University of Mosul
College of Veterinary Medicine

Investigation of the relationship between bovine endometritis severity and the expression of specific cytokines

Wardi Mohammed Hassan Khalaf

MSc Thesis
Veterinary Medicine/ Veterinary Obstetrics

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Isam Bahnan Basheer Sharum

2025 A.D. **1447 A.H.**

Abstract

Endometritis, the inflammation of the uterine mucosa, is a major reproductive disorder that adversely affects the cow's reproductive performance. However, current diagnostic methods are deficient for accurate diagnosis and pathological staging. This study employed a diagnostic model that integrates cytology and histopathology to evaluate the presence and severity of endometritis in cows, and immunohistochemistry for the localization of inflammatory interleukins. Reproductive tracts of slaughtered cows (n=137) were obtained from local slaughterhouses in Mosul city-Iraq for the period from September 2024 to April 2025. For consistency, any genetilia detected either with ovarian/ uterine disorders, pregnant uteri, or that demonstrated graafian/ corpora lutea were excluded from sampling. Therefore, according to the designed category, 76 genital samples at the proestrus period were subjected to endometrial cytobrush smears and biopsy sampling. The cytobrush smears were stained with the May-Grunwald Giemsa Stain kit (MGG) and were analyzed for polymorphonuclear leukocyte (PMNL) quantification. The PMNL threshold rates were categorized into mild (≤5%), moderate (>5-15%), and high (>15%).

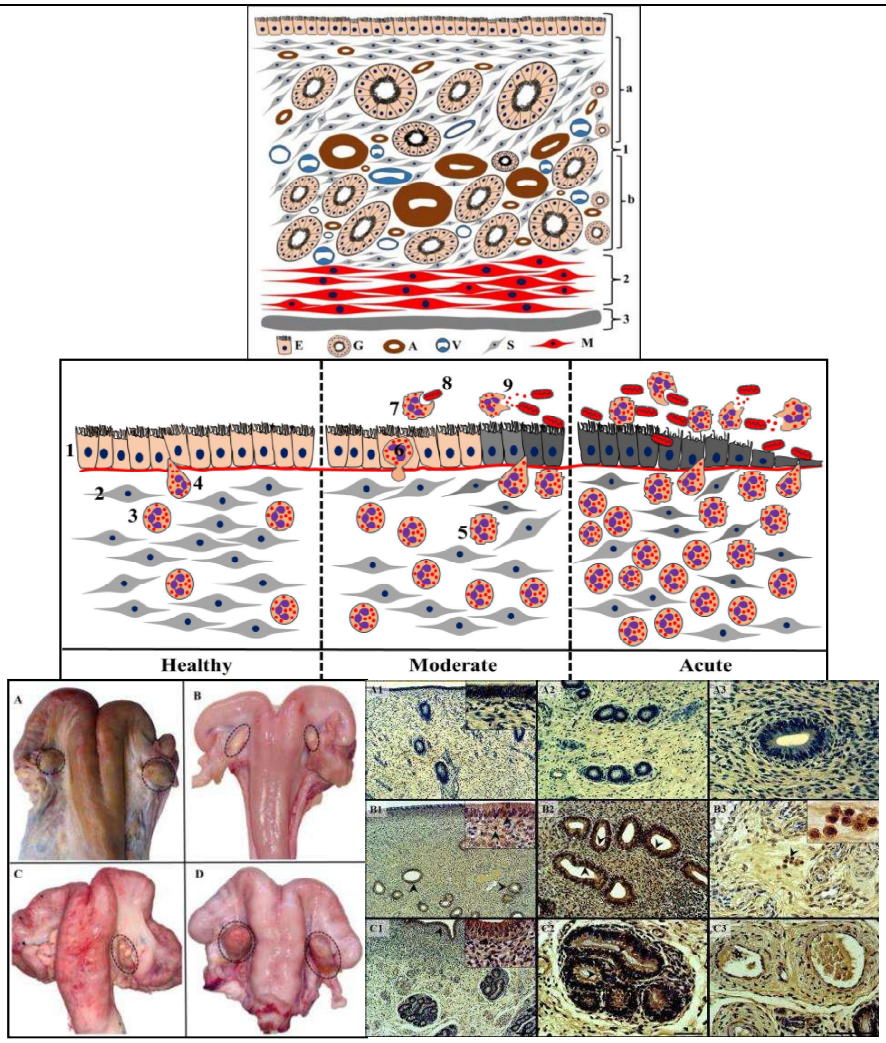
The endometrial biopsies were processed and stained with hematoxylin and eosin for the histopathological classification (mild, acute, and chronic), according to the histopathological changes. The processed endometrial sections were also utilized for the immunohistochemical localization of IL-8, IL-1β, and IL-10. One-way ANOVA analysis revealed a significant prevalence of the moderate level (51.3%, $P<0.01$), which correlated with the severity of inflammatory changes, followed by the high and mild thresholds. According to the precise pathological lesions in each category, the histopathological examination of the endometrial sections revealed that the incidence of chronic endometritis was significantly higher (47.4%, $P<0.01$) than that of both acute and mild endometritis. Interestingly, immunohistochemical staining highlighted

the differential localization and staining intensities of the studied interleukins with the severity of endometritis. The localization of IL-8 proteins was predominated on vascular endothelium, surface/ glandular epithelium. Macrophages and glandular/surface epithelium were strongly labeled with IL-1β. However, the localization of IL-10 was specifically associated with the vascular endothelium. Precisely, the highest expression intensity of IL-8 and IL-1β was associated with severe inflammation, while the stronger expression of IL-10 was mainly linked to chronic endometritis.

In conclusion, the integration of cytological, histopathological, and immunohistochemical practices not only confirmed the prevalence and severity of endometritis among the endometrial samples but also established reliable PMNL thresholds that demonstrate strong diagnostic validity and staging endometritis. The diverse localization and intensity pattern of interleukin proteins serve as vital stage-specific inflammatory biomarkers that provide further understanding of both the progression and pathogenesis of endometritis. Although the utilized approach enhances the diagnostic and staging of endometritis, future investigations need to be designed to determine the expression pattern of these interleukins in live cows diagnosed with various forms of endometritis.

Investigation of the relationship between bovine endometritis severity and the expression of specific cytokines

Author: Wardi Mohammed Hassan Khalaf Advisor: DrIsam Bahnan Basheer Sharum. Publisher: University of Mosul

HIGHLITS	GRAPHICAL ABSTRACT
Aims To assess the effectiveness of endometrial cytobrush sampling (PMNL count) and the established thresholds for detecting and staging of endometritis. To categorize endometritis based on endome	

trial histopathological lesions. To localize several inflammatory cytokines (IL-8, IL-10, and IL-1β) by immunohistochemical staining within endometrial sections To correlate the cytokines' localization patterns with the severity of endometritis and cytobru	

sh-derived PMNL threshod..	
Keywords: Cytobrush, Endometritis, Interleukins, Histopathology, Immunohistochemistry	**ABSTRACT** Endometritis, the inflammation of the uterine mucosa, is a major reproductive disorder that adversely affects the cow's reproductive performance. However, current diagnostic methods are deficient for accurate diagnosis and pathological staging. This study employed a diagnostic model that integrates cytology and histopathology to evaluate the presence and severity of endometritis in cows, and immunohistochemistry for the localization of inflammatory interleukins. Reproductive tracts of slaughtered cows (n=137) were obtained from local slaughterhouses in Mosul city-Iraq for the period from September 2024 to April 2025. For consistency, any genetilia detected either with ovarian/ uterine disorders, pregnant uteri, or that demonstrated graafian/ corpora lutea were excluded from sampling. Therefore, according to the designed category, 76 genital samples at the proestrus period were subjected to endometrial cytobrush smears and biopsy sampling. The cytobrush smears were stained with the May-Grunwald Giemsa Stain kit (MGG) and were analyzed for polymorphonuclear leukocyte (PMNL) quantification. The PMNL threshold rates were categorized into mild (≤5%), moderate (>5-15%), and high (>15%). The endometrial biopsies were processed and stained with hematoxylin and eosin for the histopathological classification (mild, acute, and chronic), according to the histopathological changes. The processed endometrial sections were also utilized for the immunohistochemical localization of IL-8, IL-1β, and IL-10. One-way ANOVA analysis revealed a significant prevalence of the moderate level (51.3%, $P<0.01$), which correlated with the severity of inflammatory changes, followed by the high and mild thresholds. According to the precise pathological lesions in each category, the histopathological examination of the endometrial sections revealed that the incidence of chronic endometritis was significantly higher (47.4%, $P<0.01$) than that of both acute and mild endometritis. Interestingly, immunohistochemical staining highlighted the differential localization and staining intensities of the studied interleukins with the severity of endometritis. The localization of IL-8 proteins was predominated on vascular endothelium, surface/ glandular epithelium. Macrophages and glandular/surface epithelium were strongly labeled with IL-1β. However, the localization of IL-10 was specifically associated with the vascular endothelium. Precisely, the highest expression intensity of IL-8 and IL-1β was associated with severe inflammation, while the stronger expression of IL-10 was mainly linked to chronic endometritis. In conclusion, the integration of cytological, histopathological, and immunohistochemical practices not only confirmed the prevalence and severity of endometritis among the endometrial samples but also established reliable PMNL thresholds that demonstrate strong diagnostic validity and staging endometritis. The diverse localization and intensity pattern of interleukin proteins serve as vital stage-specific inflammatory biomarkers that provide further understanding of both the progression and pathogenesis of endometritis. Although the utilized approach enhances the diagnostic and staging of endometritis, future investigations need to be designed to determine the expression pattern of these interleukins in live cows diagnosed with various forms of endometritis. **2025 M.Sc. Thesis @Univ. of Mosul, College Vet.Med.Dept.surgery and Theriogenology. (https://www.uomosul.edu.iq/).**

جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

دراسة العلاقة بين شدة التهاب بطانة الرحم في الأبقار والتعبير عن سيتوكينات محددة

وردي محمد حسن خلف

رسالة ماجستير
الطب البيطري / التوليد البيطري

بإشراف
الأستاذ المساعد الدكتور
عصام بهنام بشير شرم

١٤٤٧هـ ٢٠٢٥م

الخلاصة

التهاب بطانة الرحم، وهو التهاب في الغشاء المخاطي الرحمي، يُعتبر من الاضطرابات التناسلية الرئيسية التي تؤثر سلبًا على الأداء التناسلي للأبقار. ومع ذلك، فإن طرق التشخيص الحالية تفتقد الى كل من الدقة في التشخيص وتصنيف شدة الالتهاب. استخدمت هذه الدراسة نموذجًا تشخيصيًا يدمج بين علم الخلايا، وعلم الأمراض النسيجية، لتقييم وجود وشدة التهاب بطانة الرحم لدى الأبقار، فضلا عن الكيمياء النسيجية المناعية لتحديد تموضع السيتوكينات الالتهابية في بطانة الرحم. تم الحصول على الأجهزة التناسلية لأبقار هجينة مذبوحة (بعدد ١٣٧) من المسالخ المحلية في مدينة الموصل، العراق، خلال الفترة الممتدة من ايلول ٢٠٢٤ إلى نيسان ٢٠٢٥. ولضمان الاتساق، تم استبعاد أي عينة لوحظ عليها اضطرابات مبيضية أو رحمية، أو رحم حامل، أو التي أظهرت جريبات مبيضية ناضجة أو أجسام صفراء. بناءً على ذلك، خضعت ٧٦ عينة تناسلية شخصت في الفترة ما قبل الشبق لجمع المسحات والخزعات من بطانة الرحم. صبغت المسحات باستخدام طقم صبغ MGG وتم تحليلها لتحديد اعداد الكريات الدم البيضاء متعددة اشكال النوى. تم تصنيف عتبات الخلايا إلى مستويات خفيفة (≤٥%)، ومتوسطة (>٥–١٥%)، وعالية (>١٥%). تم معاملة خزعات بطانة الرحم وصبغها بالهيماتوكسيلين والإيوسين للتصنيف النسيجي المرضي (بسيط، حاد، ومزمن) وفقًا للتغيرات النسيجية المرضية. استخدام تحليل منحنيات التشغيل الاستقبال للتحقق من صلاحية العتبات المحددة من خلال تحديد حساسية ونوعية قيم قطع الخلايا الالتهابية مقابل التصنيف النسيجي المرضي. فضلا عن ذلك، تم استخدام المقاطع النسيجية من بطانة الرحم لتحديد التموضع للانترليوكينات المناعية (IL–8 و IL–1β و IL–10).

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي ارتفاع نسبة العينات وبشكل معنوي للمستوى المتوسط للعد الخلوي (٥١,٣%، وبمستوى معنوي ٠,٠١) والذي كانت له علاقة وثيقة مع شدة التغيرات الالتهابية، تلاه العتبات العالية والضعيفة. وفقًا للتغيرات النسيجية المرضية في كل تصنيف، كشفت الفحوصات النسيجية المرضية لمقاطع بطانة الرحم عن أن حدوث التهاب بطانة الرحم المزمن كان بنسبة معنوية أعلى (٥١,٣%، وبمستوى معنوي ٠,٠١) من التهاب بطانة الرحم الحاد والبسيط. من الجدير بالذكر أن تحليل منحنيات التشغيل الاستقبال أكد تناسق قيم قطع الخلايا الالتهابية، حيث أظهر حساسية ونوعية عالية في تشخيص مختلف درجات شدة الالتهاب لبطانة الرحم، ولا سيما في الأشكال الخفيفة والحادة. بشكل

مثير للاهتمام، أبرز الصبغ المناعي اختلاف في تموضع وشدة الصبغة للانترليوكينات المستعملة طبقا لشدة التهاب بطانة الرحم. كان موضع بروتينات IL-8 مهيمنًا على بطانة الأوعية الدموية والظهارة السطحية/ الغدية.

تم تحديد تموضع شديد للانترليوكين بيتا (IL-١β) في الخلايا البلعمية والظهارة الغدية/ السطحية. في حين كان تموضعIL-10 مرتبطة بشكل خاص ببطانة الأوعية الدموية. بصورة خاصة، كانت أعلى شدة تموضع لـ IL-8 وIL-1β مرتبطة بالالتهاب الشديد، في حين كان التموضع العالي لـ IL-10 مقترن بشكل رئيسي بالتهاب بطانة الرحم المزمن.

بالخلاصة، فإن دمج الفحوصات الخلوية والنسيجية المرضية والكيمياء المناعية لم يؤكد فقط تشخيص وتصنيف شدة التهاب بطانة الرحم، بل اثبت أيضًا موثوقية وصلاحية العتبات المصممة في دقة تشخيص وتصنيف التهاب بطانة الرحم. إن التوزيع المتنوع لتموضع وشدة التعبير لبروتينات الإنترليوكينات تُعتبر مؤشرات حيوية خاصة بالمرحلة الالتهابية وتوفر فهماً أعمق لكل من تقدم وشدة التهاب بطانة الرحم. على الرغم من أن النهج المستخدم في الدراسة الحالية يعزز دقة التشخيص والتصنيف لالتهاب بطانة الرحم في الفترة ما بعد الولادة، إلا أن الدراسات المستقبلية يجب أن تصمم لتحديد نمط التعبير عن هذه الإنترليوكينات في الحيوانات الحية المشخصة بأشكال مختلفة من التهاب بطانة الرحم.