynski DJ. Impairment of the interleukin system in equine endometrium during the course of endometrosis. *Biol Reprod* 2013;79:1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109447>.
- [19] Cortés-Araya Y, Amilon K, Rink BE, Black G, Lisowski Z, Donadeu FX, Esteves CL. Comparison of antibacterial and immunological properties of mesenchymal stem/stromal cells from equine bone marrow, endometrium, and adipose tissue. *Stem Cell Dev* 2018;27(21):1518–25. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0241>.
- [20] Umezawa K. Possible role of peritoneal NF- κ B in peripheral inflammation and cancer: lessons from the inhibitor DHMEQ. *Biomed Pharmacother* 2011;65(4):252–9. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.02.003>.
- [21] Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland 3rd EM, Mackay S. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 2001;130(2):363–9. <https://doi.org/10.1067/msy.2001.116672>.
- [22] Sosińska P, Baum E, Maćkowiak B, Staniszewski R, Jasiński T, Umezawa K, Bręborowicz A. Inhibition of NF- κ B with Dehydroxymethylepoxyquinomicin modifies the function of human peritoneal mesothelial cells. *Am J Transl Res* 2016;8(12):5756–65.
- [23] Sun L, Zhang S, Chang Q, Tan J. Establishment and comparison of different intrauterine adhesion modelling procedures in rats. *Reprod Fertil Dev* 2019. <https://doi.org/10.1071/RD18397>.
- [24] Celik O, Celik E, Turkuoglu I, Yilmaz E, Ulas M, Simsek Y, Karaer A, Celik N, Aydin NE, Ozerol I, Unlu C. Surgical removal of endometrioma decreases the NF- κ B1 (p50/105) and NF- κ B p65 (Rel A) expression in the eutopic endometrium during the implantation window. *Reprod Sci* 2013;20(7):762–70. <https://doi.org/10.1177/1933719112466307>.
- [25] Luo L, Li DH, Li XP, Zhang SC, Yan CF, Wu JF, Qi YH, Zhao J. Polymorphisms in the nuclear factor kappa B gene association with recurrent embryo implantation failure. *Genet Mol Res* 2016;15(2). <https://doi.org/10.4238/gmr.15027759>.
- [26] Ersahin A, Acet M, Acet T, Yavuz Y. Disturbed endometrial NF- κ B expression in women with recurrent implantation failure. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20(24):5037–40.
- [27] May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* 1998;19(2):80–8.
- [28] Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int* 1995;48(4):1263–71. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.410>.
- [29] Viedt C, Dechend R, Fei J, Hänsch GM, Kreuzer J, Orth SR. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(6):1534–47. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000015609.31253.7f>.
- [30] Viedt C, Vogel J, Athanasios T, Shen W, Orth SR, Kübler W, Kreuzer J. Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(6):914–20. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000019009.73586.7f>.
- [31] Son YH, Jeong YT, Lee KA, Choi KH, Kim SM, BY Rhim, Kim K. Roles of MAPK and NF- κ B in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51(1):71–7. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31815bd23d>.

- [32] Ohkawa T, Ueki N, Taguchi T, Shindo Y, Adachi M, Amuro Y, Hada T, Higashino K. Stimulation of hyaluronan synthesis by tumor necrosis factor- α is mediated by the p50/p65 NF- κ B complex in MRC-5 myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1999;1448(3):416–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00155-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00155-4).
- [33] Kao JJ. The NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate blocks IL-1 β induced hyaluronan synthase 1 (HAS1) mRNA transcription, pointing at NF- κ B dependence of the gene HAS1. *Exp Gerontol* 2006;41(6):641–7. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.04.003>.
- [34] Roberto da Costa RP, Serrão PM, Monteiro S, Pessa P, Robalo Silva J, Ferreira-Dias G. Caspase-3 mediated apoptosis and cell proliferation in the equine endometrium during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:925–32. <https://doi.org/10.1071/RD06159>.
- [35] Rebordão MR, Galvão A, Pinto-Bravo P, Pinheiro J, Gamboa S, Silva E, Mateus L, Ferreira-Dias G. Endometrial prostaglandin synthases, ovarian steroids, and oxytocin receptors in mares with oxytocin-induced luteal maintenance. *Theriogenology* 2017;87:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.028>.
- [36] Rebordão MR, Amaral A, Lukasik K, Szóstek-Mioduchowska A, Pinto-Bravo P, Galvão A, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology* 2018;113:8–18. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.001>.
- [37] Amaral A, Fernandes C, Lukasik K, Szóstek-Mioduchowska A, Baclawska A, Rebordão MR, Aguiar-Silva J, Pinto-Bravo P, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. Elastase inhibition affects collagen transcription and prostaglandin secretion in mare endometrium during the estrous cycle. *Reprod Domest Anim* 2018;53(Suppl 2):66–9. <https://doi.org/10.1111/rda.13258>.
- [38] Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Betancourt A, Horohov D, Scoggin KE, Squires EL, Troedsson MH. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction* 2013;145:289e96.
- [39] Cadario ME. Revisiting the diagnosis and the treatment options for an old problem: chronic and post-breeding endometritis in the mare. *Practitioner* 2014;1:21e5.
- [40] Rebordão MR, Carneiro C, Alexandre-Pires G, Brito P, Pereira C, Nunes T, Galvão A, Leitão A, Vilela C, Ferreira-Dias G. Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *J Reprod Immunol* 2014;106:41–9. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2014.08.003>.
- [41] Moore BB, Peters-Golden M, Christensen PJ, Lama V, Kuziel WA, Paine 3rd R, Toews GB. Alveolar epithelial cell inhibition of fibroblast proliferation is regulated by MCP-1/CCR2 and mediated by PGE2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L342–9. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00168.2002>.
- [42] Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1996;2:198–204.
- [43] Ikeda U, Ikeda M, Seino Y, Takahashi M, Kasahara T, Kano S, Shimada K. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat vascular smooth muscle cells by pro-inflammatory cytokines. *Atherosclerosis* 1993;104:61–8. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(93\)90176-u](https://doi.org/10.1016/0021-9150(93)90176-u).
- [44] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007;176:231–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>.
- [45] Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, Sivridis E, Koffa M, Giatromanolaki A, Boumpas DT, Ritis K, Kambas K. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol* 2014;233:294–307. <https://doi.org/10.1002/path.4359>.
- [46] Akgul Y, Word RA, Ensign LM, Yamaguchi Y, Lydon J, Hanes J, Mahendroo M. Hyaluronan in cervical epithelia protects against infection-mediated preterm birth. *J Clin Invest* 2014;124:5481–9. <https://doi.org/10.1172/JCI78765>.
- [47] Matou-Nasri S, Gaffney J, Kumar S, Slevin A. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc2 and γ -adducin. *Int J Oncol* 2009;35:761–73. https://doi.org/10.3892/ijo_00000389.

Article

Equine Endometrosis Pathological Features: Are They Dependent on NF- κ B Signaling Pathway?

Tomasz Jasiński ^{1,*}, Łukasz Zdrojkowski ^{1,*}, Ewa Kautz ², Edyta Juszcuk-Kubiak ³, Graça Ferreira-Dias ⁴ and Małgorzata Domino ^{1,*}

- ¹ Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; tomasz_jasinski@sggw.edu.pl
² Department of Molecular Biology, Institute of Genetics and Animal Biotechnology of the Polish Academy of Sciences, 05-552 Jastrzębiec, Poland; e.kautz@igbzpan.pl
³ Laboratory of Biotechnology and Molecular Engineering, Department of Microbiology, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland; edyta.juszcuk-kubiak@ibprs.pl
⁴ Departamento de Morfologia e Função, CIISA—Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 1300-47 Lisbon, Portugal; gmlfdias@fmv.ulisboa.pt
* Correspondence: lukasz_zdrojkowski@sggw.edu.pl (Ł.Z.); malgorzata_domino@sggw.edu.pl (M.D.)

Simple Summary: Endometrosis is a serious problem mainly affecting older mares' fertility. Despite the importance of this disease, its etiology and pathogenesis are not fully known. Thus, no effective treatment exists to cease or restore degenerative processes and fibrogenesis in the mares' endometria. The nuclear factor kappaB (NF- κ B) is an important factor regulating cell metabolism. Nevertheless, it is also known to promote inflammation and fibrosis in various tissues and species, as well as in the mares' endometria. The main goal was to bring new knowledge regarding endometrosis pathogenesis, which could allow for therapy development. Endometrial samples, collected postmortem from cyclic mares in estrus or diestrus, were classified histologically and used for gene expression assessment. Gene transcription of NF- κ B subunits (subunit RelA—*RelA*; subunit 1—*NF- κ B1*; subunit 2—*NF- κ B2*), pro-inflammatory molecules (monocyte chemoattractant protein-1—*MCP-1*; interleukin-6—*IL-6*), and hyaluronan synthases (hyaluronan synthase 1—*HAS 1*; hyaluronan synthase 2—*HAS 2*; hyaluronan synthase 3—*HAS 3*) were compared among endometrosis types (active, non-active, destructive, non-destructive), according to the classification of Hoffmann and co-authors. These results suggest that activation of the NF- κ B canonical pathway is involved especially in destructive endometrosis, the type when endometrial glands are damaged. These data give substantial information for further evaluations and treatment development.

Abstract: Endometrosis is an important mares' disease which considerably decreases their fertility. As classic endometrial classification methods might be insufficient for tissue pathological evaluation, further categorization into active/inactive and destructive/non-destructive types was developed by Hoffmann and others. This study aimed to compare NF- κ B pathway genes transcription among histopathological types of endometrosis, following Hoffmann and co-authors' classification. Endometrial samples, collected postmortem from cyclic mares ($n = 100$) in estrus or diestrus, were classified histologically and used for gene transcription assessment. Gene transcription of NF- κ B subunits (*RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*), pro-inflammatory molecules (*MCP-1*, *IL-6*), and hyaluronan synthases (*HAS 1*, *HAS 2*, *HAS 3*) was compared among endometrosis types (active, non-active, destructive, non-destructive). Most individual mRNA samples showed high expression of *RelA*, *NF- κ B1*, and *MCP-1* gene transcripts and the destructive type of endometrosis, simultaneously. The expression of *RelA* and *NF- κ B1* genes was higher in active destructive group than in the other groups only in the follicular phase, as well as being higher in the inactive destructive group than in the others, only in the mid-luteal phase. The increase in gene transcription of the NF- κ B canonical activation pathway in destructive endometrosis may suggest the highest changes in extracellular matrix deposition. Moreover, the estrous cycle phase might influence fibrosis pathogenesis.



Citation: Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. Equine Endometrosis Pathological Features: Are They Dependent on NF- κ B Signaling Pathway? *Animals* **2021**, *11*, 3151. <https://doi.org/10.3390/ani11113151>

Academic Editor: Mats H. T. Troedsson

Received: 28 September 2021

Accepted: 3 November 2021

Published: 4 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: endometriosis; mare; NF- κ B; MCP-1; IL-6; HAS

1. Introduction

Degenerative Endometrial Fibrosis, also referred to as endometriosis, is a major problem in equine reproduction, negatively affecting mares' fertility. As its occurrence is widespread, endometriosis is an important cause of financial losses in the equine breeding industry. Main paramount features of this disease encompass periglandular fibrosis of the endometrium and degenerative changes of endometrial glands associated with dysfunction of affected glandular epithelial cells [1,2]. Since adequate endometrial gland response is crucial in the nutrition of the embryo, as the severity of endometriosis increases, the risk of embryonic death increases [1,3]. The basic classification method, introduced by Kenney and Doig (1986), focuses on the percentage of affected glands and layers of periglandular fibrosis. This classification allocates uterine biopsy samples into categories I, IIA, IIB, and III [3]. However, more recent studies have assessed the damage of glandular epithelial cells and the metabolic activity of periglandular stromal cells as the basis for the development of an additional endometriosis classification system into four histopathological types [1,2,4]. This classification divides uterine biopsy samples using the terms destructive or nondestructive endometriosis for the description of the damaging glands, and active or inactive endometriosis for the characterization of the metabolic activity of the stroma. Following Schöniger and Schoon's opinion, these two classifications complement each other, and their combination allows for a better description of the affected mare's endometrium [2]. It should be kept in mind that the better the description of the current state of the endometrium, the more adequate the assessment of the severity of the endometrial fibrosis, and hence a more accurate prognosis of the future fertility of the mare [1,2,4].

Even though these two classification methods were developed, the etiology and pathogenesis of endometriosis still require further clarification. Some investigation has been carried out on cellular differentiation and periglandular myofibroblast transformation [1,5–7], the cycle of asynchronous differentiation [1,4,8,9], failure of innate immunity [10–12], extracellular matrix (ECM) composition [13–15], and the role of proinflammatory molecules and neutrophil extracellular traps action in stroma fibrosis remodeling [16–19]. Therefore, numerous biological indicators of endometrial pathophysiology are in the field of interest as biomarkers that can be objectively evaluated during prognostic or diagnostic protocols and treatment responses. Among such biomarkers of endometriosis, the proteins calponin, vimentin, desmin, and smooth muscle actin [1,5–7] have been proposed for the assessment of myofibroblast transformation. In addition, estrogen and progesterone receptors, uteroglobin, uterocalin, calbindin, and glycogen [1,4,8,9] have been used as indicators of cycle asynchronous differentiation. Likewise, β -defensin and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 have been suggested as indicators of innate immunity failure in the cytoplasm of endometriosis affected glands [10–12]. Moreover, hyaluronan synthases (HASs) have been suggested as the indicators of the production of ECM components with diverse biological functions [13–15], as well as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNF α) as the proinflammatory molecules involved in the activation of fibrogenesis pathway by acting on cells residing in ECM [16–20]. Given the need to evaluate regular and abnormal cellular function within the mares' endometria, some of these biomarkers should be considered to have prognostic value for breeding success or for the response to treatment of fibrosis [2,21].

It is worth noting that in humans, the inhibition of the nuclear factor kappaB (NF- κ B) pathway is one of the most popular research approaches for the prevention and treatment of fibrosis-related diseases [22–26]. The NF- κ B is a pleiotropic transcriptional regulator of the transcription of genes that are responsible for immunity and inflammatory functions [27]. The NF- κ B family of proteins consists of c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50/p105), and NF- κ B2 (p52/p100) [27,28], which are systematized into two activation

pathways—canonical (RelA, NF- κ B1) and non-canonical (RelB, NF- κ B2) [28,29]. Both pathways lead to the degradation of the inhibitory protein I κ B α or C-end of p100, respectively [28,29]. This proteasome-dependent degradation is responsible for the release of NF- κ B to the nucleus, causing numerous gene expression initialization, e.g., MCP-1, IL-6, and HAS [23,27,28]. Interestingly, in our recent research, the endometria of healthy mares were mostly devoid of NF- κ B pathway gene expression, whereas those with endometriosis frequently showed high expression of RelA in category III endometria, high expression of NF- κ B1 in categories IIA, IIB, and III, as well as high expression of NF- κ B2 in categories IIA and III. These differences have been predominantly shown in the follicular phase of the estrous cycle [20]. Since delivered results provided interesting insights for NF- κ B signaling pathway involvement in endometriosis pathogenesis regarding basic Kenney and Doig classification [20], further studies are required for better understanding the relationship between histopathological features of affected mares' endometria and the NF- κ B signaling pathway, using the endometriosis classification of Hoffmann and co-authors [1]. Thus, this study aimed to evaluate the expression of genes involved in the NF- κ B signaling pathway in mares' endometria in relation to Hoffmann et al. [1] four histopathological types of equine endometriosis. Specifically, gene transcription of NF- κ B subunits (*RelA*; *NF- κ B1*; *NF- κ B2*), pro-inflammatory molecules (*MCP-1*; *IL-6*) and hyaluronan synthases (*HAS 1*; *HAS 2*; *HAS 3*) was compared among four endometriosis types (active, non-active, destructive, non-destructive) at different phases of the estrous cycle (estrus, diestrus). In the future, it is expected, as an ultimate goal, to further evaluate the potential use of NF- κ B inhibitors in prophylaxis and treatment of equine endometriosis.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Biological material for this study consisted of equine internal genitalia and blood collected from 100 Polish warmblood mares (aged from 4 to 25 years). At a commercial slaughterhouse in Poland, samples were collected postmortem in the reproductive season (from April to September), following the European (Council Regulation (EC) No 1099/2009) and Polish (Regulation (MARD) Dz.U. 2004 205 poz. 2102) welfare mandates. No permission from the Ethical Committee following the National Legal Regulation (Act of 15 January 2015 on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes, Dz.U. 2015 poz. 266) was needed for sample collection after slaughter.

Blood samples, each with a volume of 10 mL, were collected during exsanguination into dry tubes for hormone concentration analyses (BD Vacutainer[®], Plymouth, UK). Blood samples were transported to the laboratory at +4 °C, and centrifuged (2000 \times g, 5 min), for serum retrieval, kept at –20 °C until further hormonal analysis. Serum progesterone (P4) concentration was determined using a commercial radioimmunoassay with the sensitivity of 0.15 ng/mL (KIP 1458; DIAsource ImmunoAssays SA, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgium; intra-assay coefficient of variation <5.6%; inter-assay coefficient of variation <8.8%). The sample dilution recommended by the manufacturer's protocol was used. The absorbance was measured by Multiscan Reader (Labsystem, Helsinki, Finland) using Genesis V 3.00 software.

Ovaries were collected into containers with cold saline (0.9% NaCl, Polfa S.A., Lublin, Poland) for macroscopic examination, transported at +4 °C to the laboratory, and sectioned. The presence of follicles and/or corpus luteum was noted, and their diameter was measured.

From each animal, two endometrial samples from the uterine body were collected immediately after evisceration, no longer than 5 min after the mare's death by exsanguination. One sample was inserted into containers with the 10% neutral phosphate-buffered formalin (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland) for histological examination, and the second one into RNase-free Eppendorf tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C for gene transcription analyses. Endometrial samples for histopathological examination were fixed in formalin for 24 h and then moved

to 70% ethanol (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland) for one week, and then processed for paraffin-embedded blocks.

2.2. Phases of Estrous Cycle Determination

The phases of the estrous cycle were determined based on the P4 concentration, and on the macroscopic examination of mares' ovaries, following Roberto da Costa et al. protocol [30]. Mares were included in the mid-luteal phase group (MLP) when serum P4 concentration was >1 ng/mL and on both ovaries, none of the follicles were >35 mm in diameter, and at least one corpus luteum was demonstrated. Mares were assigned into the follicular phase group (FLP) when serum P4 concentration was <1 ng/mL, and there was at least one follicle >35 mm in diameter in any of the ovaries, and no corpus luteum present. Each group, MLP and FLP, consisted of 50 mares (total $n = 100$). None of the mares were excluded due to the failure of inclusion into any one of the two phases of the estrous cycle.

2.3. Histopathological Types of Endometriosis

Fixed endometrial samples were embedded in paraffin equivalent for standard histological staining procedures. The paraffin blocks were cut in $9\ \mu\text{m}$ sections on rotation microtome Leica RM2255 (Kawa-Ska, Zalesie Gorne, Polska) and mounted on glass slides. Then, slides were deparaffinized and rehydrated in a series of immersions in xylene and decreasing concentrations of ethanol (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland). Samples were stained using standard hematoxylin-eosin (HE) protocol (hematoxylin, 3801520E, Leica, Buffalo Grove, IL, USA; eosin, HT1103128; SigmaAldrich, Poznan, Poland) and mounted under Canadian balsam resin for histological evaluation (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland).

The HE-stained slides were evaluated under a light microscope (Olympus BX43, Warsaw, Poland, magnification $40\times$ – $1000\times$) to assess the presence of inflammation and the appearance or severity of pathological degenerative changes. Endometrial samples that were chosen for RNA isolation did not appear actively inflamed in the macroscopic examination and did not reveal any inflammatory cell infiltration in the histopathological examination. Endometriosis was recognized when the microscopic hallmark, the concentric arrangement of stromal cells and/or collagen fibers around affected glands, was observed [2,31]. Endometrial samples were classified as belonging to histopathological types inactive nondestructive (IN), inactive destructive (ID), active nondestructive (AN), and active destructive (AD), according to specific pathological features [1,2]. In the non-destructive type, glandular epithelial cells were intact, whereas in the destructive type of endometriosis, degenerative lesions and necrosis were observed. The features of periglandular stromal cells' metabolic activity allowed for the inclusion into the active or inactive type. In the active type, active stromal cells characterized by an oval shape, pale cytoplasm, and ovoid hypochromatic nuclei were noted, whereas in the inactive type, inactive stromal cells with spindle-shaped elongated hyperchromatic nuclei were observed [2].

The mares with healthy endometrial tissue were included in the control group (C; $n = 20$). In addition, the remaining 80 mares were assigned to each of the four endometriosis histopathological types, as follows: (i) inactive nondestructive endometriosis (E IN; $n = 20$), (ii) inactive destructive endometriosis (E ID; $n = 20$), (iii) active nondestructive endometriosis (E AN; $n = 20$), and (iv) active destructive endometriosis (E AD; $n = 20$) (Figure 1). In all groups, half of the samples were collected from mares in FLP (C, $n = 10$; E IN, $n = 10$; E ID, $n = 10$; E AN, $n = 10$; E AD, $n = 10$) and the other half in MLP (C, $n = 10$; E IN, $n = 10$; E ID, $n = 10$; E AN, $n = 10$; E AD, $n = 10$). Part of the results on the transcription of selected genes involved in the NF- κ B signaling pathway in endometria were classified in Kenney and Doig's (1986) categories, I, IIA, IIB, III, as previously documented [20].

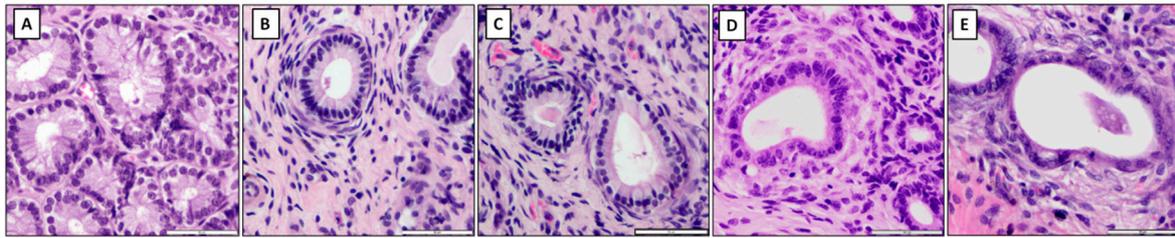


Figure 1. The microscopic image of exemplary endometrial sections classified into the following groups: (A) the control group, (B) the inactive nondestructive endometriosis, (C) the inactive destructive endometriosis, (D) the active nondestructive endometriosis, (E) the active destructive endometriosis. HE staining. magnification 400 \times .

2.4. Gene Transcription Evaluation

Frozen endometrial samples were mechanically disrupted in a liquid nitrogen environment. Afterwards, 50 mg of each sample were homogenized in Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), and total RNA was extracted using High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Rotkreuz, Switzerland). The extraction protocol recommended by the manufacturers was used. Then, a DNase treatment was performed. The RNA concentration was determined using DS-11 FX spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA) with absorbance ratios A260/280 and A260/230 of approximately 2.0. The further analysis inclusion criterion was RNA concentration above 100 ng. None of the samples were excluded due to insufficient RNA concentration.

Real-time PCR (qPCR) amplification was performed using a TaqManTM RNAto-CTTM 1-Step Kit (No 4392938, ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA) and a Quant-StudioTM 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Wilmington, DE, USA). The commercially available equine-specific TaqMan Gene Expression Assays (No 4448892 and 4441114, ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA) were used. The list of primers and 6-carboxyfluorescein (6-FAM) and 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)-labeled TaqMan probes used for the qPCR analysis was presented in Domino et al. [20]. Real-time PCR reaction had a 10 mL volume and included 15 ng of total RNA, 5 mL of TaqMan[®] RTPCR Mix (2 \times), 0.25 mL of TaqMan[®] RT Enzyme Mix (40 \times), 0.5 mL of TaqMan probe, and both PCR primers (ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA) for each gene of interest. The PCR protocol included four steps as follow reverse transcription (15 min at 48 $^{\circ}$ C), enzyme activation (10 min at 95 $^{\circ}$ C), 40 cycles of denaturation (15 s at 95 $^{\circ}$ C) and annealing/extension (1 min at 60 $^{\circ}$ C). Each sample was run in triplicate.

2.5. Data Analysis

Each endometrial sample was double categorized using estrous cycle criterion and endometriosis criterion. The estrous cycle determination data were listed as MLP or FLP for each endometrial sample. Independently, healthy endometria (C), and histopathological types of endometriosis data were allocated to each one of the following groups: C, E IN, E ID, E AN, or E AD. In each endometrial sample, transcription of the following eight genes was assessed by qPCR: *RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS 1*, *HAS 2*, and *HAS 3*. Raw data of genes transcription were normalized using the geometric mean of mRNA detected from two independent endogenous reference genes (*GAPDH*, *HPRT1*). The semi-quantitation of the target gene expression was performed in a comparative CT method ($\Delta\Delta$ CT method), where the target gene expression in the samples of category C was considered as Δ Ct Control Value.

2.6. Statistical Analysis

Univariate marginal distributions of Expression Fold Change ($2^{-\Delta\Delta$ Ct}) of the qPCR data were tested independently for each endometrial samples category and each target gene using a univariate Kolmogorov–Smirnov test. The comparison between histopathological types was assessed by Kruskal–Wallis test, followed by Dunn’s multiple comparisons test. The comparison between phases of estrous cycle was performed Unpaired t-test

with Welch's correction for normally distributed data pairs or Mann–Whitney test for non-Gaussian data pairs. Numerical data were reported on the box plots using minimum and maximum values, lower and upper quartiles, as well as median. The control group level was estimated as a maximal value of gene expression in a control group and marked on plots using a dashed line. The destructive group level was introduced when only destructive type samples were above the marked level. The destructive group level was marked on selected plots using a dashed line. The percentages of samples in each histopathological type with the value above the level of control group and destructive type were also calculated. All statistical analysis was performed using GraphPad Prism6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), where the significance level was established as $p < 0.05$.

3. Results

The heterogeneity of the distribution of transcripts of target genes in the control and endometriosis groups was observed (Figures 2–4), hence the intra-group variability was high. Therefore, the individual samples distribution was visualized including individuals of each endometriosis histopathological type and healthy endometrium.

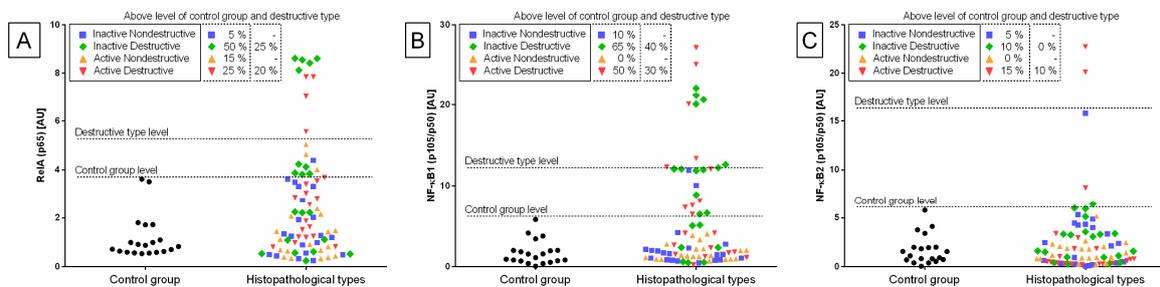


Figure 2. Distribution of (A) the gene transcription of the nuclear factor- κ B subunit RelA (*RelA*; *p65*), (B) nuclear factor- κ B subunit 1 (*NF- κ B1*; *p105/p50*), and (C) nuclear factor- κ B subunit 2 (*NF- κ B2*; *p100/p52*) in the mares' endometria in control group, and histopathological types marked with: blue squares, for the inactive nondestructive endometriosis ($n = 20$); green diamonds, for the inactive destructive endometriosis ($n = 20$); orange triangles, for the active nondestructive endometriosis ($n = 20$); and red triangles, for the active destructive endometriosis ($n = 20$). The percentage of samples that showed transcript values of a specific gene above the control group level and destructive type level are indicated in the dashed rectangles.

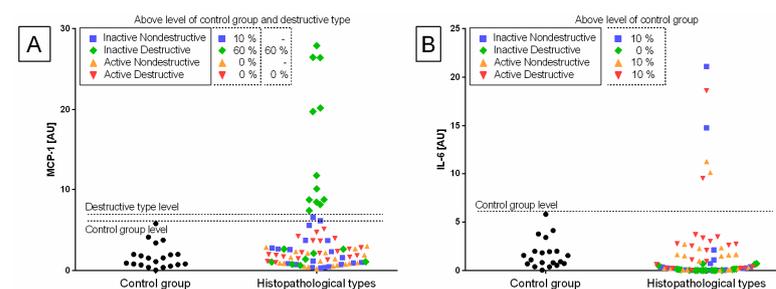


Figure 3. Distribution of (A) the gene transcription of monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*), and (B) interleukin-6 (*IL-6*) in the mares' endometria in control group and histopathological types marked with blue squares for the inactive nondestructive endometriosis ($n = 20$); green diamonds, for the inactive destructive endometriosis ($n = 20$); orange triangles, for the active nondestructive endometriosis ($n = 20$); and red triangles, for the active destructive endometriosis ($n = 20$). The percentage of samples that showed transcript values of a specific gene above the control group level and destructive type level are indicated in the dashed rectangles.

Individual sample distribution of mRNA levels of NF- κ B subunits (Figure 2), pro-inflammatory proteins (Figure 3), and hyaluronan synthases (Figure 4) differed in relation to the control group. Most individual transcript samples above the level of the control group represented *NF- κ B1* gene (60% E ID, 50% E AD, and 10% E IN), then *RelA* gene (50% E ID, 25% E AD, 15% E ID, and 5% E IN), *MCP-1* gene (60% E ID and 10% E IN), and *NF- κ B2* gene

(15% E AD, 10% E ID, and 5% E IN). For these four target genes, the individual distribution of transcripts of the destructive type dominated over the non-destructive type.

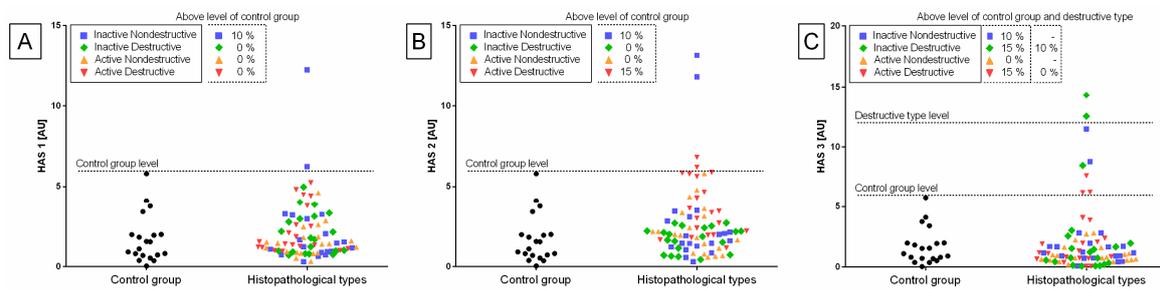


Figure 4. Distribution of gene transcription of (A) hyaluronan synthase 1 (*HAS 1*), (B) hyaluronan synthase 2 (*HAS 2*), and (C) hyaluronan synthase 3 (*HAS 3*) in the mares' endometria in control group and histopathological types marked with blue squares, for the inactive nondestructive endometrosis ($n = 20$); green diamonds, for the inactive destructive ($n = 20$); orange triangle, for the active nondestructive endometrosis ($n = 20$); and red triangles, for the active destructive endometrosis ($n = 20$). The percentage of samples that showed transcript values of a specific gene above the control group level and destructive type level are indicated in the dashed rectangles.

Transcription levels of all the genes under study were calculated for the destructive type. Most individual mRNA samples above the level of the destructive type corresponded to *MCP-1* gene transcripts (60% E ID), *NF- κ B1* gene transcripts (40% E ID and 30% E AD), and *RelA* transcripts (25% E ID and 20% E AD). However, transcription levels of *NF- κ B2* and *HAS 3* above the level of the destructive type of endometrium only occurred in 10% of E AD for *NF- κ B2* and 10% of E ID for *HAS 3* endometria. The remaining target genes transcripts did not meet the destructive type-level criterion.

The transcription of the genes under study in the histopathological types of equine endometrosis differed in relation to the control group for NF- κ B subunits of canonical (*RelA*, *NF- κ B1*), but not for the non-canonical (*NF- κ B2*) pathway (Figure 5), for *MCP-1* and *IL-6* (Figure 6), as well as for *HAS 2*, but not for *HAS 1* and *HAS 3* (Figure 7).

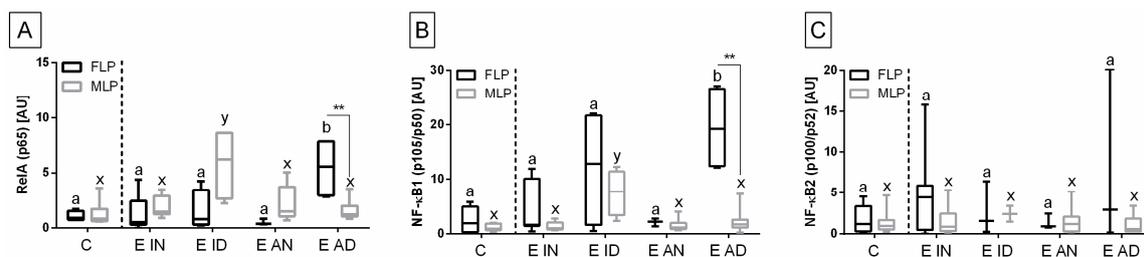


Figure 5. The transcription levels (minimum value, lower quartile, median, upper quartile, and maximum values) of (A) the nuclear factor- κ B subunit *RelA* (*RelA*; $p65$), (B) nuclear factor- κ B subunit 1 (*NF- κ B1*; $p105/p50$), and (C) nuclear factor- κ B subunit 2 (*NF- κ B2*; $p100/p52$) in the mare's endometria in follicular (FLP; $n = 50$) or mid-luteal (MLP; $n = 50$) phases of the estrous cycle. The endometrial samples classified as inactive nondestructive endometrosis (E IN; $n = 20$), inactive destructive endometrosis (E ID; $n = 20$), active nondestructive endometrosis (E AN; $n = 20$), or active destructive endometrosis (E AD; $n = 20$), and compared with the control group (C; $n = 20$). Lower case letters indicate differences between histopathological types of endometrosis for $p < 0.05$. Asterisks indicate differences between phases of estrous cycle (** $p < 0.01$).

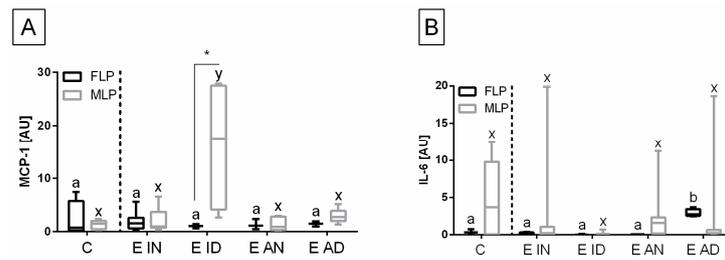


Figure 6. The transcription levels (minimum value, lower quartile, median, upper quartile, and maximum values) of (A) monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*) and (B) interleukin-6 (*IL-6*) in the mares' endometria in follicular (FLP; $n = 50$) or mid-luteal (MLP; $n = 50$) phases of the estrous cycle. The endometrial samples classified as inactive nondestructive endometriosis (E IN; $n = 20$), inactive destructive endometriosis (E ID; $n = 20$), active nondestructive endometriosis (E AN; $n = 20$), or active destructive endometriosis (E AD; $n = 20$), and compared with the control group (C; $n = 20$). Lower case letters indicate differences between histopathological types of endometriosis for $p < 0.05$. Asterisks indicate differences between phases of estrous cycle ($* p < 0.05$).

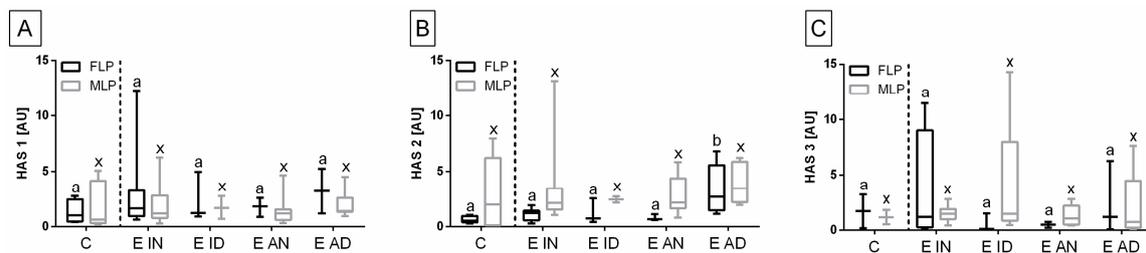


Figure 7. The expression levels (minimum value, lower quartile, median, upper quartile, and maximum values) of (A) hyaluronan synthase 1 (*HAS 1*), (B) hyaluronan synthase 2 (*HAS 2*), and (C) hyaluronan synthase 3 (*HAS 3*) in the mares' endometria in follicular (FLP; $n = 50$) and mid-luteal (MLP; $n = 50$) phases of the estrous cycle. The endometrial samples classified as inactive nondestructive endometriosis (E IN; $n = 20$), inactive destructive endometriosis (E ID; $n = 20$), active nondestructive endometriosis (E AN; $n = 20$), or active destructive endometriosis (E AD; $n = 20$), and compared with the control group (C; $n = 20$). Lower case letters indicate differences between histopathological types of endometriosis for $p < 0.05$.

The transcript expression of *RelA* gene was higher in E AD ($p = 0.033$) than in the other groups in the follicular phase, but not in the mid-luteal phase of the estrous cycle, as well as in E ID ($p = 0.018$) in mid-luteal phase, but not in the follicular phase. Moreover, *RelA* gene transcription also differed between follicular and mid-luteal phases in the E AD ($p = 0.006$; *RelA* higher in FLP), but not in E ID ($p = 0.114$) histopathological types (Figure 5A). Similarly, the transcription of *NF- κ B1* gene increased more in E AD ($p = 0.044$) than in the other groups in the follicular phase, but not in the mid-luteal phase. In addition, similarly to *RelA*, the transcription of *NF- κ B1* gene was higher in E ID ($p = 0.023$) than in the other groups in mid-luteal phase, but not in the follicular phase. The *NF- κ B1* gene transcription was raised in the follicular phase, only in the E AD ($p = 0.004$) histopathological type (Figure 5B). No differences in the expression of *NF- κ B2* gene were found between either the histopathological type or phases of the estrous cycle (Figure 5C).

The transcription of the *MCP-1* gene in the endometrium was higher in E ID ($p = 0.030$), than in the other groups, but only in the mid-luteal phase. In addition, *MCP-1* gene transcript was higher in the mid-luteal than in the follicular phases in the E ID histopathological type ($p = 0.047$) (Figure 6A). On the contrary, the transcription of *IL-6* gene was increased in E AD ($p = 0.028$) than in the other groups, but just in the follicular phase. However, no differences in the transcript level of *IL-6* were found between phases of estrous cycle in E AD ($p = 0.343$), and in any other histopathological groups (Figure 6B).

No differences in the transcription of *HAS 1* (Figure 7A) and *HAS 3* (Figure 7C) genes were found between either histopathological type of endometriosis or phases of estrous cycle. However, the transcript levels of *HAS 2* gene were higher in E AD ($p = 0.044$) than in

the other groups in the follicular phase, but not in the mid-luteal phase. Additionally, in all endometriosis groups, no differences in the mRNA levels of *HAS 2* were found between estrous cycle phases (Figure 7B).

4. Discussion

An interesting finding about the present results is the heterogeneity of gene transcription within a group. This can possibly indicate the complexity of endometriosis pathology and the involvement of some other pathways in cooperation with NF- κ B. Additionally, despite showing similar histopathological features, some mares could have been in a different stage of the disease. Thus, allocation of endometrial samples to the specific classification groups of Hoffmann and co-authors (2009) could be somehow inaccurate. In a single endometrial biopsy, usually endometrial glands may show different types of cells. Therefore, a biopsy assignment to Hoffmann et al.'s classification groups has been made based on the state of most glands [1].

In a previous study, we evaluated the transcription of NF- κ B pathway genes regarding Kenney and Doig's endometrial categories, but not the histopathological types of endometriosis [20]. Interestingly, in the present study, the destructive type of endometriosis showed the highest differences in the transcription of several genes. In other studies, this type of endometriosis depicted a larger modification of ECM, especially the increase in proteoglycans, fibronectin and laminin expression [1,3]. Our results suggest that in this specific type of endometriosis, severe changes in ECM may be associated with the NF- κ B pathway (Figure 8), which may regulate the production of connective tissue fibers. Since the destructive endometriosis is thought to decrease fertility more significantly than the non-destructive endometriosis, the NF- κ B pathway might be involved in endometrial changes, which might impair pregnancy success [3].

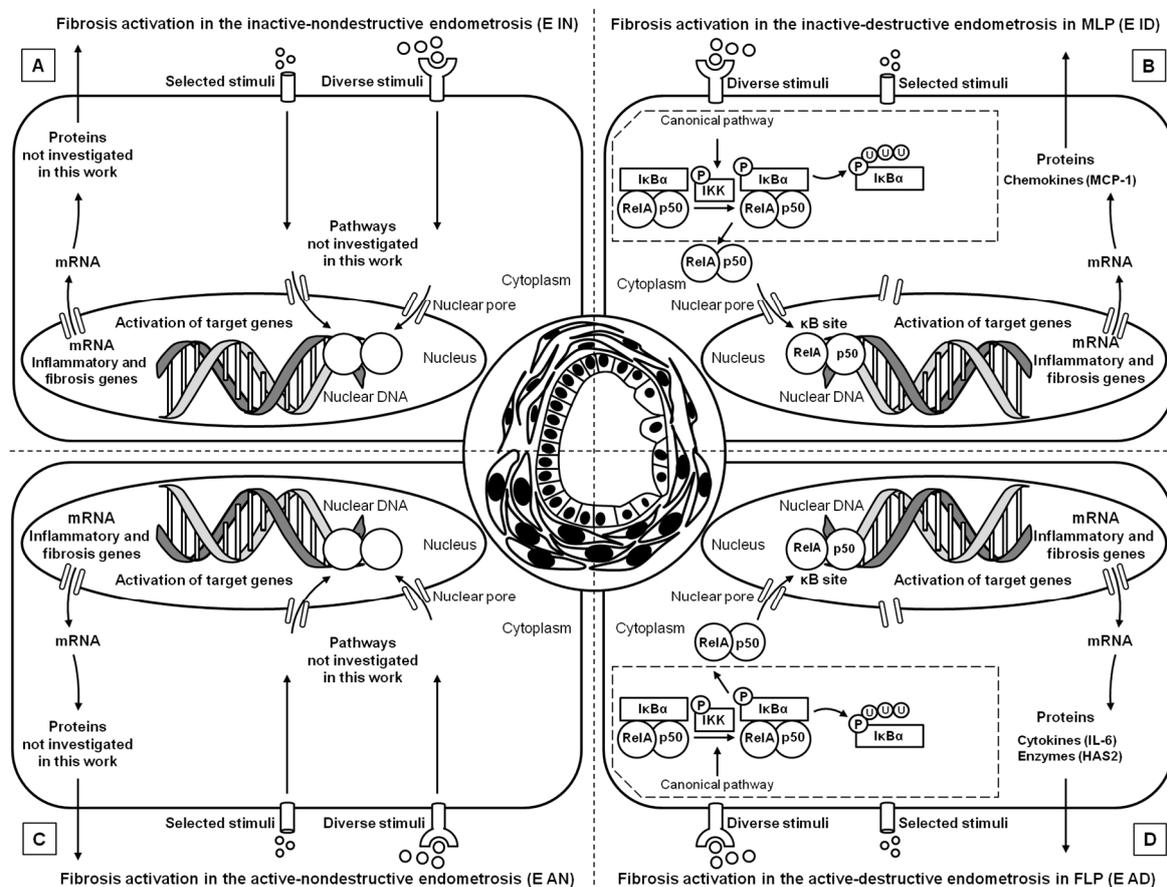


Figure 8. Schematic view of the NF- κ B signaling pathway in (A) the inactive nondestructive endometriosis, (B) the inactive destructive endometriosis, (C) the active nondestructive endometriosis, and (D) the active destructive endometriosis. Adaptation of the whole NF- κ B signaling pathway presented in Figure 1 in Domino et al. [20].

Regarding Kenney and Doig's categories, our previous study showed an increase in NF- κ B gene transcripts in the canonical pathway activation (*NF- κ B1*, *RelA*) and in the non-canonical pathway (*NF- κ B2*), observed only in FLP along with the increase in endometriosis severity [20]. However, considering the various histopathological types of mare endometriosis, the main differences regard the canonical pathway of activation, since *RelA*, *NF- κ B1*, and *MCP-1* genes transcripts increased in over than half of the endometria. It has been discovered that this pathway is coactivated by TNF α , another cytokine taking part in endometriosis pathogenesis, inducing fibroblasts' transformation into myofibroblasts [21,32]. The known increased presence of TNF α in the endometrium may be responsible for the increase in NF- κ B pathway proteins expression. The abovementioned activation may result in the promotion of MCP-1 expression, a potent factor increasing monocyte infiltration. Interestingly, these cells are the main producers of TNF α [32], thus this mechanism may act in a virtuous cycle.

Another explanation may be the fact that destructive endometriosis affects glands and glandular epithelium far more than nondestructive endometriosis [1,3]. The obtained results may show the influence of NF- κ B on the glandular epithelium, causing its degeneration, alteration in secretion composition and basal lamina degradation, which altogether decreases fertility [8]. However, there is no direct evidence proving NF- κ B involvement in basal lamina degradation, which needs to be further studied.

An increase in *RelA* transcription was noted in E AD in FLP and in E ID samples in MLP, similarly to *NF- κ B1*, associated with the canonical pathway. In addition, *MCP-1* increased in E ID in MLP, whereas *IL-6* raised in E AD in FLP, thus showing that the transcription of those genes depended not only on the type of endometriosis, but also on the phase of the estrous cycle. In contrast, when considering Kenney and Doig's endometrial classification, *IL-6* decreased significantly in FLP in samples with endometriosis [20]. These findings imply that endometrial changes induced by the NF- κ B pathway are estrous cycle-dependent. Moreover, this may suggest that the metabolic activity of fibroblasts in the endometria of mares may depend on estrous cycle regulation and variability in ovarian steroid hormones levels. However, further studies, including estrogen and progesterone receptors evaluation, are needed to confirm this theory, considering the expression of proven receptors during endometriosis [1–3].

Among the hyaluronan synthases, only the transcription of *HAS 2* showed significant changes in the endometriosis samples evaluated in the present study. An increase in *HAS 2* mRNA levels in E AD tissue retrieved in the FLP, similarly to *RelA* transcript data, suggests a connection between these proteins in endometriosis pathogenesis. On the contrary, when considering Kenney and Doig's categories, *HAS 3* gene transcriptions increased instead, in endometriosis tissues obtained in FLP [20]. Ohkawa et al. found that hyaluronan synthesis by fibroblasts is mediated by *RelA*, after stimulation by TNF α [33]. The difference found in gene transcription only in the follicular phase gives another evidence, that endometriosis pathogenesis might be somehow connected with the estrous cycle, as previously suggested [19].

The NF- κ B is known for stimulating ECM deposition in various tissues [22,23,27,29,32]. A quantitative assessment of endometriosis can be carried out based on *RelA*, *NF- κ B1*, and *MCP-1* gene transcription levels, as previously described for the use of uterocalin, uteroferrin, uteroglobin, and calbindin [8]. The achieved results may be helpful in the classification of endometriosis, as well as for the prognosis of disease development in clinical cases. However, further studies comparing NF- κ B canonical pathway proteins and epithelial cell degeneration are necessary for confirmation of this assumption. This study has shown the importance of the NF- κ B pathway on the pathogenesis of endometriosis. Since NF- κ B inhibitors have been successfully studied in suppressing ECM deposition in various tissues [34–36], this approach should be further studied as a therapeutic means for endometriosis, allowing for stopping or even reversing fibrosis.

The main limitation of this study is that the obtained data only pertain to gene transcription, and the assessment of the end products of genes in the endometrium is necessary.

The lack of immunohistochemistry for protein localization can be considered as a part of the explanation for the differing results of previous studies. Therefore, further studies encompass the use of immunohistochemistry for localization of proteins, and comparison among the various endometriosis types, which is crucial for further assumptions.

Summing up, activation of the NF- κ B canonical pathway may be associated with degeneration and necrosis of glandular epithelial cells, as results showed significant changes in gene transcription in destructive endometriosis. Moreover, steroid hormones possibly modulate the NF- κ B canonical pathway. Additionally, the activation of proinflammatory molecules, promoted by NF- κ B, may play a role in gland deformation and damage, acting on residual inflammatory cells located in ECM, but also promoting infiltration of further leukocytes. In this study, *RelA*, *NF- κ B2*, and *IL-6* transcription was increased in comparison with the control group in FLP in the active nondestructive type of endometriosis, whereas in our previous study, *RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *HAS 1*, and *HAS 3* transcription similarly increased in FLP in the respective types of Kenney and Doig's categories of endometrial classification when endometriosis was present [20]. Both findings suggest active remodeling of ECM in this phase of the cycle. Minor changes in the luteal phase may suggest that another set of chemokines present in the endometrium might be necessary to activate fibroblasts and myofibroblasts.

5. Conclusions

The NF- κ B pathway is important in the regulation of fibrosis during endometriosis, regarding the different types of this condition, based on histopathological lesions. The NF- κ B canonical pathway is upregulated especially in destructive fibrosis, indicating the highest intensity of changes in ECM deposition. The *MCP-1* gene transcription increased in the follicular phase in the inactive destructive type of endometriosis, whereas *IL-6* transcript levels raised in the mid-luteal phase in the active destructive endometriosis. Nevertheless, for further conclusions future studies are necessary, comprising more endometrial samples and additional research approaches.

Author Contributions: Conceptualization, T.J. and M.D.; methodology, T.J., Ł.Z., E.K. and M.D.; formal analysis, T.J., Ł.Z., G.F.-D. and M.D.; investigation, T.J., Ł.Z., E.K., E.J.-K., G.F.-D. and M.D.; resources, T.J. and M.D.; data curation, T.J.; writing—original draft preparation, T.J., Ł.Z. and M.D.; writing—review and editing, E.K., E.J.-K. and G.F.-D.; visualization, T.J. and M.D.; supervision, G.F.-D. and M.D.; project administration, T.J.; funding acquisition, M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by the National Science Centre, Poland, “Miniatura 2” Project, No. 2018/02/X/NZ4/00101.

Institutional Review Board Statement: The research, using the samples collected at a commercial slaughterhouse post mortem, does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes, national decree-law (Dz. U. 2015 poz. 266 and 2010-63-EU directive). No ethical approval was needed according to the list of exemptions of the II Local Committee for Ethics in Animal Research of Warsaw University of Life Sciences-SGGW (letter of September 27, 2021).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

C	endometrial samples classified to control group
E AD	endometrial samples classified to type active destructive
E AN	endometrial samples classified to type active nondestructive
E ID	endometrial samples classified to type inactive destructive
E IN	endometrial samples classified to type inactive nondestructive
ECM	extracellular matrix

FLP	follicular phases of the estrus
HAS 1	hyaluronan synthase 1
HAS 2	hyaluronan synthase 2
HAS 3	hyaluronan synthase 3
HE	hematoxylin-eosin staining
IL-6	interleukin-6
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MLP	mid-luteal phases of the estrus
NF- κ B1	nuclear factor- κ B subunit 1
NF- κ B2	nuclear factor- κ B subunit 2
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RelA	nuclear factor- κ B subunit RelA
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
TNF α	tumor necrosis factor α

References

- Hoffmann, C.; Ellenberger, C.; Mattos, R.C.; Aupperle, H.; Dhein, S.; Stief, B.; Schoon, H.A. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* **2009**, *111*, 261–278. [[CrossRef](#)]
- Schöniger, S.; Schoon, H.A. The healthy and diseased equine endometrium: A review of morphological features and molecular analyses. *Animals* **2020**, *10*, 625. [[CrossRef](#)]
- Kenney, R.M.; Doig, P.A. Equine endometrial biopsy. In *Current Therapy in Theriogenology*; Morrow, D.A., Ed.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA, 1986; pp. 723–729.
- Lehmann, J.; Ellenberger, C.; Hoffmann, C.; Bazer, F.W.; Klug, J.; Allen, W.R.; Sieme, H.; Schoon, H.A. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology* **2011**, *76*, 1326–1336. [[CrossRef](#)]
- 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. [[CrossRef](#)]
- Bischofberger, L.; Szewczyk, K.; Schoon, H.A. Unequal glandular differentiation of the equine endometrium—A separate endometrial alteration? *Pferdeheilkunde* **2019**, *35*, 304–315. [[CrossRef](#)]
- Minkwitz, C.; Schoon, H.A.; Zhang, Q.; Schöniger, S. Plasticity of endometrial epithelial and stromal cells—A new approach towards the pathogenesis of equine endometrosis. *Reprod. Dom. Anim.* **2019**, *54*, 835–845. [[CrossRef](#)]
- 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. [[CrossRef](#)]
- Stewart, F.; Gerstenberg, C.; Suire, S.; Allen, W.R. Immunolocalization of a novel protein (P19) in the endometrium of fertile and subfertile mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **2000**, *56*, 593–599.
- Schöniger, S.; Böttcher, D.; Theuß, T.; Gräfe, H.; Schoon, H.A. New insights into the innate immune defences of the equine endometrium: In situ and in vitro expression pattern of beta-defensin. *Pferdeheilkunde* **2016**, *32*, 4–14. [[CrossRef](#)]
- Schöniger, S.; Gräfe, H.; Richter, F.; Schoon, H.A. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 as transcript and protein in the healthy and diseased equine endometrium. *Res. Vet. Sci.* **2018**, *118*, 278–287. [[CrossRef](#)]
- Schöniger, S.; Gräfe, H.; Schoon, H.A. Innate immunity mechanisms of the equine endometrium—Benefit or harm? *Pferdeheilkunde* **2018**, *34*, 5–11. [[CrossRef](#)]
- Fouladi-Nashta, A.A.; Raheem, K.A.; Marei, W.F.; Ghafari, F.; Hartshorne, G.M. Regulation and roles of the hyaluronan system in mammalian reproduction. *Reproduction* **2017**, *153*, R43–R58. [[CrossRef](#)]
- Itano, N.; Sawai, T.; Yoshida, M.; Lenas, P.; Yamada, Y.; Imagawa, M.; Shinomura, T.; Hamaguchi, M.; Yoshida, Y.; Ohnuki, Y.; et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25085–25092. [[CrossRef](#)]
- Stern, R. Hyaluronan catabolism: A new metabolic pathway. *Eur. J. Cell. Biol.* **2004**, *83*, 317–325. [[CrossRef](#)]
- Walter, I.; Handler, J.; Miller, I.; Aurich, C. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometrosis. *Histol. Histopathol.* **2005**, *20*, 1105–1113.
- Rodriguez, H.I.; Stewart, A.J.; Wolfe, D.F.; Caldwell, F.J.; Harrie, M.; Whitley, E.M. Immunolocalization of the hyaluronan receptor CD44 in the reproductive tract of the mare. *Theriogenology* **2011**, *75*, 276–286. [[CrossRef](#)]
- Rebordão, M.R.; Galvao, A.; Szostek, A.; Amaral, A.; Mateus, L.; Skarzynski, D.J.; Ferreira-Dias, G. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reprod. Domest. Anim.* **2014**, *49* (Suppl. S4), 82–87. [[CrossRef](#)]
- 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. [[CrossRef](#)]
- Domino, M.; Jasinski, T.; Kautz, E.; Juszczyk-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. [[CrossRef](#)]

21. 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 endometriosis. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1119. [[CrossRef](#)]
22. Ahn, B.N.; Song, M.H.; Kim, J.H.; Kim, K.H.; Park, K.K.; Choi, Y.S. Intra-peritoneal NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide decreases postoperative intra-abdominal adhesion. *Korean J. Obstet. Gynecol.* **2012**, *55*, 244–249. [[CrossRef](#)]
23. Sosińska, P.; Baum, E.; Maćkowiak, B.; Staniszewski, R.; Jasinski, T.; Umezawa, K.; Bręborowicz, A. Inhibition of NF-kappaB with Dehydroxymethylepoxyquinomicin modifies the function of human peritoneal mesothelial cells. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 5756.
24. Alekseevna, R.V.; Pavlovich, D.A.; Evgenievich, B.Y.; Viktorovich, N.S. Nuclear factor kappa B as a potential target for pharmacological correction endothelium-associated pathology. *Res. Res. Pharm.* **2017**, *3*, 114–124.
25. Arjmand, M.H. The association between visceral adiposity with systemic inflammation, oxidative stress, and risk of post-surgical adhesion. *Arch. Physiol. Biochem.* **2020**, *6*, 1–6. [[CrossRef](#)]
26. Dejban, P.; Nikravangolsefid, N.; Chamanara, M.; Dehpour, A.; Rashidian, A. The role of medicinal products in the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD) through inhibition of TLR4/NF-kappaB pathway. *Phytother. Res.* **2021**, *35*, 835–845. [[CrossRef](#)]
27. May, M.J.; Ghosh, S. Signal transduction through NF- κ B. *Trends Immunol.* **1998**, *19*, 80–88. [[CrossRef](#)]
28. Lind, D.S.; Hochwald, S.N.; Malaty, J.; Rekkas, S.; Hebig, P.; Mishra, G.; Moldawer, L.L.; Copeland, E.M., III; MacKay, S. Nuclear factor- κ B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* **2001**, *130*, 363–369. [[CrossRef](#)]
29. Umezawa, K. Possible role of peritoneal NF- κ B in peripheral inflammation and cancer: Lessons from the inhibitor DHMEQ. *Biomed. Pharmacother.* **2011**, *65*, 252–259. [[CrossRef](#)]
30. Roberto da Costa, R.P.; Serrao, P.M.; Monteiro, S.; Pessa, P.; Robalo Silva, J.; Ferreira-Dias, G. Caspase-3 mediated apoptosis and cell proliferation in the equine endometrium during the oestrous cycle. *Reprod. Fertil. Dev.* **2007**, *19*, 925–932. [[CrossRef](#)]
31. Schoon, H.A.; Schoon, D.; Klug, E. Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde* **1997**, *13*, 453–464. [[CrossRef](#)]
32. Brasier, A.R. The nuclear factor- κ B–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *86*, 211–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ohkawa, T.; Ueki, N.; Taguchi, T.; Shindo, Y.; Adachi, M.; Amuroa, Y.; Hada, T.; Higashino, K. Stimulation of hyaluronan synthesis by tumor necrosis factor- α is mediated by the p50/p65 NF- κ B complex in MRC-5 myofibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1999**, *1448*, 416–424. [[CrossRef](#)]
34. Caon, I.; Bartolini, B.; Moretto, P.; Parnigoni, A.; Carava, E.; Vitale, D.L.; Alaniz, L.; Viola, M.; Karousou, E.; De Luca, G.; et al. Sirtuin 1 reduces hyaluronan synthase 2 expression by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B and expression of the long-noncoding RNA HAS2-AS1. *J. Biol. Chem.* **2017**, *295*, 3485–3496. [[CrossRef](#)]
35. Tong, W.; Geng, Y.; Huang, Y.; Shi, Y.; Xiang, S.; Zhang, N.; Qin, L.; Shi, Q.; Chen, Q.; Dai, K.; et al. In vivo identification and induction of articular cartilage stem cells by inhibiting NF- κ B signaling in osteoarthritis. *Stem Cells* **2015**, *33*, 3125–3137. [[CrossRef](#)]
36. Chung, S.; Son, M.; Kim, M.; Koh, E.S.; Shin, S.J.; Park, C.W.; Kim, S.; Kim, H.S. Inhibition of p300/CBP-associated factor attenuates renal tubulointerstitial fibrosis through modulation of NF- κ B and Nrf2. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells

Tomasz Jasiński¹  | Łukasz Zdrojkowski¹  | Ewa Kautz²  | Edyta Juszcuk-Kubiak³  | Graça Ferreira-Dias⁴  | Małgorzata Domino¹ 

¹Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (WULS - SGGW), Warsaw, Poland

²Department of Molecular Biology, Institute of Genetics and Animal Biotechnology of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, Poland

³Laboratory of Biotechnology and Molecular Engineering, Department of Microbiology, Prof. Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Warsaw, Poland

⁴Departamento de Morfologia e Função, CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

Correspondence

Małgorzata Domino, Department of Large Animal Diseases with Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (WULS - SGGW), Nowoursynowska 100, 02-778 Warsaw, Poland.

Email: malgorzata_domino@sggw.edu.pl

Funding information

National Science Centre

Abstract

Endometritis is an important issue decreasing mares' fertility. In the case of endometritis, both inflammatory cells infiltration and proinflammatory molecules production are regulated by various cellular and gene regulatory mechanisms, including the nuclear factor- κ B (NF- κ B)-dependent pathway. NF- κ B-signalling pathway has been recently studied in the equine endometrium in the context of endometrosis. Thus, this study aimed to determine gene transcription of NF- κ B subunits (*RelA*; *NF- κ B1*; *NF- κ B2*), proinflammatory molecules (*MCP-1*; *IL-6*) and hyaluronan synthases (*HAS 1*; *HAS 2*; *HAS 3*) in endometritis and compare them with the intensity and type of inflammatory cell infiltration. Endometrial samples, collected post-mortem from cyclic mares in oestrus or dioestrus, were classified histologically and examined using quantitative PCR. Transcription NF- κ B subunits genes did not differ with either inflammatory intensity or type of inflammatory cell infiltration. Transcription of *MCP-1* and *IL-6* genes increased with the severity of inflammation, with the involvement of *HAS 3* and *HAS 2* genes, as opposed to *HAS 1* genes. These proinflammatory molecules and hyaluronan synthases in the equine inflamed endometrium do not seem to be regulated by the NF- κ B pathway. Hence, separate signalling pathways for the development and progression of equine endometritis and endometrosis may be suggested.

KEYWORDS

endometritis, HAS, IL-6, mare, MCP-1, NF- κ B

1 | INTRODUCTION

As mucous membranes are a part of the integumentary system, they play a crucial role in the protection of the underlying tissues from damage and infection. Thus, it is reasonable that, even in healthy tissue, inflammatory cells are present. While some infiltrate cells are sparsely distributed along with the tissue, some can be found

in lymphatic follicles and around the endometrial glands, such as mononuclear inflammatory cell infiltrates interpreted as a regular component of the mucosa-associated lymphoid tissue in submucous membranes (Klose & Schoon, 2016). This is the first barrier of an organism, while these cells are the first guardians against threats to homeostasis (Christoffersen & Troedsson, 2017). Mares' endometrium may be facing bacterial influx during oestrus, after

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Reproduction in Domestic Animals* published by Wiley-VCH GmbH.

insemination/mating, delivery or even during diagnostic procedures, so the constant presence of limited infiltrate is legitimate. Apart from an immune role, these cells not also have a regulatory function, influencing fibroblasts, but also epithelium (Skarzynski et al., 2020).

Physiologically, neutrophils (polymorphonuclear cells, PMN) may be present in the lumen of a uterus only in oestrus, when the cervix is open and bacterial influx is possible. At that time, these cells may be found in the stratum compactum (SC) and in the lumen of endometrial glands (Overbeck et al., 2011). In addition, other types of cells, such as lymphocytes, macrophages and eosinophils, are in the endometrium in restricted amounts throughout the oestrous cycle. Most numerous inflammatory cells are lymphocytes, commonly seen not only in extracellular matrix (ECM) but also between epithelial cells (Watson & Thomson, 1996; Schöniger & Schoon, 2020). Macrophages and eosinophils are not so common in the endometrium. However, still, their presence in healthy endometrium is possible. There are always more cells in the SC of the endometrium, just below the luminal epithelium than in the stratum spongiosum (SP) (Watson & Thomson, 1996; Oddsdóttir et al., 2008; Overbeck et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020).

When the amount of the inflammatory cells infiltrating the uterine mucous membrane increases over the physiological level, endometritis develops (Morris et al., 2020). Endometritis is an important, often diagnosed issue decreasing mares' fertility. It can be divided into the acute post-breeding form, characterized by a substantial increase in neutrophil presence in the endometrium, while in chronic inflammation, the number of lymphocytes considerably rises. While macrophages are presumed to regulate inflammation severity, eosinophils are present primarily in chronic endometritis. Regulatory mechanisms in inflammation are driven by cytokines, used for communication between cells in the endometrial microenvironment, as well as during inflammation activation. They may be produced by inflammatory cells, fibroblasts and epithelial cells. The most important cytokines in case of endometritis seem to be interleukins 1 β , 6 and 10 (IL-1 β , IL-6 and IL-10), besides tumour necrosis factor α (TNF- α). They are mostly proinflammatory, causing an increased influx of specific types of cells into the lumen of the uterus and endometrium itself (Schöniger & Schoon, 2020; Skarzynski et al., 2020). IL-6 was found to play a predominant role in immune response in mares resistant to persistent breeding-induced endometritis (PBIE), determining proper inflammatory reaction. It plays a role in the transition from acute to chronic inflammation, thus playing an important role as a modulator of inflammatory infiltration (Woodward et al., 2013). The release of IL-6 is among others promoted by monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). Importantly, MCP-1 itself is responsible for tissue migration and infiltration of immune cells in developing inflammation. Therefore, its expression is related to the intensity of inflammatory response in endometritis (Xu et al., 2015).

Both inflammatory cell infiltration and cytokine production are modulated by various cellular and gene regulatory mechanisms (Skarzynski et al., 2020). One of such mechanisms is the nuclear factor- κ B (NF- κ B)-dependent pathway, which has been studied in the

equine endometrium in the context of fibrosis or inflammation. NF- κ B transmission is involved in the synthesis of many proteins important in fibrotic, inflammatory and defence processes, regulating the expression of many different genes (May & Ghosh, 1998; Lind et al., 2001; Tripathi & Aggarwal, 2006; Domino et al., 2020). The NF- κ B family of proteins consists of five transcription factors, which can be divided into two groups in terms of their differences in structure, function and mechanism of formation. The first includes proteins: RelA (p65), RelB and cRel, while the second includes NF- κ B1 (p50/p105) and NF- κ B2 (p52/p100). The RelA, RelB and cRel proteins are characterized by the presence of transcription activation domain sequences, thanks to which they can activate the transcription of DNA molecules. The NF- κ B1 and NF- κ B2 proteins are synthesized as precursor proteins. As a result of proteolysis, active forms, p50 and p52, are formed. These proteins do not have domains necessary to activate transcription, however, when they form dimers with the RelA proteins, RelB and cRel are active forms (May & Ghosh, 1998). These active forms function as regulatory transcription proteins. Depending on the activating stimuli of the activation mechanism, the ways of activating NF- κ B proteins were distinguished as canonical and non-canonical (Umezawa, 2011). The classic activation pathway depends mainly on the κ B inhibitor kinase complex (IKK). IKK β kinase phosphorylates nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α (I κ B α), which is ubiquitinated and degraded, thanks to which free p50/RelA and p50/c-Rel dimers are transported from the cytoplasm to the cell nucleus. An alternative activation route depends on the IKK α subunit, a part of the IKK complex, which phosphorylates the p100 protein, which is part of the p100/RelB dimer, which is still transcriptionally inactive. The phosphorylated p100 protein is ubiquitinated, the end of the protein chain is degraded and the p52 protein is being formed. The active p52/RelB dimer penetrates the cytoplasm and influences the transcription of specific genes (May & Ghosh, 1998; Lind et al., 2001; Domino et al., 2020).

The NF- κ B pathway is thought to be crucial in the development of immune response, both by stimulating and inhibiting gene expressions in various cell types. Yet, any dysregulation of this system results in immune response disturbance. Interestingly, in the equine endometrium, both types of NF- κ B activation are suspected to downregulate IL-6, having multiple functions in inflammation regulation (Tripathi & Aggarwal, 2006; Domino et al., 2020). Cytokines are not the only proinflammatory products of NF- κ B activation. Hyaluronan synthases (HAS 1, 2 and 3) are suspected to increase cell migration and adhesion, which also affect immune cell infiltration. Their properties influence the early stage of inflammation and modulate it (Necas et al., 2008). Additionally, HASs, IL-6 and MCP-1 seem to play an important role in the pathogenesis of endometriosis, another crucial reproductive problem in mares (Aresu et al., 2012). Endometritis and inflammation regulators are suspected to have a part in endometriosis pathogenesis, or even to be the main cause (Aresu et al., 2012; Rebordão, Carneiro, et al., 2014; Rebordão et al., 2018; Skarzynski et al., 2020).

Those recent findings raise the problem of NF- κ B-signalling effect on leukocyte infiltration in the equine endometrium. Thus, this study aimed to compare gene transcription of NF- κ B subunits (*RelA*; *NF- κ B1*; *NF- κ B2*), proinflammatory molecules (*MCP-1*; *IL-6*) and hyaluronan synthases (*HAS 1*; *HAS 2*; *HAS 3*) depending on the inflammatory infiltration intensity and the type of inflammatory cell infiltration.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Samples collection

Biological material for this study consisted of equine internal genitalia and blood. Samples were collected from 187 Polish warm-blood mares (aged from 3 to 25 years) at a commercial abattoir in Poland. Samples were collected post-mortem in reproductive season from April to September so that no Ethical Committee's permission was needed. According to decision of II Local Committee for Ethics in Animal Research WULS in Warsaw, this type of project does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes (national decree-law, Dz. U. 2015 poz. 266 and EU law, 2010-63-EU directive). Equine internal genitalia included ovaries and two endometrial samples from the uterine body. Samples were collected immediately after evisceration. Ovaries were placed into containers with cold saline (0.9% NaCl, Polfa S.A., Poland), transported at +4°C to the laboratory and sectioned to note the presence and diameter of follicles and/or corpus luteum. Endometrial samples were collected for histological examination and gene transcription analyses. Samples for histological examination were collected into container with the 10% formalin (Sigma-Aldrich, Poland), fixed routinely and embedded in paraffin equivalent (Sigma-Aldrich, Poland). Sample for gene transcription analyses was collected into RNase-free Eppendorf tubes (Eppendorf AG, Germany), snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Blood samples were collected into dry tubes (BD Vacutainer®, UK), transported to the laboratory at +4°C and centrifuged (2,000x g, 5 min). The serum free from any apparent haemolysis was aspirated and stored at -20°C for further hormone's analyses.

2.2 | Histopathological examination

Endometrial samples in paraffin blocks were cut in 5 μ m sections (rotation microtome Leica RM2255; Kawa-Ska, Polska) and mounted on silanized glass slides. Standard histological staining procedure was performed including deparaffinization, rehydration, stained in automated slide stainer (Multistainer Leica ST5020; Kawa-Ska, Polska) with haematoxylin (3801520E, Leica, United States) and eosin (HT1103128; Sigma Aldrich, Poland) (HE staining) and mounted under Canadian balsam (Sigma-Aldrich, Poland). Stained slides were examined under a light microscope (Olympus BX43, Poland) to assess the presence of inflammation

and the appearance or severity of pathological degenerative changes. Each endometrial sample was triple categorized using two endometritis criteria (the intensity and the type of inflammatory cell infiltration) and the oestrous cycle criterion (the follicular phase, FLP, and the mid-luteal phase, MLP). Endometrial samples were classified as presenting endometritis or not (control group) focusing on the SC. Three groups regarding the intensity of inflammatory cell infiltration, and independent from the four groups of different types of inflammatory cell infiltration, were created. The intensity of inflammatory cell infiltration was quantified as mild infiltration, moderate infiltration or severe infiltration, whereas the type of inflammatory cell infiltration was classified as macrophages infiltration, neutrophil infiltration, lymphocytes infiltration or mixed infiltration based on the type of cells recognized in the histologic sections. Neutrophil and macrophage mild infiltration was considered when 1–2 cells were depicted per 5 microscopic fields; moderate infiltration when 3–4 cells were present and severe infiltration showed >5 cells (Ricketts & Alonso, 1991; Summerfield & Watson, 1998). For lymphocyte infiltration, evenly scattered lymphoid cells were the grounds for classification as mild infiltration, while addition of aggregates was seen in moderate infiltration, and multiple aggregates, with more lymphoid cells than fibroblasts in SC, were recognized as severe infiltration (Watson & Thomson, 1996; Nervo et al., 2019). Mixed infiltration was considered when at least two types of cells with moderate level of infiltration were present in endometrium. When the microscopic hallmarks of endometrosis were observed (Schöniger & Schoon, 2020), the sample was excluded from the studied group. Among 187 collected samples, 67 samples were excluded based on the endometrosis recognition and 120 samples were classified as endometrosis free. Only endometrosis-free samples were qualified for gene transcription evaluation. Among 120 qualified samples, 24 samples of healthy endometrial tissue were included in the control group ($n = 24$). Half of the samples were collected from mares in FLP ($n = 12$) and the other half in MLP ($n = 12$) of the oestrous cycle. The remaining 96 samples were assigned to each of the three groups of the intensity of inflammatory cell infiltration, as follows: (i) mild infiltration ($n = 32$), (ii) moderate infiltration ($n = 32$) or (iii) severe infiltration ($n = 32$). In addition, independently from each of these four groups, equine endometrial histological samples were categorized according to the type of inflammatory cell infiltration, as follows: (i) macrophages infiltration ($n = 24$), (ii) neutrophil infiltration ($n = 24$), (iii) lymphocytes infiltration ($n = 24$) or (iv) mixed infiltration ($n = 24$). In all groups, half of the endometrial samples were collected from mares in FLP and grouped depending on the infiltration intensity ($n = 16$ samples from each group); or on the infiltration type ($n = 12$ samples from each group). Likewise, the other half of the endometrial samples were from mares in MLP and were classified according to the infiltration intensity ($n = 16$ samples from each group); or on the infiltration type ($n = 12$ samples from each group). Part of the results on the transcription of selected genes in healthy endometrial tissue were previously documented (Domino et al., 2020).

2.3 | Gene transcription evaluation

Frozen endometrial samples were mechanically disrupted in liquid nitrogen environment and then homogenized (50 mg of each sample; Lysing Matrix D tubes, MP Biomedicals, United States). The total RNA was extracted using the standard protocol (High Pure RNA Tissue kit; Roche, Switzerland). A DNase treatment was performed, and the RNA concentration was determined with absorbance ratios A260/280 and A260/230 (DS-11 FX spectrophotometer; DeNovix, United States). All samples evaluated in this study had a high enough RNA concentration, beyond 100 ng. In each endometrial sample, transcription of the following eight genes was assessed by real-time PCR (qPCR): *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS 1*, *HAS 2* and *HAS 3*. The qPCR amplification was performed using a TaqMan™ RNAto-CT™ 1-Step kit (No 4392938, ThermoFisher, United States) and a Quant-Studio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, United States). The commercially available equine-specific TaqMan Gene Expression Assays (No 4448892 and 4441114, ThermoFisher, United States) were used. The list of primers and 6-carboxyfluorescein (6-FAM) and 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)-labelled TaqMan probes was previously documented (Domino et al., 2020) and listed in Table 1. The qPCR reaction (10 ml volume per each reaction) included as follows: (i) 15 ng of total RNA, (ii) 5 ml of TaqMan® RT-PCR Mix (2X), (iii) 0.25 ml of TaqMan® RT Enzyme Mix (40X), (iv) 0.5 ml of TaqMan probe and (v) both PCR primers (ThermoFisher, USA) for each gene of interest. The qPCR protocol included four steps as follows: (i) reverse transcription (15 min at 48°C), (ii) enzyme activation (10 min at 95°C), (iii) 40 cycles of denaturation (15 s at 95°C) and (iv) annealing/extension (1 min at 60°C). Each sample was run in triplicate. Raw data of genes transcription were normalized using the geometric mean of reference genes (GAPDH, HPRT1). The semi-quantitation of the target gene expression was performed in a comparative CT method ($\Delta\Delta\text{CT}$ method), where the target gene expression in the samples of control group was considered as ΔCt control value.

TABLE 1 List of primers and TaqMan probes used for the qRT-PCR analysis

Gene	TaqMan assay ID/primers/probe	Amplicon length (bp)
<i>RelA</i> (p65)	Bt03253757_m1	59
<i>NK-κβ1</i> (p105/p50)	Bt03243456_m1	107
<i>NK-κβ2</i> (p100/p52)	Bt03272792_g1	101
<i>MCP-1</i> (CCL2)	Ec03468496_m1	66
<i>IL-6</i>	Ec03468680_m1	117
<i>HAS1</i>	F:GCCTATCAGGAACAACCTCC R: TAGCCCATGCTGAGCATC P: ACAACCAGAAGTTCCTGGGCACCCAC	124
<i>HAS2</i>	Ec03467769_m1	63
<i>HAS3</i>	Bt04298490_m1	73
<i>GAPDH</i>	Ec03210916_gH	118
<i>HPRT1</i>	Ec03470217_m1	84

2.4 | Phases of oestrous cycle determination

In stored serum samples, the progesterone (P4) concentration was determined using a commercial radioimmunoassay (KIP 1458; DIAsource ImmunoAssays SA, Belgium; intra-assay coefficient of variation <5.6%; inter-assay coefficient of variation <8.8%). The standard protocol was used and the absorbance was measured by Multiscan Reader (Labsystem, Finland) Genesis and V 3.00 software. The P4 concentration and the ovaries macroscopic view were used to determinate the phases of the oestrous cycle, following da Costa et al. (2007) protocol. Mares were assigned into FLP group when P4 concentration was <1 ng/ml, and at least one follicle >35 mm in diameter in any of the ovaries, and no corpus luteum present was demonstrated. Mares were assigned in MLP group when P4 concentration was >1 ng/ml and on both ovaries, none of the follicles >35 mm in diameter and at least one corpus luteum was demonstrated. Among 120 endometrial samples, 60 samples were qualified as belonging to MLP mares ($n = 60$) or FLP mares ($n = 60$) groups. None of the samples was excluded due to the failure phase determination.

2.5 | Statistical analysis

Univariate marginal distributions of normalized qPCR data were tested independently for each endometrial samples group and each target gene using a univariate Kolmogorov–Smirnov test. Because of the non-Gaussian distribution of at least one data series in each data being compared, the comparisons within the intensity of inflammatory cell infiltration groups and the type of inflammatory cell infiltration groups were assessed by Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test. The comparisons between phases of the oestrous cycle were performed by unpaired t test with Welch's correction for Gaussian data pairs or Mann–Whitney test for non-Gaussian data pairs. Numerical data were reported on plots as mean + standard deviation (SD). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism6 software (GraphPad Software Inc., USA), where the significance level was established as $p < 0.05$.

3 | RESULTS

The transcription of the genes of NF- κ B subunits under study did not differ in equine endometrium depending on the intensity of inflammatory cell infiltration for both the canonical (*RelA*, $p = .1$, [Figure 1a](#); *NF- κ B1*, $p = .8$, [Figure 1b](#)) and the non-canonical (*NF- κ B2*, $p = .8$, [Figure 1c](#)) pathways. Similarly, the transcription of the genes *RelA* ($p = .2$, [Figure 1d](#)), *NF- κ B1* ($p = .9$, [Figure 1e](#)) and *NF- κ B2* ($p = .9$, [Figure 1f](#)) did not differ with the type of inflammatory cell infiltration.

The transcription of *MCP-1* gene was higher in equine endometrium with the moderate and severe intensity of inflammatory cell

infiltration than in the mild-intensity infiltration group and the control group ($p = .02$, [Figure 2a](#)), whereas the transcription of *IL-6* gene increased gradually with the intensity infiltration. Compared to the control group, *IL-6* gene transcription was higher in the moderate-intensity infiltration group and the highest in the severe-intensity infiltration group with no differences between moderate and severe groups, mild and moderate groups as well as control and mild groups ($p = .001$, [Figure 2b](#)). Moreover, the transcription of both *MCP-1* ($p = .0004$, [Figure 2c](#)) and *IL-6* genes was higher in equine endometrium with macrophages infiltration than in the control groups ($p < .0001$, [Figure 2d](#)), with no differences with the neutrophil, lymphocytes and mixed types of inflammatory cell infiltration. Additionally, the transcription of *IL-6*

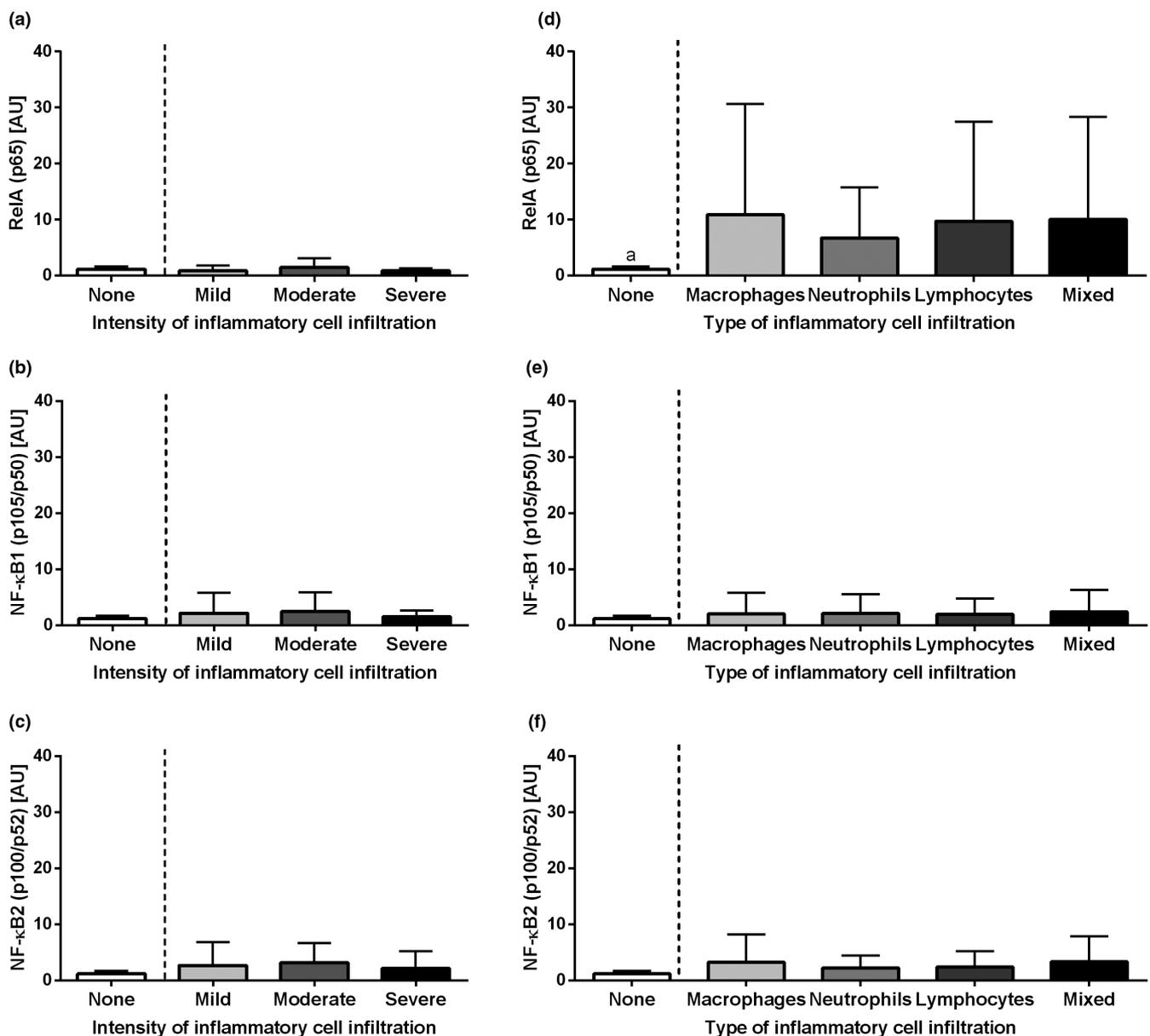


FIGURE 1 The transcription levels (mean + SD) of the nuclear factor- κ B subunit *RelA* (*RelA*; *p65*) (a, d); of nuclear factor- κ B subunit 1 (*NF- κ B1*; *p105/p50*) (b, e) and of nuclear factor- κ B subunit 2 (*NF- κ B2*; *p100/p52*) (c, f) in the mares' endometrium. The endometrial samples evaluated with respect to the intensity of inflammatory cell infiltrate (none, mild, moderate and severe) are shown in graphs a, b and c, and according to the type of inflammatory cell infiltration (macrophages, neutrophils, lymphocytes and mixed cells) or no cell infiltration detected (none) in d, e and f. No significant differences were found between groups ($p > .05$)

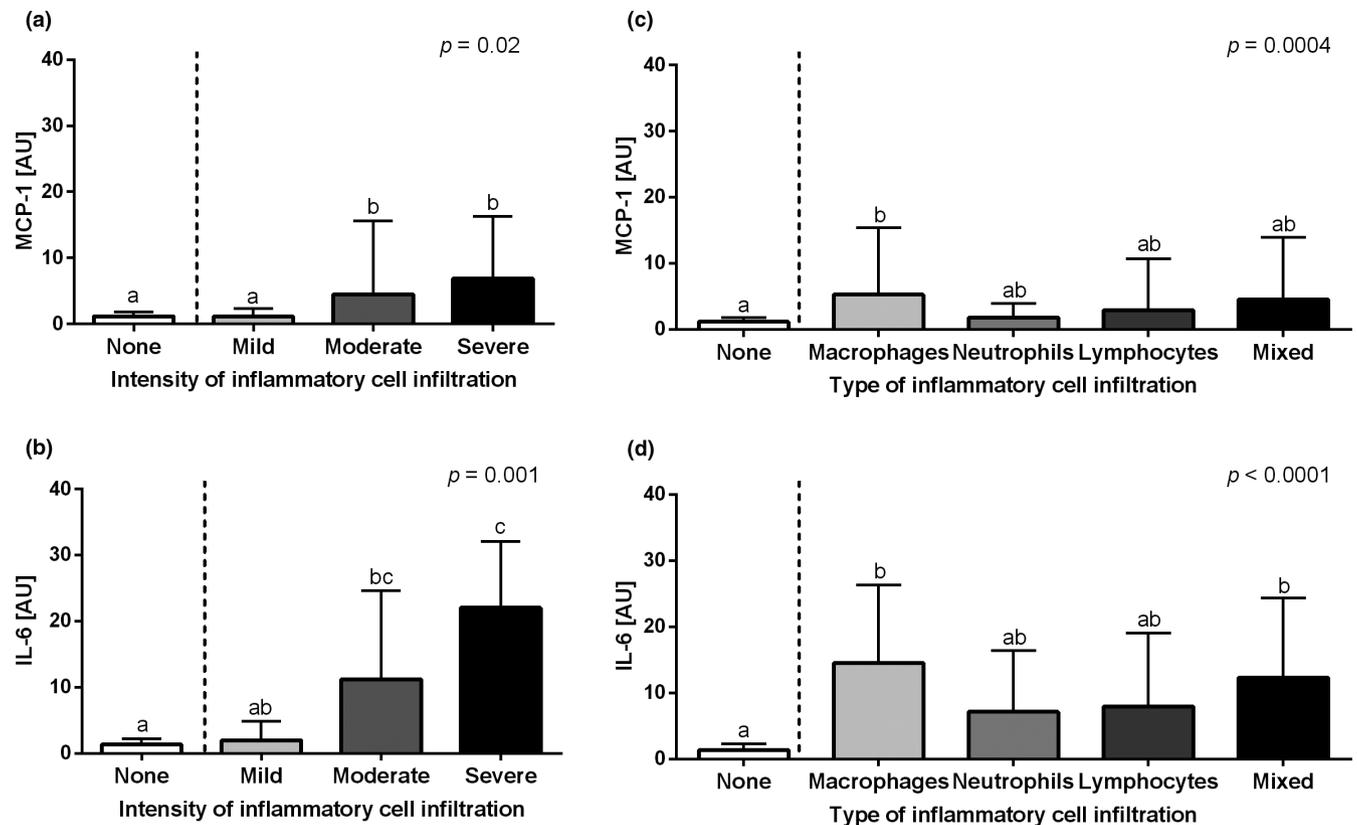


FIGURE 2 The transcription levels (mean + SD) of (a, c) the monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*) and (b, d) interleukin-6 (*IL-6*) in the mares' endometrium. The endometrial samples evaluated with respect to the intensity of inflammatory cell infiltrate (none, mild, moderate and severe) are shown in graphs A and B, and according to the type of inflammatory cell infiltration (macrophages, neutrophils, lymphocytes and mixed cells) or no cell infiltration detected (none) in C and D. Different letters indicate differences between groups for $p < .05$

gene was also increased in the equine endometrium with mixed infiltration than in the control groups.

The transcription of the HASs genes under study differed depending on both type of HAS and the inflammatory status of endometrium. The transcription of *HAS 1* gene did not differ in equine endometrium depending on both the intensity ($p = .1$, Figure 3a) and the type ($p = .8$, Figure 3d) of inflammatory cell infiltration. On the other hand, the transcription of *HAS 2* gene was higher in equine-infiltrated endometrium than in the control group regardless of the intensity infiltration and with no differences among mild, moderate and severe groups ($p = .0004$, Figure 3b). Similarly, the transcription of *HAS 3* gene was higher in equine endometrium with the mild- and moderate-intensity infiltration than in the control group, but not in the severe infiltration group. No differences were noted for the *HAS 3* gene transcription between the control and severe groups, as well as mild, moderate and severe groups ($p = 0.02$, Figure 3c). The transcription of both *HAS 2* ($p = .0006$, Figure 3e) and *HAS 3* ($p = .03$, Figure 3f) genes was higher in equine endometrium with macrophages, lymphocytes and mixed infiltration than in the control groups. Yet, no differences between the control and neutrophil infiltrated groups as well as between groups with different types of inflammatory cell infiltration were noted.

When the phases of the oestrous cycle were considered, as before the transcription of the genes of NF- κ B subunits did not differ in equine endometrium depending on the intensity of inflammatory cell infiltration for both the canonical (*RelA*, FLP $p = .4$, MLP $p = .4$, Figure 4a; *NF- κ B1*, FLP $p = .5$, MLP $p = .06$, Figure 4b) and the non-canonical (*NF- κ B2*, FLP $p = .9$, MLP $p = .7$, Figure 4c) pathways. Likewise, the transcription of the genes of *RelA* (FLP $p = .3$, MLP $p = .6$, Figure 4d), *NF- κ B1* (FLP $p = .9$, MLP $p = .5$, Figure 4e) and *NF- κ B2* (FLP $p = .996$, MLP $p = .6$, Figure 4f) did not differ depending on the type of inflammatory cell infiltration. No differences ($p > .05$) were found between the phases of the oestrous cycle for any of the studied NF- κ B subunits.

When the phases of the oestrous cycle were considered, the transcription of *MCP-1* gene did not differ in equine endometrium depending on the intensity of inflammatory cell infiltration (FLP $p = .253$, MLP $p = .142$, Figure 5a), whereas the transcription of *IL-6* gene increased gradually with the intensity infiltration in MLP ($p = .02$) but not in FLP ($p = .1$). In MLP compared to the control group, *IL-6* gene expression was higher in the severe-intensity infiltration group. No differences were noted among control, mild and moderate groups as well as between moderate and severe groups (Figure 5b). Furthermore, the transcription of both *MCP-1* (MLP $p = .002$, Figure 5c) and *IL-6* (FLP $p = .04$, MLP $p < .0001$, Figure 5d)

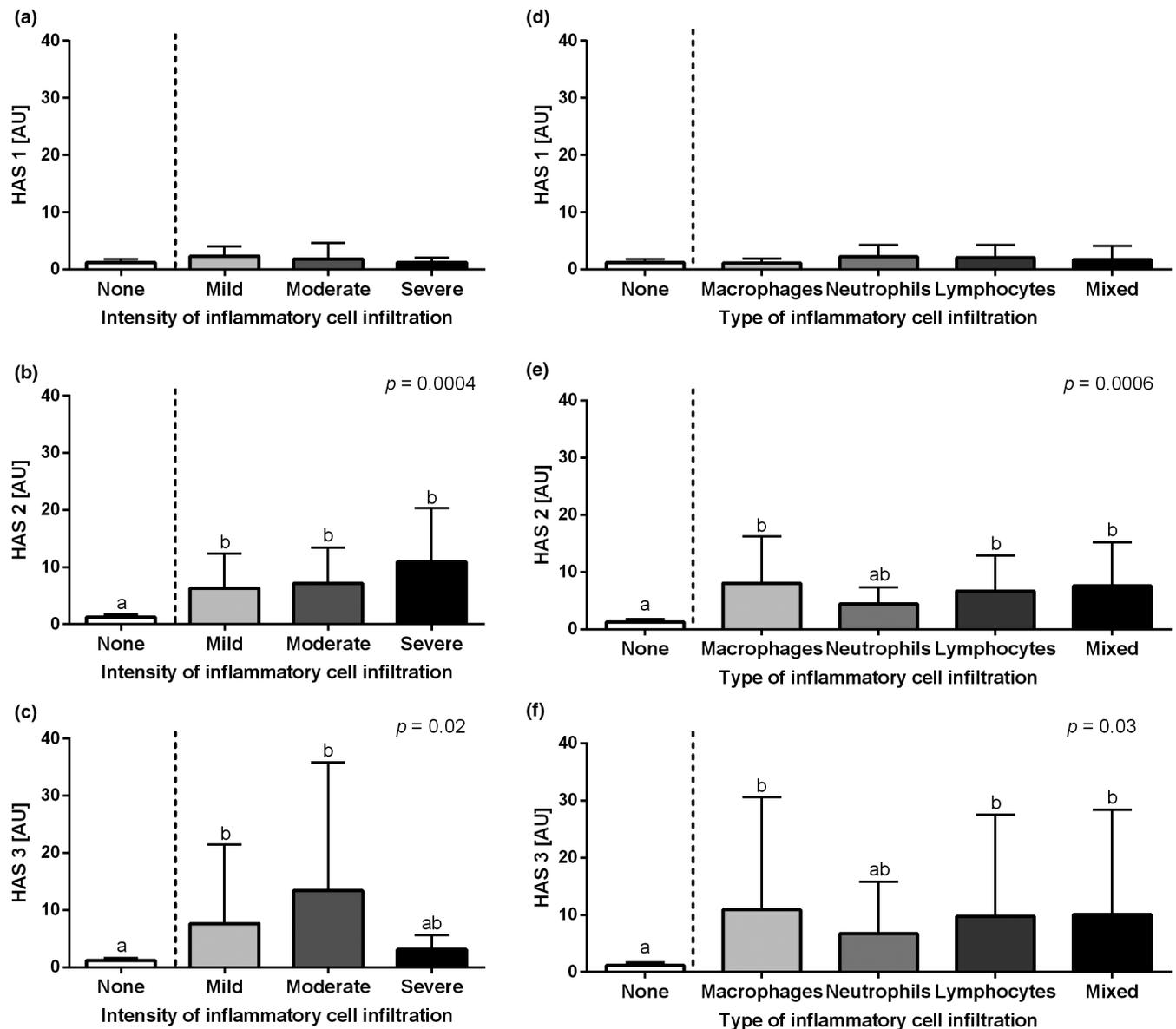


FIGURE 3 The transcription levels (mean + SD) of (a, d) the hyaluronan synthase 1 (*HAS 1*), (b, e) hyaluronan synthase 2 (*HAS 2*) and (c, f) hyaluronan synthase 3 (*HAS 3*) in the mares' endometrium. The endometrial samples evaluated with respect to the intensity of inflammatory cell infiltrate (none, mild, moderate and severe) are shown in graphs A, B and C, and according to the type of inflammatory cell infiltration (macrophages, neutrophils, lymphocytes and mixed cells) or no cell infiltration detected (none) in D, E and F. Different letters indicate differences between groups for $p < .05$

genes was higher in equine endometrium with macrophages infiltration than in the control groups in both FLP and MLP, excepting *MCP-1* in FLP ($p = .2$). For the transcription of *MCP-1* in MLP and *IL-6* in FLP, no differences were noted among control group, the neutrophil, lymphocyte and mixed types of infiltration, as well as among the macrophage, lymphocyte and mixed types of infiltration. However, for the transcription of *IL-6* in FLP, no differences were noted among control group, the neutrophil, lymphocyte and mixed types of infiltration, and also among macrophage, neutrophil, lymphocyte and mixed types of infiltration. No differences were found between the phases of the oestrous cycle for any of the studied proinflammatory molecules ($p > .05$).

When the phases of the oestrous cycle were considered, the transcription of *HAS 1* gene did not differ in equine endometrium depending on the intensity of inflammatory cell infiltration (FLP $p = .6$, MLP $p = .05$, Figure 6a) and the type of inflammatory cell infiltration (FLP $p = .5$, MLP $p = .2$, Figure 6d). In addition, the transcription of *HAS 2* gene was higher in equine-infiltrated endometrium than in the control group regardless of the intensity of infiltration in MLP ($p = .005$) but not in FLP ($p = .2$). No differences among mild, moderate and severe groups were found (Figure 6b). Similarly, in MLP, the transcription of *HAS 3* gene was higher in equine endometrium with the mild-intensity infiltration than in the control group, but not in the moderate and severe groups

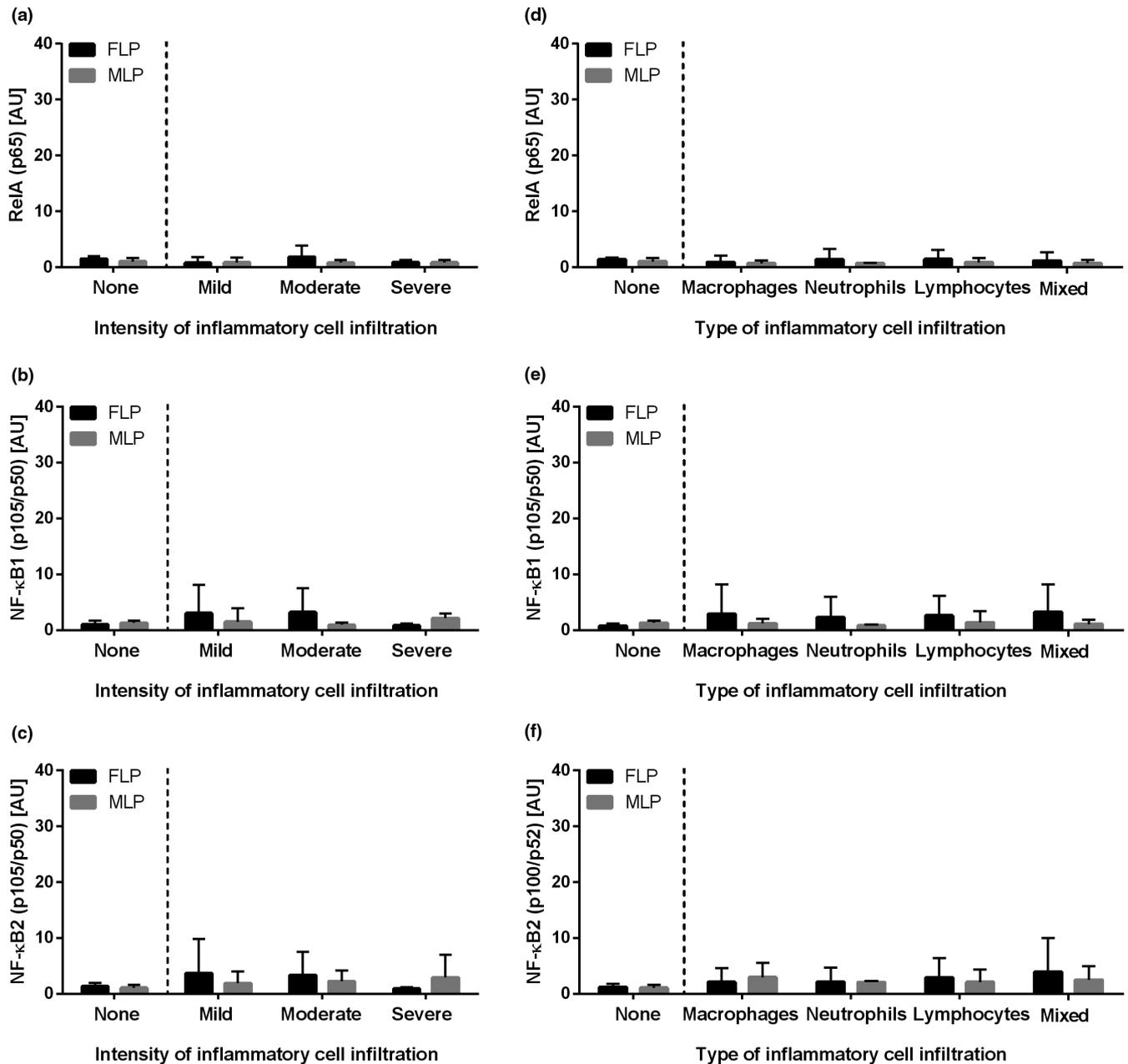


FIGURE 4 The transcription levels (mean + SD) of (a, d) the nuclear factor- κ B subunit RelA (*RelA*; *p65*), (b, e) nuclear factor- κ B subunit 1 (*NF- κ B1*; *p105/p50*) and (c, f) nuclear factor- κ B subunit 2 (*NF- κ B2*; *p100/p52*) in the mares' endometrium in follicular (FLP) or mid-luteal (MLP) phases of the oestrous cycle. The endometrial samples evaluated with respect to the intensity of inflammatory cell infiltrate (none, mild, moderate and severe) are shown in graphs a, b and c, and according to the type of inflammatory cell infiltration (macrophages, neutrophils, lymphocytes and mixed cells) or no cell infiltration detected (none) in d, e and f. No differences were found between the phases of the oestrous cycle for any of the studied NF- κ B subunits ($p > .05$)

($p = .01$). No other differences were noted for *HAS 3* gene expression among control, moderate and severe groups, as well as mild, moderate and severe groups (Figure 6c). The transcription of *HAS 3* gene in FLP did not differ depending on the intensity of inflammatory cell infiltration (FLP $p = .3$, Figure 6c). The transcription of *HAS 2* genes in MLP was higher in equine endometrium with macrophages, lymphocytes and mixed inflammatory cell infiltration than in the control and neutrophils groups ($p = .0007$,

Figure 6e). However, the transcription of *HAS 2* gene in FLP ($p = .3$, Figure 6e), *HAS 3* gene in FLP ($p = .5$, Figure 6f) and *HAS 3* gene in MLP ($p = .06$, Figure 6f) did not differ depending on the type of inflammatory cell infiltration. Additionally, the transcription of *HAS 3* gene in the mild-intensity infiltration group was higher in MLP than in FLP ($p = .04$). No other differences ($p > .05$) were found between the phases of the oestrous cycle for the studied hyaluronan synthases.

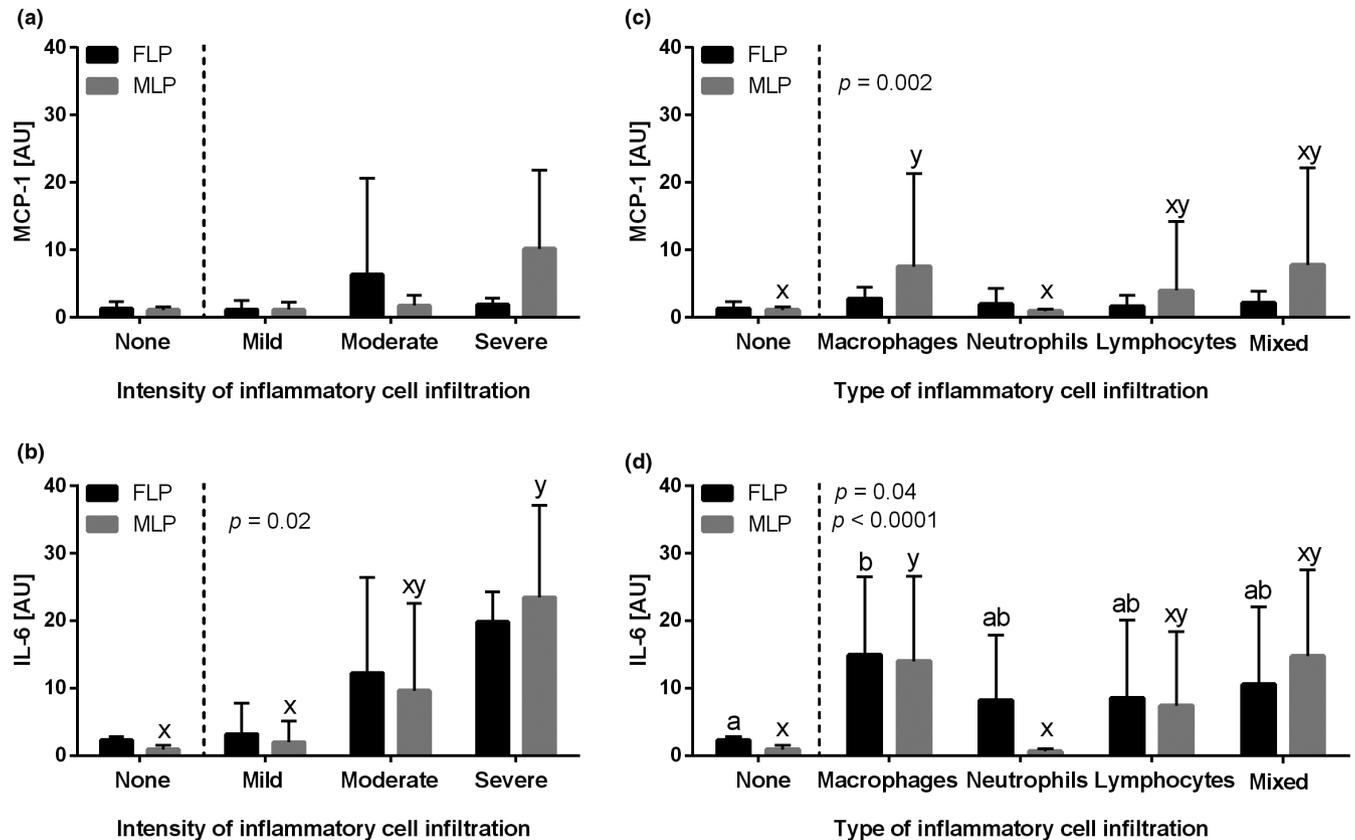


FIGURE 5 The transcription levels (mean + SD) of (a, c) the monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*) and (b, d) interleukin-6 (*IL-6*) in the mares' endometrium in follicular (FLP) or mid-luteal (MLP) phases of the oestrous cycle. The endometrial samples evaluated with respect to the intensity of inflammatory cell infiltrate (none, mild, moderate and severe) are shown in graphs a and b, and according to the type of inflammatory cell infiltration (macrophages, neutrophils, lymphocytes and mixed cells) or no cell infiltration detected (none) in c and d. Different letters indicate differences between groups for $p < .05$

4 | DISCUSSION

As shown in recent studies, NF- κ B-dependent pathway may take part in the development of endometriosis. Its activation leads to inhibition of IL-6 and activation of hyaluronan synthases, HAS 1 and HAS 3. These changes are especially prominent in the follicular phase of the oestrous cycle, and the destructive type of endometriosis, characterized by extensive glands destruction and degeneration. Additionally, levels of transcripts of genes of immunomodulatory cytokines depend on the stage of the oestrous cycle, with an increase in *MCP-1* and a decrease in *IL-6* in the follicular phase, which may result in increased cell migration into the endometrium (Domino et al., 2020). Importantly, equine endometrial samples used in the previous studies (Domino et al., 2020) did not show signs of inflammation. While these cytokines are thought to be involved in the endometriosis pathway, they are essentially important in inflammation development (Christoffersen & Troedsson, 2017; Woodward et al., 2013; Marth et al., 2018; Skarzynski et al., 2020; Morris et al., 2020; Hedia et al., 2021). This indicates the importance of NF- κ B evaluation in the context of endometritis. Research conducted regarding the type and severity of inflammation should give an insight into the role of this pathway in the regulation of modulatory cytokines. Differences

in the regulation of this pathway may suggest separate mechanisms in the pathogenesis of endometriosis and endometritis and give another perspective on the influence of inflammation on the development of endometriosis, which has been widely studied (Aresu et al., 2012; Rebordão, Carneiro, et al., 2014; Rebordão, Galvão, et al., 2014; Klose & Schoon, 2016; Rebordão et al., 2018; Schöniger & Schoon, 2020; Skarzynski et al., 2020)

An increase in the transcription of the *MCP-1* gene in moderate and severe infiltration may suggest that its function is rather sustained in the inflammatory process, than its initiation. The highest transcription was found in macrophages-dominant infiltration. While *MCP-1* is being produced by this type of cell, it also increases its further migration into the tissue, which might explain these results. This can also confirm the major regulatory function of macrophages, which are responsible for the production of a variety of cytokines (Arici et al., 1999; Fumuso et al., 2003; Yadav et al., 2010). Interestingly, *MCP-1* was found not being connected with the fibrosis process in the endometrium during endometriosis (Domino et al., 2020), except in the inactive destructive endometriosis in the follicular phase (Jasiński et al., 2021). While this cytokine production may be regulated by the NF- κ B pathway, in the current study this was not in agreement with the transcript levels of NF- κ B subunits. This

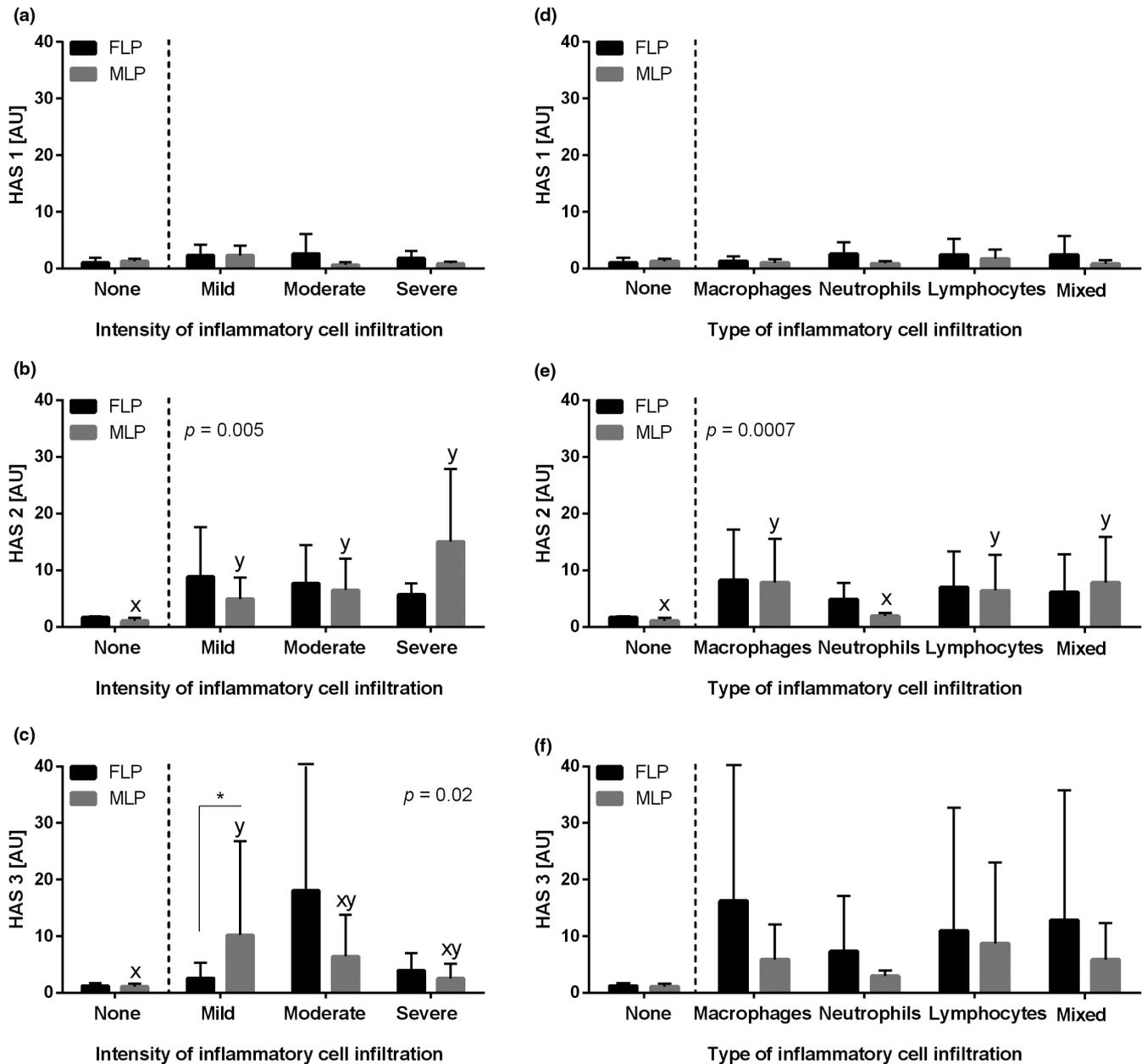


FIGURE 6 The transcription levels (mean + SD) of (a, d) the hyaluronan synthase 1 (*HAS 1*), (b, e) hyaluronan synthase 2 (*HAS 2*) and (c, f) hyaluronan synthase 3 (*HAS 3*) in the mares' endometrium in follicular (FLP) or mid-luteal (MLP) phases of the oestrous cycle evaluated with respect to the intensity of inflammatory cell infiltrate (none, mild, moderate and severe) are shown in graphs a, b and c, and according to the type of inflammatory cell infiltration (macrophages, neutrophils, lymphocytes and mixed cells) or no cell infiltration detected (none) in d, e and f. Different letters indicate differences between groups for the same oestrous cycle phase ($p < .05$). The asterisk indicates differences between phases of oestrous cycle ($*p < .05$)

result may suggest a different role of this cytokine in the regulation in endometritis and endometriosis establishment, especially regarding MCP-1 involvement (Yadav et al., 2010; Domino et al., 2020; Jasiński et al., 2021).

Transcription of *IL-6* gene increased along with the increase in inflammation severity, which is in line with recent studies, as it is one of the most important cytokines in endometritis development (Fumuso et al., 2003; Woodward et al., 2013; Christoffersen & Troedsson, 2017; Skarzynski et al., 2020). An increase in transcription was found in macrophage- and mixed-type inflammatory cell infiltration. These

results confirm that macrophages are the main cells responsible for the production of this cytokine. Thus, its regulatory function for cell migration and infiltration is crucial in the inflammatory response (Arici et al., 1999; Yadav et al., 2010). In PBIE, cytokine production was found to be prolonged in susceptible mares, making them less fertile, as endometritis persists at the time of embryo descent from the oviduct to the uterus. Current results may confirm that macrophage-related regulation is an important factor in prolonged inflammation, and is a reason for decreased fertility (Christoffersen et al., 2012; Tanaka et al., 2014; Christoffersen & Troedsson, 2017;

Morris et al., 2020; Skarzynski et al., 2020). Transcription levels of *IL-6* and *MCP-1* genes in inflammation differ from those in endometriosis, where none of them was involved in the severity of endometrial fibrosis degenerative processes. This may suggest that their function in inflammation is not affecting fibrotic processes in ECM (Domino et al., 2020; Jasiński et al., 2021).

Lack of significant differences in transcription of *HAS 1* gene suggests that this enzyme may not be involved in cell migration and adhesion in mare endometrial inflamed tissue. Nevertheless, the transcription of *HAS 2* and *HAS 3* genes has raised with increased immune cell infiltration in the endometrium. Changes were found in all types of the infiltrate. Yet, for both genes, the increase in transcript levels was the lowest in neutrophil infiltration. This result is consistent with the fact that binding of CD44, which is the receptor for hyaluronic acid, with its ligand occurs during migration of T-lymphocytes and monocytes. Fragmented hyaluronic acid acts as a proinflammatory particle, increasing cytokine production (Kessler et al., 2008). This is compatible with the achieved results, suggesting hyaluronan role in leukocyte migration into the equine endometrium. In samples with endometriosis, transcription of *HAS 1* gene was increased in the initial stage of the disease, while transcription of *HAS 3* gene was higher in all groups of endometriosis compared to unaffected endometrium. On the contrary, transcription of *HAS 2* gene did not differ between endometriosis and healthy endometrium, but its transcription increased in active destructive endometriosis form during oestrus, in which severity and intensity of changes are the highest (Jasiński et al., 2021). This shows that transcription of different synthases might be engaged in endometriosis and endometritis.

The present data show that the NF- κ B pathway is not taking part in the regulation of cell migration in the equine endometrium. The increase in transcription of genes of selected cytokines and enzymes is not in line with the results considering NF- κ B subunits. This is an important finding, suggesting that their synthesis, in the equine endometrium, is not regulated by this pathway, but different mechanisms are involved. This finding may be important in studies regarding equine endometriosis. In a previous study, we have found that hormone-dependent activation of NF- κ B may lead to fibrosis (Domino et al., 2020). Therefore, one may suggest that there is a specific pathway regulating only fibrosis in mare's uterus (endometriosis), but not endometritis. This suggests that it may be a specific marker for degeneration and fibrosis in endometriosis, possibly useful in diagnosis and progression of the severity of the process. It is especially important in uterine clearance after mating or artificial insemination. Uterine immune cells infiltration makes it possible to prepare the intrauterine environment for embryo descent and develop pregnancy (Fumuso et al., 2003; Christoffersen et al., 2012; Skarzynski et al., 2020). Proper functioning of the uterine immune system is not only important in case of injury or infection but it is also crucial for the maintenance of mare's fertility, by enabling physiological functioning of the uterus, regulating endometrial hormone production, especially by cytokines (Skarzynski et al., 2020).

In a regularly cycling mare, the number of immune cells in the endometrium varies depending on the phase of the oestrous cycle

(Da Costa et al., 2003; Fumuso et al., 2003; Gerber, 2006), to which the current results are in agreement as the majority of the transcription differences were showed only in the mares' endometrium in the mid-luteal phases compared with the mares' endometrium in the follicular phase. Yet, in increased leukocyte infiltration in the endometrium, migration of cells, as well as their defensive functions, such as phagocytosis, are not depending on the oestrous cycle phase (Da Costa et al., 2003; Fumuso et al., 2003; Gerber, 2006). This fact may explain poor correlations when the phase of the oestrous cycle was taken into consideration. Immune system competencies are therefore not disturbed by physiological changes in ovarian steroids levels (Gerber, 2006). However, other NF- κ B-signalling pathway seems to be activated in the follicular phase and in the mid-luteal phase in the presence of inactive destructive or active destructive endometriosis respectively (Jasiński et al., 2021). On the other hand, concerning the classical Kenney and Doig classification of endometriosis (Kenney & Doig, 1986), greater differences were found in the follicular phase than in the luteal phase of the oestrous cycle (Domino et al., 2020). In the current study, no oestrous cycle-related differences were found in the NF- κ B subunits of both canonical and non-canonical pathways, as well as more differences in transcription of *HAS2*, *HAS3*, *MCP-1* and *IL-6* were noted when compared non-divided than oestrous cycle-divided data series. Therefore, one may assume that inflammatory processes have taken over the cell cytokine profile. However, further studies are still required to prove reported assumptions.

5 | CONCLUSIONS

In mare endometrium, transcription of *IL-6* and *MCP-1* genes increased with the severity of inflammation, especially with dominant macrophages. Among hyaluronan synthases, transcription of *HAS 2* and *HAS 3* genes was higher in the presence of endometritis, possibly increasing cell migration and adhesion. Yet, their production was not regulated by the NF- κ B pathway, suggesting this via is not engaged in endometritis regulation. This claim shows the difference with data obtained on endometriosis, suggesting a separate pathway for the development of the disease. In addition, oestrous cycle did not affect the expression of the genes under study, suggesting that inflammation takes over cytokine control of immune cells.

ACKNOWLEDGEMENT

The study was supported by the National Science Centre in Poland, 'Miniatura 2 Project, No. 2018/02/X/NZ4/00101.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors have any conflict of interest to declare.

AUTHORS CONTRIBUTION

The idea for the study was conceived by TJ and MD. The experimental protocol was designed by TJ, LZ, EK and MD. The data were obtained by TJ, LZ, EK, EJK, GFD and MD. It was statistically analysed

by TJ, GFD and MD and discussed by all authors. The manuscript was written by TJ, LZ and MD, critically revised by GFD and finally revised and accepted by all authors.

ETHICAL APPROVAL

The Ethics Review Board II Local Committee for Ethics in Animal Research of Warsaw University of Life Sciences – SGGW considers that this type of project does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes, national decree-law (Dz. U. 2015 poz. 266 and 2010-63-EU directive).

DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Tomasz Jasiński  <https://orcid.org/0000-0003-2906-9944>

Łukasz Zdrojkowski  <https://orcid.org/0000-0002-4401-9016>

Ewa Kautz  <https://orcid.org/0000-0002-8240-1224>

Edyta Juszczuk-Kubiak  <https://orcid.org/0000-0001-5093-5320>

Graça Ferreira-Dias  <https://orcid.org/0000-0003-0622-6513>

Małgorzata Domino  <https://orcid.org/0000-0001-9436-1074>

REFERENCES

- 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*, 171–177.
- Arici, A., Senturk, L. M., Seli, E., Bahtiyar, M. O., & Kim, G. (1999). Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone. *Biology of Reproduction*, *61*, 85–90.
- Christoffersen, M., & Troedsson, M. H. T. (2017). Inflammation and fertility in the mare. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*, 14–20.
- Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A. M., Jacobsen, S., Petersen, M. R., Troedsson, M. H., & Lehn-Jensen, H. (2012). Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Veterinary Research*, *8*, 1–14.
- Roberto da Costa, R. P., Carvalho, H., Agrícola, R., Alpoim-Moreira, J., Martins, C., & Ferreira-Dias, G. (2003). Peripheral blood neutrophil function and lymphocyte subpopulations in cycling mares. *Reproduction in Domestic Animals*, *38*, 464–469.
- Da Costa, R. R., Ferreira-Dias, G., Mateus, L., Korzekwa, A., Andronowska, A., Platek, R., & Skarzynski, D. J. (2007). Endometrial nitric oxide production and nitric oxide synthases in the equine endometrium: relationship with microvascular density during the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, *32*, 287–302.
- Domino, M., Jasiński, T., Kautz, E., Juszczuk-Kubiak, E., Ferreira-Dias, G., Zabiński, R., Sady, M., & Gajewski, Z. (2020). Expression of genes involved in the NF- κ B-dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology*, *147*, 18–24.
- Fumoso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I., & Bowden, R. A. (2003). Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *96*, 31–41.
- Gerber, D. (2006). *Morphometric determination of endometrial leukocyte migration during different stages of the equine oestrous cycle*. University of Pretoria. Doctoral dissertation.
- Hedia, M., Ibrahim, S., Mahmoud, K., Ahmed, Y., Ismail, S., & El-Belely, M. (2021). Hemodynamic changes in cytokines, chemokines, acute phase proteins and prostaglandins in mares with subclinical endometritis. *Theriogenology*, *171*, 38–43.
- Jasiński, T., Zdrojkowski, Ł., Kautz, E., Juszczuk-Kubiak, E., Ferreira-Dias, G., & Domino, M. (2021). Equine endometriosis pathological features: are they dependent on NF- κ B signaling pathway? *Animals*, *11*, 3151.
- Kenney, R. M., & Doig, P. A. (1986). Equine endometrial biopsy. In: D. A. Morrow (Ed.), *Current therapy in theriogenology* (pp. 723–729). W. B. Saunders.
- Kessler, S., Rho, H., West, G., Flocchi, C., Drazba, J., & De La Motte, C. (2008). Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clinical and Translational Science*, *1*, 57–61.
- 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 endometriosis. *Pferdeheilkunde*, *32*, 15–23.
- Lind, D. S., Hochwald, S. N., Malaty, J., Rekkas, S., Hebig, P., Mishra, G., Moldawer, L. L., Copeland, E. M. III, & MacKay, S. (2001). Nuclear factor- κ B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery*, *130*, 363–369.
- Marth, C. D., Firestone, S. M., Hanlon, D., Glenton, L. Y., Browning, G. F., Young, N. D., & Krekeler, N. (2018). Innate immune genes in persistent mating-induced endometritis in horses. *Reproduction, Fertility, and Development*, *30*, 533–545.
- May, M. J., & Ghosh, S. (1998). Signal transduction through NF- κ B. *Trends in Immunology*, *19*, 80–88.
- Morris, L. H., McCue, P. M., & Aurich, C. (2020). Equine endometritis: A review of challenges and new approaches. *Reproduction*, *160*, R95–R110.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet Med (Praha)*, *53*, 397–411.
- Nervo, T., Nebbia, P., Bertero, A., Robino, P., Stella, M. C., Rota, A., & Appino, S. (2019). Chronic endometritis in subfertile mares with presence of Chlamydial DNA. *Journal of Equine Veterinary Science*, *73*, 91–94.
- Oddsóttir, C., Smith, S., & Watson, E. D. (2008). Leukocyte distribution in the equine endometrium as a response to acute induced endometritis. *Pferdeheilkunde*, *24*, 66–70.
- Overbeck, W., Witte, T. S., & Heuwieser, W. (2011). Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, *75*, 1311–1318.
- 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.
- Rebordão, M. R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T., Galvao, A., Leitao, A., Vilela, C., & Ferreira-Dias, G. (2014). Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of Reproductive Immunology*, *106*, 41–49.
- Rebordão, M. R., Galvão, A., Szóstek, A., Amaral, A., Mateus, L., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2014). Physiopathologic mechanisms involved in mare endometriosis. *Reproduction in Domestic Animals*, *49*, 82–87.
- Ricketts, S. W., & Alonso, S. (1991). Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Veterinary Journal*, *23*, 185–188.
- Schöniger, S., & Schoon, H. A. (2020). The healthy and diseased equine endometrium: A review of morphological features and molecular analyses. *Animals*, *10*, 625.
- 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.
- Summerfield, N. J., & Watson, E. D. (1998). Endometrial macrophage populations in genitally normal mares at oestrus and dioestrus and in mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, 30, 79–81.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a016295.
- Tripathi, P., & Aggarwal, A. (2006). NF- κ B transcription factor: A key player in the generation of immune response. *Current Science*, 90, 519–531.
- Umezawa, K. (2011). Possible role of peritoneal NF- κ B in peripheral inflammation and cancer: Lessons from the inhibitor DHMEQ. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65, 252–259.
- Watson, E. D., & Thomson, S. R. M. (1996). Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, 28, 106–110.
- Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K. E., Squires, E. L., & Troedsson, M. H. (2013). Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reprod*, 145, 289–296.
- Xu, D., Xiong, H., Xiao, Z., He, J., Liao, Q., Xue, L., Wang, N., & Yang, Q. (2015). Uterine cytokine profile in a rat model of endometritis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 73, 214–220.
- Yadav, A., Saini, V., & Arora, S. (2010). MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clinica Chimica Acta*, 411, 1570–1579.

How to cite this article: Jasiński, T., Zdrojkowski, Ł., Kautz, E., Juszczyk-Kubiak, E., Ferreira-Dias, G., & Domino, M. (2022). The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 598–610. <https://doi.org/10.1111/rda.14099>



Article

Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF- κ B-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction

Tomasz Jasiński ¹, Łukasz Zdrojkowski ^{1,*}, Graça Ferreira-Dias ², Ewa Kautz ¹, Edyta Juszcuk-Kubiak ³ and Małgorzata Domino ^{1,*}

¹ Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; tomasz_jasinski@sggw.edu.pl (T.J.); ewa_kautz@sggw.edu.pl (E.K.)

² Departamento de Morfologia e Função, CIISA—Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 1300-477 Lisbon, Portugal; gmlfdias@fmv.ulisboa.pt

³ Laboratory of Biotechnology and Molecular Engineering, Department of Microbiology, Prof. Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, 02-532 Warsaw, Poland; edyta.juszcuk-kubiak@ibprs.pl

* Correspondence: lukasz_zdrojkowski@sggw.edu.pl (Ł.Z.); malgorzata_domino@sggw.edu.pl (M.D.)

Abstract: Endometrosis is a frequently occurring disease decreasing mares' fertility. Thus, it is an important disease of the endometrium associated with epithelial and stromal cell alterations, endometrium gland degeneration and periglandular fibrosis. Multiple degenerative changes are found in uterine mucosa, the endometrium. However, their pathogenesis is not well known. It is thought that nuclear factor- κ B (NF- κ B), a cell metabolism regulator, and its activation pathways take part in it. The transcription of the profibrotic pathway genes of the NF- κ B in fibrotic endometria differed between the follicular (FLP) and mid-luteal (MLP) phases of the estrous cycle, as well as with fibrosis progression. This study aimed to investigate the transcription of genes of estrogen (*ESR1*, *ESR2*) and progesterone receptors (*PGR*) in equine endometria to find relationships between the endocrine environment, NF- κ B-pathway, and fibrosis. Endometrial samples ($n = 100$), collected in FLP or MLP, were classified histologically, and examined using quantitative PCR. The phase of the cycle was determined through the evaluation of ovarian structures and hormone levels (estradiol, progesterone) in serum. The transcription of *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* decreased with the severity of endometrial fibrosis and degeneration of the endometrium. Moreover, differences in the transcription of *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* were noted between FLP and MLP in the specific categories and histopathological type of equine endometrosis. In FLP and MLP, specific moderate and strong correlations between *ESR1*, *ESR2*, *PGR* and genes of the NF- κ B pathway were evidenced. The transcription of endometrial steroid receptors can be subjected to dysregulation with the degree of equine endometrosis, especially in both destructive types of endometrosis, and mediated by the canonical NF- κ B pathway depending on the estrous cycle phase.

Keywords: NF- κ B; endometrosis; receptor; estrogen; progesterone; endometrium; horse



Citation: Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Ferreira-Dias, G.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Domino, M. Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF- κ B-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7360. <https://doi.org/10.3390/ijms23137360>

Academic Editors: Alfonso Baldi and Anna Perri

Received: 16 May 2022

Accepted: 28 June 2022

Published: 1 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Previous studies on the equine endometrium have focused on the molecular mechanisms involved in physiological aspects [1–4] and the pathogenesis of endometrial diseases, often associated with mares' subfertility [5–9]. Despite the relentless efforts and new scientific reports, the pathogenesis of nonsuppurative endometritis and endometrosis remains unknown, and routinely available treatment is still undeveloped [3,10–12]. Endometrosis, also referred to as degenerative endometrial fibrosis, is the most important clinically silent endometrial disease associated with infertility in mares [13,14]. The fertility prognosis of

this condition has been based on the histopathological categorization proposed by Kenney and Doig [15], together with the amendments of Hoffmann and collaborators [13]. Thus, equine endometrial samples can be classified in two ways: firstly, as Kenney's and Doig's categories from normal endometrium (I) to mild (IIa), moderate (IIb), and severe (III) equine endometriosis [15]. Another classification proposed by Hoffmann et al. for histopathological types of endometriosis includes inactive-nondestructive, inactive-destructive, active-nondestructive, and active-destructive endometriosis [13]. In the endometria of mares affected by endometriosis, both epithelial and stromal cell alterations occur and become the cause of the degeneration, dilatation, and atypical differentiation of the affected glands [14]. At the beginning of fibrogenesis, periglandular stromal cells synthesize collagen fibers, while with the progression of the fibrotic process there is a predominance of myofibroblasts and metabolic active or inactive stromal cells without signs of collagen synthesis [5]. The epithelial differentiation may present an irregular pattern in fibrotic uterine glands [16], causing alterations in several epithelial cell enzyme patterns [17], and glycoconjugates [18]. As epithelial cell differentiation usually depends on the ovarian steroids' concentration, the independence of hormonal control and altered paracrine interaction of endometrium is suspected in the pathogenesis of endometriosis [5].

The healthy endometrium undergoes cyclic changes with typical cellular patterns in response to the ovarian steroid hormones estradiol and progesterone [13]. The ovarian steroids act on the endometrium through two pathways, canonical and noncanonical. The canonical mechanism mediates their effects through nuclear receptors, whereas the non-canonical mechanism acts at the membrane level. In the noncanonical pathway, recognized as a nongenomic signaling, steroid hormones nonspecifically bind to extracellular or membrane proteins which may cause a variety of biological effects. In the canonical pathway, recognized as a genomic signaling, steroid hormones specifically bind to intranuclear receptors, which causes a specific biological effect, which is considered to be responsible for functional cyclic changes in the endometrium [19].

In the canonical pathway, estrogen has two specific estrogen receptors (ER- α and ER- β), encoded by different genes, *ESR1* (locus NM 001081772) and *ESR2* (locus XM 001915519) [20,21]. In turn, progesterone has two isoforms of progesterone receptors (PR isoform A and PR isoform B), encoded by the same gene *PGR* (locus XM 001498494) [21,22]. Both estrogen and progesterone pass through the cytoplasm and bind to an intranuclear receptor [23] in the luminal and glandular epithelial cells and stromal cells [24], and act through the induction of transcription for a variety of genes, thus regulating cell development and differentiation [25]. The binding of estradiol to ER- α , the predominant ER in the uterus [26], stimulates the cellular proliferation of both the epithelial and stromal cells and upregulates PR expression [3,21,27]. On the contrary, the binding of estradiol to ER- β inhibits the uterotrophic effects of ER- α and downregulates the PR expression in the luminal epithelium [26]. Similarly, progesterone binds to PR, with isoform A being predominant in the uterus and ovaries, while PGR-B is mostly expressed in the mammary gland [28], antagonizes estrogen-induced epithelial proliferation and downregulates PR expression [3,27]. In this way the circulating concentrations of ovarian steroids regulate not only biological effects, but also the abundance of their receptors [21,23,24,29]. In estrus, a higher endometrial expression of ER- α , but not ER- β , was evidenced compared to diestrus [21,29]. However, the expression of PR differed similarly to ER- α [29] or did not differ [21] between the phase of the estrous cycle. Moreover, the abundance of both ER and PR varies with the type of endometrial cell [21,23,24,29]. In glandular epithelia, the highest levels of ER and PR were observed in the early diestrus, whereas the lowest was found in the mid-diestrus. In contrast, in stromal cells, receptor levels gradually increased from the lowest in the early diestrus to the highest on the ovulation day [24]. Thus, stromal proliferation is most strongly expressed in proestrus, and epithelial proliferation is most strongly expressed in early diestrus [21,24,29]. Both differences in the abundance of ER and PR, which are estrous phase- and cell type-dependent [21,23], cause hormone-induced morphological and functional changes in the endometrium. These hormone-induced

changes are mediated by paracrine factors and seem to be dependent on the crosstalk between epithelial and stromal cells [3,30].

In mares' endometria affected by endometriosis, the damage of the basal lamina and a disturbed stroma–epithelium interaction [14] may cause the deregulation of the effect of ovarian steroids on the glandular epithelium, as it is mediated by the surrounding stroma [13,14]. Moreover, endometrotic glands often display an abnormal abundance of both ER and PR. In contrast to healthy glands, predominantly low ER and PR expression in affected endometrium was evidenced [5,13,14,17,24]. This fibrosis-associated abnormal abundance of ER and PR, as well as alterations in the cytoskeleton and basement membrane [13,14,16], seems to be involved in changes in the components of histotrophe in endometrotic glands, thus impairing fertility [3,5,14]. Besides the ovarian steroid receptors, the abnormal expression of cellular differentiation markers (desmin, vimentin, α -smooth-muscle-actin, and Ki-67-antigen) [1,13], basement membrane integrity markers (laminin, and fibronectin) [13], endometrial proteins (uterocalin, uteroferrin, uteroglobin, and calbindin) [5], and subunits of the nuclear factor kappaB (NF- κ B) pathway (RelA, RelB, NF- κ B1, and NF- κ B2) [31,32] have previously been evidenced in the endometrotic endometria. The NF- κ B activation takes place through canonical and noncanonical signaling pathways, which engage RelA/NF- κ B1 and RelB/NF- κ B2 subunits, respectively [33]. Each activation of this pleiotropic transcriptional regulator affects the transcription of genes of many proteins involved in fibrotic, inflammatory, and defense processes [31,34–36] in many fibrosis-related diseases [37–41]. In equine endometrium, the transcription level of the investigated NF- κ B subunits and the NF- κ B-pathway-related pro-inflammatory molecules (MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; IL-6, interleukin-6) and hyaluronan synthases 1–3 (HAS1; HAS2; HAS3) differed significantly not only in terms of the degree of Kenney and Doig's [31] and Hoffmann et al. [32] endometriosis classification, but also in terms of the phase of the estrous cycle [31,32]. Therefore, we hypothesized that endocrine-related morphological and functional endometrial disturbances, which were suspected to be one of the mechanisms of mares' infertility [3,13,24], could be related to the NF- κ B signaling pathway.

The present study aimed at the comparison of estrogen and progesterone receptors' transcription levels in equine endometrium between Kenney and Doig's categories [15] and histopathological types [13] of equine endometriosis, considering the expression of selected genes (*RelA*, *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS1*, *HAS2*, and *HAS3*) involved in the NF- κ B signaling pathway.

2. Results

2.1. The Categories and Histological Types of Equine Endometriosis and the Ovarian Steroid Receptors

The transcription of the studied genes regarding categories of equine endometriosis was higher in category I than in categories IIa, IIb, and III for *ESR1* ($p < 0.0001$; Figure 1A), *ESR2* ($p < 0.0001$; Figure 1B), and *PGR* ($p < 0.0001$; Figure 1C), except for *ESR2* transcription in category IIa, which was similar to category I. No differences were found between categories in the affected endometrium for the three studied receptors, excepting difference in *ESR2* transcription between category IIa and categories IIb and III ($p < 0.05$).

Regarding histopathological types of equine endometriosis, the transcription was higher in the control group than in endometriosis types E ID and E AD for *ESR1* ($p < 0.0001$; Figure 2A), *ESR2* ($p < 0.0001$; Figure 2B), and *PGR* ($p < 0.0001$; Figure 2C). The expression of *ESR1* ($p < 0.05$) was higher in the control group than in endometriosis types E IN and E AN, but not *ESR2* and *PGR*. No differences were found between endometriosis types in the affected endometrium for all three studied receptors.

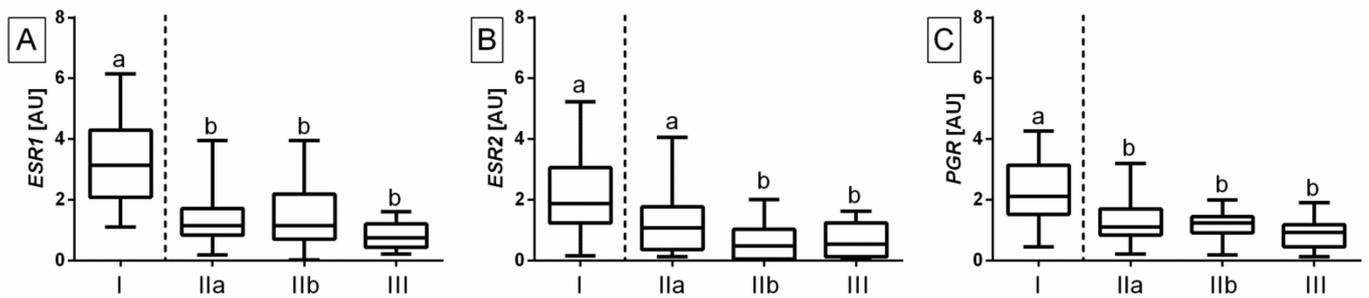


Figure 1. Transcription levels of (A) estrogen receptor α (*ESR1*), (B) estrogen receptor β (*ESR2*), and (C) progesterone receptor (*PGR*) in the mares' endometria. The endometrial samples were classified as Kenney and Doig categories I ($n = 20$), IIa ($n = 30$), IIb ($n = 30$), or III ($n = 20$). Category I included C group ($n = 20$) samples; category IIa included types E IN ($n = 5$), E ID ($n = 10$), E AN ($n = 12$), and E AD ($n = 3$) samples; category IIb included types E IN ($n = 11$), E ID ($n = 5$), E AN ($n = 5$), and E AD ($n = 9$) samples; and category III included types E IN ($n = 4$), E ID ($n = 5$), E AN ($n = 3$), and E AD ($n = 8$) samples. Boxes represent lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. The dashed line separates the categories of healthy from affected endometrium. Lowercase letters indicate differences between categories of endometrosis for $p < 0.05$.

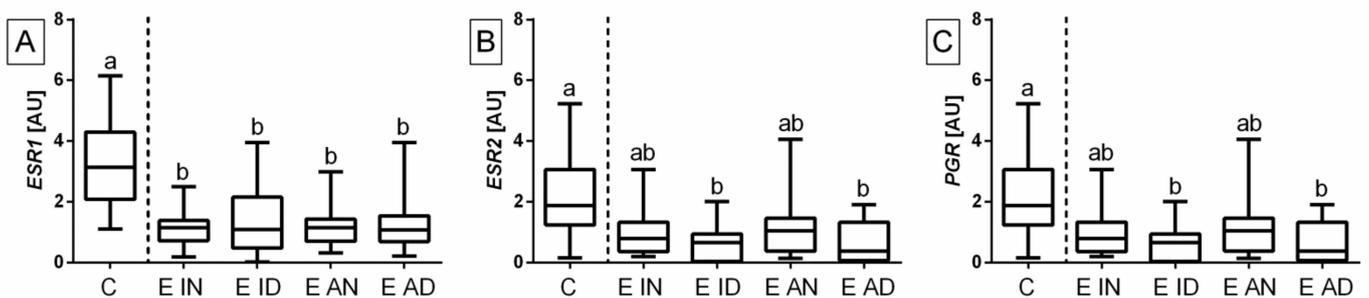


Figure 2. Transcription levels of (A) estrogen receptor α (*ESR1*), (B) estrogen receptor β (*ESR2*), and (C) progesterone receptor (*PGR*) in the mares' endometria. The endometrial samples classified as control group (C; $n = 20$) or as inactive nondestructive (E IN; $n = 20$), inactive destructive (E ID; $n = 20$), active nondestructive (E AN; $n = 20$), or active destructive (E AD; $n = 20$) types of endometrosis. C group included category I ($n = 20$) samples; type E IN included categories IIa ($n = 5$), IIb ($n = 11$), and III ($n = 4$) samples; type E ID included categories IIa ($n = 10$), IIb ($n = 5$), and III ($n = 5$) samples; type E AN included categories IIa ($n = 12$), IIb ($n = 5$), and III ($n = 3$) samples; and type E AD included categories IIa ($n = 3$), IIb ($n = 9$), and III ($n = 8$) samples. Boxes represent lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. The dashed line separates the unaffected endometrium and types of affected endometrium. Lowercase letters indicate differences between histopathological types of endometrosis for $p < 0.05$.

2.2. Phases of the Estrous Cycle and Ovarian Steroid Receptors Regarding Equine Endometrosis Categories

The transcription of the studied genes regarding categories of equine endometrosis differed between the phases of the estrous cycle in selected categories for *ESR1* (Figure 3A) and *ESR2* (Figure 3B), but not for *PGR* (Figure 3C). As such, the transcription of *ESR1* was higher in FLP than in MLP in categories I ($p = 0.008$) and IIa ($p < 0.0001$), but not in categories IIb ($p = 0.07$) and III ($p = 0.06$). Concerning comparisons between categories in the selected phases of estrous cycle, in both FLP ($p < 0.0001$) and MLP ($p < 0.0001$) the transcription of *ESR1* was higher in category I than in categories IIa, IIb, and III, with no differences between categories in the affected endometrium (Figure 3A).

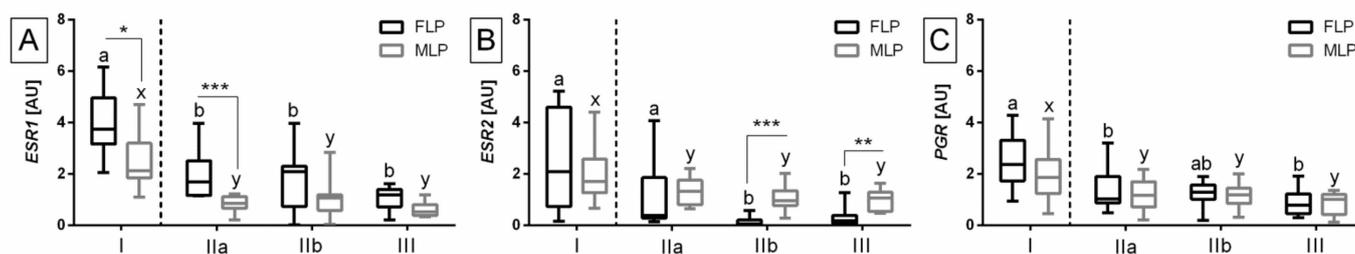


Figure 3. The transcription levels of (A) estrogen receptor α (*ESR1*), (B) estrogen receptor β (*ESR2*), and (C) progesterone receptor (*PGR*) in the mares' endometria in follicular (FLP; $n = 50$) or mid-luteal (MLP; $n = 50$) phases of the estrous cycle. The endometrial samples were classified as Kenney and Doig's category I ($n = 20$), IIa ($n = 30$), IIb ($n = 30$), or III ($n = 20$). Category I included C group ($n = 20$) samples; category IIa included types E IN ($n = 5$), E ID ($n = 10$), E AN ($n = 12$), and E AD ($n = 3$) samples; category IIb included types E IN ($n = 11$), E ID ($n = 5$), E AN ($n = 5$), and E AD ($n = 9$) samples; and category III included types E IN ($n = 4$), E ID ($n = 5$), E AN ($n = 3$), and E AD ($n = 8$) samples. Boxes represent lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. The dashed line separates the categories of unaffected and affected endometria. Lowercase letters indicate differences between categories of endometrosis for $p < 0.05$. Asterisks indicate differences between phases of estrous cycle (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$).

In addition, the transcription of *ESR2* was lower in FLP than MLP in categories IIb ($p < 0.0001$) and III ($p = 0.002$), but not in categories I ($p = 0.41$) and IIa ($p = 0.15$). Concerning comparisons between categories in the selected phases of estrous cycle, in FLP the transcription of *ESR2* was higher in categories I and IIa than in categories IIb and III ($p < 0.0001$), whereas in MLP the transcription of *ESR2* was higher in category I than in categories IIa, IIb, and III ($p = 0.004$). No differences were found between categories I and IIa, as well as IIb and III in FLP, and neither between categories IIa, IIb, and III in MLP (Figure 3B).

Concerning comparisons between categories in the selected phases of the estrous cycle, in FLP the transcription of *PGR* was higher in category I than in categories IIa and III ($p = 0.0007$). Nevertheless, in MLP the transcription of *PGR* was higher in category I than in categories IIa, IIb, and III ($p = 0.002$). No differences were found between categories I and IIb, but also IIa, IIb, and III in FLP, and likewise between categories IIa, IIb, and III in MLP (Figure 3C).

2.3. Phases of the Estrous Cycle and Ovarian Steroid Receptors Regarding Histopathological Types of Equine Endometrosis

The transcription of the studied genes regarding histopathological types of equine endometrosis differed between the phases of the estrous cycle in the selected endometrosis types for *ESR1* (Figure 4A) and *ESR2* (Figure 4B), but not for *PGR* (Figure 4C).

The levels of *ESR1* transcripts were higher in FLP than in MLP in the control group ($p = 0.008$) and endometrosis types E IN ($p < 0.0001$), E AN ($p = 0.01$), and E AD ($p = 0.04$), but not E ID ($p = 0.43$). Concerning comparisons between the histopathological types of endometrosis in the selected phases of estrous cycle, in both FLP ($p = 0.001$) and MLP ($p = 0.0006$) the transcription of *ESR1* was higher in the control group than in types E IN, E ID, E AN, and E AD, with no differences between types in affected endometrium (Figure 4A).

A decrease was observed in the transcription of *ESR2* in FLP, when compared to MLP in endometrosis types E ID ($p < 0.0001$) and E AD ($p < 0.0001$), but not in the control group ($p = 0.41$) and in E IN ($p = 0.10$) and E AN types ($p = 0.35$). Concerning the comparisons between histopathological types of endometrosis in the selected phases of the estrous cycle, in FLP the transcription of *ESR2* was higher in the control group and in endometrosis types E IN and E AN than in types E ID and E AD ($p < 0.0001$). In MLP, no differences were found in the transcripts of *ESR2* between the compared groups ($p = 0.16$). In addition, in

the control group, mRNA levels did not differ from endometriosis types E IN, E AN, and between endometriosis types E ID and E AD in FLP (Figure 4B).

Concerning comparisons between endometriosis histopathological types in the selected phases of the estrous cycle, both in FLP ($p = 0.005$) and MLP ($p = 0.007$) the transcription of *PGR* was higher in the control group than in types E IN, E ID, E AN, and E AD. No differences were noticed between types in the affected endometrium both in FLP and MLP (Figure 4C).

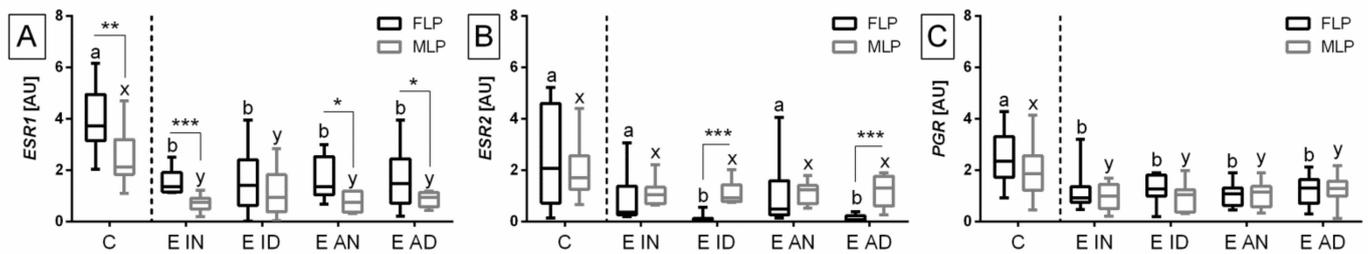


Figure 4. Transcription levels of (A) estrogen receptor α (*ESR1*), (B) estrogen receptor β (*ESR2*), and (C) progesterone receptor (*PGR*) in the mares' endometria in follicular (FLP; $n = 50$) or mid-luteal (MLP; $n = 50$) phases of the estrous cycle. The endometrial samples classified as control group (C; $n = 20$) or as inactive nondestructive (E IN; $n = 20$), inactive destructive (E ID; $n = 20$), active nondestructive (E AN; $n = 20$), or active destructive (E AD; $n = 20$) types of endometriosis. C group included category I ($n = 20$) samples; type E IN included categories IIa ($n = 5$), IIb ($n = 11$), and III ($n = 4$) samples; type E ID included categories IIa ($n = 10$), IIb ($n = 5$), and III ($n = 5$) samples; type E AN included categories IIa ($n = 12$), IIb ($n = 5$), and III ($n = 3$) samples; and type E AD included categories IIa ($n = 3$), IIb ($n = 9$), and III ($n = 8$) samples. Boxes represent lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. The dashed line separates the unaffected endometrium and types of affected endometrium. Lowercase letters indicate differences between histopathological types of endometriosis for $p < 0.05$. Asterisks indicate differences between phases of estrous cycle (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$).

2.4. The *Nf-Kb* Signaling Pathway and Ovarian Steroid Receptors in Endometrium Categories and Endometriosis Types

In category I, a strong negative correlation in MLP was noted between the transcripts of *ESR2* and *IL-6* ($\rho = -0.72$; $p = 0.01$). In category IIa, positive correlations were observed between mRNA levels in both FLP and MLP. In FLP, a strong correlation between *PGR* and *RelA* ($\rho = 0.75$; $p = 0.002$) and a moderate correlation between *ESR2* and *HAS2* ($\rho = 0.63$; $p = 0.01$) were noted. In MLP, moderate correlations between *ESR1* and *IL-6* ($\rho = 0.58$; $p = 0.03$) and between *PGR* and *HAS2* ($\rho = 0.61$; $p = 0.02$) were found. Moreover, a moderate negative correlation in MLP was observed between the transcript levels of *PGR* and *NK- κ B2* ($\rho = -0.52$; $p = 0.04$) (Table 1).

In category IIb, a moderate negative correlation in MLP was reported between transcriptions of *PGR* and *HAS3* ($\rho = -0.64$; $p = 0.006$). In category III, moderate negative correlations were observed in FLP for transcriptions of *ESR2* and *HAS1* ($\rho = -0.69$; $p = 0.03$), *ESR2* and *HAS3* ($\rho = -0.67$; $p = 0.008$), *PGR* and *HAS1* ($\rho = -0.46$; $p = 0.04$), and *PGR* and *HAS3* ($\rho = -0.64$; $p = 0.03$). Moreover, a moderate negative correlation in MLP was noted between transcriptions of *PGR* and *HAS1* ($\rho = -0.66$; $p = 0.04$). Concerning categories of equine endometriosis, the other values of Spearman's correlation coefficient were not statistically significant ($p > 0.05$) (Table 1).

Table 1. Spearman's correlation coefficient (ρ) between transcription levels of ovarian steroid receptors (*ESR1*, *ESR2*, *PGR*) and transcription levels of selected proteins of the nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway (*RelA*, *NK- κ B1*, *NK- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS1*, *HAS2*, *HAS3*) in equine endometrium classified according to different categories (I, IIa, IIb, III). The value of ρ is reported for the follicular (FLP) and mid-luteal (MLP) phases of the estrous cycle. In one cell in the table, both ρ values are reported as ρ for FLP; ρ for MLP.

	<i>RelA</i>	<i>NK-κB1</i>	<i>NK-κB2</i>	<i>MCP-1</i>	<i>IL-6</i>	<i>HAS1</i>	<i>HAS2</i>	<i>HAS3</i>
Category I								
<i>ESR1</i>	0.14; 0.17	0.00; -0.12	0.01; -0.31	-0.15; 0.37	0.09; -0.21	0.00; -0.47	-0.05; 0.13	-0.09; 0.24
<i>ESR2</i>	0.05; 0.17	-0.05; 0.49	-0.09; -0.14	-0.10; 0.46	0.40; -0.75 *	0.63; 0.43	-0.05; -0.32	-0.40; -0.03
<i>PGR</i>	-0.28; 0.04	0.10; 0.49	0.06; 0.39	-0.34; -0.19	-0.18; 0.04	-0.09; 0.41	0.10; 0.02	0.18; -0.28
Category IIa								
<i>ESR1</i>	0.36; 0.18	-0.01; 0.35	0.30; -0.28	-0.22; 0.39	-0.22; 0.58 *	0.20; 0.05	0.41; -0.06	0.11; 0.41
<i>ESR2</i>	0.37; 0.12	0.12; -0.02	0.20; -0.19	-0.47; 0.19	-0.47; 0.05	0.17; 0.21	0.63 *; 0.09	0.38; 0.39
<i>PGR</i>	0.75 *; -0.24	-0.04; -0.05	0.35; -0.52 *	-0.15; 0.41	-0.15; 0.28	0.20; 0.17	0.37; 0.61 *	0.27; 0.16
Category IIb								
<i>ESR1</i>	0.48; 0.27	-0.09; -0.09	0.19; -0.16	-0.07; 0.03	-0.30; -0.24	-0.30; 0.03	0.03; 0.29	-0.48; 0.38
<i>ESR2</i>	0.28; 0.22	-0.02; 0.43	0.11; 0.32	-0.05; -0.05	-0.22; 0.01	-0.14; -0.02	-0.26; -0.02	-0.13; 0.02
<i>PGR</i>	0.30; -0.34	0.04; -0.11	0.14; -0.03	0.00; -0.34	-0.20; 0.25	-0.20; -0.17	-0.13; -0.03	-0.16; -0.64 *
Category III								
<i>ESR1</i>	-0.16; 0.00	-0.09; 0.48	-0.15; 0.43	0.07; 0.16	0.02; 0.08	-0.16; 0.28	0.01; -0.10	-0.14; -0.07
<i>ESR2</i>	-0.18; -0.39	-0.04; -0.09	0.15; 0.10	-0.17; 0.10	-0.01; 0.46	-0.69 *; 0.21	-0.44; 0.15	-0.67 *; -0.16
<i>PGR</i>	-0.40; 0.27	-0.14; 0.09	-0.34; 0.22	-0.45; -0.32	0.31; -0.21	-0.46 *; -0.66 *	-0.69; -0.05	-0.64 *; 0.45

ESR1—estrogen receptor α gene; *ESR2*—estrogen receptor β gene; *PGR*—progesterone receptor gene; *RelA*—the nuclear factor κ B subunit RelA; *NK- κ B1*—the nuclear factor κ B subunit 1; *NK- κ B2*—the nuclear factor κ B subunit 2; *MCP-1*—monocyte chemoattractant protein-1 gene; *IL-6*—interleukin-6; *HAS1*—hyaluronan synthase 1 gene; *HAS2*—hyaluronan synthase 2 gene; *HAS3*—hyaluronan synthase 3 gene. Bolded values of ρ and asterisk reflect consistency between selected transcript levels for $p < 0.05$.

Regarding the histopathological types of equine endometriosis, in the inactive non-destructive type of endometriosis, a strong positive correlation in FLP was noted between transcriptions of *PGR* and *NK- κ B2* ($\rho = 0.77$; $p = 0.01$). Moreover, moderate negative correlations were reported in MLP for transcriptions of *ESR2* and *RelA* ($\rho = -0.66$; $p = 0.02$), *ESR2* and *MCP-1* ($\rho = -0.65$; $p = 0.04$), *PGR* and *IL-6* ($\rho = -0.66$; $p = 0.04$), and *PGR* and *HAS2* ($\rho = -0.65$; $p = 0.007$). In the inactive destructive type of endometriosis, positive correlations were observed in FLP between transcripts of *ESR1* and *HAS1* ($\rho = 0.76$; $p = 0.02$) and *ESR1* and *HAS2* ($\rho = 0.58$; $p = 0.04$) as strong and moderate, respectively. Moreover, in MLP strong, moderate, and weak positive correlations were noted between transcriptions of *ESR1* and *IL-6* ($\rho = 0.78$; $p = 0.004$), *ESR1* and *RelA* ($\rho = 0.53$; $p = 0.008$), *ESR1* and *NK- κ B1* ($\rho = 0.40$; $p = 0.02$), and *ESR1* and *MCP-1* ($\rho = 0.39$; $p = 0.004$), whereas strong and moderate negative correlations were observed between the mRNA levels of *ESR1* and *HAS1* ($\rho = -0.78$; $p = 0.004$) and *ESR1* and *HAS2* ($\rho = -0.66$; $p = 0.02$), respectively (Table 2).

In the active nondestructive type of endometriosis, in MLP, strong and moderate negative correlations were reported between transcriptions of *PGR* and *MCP-1* ($\rho = -0.75$; $p = 0.01$) and between *ESR2* and *NK- κ B1* ($\rho = -0.69$; $p = 0.03$), respectively. A strong positive correlation was noted between transcriptions of *PGR* and *HAS3* ($\rho = 0.75$; $p = 0.02$). In the active destructive type of endometriosis, a strong positive correlation was observed in FLP between transcripts of *ESR1* and *HAS2* ($\rho = 0.72$; $p = 0.02$). Moreover, in FLP, strong and moderate negative correlations were reported between transcripts of *PGR* and *NK- κ B1* ($\rho = -0.78$; $p = 0.03$), *ESR2* and *RelA* ($\rho = -0.77$; $p = 0.004$), and *ESR2* and *NK- κ B1* ($\rho = -0.66$; $p = 0.01$), respectively. No other Spearman's correlation coefficient values were statistically significant ($p > 0.05$) (Table 2).

Table 2. Spearman’s correlation coefficient (ρ) between transcription levels of ovarian steroid receptors (*ESR1*, *ESR2*, *PGR*) and transcription levels of selected proteins of the nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway (*RelA*, *NK- κ B1*, *NK- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS1*, *HAS2*, *HAS3*) in equine endometrium classified according to different histopathological types of endometriosis (E IN, E ID, E AN, E AD). The value of ρ is reported for the follicular (FLP) and mid-luteal (MLP) phases of the estrous cycle. In one cell in the table, both ρ values are reported as ρ for FLP; ρ for MLP.

	<i>RelA</i>	<i>NK-κB1</i>	<i>NK-κB2</i>	<i>MCP-1</i>	<i>IL-6</i>	<i>HAS1</i>	<i>HAS2</i>	<i>HAS3</i>
E IN								
<i>ESR1</i>	0.12; -0.21	-0.06; 0.36	0.58; 0.18	-0.12; -0.12	0.07; 0.22	0.11; 0.45	-0.50; -0.33	-0.34; 0.56
<i>ESR2</i>	0.14; -0.66 *	-0.43; -0.62	0.60; -0.14	0.10; -0.65 *	0.29; 0.02	0.35; 0.12	-0.43; 0.53	0.34; -0.05
<i>PGR</i>	0.09; 0.16	-0.23; 0.31	0.77 *; -0.11	-0.21; -0.15	0.04; -0.66 *	0.09; 0.05	0.37; -0.65 *	0.00; 0.35
E ID								
<i>ESR1</i>	-0.55; 0.53 *	-0.27; 0.40 *	-0.18; -0.66	-0.18; 0.39 *	-0.18; 0.78 *	0.76 *; -0.78 *	0.58 *; -0.66 *	0.58; -0.12
<i>ESR2</i>	0.51; 0.19	0.38; 0.14	0.45; 0.66	0.45; -0.36	0.45; 0.55	-0.34; 0.55	-0.11; 0.66	0.11; 0.64
<i>PGR</i>	-0.51; 0.00	-0.06; 0.54	-0.13; 0.03	-0.13; 0.27	-0.13; 0.32	0.27; 0.32	-0.13; 0.03	0.13; -0.27
E AN								
<i>ESR1</i>	-0.12; -0.30	0.31; 0.00	-0.31; -0.34	0.39; 0.33	-0.31; 0.31	-0.39; -0.11	0.39; -0.12	-0.03; -0.33
<i>ESR2</i>	-0.21; 0.17	0.27; -0.69 *	-0.27; -0.48	0.44; 0.10	-0.27; 0.22	-0.44; -0.03	0.44; 0.50	0.03; -0.10
<i>PGR</i>	0.53; 0.06	0.18; 0.47	-0.18; -0.21	-0.37; -0.75 *	-0.18; 0.25	0.37; 0.20	-0.37; 0.31	-0.45; 0.75 *
E AD								
<i>ESR1</i>	0.23; -0.23	-0.41; 0.36	0.19; -0.07	-0.21; 0.03	-0.37; 0.15	0.10; -0.16	0.72 *; 0.06	0.19; 0.48
<i>ESR2</i>	-0.77 *; 0.02	-0.66 *; -0.13	-0.23; 0.54	0.42; -0.09 *	-0.11; 0.72	-0.31; -0.43	0.15; -0.06	-0.15; -0.10
<i>PGR</i>	-0.20; 0.05	-0.78 *; 0.15	0.36; 0.10	-0.07; -0.01	-0.51; 0.04	0.10; 0.00	-0.02; -0.06	0.28; 0.42

ESR1—estrogen receptor α gene; *ESR2*—estrogen receptor β gene; *PGR*—progesterone receptor gene; *RelA*—the nuclear factor κ B subunit RelA; *NK- κ B1*—the nuclear factor κ B subunit 1; *NK- κ B2*—the nuclear factor κ B subunit 2; *MCP-1*—monocyte chemoattractant protein-1 gene; *IL-6*—interleukin-6; *HAS1*—hyaluronan synthase 1 gene; *HAS2*—hyaluronan synthase 2 gene; *HAS3*—hyaluronan synthase 3 gene. E IN—type inactive nondestructive of endometriosis; E ID—type inactive destructive of endometriosis; E AN—type active nondestructive of endometriosis; E AD—type active destructive of endometriosis. Bolded values of ρ and asterisk reflect consistency between selected transcript levels for $p < 0.05$.

3. Discussion

In comparison to the healthy endometrium, the transcription levels of *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* decreased with the severity of endometrial fibrosis, although for *ESR2* this decrease started at category IIb. The results regarding the endometrial *ESR1* and *PGR* mRNA contents agree with the findings of Hoffman et al. [13], who reported a decrease in the protein expression of ovarian steroid receptors with the fibrosis and the study of Lehmann et al. [14] which showed a reduction in staining intensity for ER- α and PR in the stromal cells present in fibrosis areas around endometrial glands, regardless of the endometrium category. Concerning the histopathological types of equine endometriosis, the transcription levels of *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* were lower in inactive and active types of destructive endometriosis in comparison to the healthy endometrium. Moreover, the transcription level of *ESR1* decreased similarly in inactive and active types of nondestructive endometriosis, which is in agreement with previous findings in the fibrotic stroma [13,14]. In contradiction to the current findings, in the active nondestructive type of endometriosis, a predominant increase in the ER- α and PR expression was reported [13,14], even though only in the glandular epithelia that were not differentiated from the fibrotic stromal cells in the current study.

In addition to the previous knowledge of the putative influence of fibrosis on ER- α expression [13], the current results suggest a relationship between the destructiveness of fibrosis and both ER- α and ER- β gene transcription. Nevertheless, the precise kinetics and chronological succession of pathological events involving the increase in collagen deposition and impairment of ovarian steroid receptors in mare endometriosis remain unknown. It is worth noting that these data are in line with another study [13], where the most severe decrease in the expression of ER- α and PR was observed in the destructive fibrosis. As Hoffman et al. [13] and Lehmann et al. [14] did not investigate ER- β expres-

sion, to the best of our knowledge this is the first report comparing the transcription level of *ESR2* between consecutive Kenney and Doig endometrial categories [15] and Hoffman et al. [13] histological types of equine endometrosis. Although in previous studies [13,14] an immunohistochemical examination was performed, in the present research, only the transcription analyses were considered. As the transcripts only partially explain the protein concentrations present in the tissue [42], and different processes can regulate mRNA and protein production and degradation [43], some differences between tissue and molecular expressions may be ascribed to post-transcriptional regulation.

It is well known that functional endometrial morphology, concerning proliferation and secretion, is consistent with the follicular and luteal phases of the estrous cycle [3,44]. Therefore, cell proliferation and apoptosis in the equine endometrium should be considered in two phases, stromal proliferation during the follicular phase, and epithelial proliferation during the luteal phase, both in healthy [23,45] and fibrotic endometria. However, the expression of ovarian steroid receptors in consecutive categories and histopathological types of equine endometrosis has not yet been compared between the phases of the estrous cycle at transcript levels.

In the unaffected endometrium, the transcription of *ESR1* was higher in FLP than in MLP in contrast to transcription of *PGR* and *ESR2*, which was similar in both phases. Although the transcription of *ESR1* observed in this study is consistent with work conducted by Silva et al. [21] and Hartt et al. [29], the *PGR* results are partially different. Likewise, regarding the transcription of *ESR1*, some studies reported that *PGR* transcription was higher in FLP than in MLP [29,46,47]. However, no differences in *PGR* mRNA levels between phases were found in the present study and others [21]. Moreover, our data on *ESR2* transcription are convergent with Silva et al. report [21], which is one of the few studies investigating the estrous cycle's influence on *ESR2* expression in equine endometrium. Some discrepancies in the previous and current results may be explained by differences in the methodology applied herein, and in the previous studies [21,29,46–48], of which Silva and coworkers' [21] methodology was the most similar to the one presented here.

In comparison to the unaffected endometrium, the transcription levels of *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* generally decreased with the severity of endometrial fibrosis in both phases of the estrous cycle. The only two exceptions were for *ESR2* in category IIa and *PGR* in category IIb, both in the FLP, but not in the MLP, where their transcription levels did not differ from category I. Moreover, the differences in transcription of *ESR1* between FLP and MLP, which were referred to be detectable in healthy [21,29] and mildly affected endometria, became undetectable in moderate and severe endometrosis. In contrast, the transcription of *ESR2* in mare endometrium that was not affected by the phases of the estrous cycle [21] was lower in FLP than in MLP in moderate and severe endometrosis. It might be suggested that the transcription of endometrial steroid receptors is upregulated by estradiol and downregulated by progesterone in equine healthy endometrium [23,24,29], which is prone to dysregulation in the course of endometrosis.

After assigning endometrial samples to the FLP or MLP group, a decrease in the transcription levels of *ESR1* and *PGR* was shown in all histopathological types of equine endometrosis, in comparison to healthy endometrium, in both phases of the estrous cycle. Our results are in line with Hoffman et al. [13] and Lehmann et al. [14] immunohistochemistry findings in stromal cells. The differences in the transcription of *ESR1* between FLP and MLP detectable in healthy endometrium were still present in both active types of endometrosis, and the inactive nondestructive type, in contrast to inactive destructive endometrosis. The absence of differences in the transcription of *PGR* in both healthy and qualitatively affected endometrium may support the previous hypothesis that ER-dependent rather than PR-dependent endometrial function deregulation may play a greater role in the pathogenesis of endometrosis [13]. Interestingly, the transcription of *ESR2* was lower in FLP than in MLP in both destructive types of endometrosis, which was not seen in the control group or any other histopathological types. One may note that the activation of ER- α and ER- β has opposite effects on gene transcription [49]. Thus, ER- β may downregulate

ER functions, as ER- β shows an inhibitory activity on ER- α transcriptional activity [50] by forming heterodimers with ER- α [51,52]. Therefore, it can be suggested the estrogen secreted during FLP interacts with both ER- α and ER- β , causing the classic ER- α -dependent uterotrophic effects, and ER- β -dependent hindering of ER- α effects [26]. In both destructive types of endometriosis, when *ESR2* transcription is significantly low, the ER- β -dependent inhibitory activity might be reduced, and despite no increase in *ESR1* transcription, the final ER- α -dependent uterotrophic effects may be enhanced.

Based on previous [24] and current results, one may conclude that in both destructive types of endometriosis, the ER- α abundance in the endometrial stroma is the highest in FLP. With similar peripheral estrogen physiological concentrations, characteristic of the FLP, mare endometrium with a higher ER- α abundance showed a stronger tissue effect, with estrogen-dependent cellular proliferation, as reported in other species and tissues [27,53]. Such an activation may overinfluence stromal differentiation and induce stroma–epithelium interactions [24], the latter of which is disturbed in destructive endometriosis. In a healthy endometrium, the effect of ovarian steroids on the glandular epithelia is mediated by the surrounding stroma [14,54]. It is an intact basal lamina in the healthy endometrium that ensures the complex paracrine interactions between the epithelia and the underlying stroma [13,55], inhibiting the direct interaction between stromal cells, epithelial cells, and the extracellular matrix (ECM). In destructive endometriosis, the damage of the basal lamina [5,13,56] allows for the direct interactions between epithelial cell surface integrins and the fibrotic ECM, and between stromal and epithelial cells [13]. Together with the altered ER- α and PR expression in epithelial cells [13,14], and the lowered *ESR2* transcription, they may become crucial for both stromal and epithelial cell integrity causing degeneration, endometrial glandular dilatation, and atypical differentiation of the affected glands [13,14], especially since *ESR2* transcription was similarly low in both moderate and severe endometriosis. The current estrous cycle-dependent results support Hoffman and collaborators' [13] suggestion of advanced de-differentiation of the stromal cells within the fibrotic foci. However, they also put forward a contradictory statement that fibrotic stromal cells are unable to react to cyclic endocrine changes and become independent of hormonal regulation. The present data suggest that in endometriosis, the histological features of maldifferentiated stromal and glandular epithelia are asynchronous to the estrous cycle phase, which supports previous research [13]. However, it suggests that the endometrium becomes independent of estrous cycle regulation [13], whereas our study indicates that the asynchrony of the endometrium may be still estrous cycle-dependent but might be caused by a deregulation of ER functions related to the impairment of ER- α and ER- β activity.

In a previous study, Rebordão et al. [57] also suggested that the pathogenesis of equine endometriosis might be somehow connected with the estrous cycle. This statement was previously supported by our previous reports, where the transcription of NF- κ B pathway genes regarding Kenney and Doig's endometrial categories [31] and the histopathological types of endometriosis [32] were investigated. The NF- κ B is known for stimulating ECM deposition in various tissues [33,34,37,38,58] and mediating hyaluronan synthesis by fibroblasts [59]. Therefore, the NF- κ B-dependent activation of proinflammatory molecules may play a role in gland deformation and damage and altered interactions between epithelial cells and the fibrotic ECM [31,32]. As the histopathological type of endometriosis depicted a larger modification of ECM, especially the increase in proteoglycans, fibronectin, and laminin expression [13,15], we have suggested the active remodeling of ECM in FLP. With the evolution of the concepts of equine endometriosis, it was shown that the ECM architecture and endometrial function are affected by the neutrophil extracellular traps (NETs), pro-inflammatory cytokines, pro-fibrotic pathways, growth factors and epigenetics [12].

In our previous study, just in FLP equine endometrium, the transcriptions of *RelA*, *NF- κ B1*, *IL-6*, and *HAS2* were higher in the active destructive type of endometriosis than in the control group [31]. In the current study, we supported these findings with the strong and moderate negative correlations reported just in E AD, for the transcription between *ESR2* and *RelA* or *NF- κ B1*, respectively, as well as the strong correlation for the

transcription between *PGR* and *RelA*, and between *ESR1* and *HAS2*, negative and positive, respectively. Moreover, in MLP an increase in *RelA*, *NF-κB1*, and *MCP-1* transcription was noted in E ID [32], which in the current study is supported by the weak to moderate positive correlations with *ESR1* transcription. Concerning Kenney and Doig's categories of endometriosis [15], in our previous study *RelA*, *NF-κB1*, *NF-κB2*, *HAS1*, and *HAS3* transcriptions increased similarly with the degree of endometrial fibrosis, just in FLP [31], which in the current study is supported by the correlation with *ESR2* and *PGR* transcription but only for *HAS1* and *HAS3*. Although these results support the previous argument that the endometrial fibrotic changes mediated by the canonical NF-κB pathway are estrous cycle-dependent [31,32], the direction of these relationships and co-localization of corresponding protein concentrations in the tissue require further research. However, it can be suggested that the metabolic activity of fibroblasts in the equine endometrium affected by endometriosis may also depend on deregulation by ovarian steroid hormones. Since NF-κB inhibitors have been successfully studied in suppressing ECM deposition in various tissues [60–62], further works are required to establish the clinical applicability of research data on possible specific treatment of equine endometriosis.

4. Materials and Methods

4.1. Biological Material Collection

In the current study, the biological material consisted of equine internal genitalia and blood collected from 100 Polish warmblood mares (aged from 3 to 25 years) at a commercial abattoir in Poland. Biological sample collection was performed post-mortem, which does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes, national decree-law (Dz. U. 2015 poz. 266) and EU law (2010-63-EU directive). Thus, no Ethical Committee's permission was needed for sample retrieval after slaughter (decision of II Local Committee for Ethics in Animal Research WULS in Warsaw from 27 October 2021). Samples were obtained in the reproductive season from April to September.

Endometrial samples with a minimal size of 10 × 5 × 5 mm were collected from the junction between the uterine body and one uterine horn. Samples were collected immediately after evisceration. All samples were immersed in appropriate solutions, as follows: ovaries in cold 0.9% NaCl (Polfa S.A., Lublin, Poland); one endometrial sample into RNase-free Eppendorf tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and another endometrial sample into 10% neutral phosphate-buffered formalin (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland). Then, samples were transported to the laboratory under specific conditions: ovaries at +4 °C, endometrial samples for gene transcription analyses in liquid nitrogen, and endometrial samples for histological examination at room temperature. In the laboratory, ovaries were sectioned and the presence and diameter of follicles and/or corpus luteum were noted. Endometrial samples for gene transcription analyses were stored at –80 °C, whereas endometrial samples for histological examination were fixed in formalin for 24 h, moved to 70% ethanol (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland) for one week at room temperature, and then embedded in paraffin (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland) for standard histological staining procedures.

Blood samples were collected into dry tubes (BD Vacutainer[®], Plymouth, UK), transported to the laboratory at +4 °C, and centrifuged (2000 × g, 5 min). The serum, free from any apparent hemolysis, was aspirated and stored at –20 °C.

4.2. Phases of Estrous Cycle Determination

The phases of the estrous cycle were determined based on the concentration of ovarian steroid hormones, 17 β-estradiol (E₂) and progesterone (P₄), as well as on the macroscopic examination of mares' ovaries, according to da Costa et al. protocol [45]. The concentrations of E₂ and P₄ were determined by commercial radioimmunoassay with a sensitivity 1.36 pg/mL (curve range 2.52 pg/mL to 22.8 pg/mL) for E₂ (Estrus-Us-Ct, Cis Bioassays, Codolet, France) with intra-assay coefficient of variation <6.9% and inter-assay coefficient of variation <9.1%; and 0.05 ng/mL (curve range 0.12 ng/mL to 18.38 ng/mL) for P₄ with

intra-assay coefficient of variation <5.6% and inter-assay coefficient of variation <8.8% (KIP 1458; DIAsource ImmunoAssays SA, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgium). Mares were assigned to the mid-luteal phase group (MLP; $n = 50$) when serum concentrations of E_2 and P_4 were <4 pg/mL and >1 ng/mL, respectively; and on both ovaries, none of the follicles >35 mm in diameter and at least one corpus luteum was demonstrated. Mares were included into the follicular phase group (FLP; $n = 50$) when serum concentrations of E_2 and P_4 were >4 pg/mL and <1 ng/mL, respectively; and there was at least one follicle >35 mm in diameter in any of the ovaries and no corpus luteum.

4.3. Histopathological Examination of Mares' Endometria

Formaldehyde was flushed from samples with 70% ethyl alcohol. Samples were paraffined with standard protocols and cut into 6 μ m sections with rotation microtome Leica RM2255 (Kawa-Ska, Zalesie Gorne, Polska) and mounted on glass slides. Slides were deparaffinized and rehydrated in a series of immersions in xylene and decreasing concentrations of ethanol (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland). Then, samples were stained using standard hematoxylin-eosin (HE) protocol (hematoxylin, 3801520E, Leica, Buffalo Grove, IL, USA; eosin, HT1103128; SigmaAldrich, Poznan, Poland) and mounted under Canadian balsam resin for histological evaluation (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland). The HE-stained slides were evaluated under a light microscope (Olympus BX43, Warsaw, Poland, magnification 40 \times –1000 \times). The presence of inflammation and the appearance or severity of pathological degenerative changes were microscopically assessed. For RNA isolation, only samples that did not appear actively inflamed in the macroscopic examination and did not reveal any inflammatory cell infiltration in the histopathological examination were selected.

Equine endometrosis was recognized when the microscopic hallmark, the concentric arrangement of stromal cells and/or collagen fibers around affected glands, was observed [3,63]. The same endometrial samples ($n = 100$) were independently classified twice, (i) as belonging to category I, IIa, IIb, or III of Kenney and Doig [15] according to the degree of fibrosis [15], and (ii) as belonging to histopathological type E IN, E ID, E AN, or E AD of Hoffmann and collaborators [13] according to specific pathological features [13].

The mares with healthy endometrial tissue were included in the category I (category I; $n = 20$) of (i) Kenney and Doig's classification and in the control group (C; $n = 20$) of (ii) Hoffmann and collaborators' classification. Whenever endometrosis was present, samples were further graded regarding (i) Kenney and Doig's categories and (ii) Hoffmann and collaborators' histopathological types. Thus, the remaining 80 endometrial samples were categorized twice. Firstly, endometrial samples ($n = 80$) were assigned to remaining the three Kenney and Doig's categories, as follows: (i) mild endometrosis (category IIa; $n = 30$), (ii) moderate endometrosis (category IIb; $n = 30$), and (iii) severe endometrosis (category III; $n = 20$). Secondly, endometrial samples ($n = 80$) were assigned to each of the four Hoffmann and collaborators' histopathological types, as follows: (i) inactive-nondestructive endometrosis (E IN; $n = 20$), (ii) inactive-destructive endometrosis (E ID; $n = 20$), (iii) active-nondestructive endometrosis (E AN; $n = 20$), and (iv) active-destructive endometrosis (E AD; $n = 20$).

A detailed distribution of samples between the two classification systems is presented in Table 3.

Concerning Kenney and Doig's classification, category IIa included types E IN ($n = 5$), E ID ($n = 10$), E AN ($n = 12$), and E AD ($n = 3$) samples; category IIb included types E IN ($n = 11$), E ID ($n = 5$), E AN ($n = 5$), and E AD ($n = 9$) samples; and category III included types E IN ($n = 4$), E ID ($n = 5$), E AN ($n = 3$), and E AD ($n = 8$) samples.

Concerning Hoffmann and collaborators' classification, type E IN included categories IIa ($n = 5$), IIb ($n = 11$), and III ($n = 4$) samples; type E ID included categories IIa ($n = 10$), IIb ($n = 5$), and III ($n = 5$) samples; type E AN categories included IIa ($n = 12$), IIb ($n = 5$), and III ($n = 3$) samples; and type E AD included categories IIa ($n = 3$), IIb ($n = 9$), and III ($n = 8$) samples.

Table 3. The distribution of samples between the two classification systems of (i) Kenney and Doig and (ii) Hoffmann and collaborators.

	C/I	IIa	IIb	III	Totals
E IN		5	11	4	20
E ID		10	5	5	20
E AN		12	5	3	20
E AD		3	9	8	20
Totals	20	30	30	20	100/80

Kenney and Doig's classification: I—category I; IIa—category IIa; IIb—category IIb; III—category III; Hoffmann and collaborators's classification: C—control group; E IN—type inactive nondestructive of endometriosis; E ID—type inactive destructive of endometriosis; E AN—type active nondestructive of endometriosis; E AD—type active destructive of endometriosis.

In all groups representing the categories and histopathological types of equine endometriosis, half of the samples were collected from mares in FLP (category I/C, $n = 10$; category IIa, $n = 15$; category IIb, $n = 15$; category III, $n = 10$; E IN, $n = 10$; E ID, $n = 10$; E AN, $n = 10$; E AD, $n = 10$) and the other half in MLP (category I/C, $n = 10$; category IIa, $n = 15$; category IIb, $n = 15$; category III, $n = 10$; E IN, $n = 10$; E ID, $n = 10$; E AN, $n = 10$; E AD, $n = 10$). In the same endometria, the transcription of selected genes involved in the NF- κ B signaling pathway (*RelA*; *NK- κ B1*; *NK- κ B2*; *MCP-1*; *IL-6*; *HAS1*; *HAS2*; *HAS3*) was investigated. However, these whole results have been previously reported for both, categories [31] and histological types of equine endometriosis [32]. The raw data of the transcription of genes investigated in the present study were used in a previous one to find the putative relationship between transcription of ovarian steroid receptor genes and the NF- κ B-dependent signaling pathway in the mare's endometrium affected by equine endometriosis.

4.4. Gene Transcription Evaluation in Mares' Endometria

Endometrial samples stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ were mechanically disrupted in a liquid nitrogen environment. Then, 50 mg of each sample were homogenized in Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), and total RNA was extracted using High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Rotkreuz, Switzerland) using a standard protocol. Afterward, a DNase treatment was performed. The RNA concentration was determined using DS-11 FX spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA) with absorbance ratios A260/280 and A260/230 of approximately 2.0. Further analysis was allowed only for these samples that have RNA content above 100 ng. None of the samples was excluded due to insufficient RNA content.

Real-time PCR (qPCR) amplification was performed using a TaqManTM RNAto-CTTM 1-Step Kit (No 4392938, ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA) and a Quant-StudioTM 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Wilmington, DE, USA). The commercially available equine-specific TaqMan Gene Expression Assays (No 4448892 and 4441114, ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA) were used. Primers specific for the selected transcripts *ESR1*, *ESR2*, and *PGR*, were designed using Primer-BLAST (NCBI; Table 4). Two reference genes, *GAPDH* (Ec03210916_gH) and *HPRT1* (Ec03470217_m1), were also evaluated. Real-time PCR reaction had a 10 mL volume and included 15 ng of total RNA, 5 mL of TaqMan[®] RTPCR Mix (2 \times), 0.25 mL of TaqMan[®] RT Enzyme Mix (40 \times), 0.5 mL of TaqMan probe, and both PCR primers (ThermoFisher, Swedesboro, NJ, USA) for each gene of interest. The PCR protocol included four steps, as follows: reverse transcription (15 min at $48\text{ }^{\circ}\text{C}$), enzyme activation (10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$), 40 cycles of denaturation (15 s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$), and annealing/extension (1 min at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Each sample was run in duplicate [31,32].

Table 4. Forward and reverse primer sequences used for estrogen receptor α (*ESR1*) and estrogen receptor β (*ESR2*), and progesterone receptor (*PGR*).

Gene	Primer Sequence
<i>ESR1</i>	Forward: 5'-TCCATGGAGCACCCAGGAAAGC-3' Reverse: 3'-CGGAGCCGAGATGACGTAGCC-5'
<i>ESR2</i>	Forward: 5'-TCCTGAATGCTGTGACCGAC-3' Reverse: 3'-GTGCCTGACGTGAGAAAGGA-5'
<i>PGR</i>	Forward: 5'-CTTCCCCGACTGCGCGTACC-3' Reverse: 3'-TTGTGTGGCTGGAAGTCGCCG-5'

In each endometrial sample, transcription of the three studied genes (*ESR1*, *ESR2*, and *PGR*) and two independent endogenous reference genes (*GAPDH* and *HPRT1*) was assessed by qPCR. Each endometrial sample was triply categorized using estrous cycle criterion and two endometriosis criteria (the Kenney and Doig's classification and histopathological types of equine endometriosis defined by Hoffman and collaborators). Raw data of genes transcription were normalized using the geometric mean of mRNA detected from two reference genes. The semi-quantitation of the target gene expression was performed in a comparative CT method ($\Delta\Delta$ CT method), where the target gene expression in the samples of category I/group C was considered as Δ Ct Control Value [31,32].

4.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data analysis was performed in the following three steps: (i) testing the differences between categories and histopathological types without considering the phase of the estrous cycle; (ii) testing the differences between categories, histopathological types, and phases considering the phase of the estrous cycle; (iii) calculating the correlation coefficient between transcription of genes of the ovarian steroid receptors and the NF- κ B-dependent signaling pathway.

Data from 100 endometrial samples were presented as separate data series of Expression Fold Change ($2^{-\Delta\Delta$ Ct) of the qPCR *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* data for each studied category and histopathological type of equine endometriosis. Data series were tested independently for univariate distributions using a Shapiro–Wilk normality test. As at least one data series showed a non-Gaussian distribution, the comparisons between data series were assessed using the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, independently from the studied categories and histopathological types. The significance level was established as $p < 0.05$.

Then, each studied category and histopathological type was divided into FLP and MLP data series, and a Shapiro–Wilk normality test was performed for each new data series. As at least one data series showed a non-Gaussian distribution, the comparisons between data series were assessed using the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test, independently from the studied categories in FLP and MLP, as well as histopathological types in FLP and MLP. The comparisons between the phases of the estrous cycle were performed by Unpaired t-test with Welch's correction for Gaussian data pairs or Mann–Whitney test for non-Gaussian data pairs. For both tests, the significance level was established as $p < 0.05$.

Spearman's rank correlation coefficient (ρ) was calculated for all pairs of (iii) data series represented *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* as well *RelA*, *NK- κ B1*, *NK- κ B2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS1*, *HAS2*, and *HAS3*, for FLP and MLP separately. The value of ρ reflected the consistency when the P was considered significant ($p < 0.05$).

Numerical data in box plots are represented by minimum and maximum values, lower and upper quartiles as well as medians. Numerical data in tables are reported as ρ ; ρ in each cell for FLP; MLP, together. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

5. Conclusions

In comparison to the unaffected endometrium, the transcription of *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* decreased with the severity of endometrial fibrosis as well as in inactive and active types of destructive endometrosis. In addition, when the effect of the phases of the estrous cycle was considered, differences in the transcription of *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* between phases were observed in the specific categories and histopathological type of equine endometrosis. The transcription of endometrial steroid receptors is subject to dysregulation with the severity of equine endometrosis, especially in both destructive types of endometrosis. Moreover, the ER-dependent rather than PR-dependent deregulation seems to play a greater role in the pathogenesis of endometrosis. Therefore, the role of the so far not assessed *ESR2* should be investigated. It is worth noting that both in FLP and MLP specific moderate and strong correlations between *ESR1*, *ESR2*, *PGR* and *RelA*, *NK-κB1*, *NK-κB2*, *MCP-1*, *IL-6*, *HAS1*, *HAS2*, and *HAS3* were evidenced, especially in both types of destructive endometrosis. Thus, the previous thesis that the endometrial fibrotic changes mediated by the canonical NF-κB pathway are estrous cycle-dependent was upheld. However, the specific relationship and co-localization of corresponding proteins in the endometrial tissue require further research.

Author Contributions: Conceptualization, T.J. and M.D.; methodology, T.J., Ł.Z., E.K. and M.D.; formal analysis, T.J., Ł.Z., G.F.-D. and M.D.; investigation, T.J., Ł.Z., E.K., E.J.-K., G.F.-D. and M.D.; resources, T.J. and M.D.; data curation, T.J.; writing—original draft preparation, T.J., Ł.Z. and M.D.; writing—review and editing, E.K., E.J.-K. and G.F.-D.; visualization, T.J. and M.D.; supervision, G.F.-D. and M.D.; project administration, T.J.; funding acquisition, M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by the National Science Centre, Poland, “Miniatura 2” Project, No. 2018/02/X/NZ4/00101.

Institutional Review Board Statement: The research, using the samples collected postmortem at a commercial slaughterhouse, does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes, national decree-law (Dz. U. 2015 poz. 266 and 2010-63-EU directive). No ethical approval was needed according to the list of exemptions of the II Local Committee for Ethics in Animal Research of Warsaw University of Life Sciences-SGGW (letter of 27 September 2021).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Da Costa, R.R.; Ferreira-Dias, G.; Mateus, L.; Korzekwa, A.; Andronowska, A.; Platek, R.; Skarzynski, D.J. Endometrial nitric oxide production and nitric oxide synthases in the equine endometrium: Relationship with microvascular density during the estrous cycle. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2007**, *32*, 287–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Schöniger, S.; Schoon, H.A. The healthy and diseased equine endometrium: A review of morphological features and molecular analyses. *Animals* **2020**, *10*, 625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. 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. Neutrophils, monocytes and other immune components in the equine endometrium: Friends or foes? *Theriogenology* **2020**, *150*, 150–157. [[CrossRef](#)]
5. 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. [[CrossRef](#)]
6. Rebordão, M.R.; Galvão, A.; Szóstek, A.; Amaral, A.; Mateus, L.; Skarzynski, D.J.; Ferreira-Dias, G. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reprod. Dom. Anim.* **2014**, *49*, 82–87. [[CrossRef](#)]

7. Szóstek-Mioduchowska, A.; Leciejewska, N.; Zelmańska, B.; Staszkiwicz-Chodor, J.; Ferreira-Dias, G.; Skarzynski, D. Lysophosphatidic acid as a regulator of endometrial connective tissue growth factor and prostaglandin secretion during estrous cycle and endometrosis in the mare. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 343. [[CrossRef](#)]
8. Minkwitz, C.; Schoon, H.-A.; Zhang, Q.; Schöniger, S. Plasticity of endometrial epithelial and stromal cells—A new approach towards the pathogenesis of equine endometrosis. *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *54*, 835–845. [[CrossRef](#)]
9. Szóstek-Mioduchowska, A.Z.; 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. [[CrossRef](#)]
10. 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. Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97889. [[CrossRef](#)]
11. Amaral, A.; Fernandes, C.; Morazzo, S.; Rebordão, M.R.; Szóstek-Mioduchowska, A.; Lukasik, K.; Gawronska-Kozak, B.; da Gama, L.T.; 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. [[CrossRef](#)]
12. Katila, T.; Ferreira-Dias, G. Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals* **2022**, *12*, 779. [[CrossRef](#)]
13. Hoffman, C.; Ellenberger, C.; Mattos, R.C.; Aupperle, H.; Dhein, S.; Stief, B.; Schoon, H.-A. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* **2009**, *111*, 261–278. [[CrossRef](#)]
14. Lehmann, J.; Ellenberger, C.; Hoffmann, C.; Bazer, F.W.; Klug, J.; Allen, W.R.; Sieme, H.; Schoon, H.A. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology* **2011**, *76*, 1326–1336. [[CrossRef](#)]
15. Kenney, R.M.; Doig, P.A. Equine endometrial biopsy. In *Current Therapy in Theriogenology*; Morrow, D.A., Ed.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA, 1986; pp. 723–729.
16. Schoon, H.-A.; Wiegandt, I.; Schoon, D.; Aupperle, H.; Bartmann, C.-P. Functional disturbances in the endometrium of barren mares: A histological and immunohistological study. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **2000**, *56*, 381–391.
17. Brunckhorst, D.; Schoon, H.A.; Bader, H.; Sieme, H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertilität* **1991**, *7*, 44–51.
18. Walter, I.; Klein, M.; Handler, J.; Aurich, J.E.; Reifinger, M.; Aurich, C. Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 840–845. [[CrossRef](#)]
19. Wilkenfeld, S.R.; Lin, C.; Frigo, D.E. Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions. *Steroids* **2018**, *133*, 2–7. [[CrossRef](#)]
20. Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjöld, M.; Gustafsson, J.A. Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocr. Metab.* **1997**, *82*, 4258–4265. [[CrossRef](#)]
21. Silva, E.S.M.; Scoggin, K.E.; Canisso, I.F.; Troedsson, M.H.T.; Squires, E.L.; Ball, B.A. Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* **2014**, *151*, 169–181. [[CrossRef](#)]
22. Mote, P.A.; Arnett-Mansfield, R.L.; Gava, N.; Defazio, A.; Mulac-Jericevic, B.; Conneely, O.M.; Clarke, C.L. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrus cycle. *Endocrinology* **2006**, *147*, 5503–5512. [[CrossRef](#)]
23. Watson, E.D.; Skolnik, S.B.; Zanicosky, H.G. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology* **1992**, *38*, 575–580. [[CrossRef](#)]
24. Aupperle, H.; Özgen, S.; Schoon, H.A.; Schoon, D.; Hoppen, H.O.; Sieme, H.; Tannapfel, A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Vet. J.* **2000**, *32*, 228–232. [[CrossRef](#)]
25. DeFranco, D.B. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 1449–1455. [[CrossRef](#)]
26. Weihua, Z.; Saji, S.; Makine, S.; Cheng, G.; Jensen, E.V.; Warner, M.; Gustafsson, J.A. Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5936–5941. [[CrossRef](#)]
27. Cunha, G.R.; Cooke, P.S.; Kurita, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch. Histol. Cytol.* **2004**, *67*, 417–434. [[CrossRef](#)]
28. Mulac-Jericevic, B.; Lydon, J.P.; Demayo, F.J.; Conneely, O.M. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9744–9749. [[CrossRef](#)]
29. Hartt, L.S.; Carling, S.J.; Joyce, M.M.; Johnson, G.A.; Vanderwall, D.K.; Ott, T.L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction* **2005**, *130*, 241–250. [[CrossRef](#)]
30. Cooke, P.S.; Buchanan, D.L.; Young, P.; Setiawan, T.; Brody, J.; Korach, K.S.; Taylor, J.; Lubahn, D.B.; Cunha, G.R. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6535–6540. [[CrossRef](#)]
31. 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. [[CrossRef](#)]
32. Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. Equine Endometrosis Pathological Features: Are They Dependent on NF- κ B Signaling Pathway? *Animals* **2021**, *11*, 3151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Umezawa, K. Possible role of peritoneal NF- κ B in peripheral inflammation and cancer: Lessons from the inhibitor DHMEQ. *Biomed Pharm.* **2011**, *65*, 252.e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. May, M.J.; Ghosh, S. Signal transduction through NF- κ B. *Trends Immunol.* **1998**, *19*, 80–88. [[CrossRef](#)]
35. Lind, D.S.; Hochwald, S.N.; Malaty, J.; Rekkas, S.; Hebig, P.; Mishra, G.; Moldawer, L.L.; Copeland III, E.M.; MacKay, S. Nuclear factor- κ B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* **2001**, *130*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tripathi, P.; Aggarwal, A. NF- κ B transcription factor: A key player in the generation of immune response. *Curr. Sci.* **2001**, *90*, 519–531.
37. Ahn, B.N.; Song, M.H.; Kim, J.H.; Kim, K.H.; Park, K.K.; Choi, Y.S. Intra-peritoneal NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide decreases postoperative intra-abdominal adhesion. *Korean J. Obstet. Gynecol.* **2012**, *55*, 244–249. [[CrossRef](#)]
38. Sosinska, P.; Baum, E.; Mackowiak, B.; Staniszewski, R.; Jasinski, T.; Umezawa, K.; Breborowicz, A. Inhibition of NF-kappaB with Dehydroxymethylepoxyquinomicin modifies the function of human peritoneal mesothelial cells. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 5756.
39. Alekseevna, R.V.; Pavlovich, D.A.; Evgenievich, B.Y.; Viktorovich, N.S. Nuclear factor kappa B as a potential target for pharmacological correction endothelium-associated pathology. *Res. Res. Pharm.* **2017**, *3*, 114–124.
40. Arjmand, M.H. The association between visceral adiposity with systemic inflammation, oxidative stress, and risk of post-surgical adhesion. *Arch. Physiol. Biochem.* **2020**, *6*, 1–6. [[CrossRef](#)]
41. Dejbani, P.; Nikravangolsefid, N.; Chamanara, M.; Dehpour, A.; Rashidian, A. The role of medicinal products in the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD) through inhibition of TLR4/NF-kappaB pathway. *Phytother. Res.* **2021**, *35*, 835–845. [[CrossRef](#)]
42. De Sousa Abreu, R.; Penalva, L.O.; Marcotte, E.; Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 1512–1526. [[CrossRef](#)]
43. Vogel, C.; Marcotte, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 227–232. [[CrossRef](#)]
44. Schoon, H.-A.; Schoon, D.; Klug, E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde* **1992**, *8*, 355–362. [[CrossRef](#)]
45. Da Costa, R.R.P.; Serrao, P.M.; Monteiro, S.; Pessa, P.; Robalo Silva, J.; Ferreira-Dias, G. Caspase-3 mediated apoptosis and cell proliferation in the equine endometrium during the oestrous cycle. *Reprod. Fertil. Dev.* **2007**, *19*, 925–932. [[CrossRef](#)]
46. Gebhardt, S.; Merkl, M.; Herbach, N.; Wanke, R.; Handler, J.; Bauersachs, S. Exploration of global gene expression changes during the oestrous cycle in equine endometrium. *Biol. Reprod.* **2012**, *87*, 1–13. [[CrossRef](#)]
47. McDowell, K.J.; Adams, M.H.; Adam, C.Y.; Simpson, K.S. Changes in equine endometrial oestrogen receptor and progesterone receptor mRNAs during the oestrus cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J. Reprod. Fertil.* **1999**, *117*, 135–142. [[CrossRef](#)]
48. Honnens, A.; Weisser, S.; Welter, H.; Einspanier, R.; Bollwein, H. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrus cycle in mares. *J. Reprod. Develop.* **2011**, *57*, 43–48. [[CrossRef](#)]
49. Paech, K.; Webb, P.; Nisson, S.; Gustafsson, J.-Å.; Kushner, P.J.; Scanlan, S. Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER α and ER β at AP1 Sites. *Science* **1997**, *177*, 1508–1510. [[CrossRef](#)]
50. Hall, J.M.; McDonnell, D.P. The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology* **1999**, *140*, 5566–5578. [[CrossRef](#)]
51. Pettersson, K.; Grandien, K.; Kuiper, G.G.J.M.; Gustafsson, J.-Å. Mouse Estrogen Receptor β Forms Estrogen Response Element-Binding Heterodimers with Estrogen Receptor α . *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11*, 1486–1496.
52. Cowley, S.M.; Hoare, S.; Mosselman, S.; Parker, M.G. Estrogen Receptors α and β Form Heterodimers on DNA. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19858–19862. [[CrossRef](#)]
53. Lubahn, D.B.; Moyer, J.S.; Golding, T.S.; Couse, J.F.; Korach, K.S.; Smithies, O. Alteration of reproduction function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11162–11166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Pierro, E.; Minici, F.; Alesiani, O.; Miceli, F.; Proto, C.; Screpanti, I.; Lanzone, A. Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium. *Biol. Reprod.* **2001**, *64*, 831–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Arnold, J.T.; Kaufman, D.G.; Seppala, M.; Lessey, B.A. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: A new co-culture model. *Hum. Reprod.* **2001**, *16*, 836–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Klymkowsky, M.W.; Bachant, J.B.; Domingo, A. Functions of intermediate filaments. *Cell Motil. Cytoskeleton* **1989**, *14*, 309–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Brasier, A.R. The nuclear factor- κ B–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *86*, 211–218. [[CrossRef](#)]
59. Ohkawa, T.; Ueki, N.; Taguchi, T.; Shindo, Y.; Adachi, M.; Amuro, Y.; Hada, T.; Higashino, K. Stimulation of hyaluronan synthesis by tumor necrosis factor- α is mediated by the p50/p65 NF- κ B complex in MRC-5 myofibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1999**, *1448*, 416–424. [[CrossRef](#)]

60. Caon, I.; Bartolini, B.; Moretto, P.; Parnigoni, A.; Carava, E.; Vitale, D.L.; Alaniz, L.; Viola, M.; Karousou, E.; De Luca, G.; et al. Sirtuin 1 reduces hyaluronan synthase 2 expression by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B and expression of the long-noncoding RNA HAS2-AS1. *J. Biol. Chem.* **2017**, *295*, 3485–3496. [[CrossRef](#)]
61. Tong, W.; Geng, Y.; Huang, Y.; Shi, Y.; Xiang, S.; Zhang, N.; Qin, L.; Shi, Q.; Chen, Q.; Dai, K.; et al. In vivo identification and induction of articular cartilage stem cells by inhibiting NF- κ B signaling in osteoarthritis. *Stem Cells* **2015**, *33*, 3125–3137. [[CrossRef](#)]
62. Chung, S.; Son, M.; Kim, M.; Koh, E.S.; Shin, S.J.; Park, C.W.; Kim, S.; Kim, H.S. Inhibition of p300/CBP-associated factor attenuates renal tubulointerstitial fibrosis through modulation of NF- κ B and Nrf2. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1554. [[CrossRef](#)]
63. Schoon, H.A.; Schoon, D.; Klug, E. Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde* **1997**, *13*, 453–464. [[CrossRef](#)]

9.2. Oświadczenia współautorów

Lek. wet. Tomasz Jasiński
tomasz_jasinski@sggw.edu.pl

Warszawa, 14.11.2022

Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

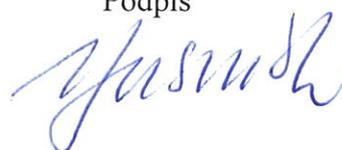
Domino, M.; Jasinski, T.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Zabielski, R.; Sady, M.; Gajewski, Z. (2020). Expression of genes involved in the NF- κ B dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology*, 147, 18-24 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 40% i polegał na udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu oraz udziale w opracowaniu koncepcji badań;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2021). Equine endometrosis pathological features: Are they dependent on NF- κ B Signaling pathway? *Animals*, 11, 3151 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 60% i polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metodologii badań, udziale w analizie danych, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia, udziale w zapewnieniu zasobów do realizacji doświadczenia, przechowywaniu danych, udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu, udziale w przygotowaniu rycin oraz zarządzaniu projektem;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2022). The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 598–610 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 60% i polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w zaprojektowaniu protokołu doświadczenia, udziale w pozyskiwaniu danych, udziale w analizie danych, udziale w dyskusji uzyskanych wyników oraz udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Ferreira-Dias, G.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Domino, M. (2022). Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF- κ B-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7360 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 60% i polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metodologii badań, udziale w analizie danych, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia, udziale w zapewnieniu zasobów do realizacji doświadczenia, przechowywaniu danych, udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu, udziale w przygotowaniu rycin oraz zarządzaniu projektem.

Podpis



Warszawa, 14.11.2022

Dr Ewa Kautz
ewa_kautz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Domino, M.; Jasinski, T.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Zabielski, R.; Sady, M.; Gajewski, Z. (2020). Expression of genes involved in the NF- κ B dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology*, 147, 18-24 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w analizie danych;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2021). Equine endometrosis pathological features: Are they dependent on NF- κ B Signaling pathway? *Animals*, 11, 3151 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w opracowaniu metodologii badań, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia oraz udziale w recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2022). The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 598–610 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w zaprojektowaniu protokołu doświadczenia, udziale w pozyskiwaniu danych oraz udziale w dyskusji uzyskanych wyników;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Ferreira-Dias, G.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Domino, M. (2022). Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF- κ B-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7360 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w opracowaniu metodologii badań, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia oraz udziale w recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 14.11.2022

Dr hab. Edyta Juszcuk-Kubiak
edyta.juszcuk-kubiak@ibprs.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

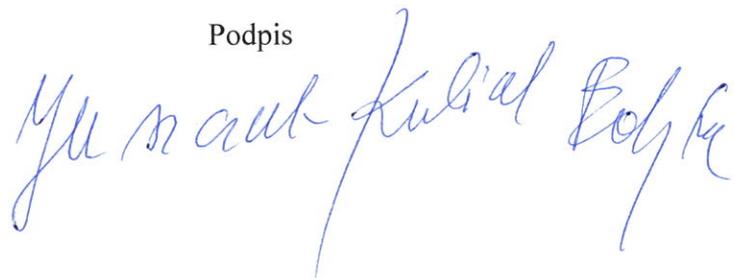
Domino, M.; Jasinski, T.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Zabielski, R.; Sady, M.; Gajewski, Z. (2020). Expression of genes involved in the NF- κ B dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology*, 147, 18-24 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w analizie danych;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2021). Equine endometrosis pathological features: Are they dependent on NF- κ B Signaling pathway? *Animals*, 11, 3151 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w przeprowadzeniu doświadczenia oraz udziale w recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2022). The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 598–610 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w pozyskiwaniu danych oraz udziale w dyskusji uzyskanych wyników;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Ferreira-Dias, G.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Domino, M. (2022). Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF- κ B-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7360 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w przeprowadzeniu doświadczenia oraz udziale w recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu.

Podpis



Lizbona, 11.11.2022

Prof. Graça Ferreira-Dias
gmlfdias@fmv.ulisboa.pt

Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

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- κ B dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology*, 147, 18-24 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu oraz udziale w nadzorze nad powstawaniem manuskryptu.

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2021). Equine endometrosis pathological features: Are they dependent on NF- κ B Signaling pathway? *Animals*, 11, 3151 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w analizie danych, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia, udziale w recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu oraz udziale w nadzorze nad powstawaniem manuskryptu.

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2022). The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 598–610 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w pozyskiwaniu danych, udziale w analizie danych, udziale w dyskusji uzyskanych wyników, oraz krytycznym recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu.

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Ferreira-Dias, G.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Domino, M. (2022). Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF- κ B-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7360 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w analizie danych, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia, udziale w recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu oraz udziale w nadzorze nad powstawaniem manuskryptu.



Warszawa, 14.11.2022

Lek. wet. Łukasz Zdrojkowski
lukasz_zdrojkowski@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2021). Equine endometrosis pathological features: Are they dependent on NF- κ B Signaling pathway? *Animals*, 11, 3151 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w opracowaniu metodologii badań, udziale w analizie danych, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia oraz udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2022). The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 598–610 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w zaprojektowaniu protokołu doświadczenia, udziale w pozyskiwaniu danych, udziale w dyskusji uzyskanych wyników oraz udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Ferreira-Dias, G.; Kautz, E.; Juszcuk-Kubiak, E.; Domino, M. (2022). Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF- κ B-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7360 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 5% i polegał na udziale w opracowaniu metodologii badań, udziale w analizie danych, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia oraz udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu.

Podpis

Dr hab. Małgorzata Domino

Warszawa, 14.11.2022

malgorzata_domino@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

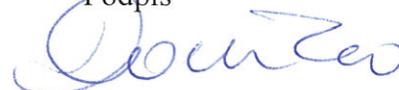
Domino, M.; Jasinski, T.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Zabielski, R.; Sady, M.; Gajewski, Z. (2020). Expression of genes involved in the NF- κ B dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology*, 147, 18-24 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 40% i polegał na udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu, udziale w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu doświadczenia, opracowaniu metodologii badań, zarządzaniu projektem, udziale w analizie danych oraz udziale w pozyskaniu finansowania projektu;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2021). Equine endometrosis pathological features: Are they dependent on NF- κ B Signaling pathway? *Animals*, 11, 3151 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 20% i polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metodologii badań, udziale w analizie danych, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia, udziale w zapewnieniu zasobów do realizacji doświadczenia, udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu, udziale w przygotowaniu rycin, udziale w nadzorze nad powstawaniem manuskryptu oraz pozyskaniu finansowania projektu;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Ferreira-Dias, G.; Domino, M. (2022). The NF- κ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 598–610 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 20% i polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w zaprojektowaniu protokołu doświadczenia, udziale w pozyskiwaniu danych, udziale w analizie danych, udziale w dyskusji uzyskanych wyników oraz udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu;

Jasiński, T.; Zdrojkowski, Ł.; Ferreira-Dias, G.; Kautz, E.; Juszczuk-Kubiak, E.; Domino, M. (2022). Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF- κ B-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7360 mój indywidualny udział w jej powstaniu wynosił 20% i polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metodologii badań, udziale w analizie danych, udziale w przeprowadzeniu doświadczenia, udziale w zapewnieniu zasobów do realizacji doświadczenia, udziale w pisaniu oryginalnego szkicu manuskryptu, udziale w przygotowaniu rycin, udziale w nadzorze nad powstawaniem manuskryptu oraz pozyskaniu finansowania projektu.

Podpis



Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW

.....
(czytelny podpis autora)