

mgr farm. Alicja Sztokfisz-Ignasiak

Rola chromograniny A w patogenezie endometriozy

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Izabela R. Janiuk

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego
Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024

Słowa kluczowe: endometrioza, chromogranina A, katestatyna, pankreastatyna, wazostatyna, rodzina granin

Key words: endometriosis, chromogranin A, catestatin, pancreastatin, vasostatin, granin family

Najserdeczniejsze wyrazy wdzięczności składam mojej Pani Promotor **dr hab. n. med. Izabeli Janiuk** za nieocenioną pomoc, wspólną pracę, motywację podczas pisania niniejszej rozprawy, konstruktywne, wielogodzinne dyskusje, cierpliwe odpowiedzi na zadawane pytania oraz wsparcie, które w wielu momentach było mi bardzo potrzebne.

Panu **prof. dr hab. n. med. Jackowi Malejczykowi** dziękuję przede wszystkim za obdarzenie mnie zaufaniem i możliwość pracy naukowej pod swoją opieką, cenne uwagi i wskazówki na każdym etapie badań, poświęcony czas, inspirujące rozmowy oraz za przekazywanie wiedzy naukowej z wielką pasją.

Panu **prof. Piotrowi Roszkowskiemu** oraz Panu **dr hab. Filipowi Dąbrowskiemu** składam serdeczne podziękowania za kwalifikację pacjentek oraz pobieranie materiału do badań.

Kolegom i Koleżankom z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii dziękuję za ciepłe przyjęcie do zespołu, życzliwość oraz dobre słowa. Dziękuję w szczególności **dr hab. Anecie Ścieżyńskiej** za nieocenioną pomoc na początku moich studiów doktoranckich oraz **Michałowi Komorowskiemu** za wspólną pracę.

Studentom z koła naukowego HESA, a przede wszystkim **Mai Owe-Larsson** i **Mikołajowi Paterowi**, dziękuję za wspólną pracę i miło spędzony czas.

Rodzinie oraz Bliskim, a w szczególności **Mężowi Karolowi, Rodzicom** i **Agnieszce Czajkowskiej** dziękuję za wsparcie, wiarę we mnie, chęć niesienia pomocy w każdej chwili oraz za cierpliwość i wyrozumiałość podczas realizacji pracy doktorskiej. Dziękuję również moim **Dzieciom – Mieszkowi i Urszuli**, które codziennie przypominały mi, co w życiu jest najważniejsze.

SPIS TREŚCI

SPIS RYCIN I TABEL	6
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	10
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	12
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	15
1. WSTĘP.....	18
1.1 Endometrioza	18
1.1.1 Etiopatogeneza endometriozy	19
1.1.2 Epidemiologia endometriozy	23
1.1.3 Klasyfikacja endometriozy.....	23
1.1.4 Diagnostyka endometriozy.....	24
1.1.5 Leczenie endometriozy	25
1.1.6 Endometrioza a płodność	26
1.2 Chromogranina A.....	27
1.2.1 Rodzina granin	27
1.2.2 Struktura chromograniny A.....	29
1.2.3 Biosynteza, wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe przetwarzanie chromograniny A.....	30
1.2.4 Biologiczna rola chromograniny A oraz jej pochodnych.....	33
1.2.5 Chromogranina A w różnych stanach patologicznych.....	37
1.3 Związek chromograniny A oraz jej pochodnych z endometriozą.....	38
2. ZAŁOŻENIA I CELE	39
3. MATERIAŁY I METODY	40
3.1 Uczestnicy badania.....	40
3.2 Immunohistochemia.....	41
3.3 Testy immunoenzymatyczne (ELISA).....	44
3.4 Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja.....	44
3.5 Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym.....	46
3.6 Hodowla komórkowa.....	47
3.7 Analiza statystyczna.....	48
4. WYNIKI.....	49
4.1 Identyfikacja chromograniny A w endometrium eutopowym oraz we fragmentach tkanek zmienionych chorobowo	49
4.2 Występowanie chromograniny A i jej pochodnych w płynach ustrojowych.....	50
4.2.1 Porównanie stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym w grupie badanej i kontrolnej.....	50
4.2.2 Korelacja stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym	

4.2.3	Analiza ROC stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym.....	56
4.2.4	Porównanie stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym według stopnia rASRM.....	60
4.2.5	Korelacja stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym ze skalą rASRM	63
4.2.6	Porównanie stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych	66
4.2.7	Korelacja stężenia chromograniny A ze stężeniami jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym.....	70
4.3	Ekspresja mRNA dla genu CHGA we fragmentach tkanki zmian endometriotycznych oraz w endometrium eutopowym.....	72
4.4	Ekspresja mRNA dla genu CHGA w liniach komórkowych 12Z oraz Ishikawa po sty-mulacji cytokinami.....	73
5.	DYSKUSJA	76
6.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	82
7.	PIŚMIENNICTWO	83

SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie struktury genu ludzkiej chromograniny A oraz peptydów pochodzących z jej rozpadu.

Rycina 2. Lokalizacja immunohistochemiczna chromograniny A w endometrium eutopowym pobranym od pacjentek z grupy kontrolnej.

Rycina 3. Lokalizacja immunohistochemiczna chromograniny A w zmianach endometrioidalnych na otrzewnej (A-C) oraz we fragmentach torbieli endometrialnych (D-F) pobranych od pacjentek z grupy badanej.

Rycina 4. Stężenie chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą (Endo) w porównaniu do kobiet bez endometriozy (grupa kontrolna; K).

Rycina 5. Stężenie katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą (Endo) w porównaniu do kobiet bez endometriozy (grupa kontrolna; K).

Rycina 6. Stężenie pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą (Endo) w porównaniu do kobiet bez endometriozy (grupa kontrolna; K).

Rycina 7. Stężenie wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą (Endo) w porównaniu do kobiet bez endometriozy (grupa kontrolna; K).

Rycina 8. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA, A), katestatyny (CST, B), pankreastatyny (PST, C) oraz wazostatyny II (VS-II, D) w surowicy i płynie otrzewnowym u pacjentek z grupy badanej i kontrolnej.

Rycina 9. Analiza ROC stężenia chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriożą w porównaniu do kobiet bez endometriozy.

Rycina 10. Analiza ROC stężenia katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriożą w porównaniu do kobiet bez endometriozy.

Rycina 11. Analiza ROC stężenia pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriożą w porównaniu do kobiet bez endometriozy.

Rycina 12. Analiza ROC stężenia wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w porównaniu do kobiet bez endometriozy.

Rycina 13. Stężenie chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z I i II (I/II) oraz III i IV (III/IV) stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej.

Rycina 14. Stężenie katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z I i II (I/II) oraz III i IV (III/IV) stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej.

Rycina 15. Stężenie pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z I i II (I/II) oraz III i IV (III/IV) stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej.

Rycina 16. Stężenie wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z I i II (I/II) oraz III i IV (III/IV) stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej.

Rycina 17. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) ze skalą rASRM (I/II, III/IV) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 18. Korelacja stężenia katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) ze skalą rASRM (I/II, III/IV) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 19. Korelacja stężenia pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) ze skalą rASRM (I/II, III/IV) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 20. Korelacja stężenia wazostatyny (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) ze skalą rASRM (I/II, III/IV) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 21. Stężenie chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych: torbiele endometrialne (TE), zmiany na otrzewnej (O), zmiany w obu tych lokalizacjach (TE+O) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 22. Stężenie katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych: torbiele endometrialne (TE), zmiany na otrzewnej (O), zmiany w obu tych lokalizacjach (TE+O) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 23. Stężenie pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych: torbiele endometrialne (TE), zmiany na otrzewnej (O), zmiany w obu tych lokalizacjach (TE+O) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 24. Stężenie wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych: torbiele endometrialne (TE), zmiany na otrzewnej (O), zmiany w obu tych lokalizacjach (TE+O) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 25. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA) i katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z grupy kontrolnej oraz badanej.

Rycina 26. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA) i pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z grupy kontrolnej oraz badanej.

Rycina 27. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA) i wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z grupy kontrolnej oraz badanej.

Rycina 28. Mapy cieplne macierzy korelacji pomiędzy stężeniami chromograniny A (CgA) i jej pochodnych katestatyny (CST), pankreastatyny (PST) i wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z grupy kontrolnej oraz badanej.

Rycina 29. Porównanie ekspresji mRNA dla genu *CHGA* we fragmentach torbieli endometrialnych pobranych od kobiet z grupy badanej (Endo) z ekspresją tego genu w endometrium eutopowym pobranym od kobiet z grupy kontrolnej (K).

Rycina 30. Ekspresja mRNA dla genu chromograniny A (*CHGA*) w komórkach linii 12Z pod wpływem stymulacji wybranymi cytokinami: IL-1 (A), IL-6 (B), TGFβ (C), TNF (D) w stężeniach 10 ng/mL oraz 20 ng/mL.

Rycina 31. Ekspresja mRNA dla genu chromograniny A (*CHGA*) w komórkach linii Ishikawa pod wpływem stymulacji wybranymi cytokinami: IL-1 (A), IL-6 (B), TGFβ (C), TNF (D) w stężeniach 10 ng/mL oraz 20 ng/mL.

Tabela 1. Zestawienie białek należących do rodziny granin.

Tabela 2. Charakterystyka badanych grup.

Tabela 3. Zestawy użyte do wykonania testów immunoenzymatycznych ELISA.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej w zestawie High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Tabela 5. Warunki reakcji syntezy cDNA.

Tabela 6. Warunki przeprowadzania reakcji PCR.

Tabela 7. Porównanie stężeń chromograniny A (CgA), katestatyny (CST), pankreastatyny (PST) oraz wazostatyny II (VS-II) w surowicy i płynie otrzewnowym w grupie badanej (Endo) oraz w grupie kontrolnej (K).

Tabela 8. Wartości indeksów Youdena, *positive predictive value* (PPV) oraz *negative predictive value* (NPV) obliczone na podstawie analizy krzywych ROC.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AG	aparat Golgiego
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i> - Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
CA	katecholaminy
CgA	chromogranina A
CgB	chromogranina B
CHR	chromofungina
CPE	karboksypeptydaza E
CST	katestatyna
DAMP	<i>Danger/Damage Associated Molecular Patterns</i> - alarminy
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i> - Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii
GnRH	gonadoliberyna
HLA	ludzki antygen leukocytarny
HMGB1	<i>High-Mobility Group Box 1</i>
IHC	immunohistochemia
IL-1	interleukina-1
IL-6	interleukina-6
IL-8	interleukina-8
IL-17	interleukina-17
IL-33	interleukina-33
ISG	niedojrzałe pęcherzyki wydzielnicze
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptor</i>
MSG	dojrzałe pęcherzyki wydzielnicze
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne
PC	konwertazy prohormonów
PC1/3	konwertaza prohormonu 1/3
PC2	konwertaza prohormonu 2
pI	punkt izoelektryczny
POMC	proopiomelanokortyna

PST	pankreastatyna
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i> - receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji
SgII	sekreto granina II
SgIII	sekreto granina III
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein (SNAP) Receptor</i>
TGN	sieć <i>trans</i> aparatu Golgiego
Th2	limfocyty T pomocnicze typu 2
Th17	limfocyty T pomocnicze produkujące IL-17
TLR4	<i>Toll-Like Receptor-4</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - czynnik martwicy nowotworu
t-PA	tkankowy aktywator plazminogenu
u-PA	urokinazowy aktywator plazminogenu
VIF	czynnik hamujący zwężanie naczyń
VS-I	wazostatyna I
VS-II	wazostatyna II

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Endometrioza to przewlekła, estrogenozależna, zapalna choroba ginekologiczna, związana z bólem w obrębie miednicy mniejszej oraz z niepłodnością, dotykająca w szczególności kobiety w wieku rozrodczym, ale również te po menopauzie. Choroba ta charakteryzuje się obecnością tkanki endometrialnej poza jej fizjologicznym położeniem, a ektopowa lokalizacja dotyczy głównie jajników, otrzewnej w obszarze miednicy mniejszej oraz przestrzeni odbytniczo-pochwowej. Częstość występowania endometriozy sięga 10% w populacji kobiet na całym świecie, a wśród kobiet cierpiących z powodu niepłodności, wzrasta nawet do 50% przypadków. Patogeneza omawianej choroby pozostaje zagadką. Istnieją trzy klasyczne teorie, obecnie uważane jedynie za „punkt wyjścia” do bardziej zaawansowanych badań, ponieważ przedstawiają one prawdopodobne szlaki migracji komórek endometrialnych do miejsc ektopowych, ale nie uzasadniają sposobu ich implantacji, proliferacji i aktywacji. Z tego powodu na całym świecie od kilkudziesięciu lat prowadzone są badania, mające na celu wyjaśnienie tych mechanizmów. Szacuje się, że diagnoza endometriozy od momentu pojawienia się pierwszych objawów jest opóźniona o 10 lat. Od 2022 roku Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii (ESHRE) zaleca odejście od laparoskopii jako „złotego standardu” w diagnostyce endometriozy na rzecz empirycznych terapii farmakologicznych oraz badań obrazowych.

Chromogranina A (CgA) jest kwaśną hydrofilową glikoproteiną należącą do rodziny granin, która pierwotnie została zidentyfikowana w ziarnistościach chromafinowych rdzenia nadnerczy u bydła. Jest prohormonem dla wielu biologicznie aktywnych peptydów, z których najważniejsze i najszerzej zbadane to: wazostatyna I (VS-I), wazostatyna II (VS-II), chromofungina (CHR), chromacyna, prochromacyna, pankreastatyna (PST), katestatyna (CST), serpinina oraz WE-14. CgA występuje nie tylko w komórkach chromochłonnych, ale ulega ekspresji również w keratynocytach, komórkach mięśnia sercowego, komórkach śródbłonna i komórkach wysp trzustkowych u wielu gatunków kręgowców, w tym u człowieka. Pełni ona wiele funkcji zarówno wewnątrzkomórkowo, jak i na zewnątrz komórki. Wraz z hormonami, przekaźnikami i aminami bierze udział w sortowaniu i tworzeniu ziarnistości wydzielniczych oraz pęcherzyków synaptycznych. Jest jednym z elementów siły napędowej indukującej pączkowanie błony sieci *trans* aparatu Golgiego (TGN) do tworzenia pęcherzyków wydzielniczych oraz uczestniczy w fuzji ziarnistości wydzielniczych z błoną komórkową. CgA jest wyjątkową cząsteczką, ponieważ pochodzące z jej rozpadu peptydy wykazują

antagonistyczne działania w zakresie utrzymywania homeostazy w organizmie. Przykładowo, CgA pełnej długości jest regulatorem angiogenezy, a także prekursorem peptydów działających proangiogennie (np. CST, VS-II) oraz antyangiogennie (VS-I). Z kolei homeostaza glukozy utrzymywana jest przez PST, będącą peptydem antyinsulinowym oraz CST, wykazującą działanie proinsulinowe. Omawiana glikoproteina ulega ekspresji w wielu guzach endokrynnych i neuroendokrynnych, a jej podwyższony poziom we krwi może towarzyszyć również stanom nienowotworowym: niewydolności narządów, stanom zapalnym, chorobom autoimmunizacyjnym czy niektórym chorobom sercowo-naczyniowym.

Do tej pory związek pomiędzy CgA oraz jej pochodnymi a endometriozą nie został opisany.

Celami niniejszej pracy były:

- immunohistochemiczna (IHC) identyfikacja CgA oraz zbadanie ekspresji genu *CHGA* za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR) w zmianach endometrioidalnych oraz endometrium eutopowym pobranym od zdrowych pacjentek,
- określenie obecności, stężenia oraz wzajemnej korelacji CgA i produktów jej rozpadu: CST, PST i VS-II w surowicy i płynie otrzewnowym pobranych zarówno od pacjentek ze zdiagnozowaną endometriozą, jak i zdrowych kontroli, przy pomocy testów immunoenzymatycznych ELISA,
- próba określenia potencjalnego mechanizmu odpowiedzialnego za ekspresję CgA za pomocą badań na hodowlach komórkowych.

Grupę badaną stanowiły pacjentki, u których zarówno laparoskopowo, jak i histopatologicznie potwierdzono endometriozę, a grupę kontrolną – pacjentki hospitalizowane i operowane z innych przyczyn niż endometrioza, u których nie zdiagnozowano tej choroby.

W badaniach *in vitro* komórki dwóch linii komórkowych (12Z i Ishikawa) inkubowano z cytokinami IL-1, IL-6, TNF oraz TGF β w stężeniach 10 ng/mL oraz 20 ng/mL przez 24 godziny. Po tym czasie oznaczano ekspresję genu *CHGA* w komórkach pobranych z hodowli (RT-PCR).

W reakcjach immunohistochemicznych, którym poddano fragmenty zmian endometrioidalnych wykazano grupy komórek chromograninopozytywnych, a w endometrium

eutopowym jedynie pojedyncze komórki wykazujące ekspresję CgA. Nie zaobserwowano natomiast zwiększonej ekspresji mRNA genu *CHGA* w torbielach endometrialnych w porównaniu do endometrium eutopowego pobranego od kobiet z grupy kontrolnej. W surowicach oraz płynach otrzewnowych wykazano wyższe stężenia CgA, CST i PST u pacjentek z endometriozą w porównaniu do grupy kontrolnej. Dla VS-II nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w wyżej wymienionych płynach. W badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych wykazano wyższą ekspresję mRNA dla genu *CHGA* w komórkach 12Z po stymulacji IL-1 oraz w komórkach Ishikawa po stymulacji TNF. Zmniejszoną ekspresję wyżej wymienionego genu zaobserwowano natomiast w linii komórkowej Ishikawa po stymulacji TGFβ.

Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że CgA oraz jej pochodne (CST i PST) odgrywają istotną rolę w patogenezie endometriozy, a także mogą stać się jednym z biomarkerów w małoinwazyjnej diagnostyce tej choroby lub potencjalnym celem terapeutycznym.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The role of chromogranin A in the pathogenesis of endometriosis

Endometriosis is a chronic, estrogen-dependent, inflammatory gynecological disorder associated with pelvic pain and infertility. It affects not only women of reproductive age, but also those post-menopause. Endometriosis is characterized by the presence of endometrial-like tissue outside its physiological location. Those ectopic locations include the ovaries and/or the pelvic viscera. This disorder affects ca. 10% of women worldwide. Among women suffering from infertility, this number increases to 50% of cases. The pathogenesis of endometriosis is still unclear. There are three classic theories, currently considered only as a “starting point” for more advanced research. Although they present probable pathways of endometrial cell migration to ectopic sites, they do not explain the method of their implantation, proliferation, and activation. Further research has been conducted worldwide for decades to explain these mechanisms. It is estimated that the diagnosis of endometriosis is delayed by 10 years. From 2022, the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) recommends branching off from laparoscopy as “a gold standard” for the diagnosis of endometriosis on behalf of empirical pharmacological therapies and medical imaging tests.

Chromogranin A (CgA) is an acidic hydrophilic glycoprotein belonging to the granin family, which was initially identified in the chromaffin granules of the bovine adrenal medulla. It is a prohormone for several biologically active peptides, the most important and most widely studied of which are: vasostatin I (VS-I), vasostatin II (VS-II), chromofungin (CHR), chromacin, prochromacin, pancreastatin (PST), catestatin (CST), serpinin and WE-14. CgA is not only found in chromaffin cells, but it is also expressed in keratinocytes, cardiac muscle cells, endothelial cells, and pancreatic islet cells in many animal species. It has various intra- and extracellular functions. Along with hormones, transmitters, and amines it is involved in the sorting and formation of secretory granules or synaptic vesicles. It is one of the driving forces inducing membrane budding of the trans-Golgi network (TGN) to form secretory vesicles and participates in the fusion of secretory granules with the plasma membrane. CgA is a unique molecule because the peptides derived from its degradation exhibit antagonistic effects on maintaining homeostasis in the body. For instance, full-length CgA is a regulator of angiogenesis and a precursor of peptides that act proangiogenically (e.g. CST, VS-II) and anti-angiogenically (VS-I). In turn, glucose homeostasis is maintained by PST, an anti-insulin peptide and CST, which has pro-insulin activity. CgA is expressed in many endocrine and

neuroendocrine tumors and its elevated levels in the blood may also accompany non-cancerous conditions, e.g. organ failure, inflammation, autoimmune disease, or cardiovascular diseases.

So far, the connection between CgA and its derivatives and endometriosis has not been described.

The aims of the study included:

- immunohistochemical (IHC) identification of CgA and examination of the *CHGA* gene expression by using polymerase chain reaction with real-time analysis (RT-PCR) in endometrial lesions and eutopic endometrium collected from healthy patients,
- determination of the presence, concentration, and cross correlation of CgA and its degradation products: CST, PST and VS-II in serum and peritoneal fluid collected from both group of patients: 1) diagnosed with endometriosis and 2) healthy controls, using immunoenzymatic ELISA tests,
- an attempt to determine the potential mechanism responsible for CgA expression using cell culture studies.

The study group consisted of patients suffering from endometriosis, in which the disease was confirmed both laparoscopically and histopathologically. The control group consisted of patients hospitalized and operated on for reasons other than endometriosis in whom disease was not diagnosed.

In *in vitro* studies two cell lines (12Z and Ishikawa) were incubated with cytokines IL-1, IL-6, TNF and TGF β at concentrations 10 ng/mL and 20 ng/mL for 24 hours. After that time, in cells collected from cell culture, the expression of *CHGA* (RT-PCR) was determined.

Immunohistochemical reactions showed groups of chromogranin-positive cells in fragments of endometrioid lesions, whereas in eutopic endometrium only single cells revealed CgA expression. However, no increased mRNA expression of the *CHGA* gene was observed in endometrial cysts compared to eutopic endometrium collected from the control group of women. Higher concentrations of CgA, CST and PST in serum and peritoneal fluid were detected in patients with endometriosis compared to the controls. In the above-mentioned fluids, no statistically significant differences in VS-II levels were observed. Cell culture studies showed higher mRNA expression for the *CHGA* gene in 12Z cells after IL-1 stimulation and in

Ishikawa cells after TNF stimulation. On the other hand, reduced expression of this gene was observed in the Ishikawa cell line after TGF β stimulation.

In conclusion, based on the obtained results, it can be assumed that CgA and its derivatives – CST and PST play a crucial role in the pathogenesis of endometriosis and may become biomarkers in minimally invasive diagnostics of this disease, and furthermore, targeting the CgA pathway might constitute a promising, novel therapeutic approach to endometriosis.

1. WSTĘP

1.1 Endometrioza

Endometrioza (*endometriosis*) po raz pierwszy została opisana pod koniec XVII wieku, ale dopiero w drugiej połowie XX wieku stwierdzono, że charakteryzuje się ona obecnością aktywnej tkanki endometrium poza jamą macicy [1]. Od tamtego czasu choroba ta pozostaje przedmiotem licznych, niejednokrotnie sprzecznych hipotez na temat patomechanizmu powstawania zmian ektopowych.

Obecnie endometrioza definiowana jest jako przewlekła, estrogenozależna, zapalna choroba ginekologiczna, związana z bólem w obrębie miednicy mniejszej oraz z niepłodnością, dotycząca w szczególności kobiety w wieku rozrodczym, ale także te po menopauzie.

Główną cechą omawianego schorzenia jest obecność tkanki endometrialnej poza jej fizjologicznym położeniem, a ektopowa lokalizacja dotyczy głównie jajników, otrzewnej w obszarze miednicy mniejszej oraz przestrzeni odbytniczo-pochwowej [2-5].

W 2017 roku klasyczną definicję endometriozy zaktualizowano do obecności czynnego nabłonka i/lub podścieliska podobnego do endometrium poza błoną śluzową i mięśniową macicy. Przedstawiony opis ciągle jednak nie oddaje złożonego charakteru tego enigmatycznego schorzenia, ponieważ nie uwzględnia zróżnicowanych typów, objawów oraz patogennych mechanizmów obserwowanych u różnych pacjentek [6].

Częstość występowania endometriozy sięga 10% w populacji kobiet na całym świecie [7]. Jest ona uważana za chorobę ogólnoustrojową, a nie obejmującą swoim zasięgiem tylko obszar miednicy mniejszej [8]. Omawiane schorzenie charakteryzuje się współwystępowaniem wielu dolegliwości, z których najczęściej opisywane są obfite i/lub bolesne miesiączki (dysmenorrhea), przewlekłe dolegliwości bólowe zlokalizowane w obrębie miednicy mniejszej, ból w trakcie współżycia (dyspareunia), obniżona płodność oraz niepłodność [9]. Według danych literaturowych, u kobiet cierpiących z powodu niepłodności, częstość występowania tej choroby wzrasta nawet do 50% przypadków [7].

Do rzadziej wymienianych oraz mniej specyficznych objawów endometriozy należą: bolesne mikcje (dysuria), krwimocz, bolesne wypróżnienia (dyschezja), krwiste i/lub ołówkowate stolce, zaparcia, biegunki, wzdęcia, ogólne osłabienie oraz dolegliwości bólowe ze strony odcinka lędźwiowego i/lub krzyżowego kręgosłupa [10-12]. Najmniej typowymi

dolegliwościami u pacjentek są: nawracający ból w obszarze kończyny dolnej o charakterze rwy kulszowej oraz cykliczne krwawienie z odbytnicy lub dróg moczowych [13].

Skumulowany efekt przewlekłych objawów bólowych jest dużym obciążeniem dla osób cierpiących [14], ponieważ aż 70% kobiet objętych badaniem zmaga się z nieuleczalnym bólem [15], co niewątpliwie wpływa na jakość ich życia [16]. Co więcej, ciężka postać endometriozy w większości przypadków powoduje rozległe zrosty w obrębie miednicy mniejszej oraz zniekształcenia anatomii miednicy, a zmiany endometriotyczne można także zaobserwować w bliźnie po cięciu cesarskim oraz w bliźnie po okołoporodowym nacięciu krocza [17]. Badania pokazują, że pacjentki z endometriozą mają znacznie wyższe wskaźniki chorób współistniejących [18]. Objawy omawianej choroby, szczególnie te związane z bólem, zwiększają częstość występowania przewlekłego stresu, lęku, depresji oraz obniżonej jakości życia wśród kobiet z endometriozą, w porównaniu z kobietami zdrowymi [19].

Przebieg endometriozy może być również asymptomatyczny, a choroba bywa rozpoznawana przypadkowo podczas innych zabiegów operacyjnych, a zdarza się, że jedynym objawem jest obniżona płodność lub bezpłodność pacjentki. Niezwykle zróżnicowany, niespecyficzny charakter tego schorzenia opóźnia właściwą diagnostykę nawet o 10 lat w stosunku do wystąpienia pierwszych objawów [13].

Złotym standardem w diagnostyce endometriozy przez wiele lat była inwazyjna ocena chirurgiczna przeprowadzana za pomocą laparoskopii lub laparotomii, a do określenia stopnia zaawansowania choroby opracowano specjalny system punktacji [2-5, 20].

1.1.1 Etiopatogeneza endometriozy

Istnieją trzy klasyczne teorie dotyczące patogenezy endometriozy, obecnie uważane jedynie za „punkt wyjścia” do bardziej zaawansowanych badań [21].

Najpopularniejsza koncepcja pojawiła się w latach trzydziestych XX wieku, kiedy to Sampson [22] opublikował wyniki swoich spostrzeżeń dotyczących wstecznego transportu krwi miesięczkowej z jamy macicy, przez jajowody, do jamy otrzewnowej. Zjawisko to wymaga obecności żywych komórek we krwi miesięczkowej, zdolnych do implantacji i rozrostu poza jamą macicy [22]. Pomimo, że przez lata teoria ta była uważana za podstawową dotyczącą powstawania endometriozy, to w toku badań przeprowadzanych nad omawianą chorobą

pojawiło się wiele niejasności i pytań. Potwierdzono, że wsteczna menstruacja występuje u większości miesiączkujących kobiet, ale jedynie u nieznaczonej grupy z nich stwierdza się endometriozę [23]. Przedstawiona teoria dotycząca zdolnych do implantacji nieobumarłych fragmentów złuszczonej błony do miejsc ektopowych, zwłaszcza do jamy otrzewnej, nie uwzględnia kluczowego dla procesu transplantacji znaczenia czynników genetycznych, biochemicznych i immunologicznych, które ułatwią przeżycie, inwazję oraz unaczynienie zmian.

Inną możliwą przyczynę omawianego schorzenia opisuje hipoteza wysunięta przez Roberta Meyera w 1919 roku, odnosząca się do metaplastji komórek [24]. Autor podejrzewał, że źródłem komórek endometriotycznych poza jamą macicy są komórki nabłonkowe pochodzące z pierwotnej jamy ciała, które pod wpływem czynników hormonalnych i zapalnych ulegają metaplastji [24]. Mimo, że teoria ta ma wielu zwolenników, nie wyjaśnia ona, dlaczego omawiane zjawisko zachodzi jedynie u pewnej grupy osób oraz jakie czynniki zewnętrzne są potrzebne do różnicowania komórek macierzystych.

Trzecią koncepcję dotyczącą patogenezy endometriozy przedstawił Halban [25]. Autor zaproponował teorię rozsiewu komórek endometriotycznych drogą układu krwionośnego, co wyjaśniałoby nieliczne przypadki endometriozy występującej w miejscach nietypowych, np. w opłucnej czy układzie nerwowym [25].

Wyżej opisane koncepcje dotyczące progresji ektopowego endometrium zostały opracowane na początku XX wieku. Niewątpliwym jest fakt, że przedstawiają one prawdopodobne szlaki migracji komórek endometrialnych do miejsc ektopowych, jednak żadna z przytoczonych teorii nie wyjaśnia sposobu ich implantacji, proliferacji i aktywacji. Z tego powodu na całym świecie od kilkadziesiąt lat prowadzone są badania, mające na celu wyjaśnienie tych mechanizmów [21].

Obecnie naukowcy pracują nad określeniem potencjalnych czynników, mechanizmów i zjawisk odpowiedzialnych za powstawanie endometriozy. Jej etiopatogeneza może obejmować różnorodne czynniki hormonalne, środowiskowe, immunologiczne czy genetyczne. Wiadomo na przykład, że najważniejszą grupą hormonów biorących udział w patogenezie omawianego schorzenia są estrogeny, które nasilają objawy choroby, powodując proliferację endometrium ektopowego [26]. Z kolei w 2015 roku zasugerowano, że estradiol jest kluczowym mediatorem interakcji makrofag-nerw w endometriozie otrzewnowej [27], a kilka lat wcześniej pokazano, że w obrębie zmian endometriotycznych w otrzewnej,

zwiększona liczba makrofagów współwystępuje z włóknami nerwowymi [28], co w rezultacie może sprzyjać objawom bólowym związanym z tą chorobą. Ponadto udowodniono, że zmniejszenie poziomu ekspresji receptorów progesteronowych i tym samym oporność tkanek na działanie docelowego hormonu, może być jednym ze zjawisk odpowiedzialnym za powstawanie tego schorzenia [29, 30].

Wykazano także, że etiopatogeneza endometriozy może zależeć od zwiększonego poziomu leptyny [31] oraz greliny [32], czyli hormonów związanych z metabolizmem. Wśród innych potencjalnych czynników zaangażowanych w patogenezę endometriozy dodatkowo wymienia się stres oksydacyjny [33] i dioksyny, które poprzez wiązanie ze specyficznymi receptorami, zaburzają procesy detoksykacji oraz modulują proces zapalny w zmienionej tkance [34].

Na podkreślenie zasługuje fakt, że przewlekły stan zapalny jest jedną z cech charakteryzujących endometriozę. Reakcje zapalne zależą przede wszystkim od produkcji cytokin prozapalnych, takich jak interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6), interleukina-8 (IL-8) czy czynnik martwicy nowotworu (TNF) [35-38]. Co więcej, lokalna produkcja przeciwciał prozapalnych oraz zwiększona produkcja autoprzeciwciał i zniesienie miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi komórkowej przemawiają za tym, że endometriozę można rozpatrywać jako chorobę autoimmunizacyjną [39, 40].

W płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą zaobserwowano zwiększony udział procentowy neutrofili w porównaniu z kobietami zdrowymi [41], co jest prawdopodobnie wynikiem podwyższonego stężenia chemoatraktantów neutrofili (np. IL-8) zarówno w osoczu, jak i w płynie otrzewnowym u tych pacjentek [42]. Wykazano, że w miejscach zapalnych kluczową rolę w rekrutacji neutrofili, poprzez uwalnianie cytokin, odgrywają makrofagi i komórki tuczne. Liczba tych dwóch populacji komórek jest podwyższona w zmianach endometriotycznych. Mogą one także potencjalnie wpływać na funkcje komórek obojętno-chłonnych w omawianej chorobie [43, 44].

Wiadomo, że środowisko otrzewnej w endometriozie hamuje aktywność komórek NK oraz że komórki NK pochodzące od pacjentek z tym schorzeniem wykazują nieprawidłową ekspresję receptorów hamujących na swojej powierzchni w porównaniu z komórkami NK zdrowych kobiet [45-47]. Przykładowo, w komórkach NK znajdujących się w jamie otrzewnowej u pacjentek z endometriozą zaobserwowano zwiększoną ekspresję receptorów KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) [45-47], które rozpoznają ludzki antygen leuko-

cytarny (HLA) klasy I na komórkach docelowych [48]. Uważa się, że KIR hamują cytotoksyczność komórek NK wobec komórek docelowych, tym samym umożliwiając inicjację i progresję zmian endometriotycznych w miejscach ektopowych [47].

Naukowcy postulują, że istotną rolę w patogenezie omawianej choroby odgrywają również alarminy, czyli wzorce molekularne związane z uszkodzeniami (DAMP – *danger/damage associated molecular patterns*), które są endogennymi cząsteczkami immunostymulującymi, uwalnianymi w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki lub stan zapalny [49]. Przykładem DAMP obecnych w płynie menstruacyjnym jest *high-mobility group box-1* (HMGB1). HMGB1 może działać jako czynnik proangiogeny oraz mediator stanu zapalnego poprzez aktywację receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE – *receptor for advanced glycation endproducts*) i szlaków *toll-like receptor-4* (TLR4). Badacze sugerują, że obecność HMGB1 w płynie menstruacyjnym może przyczyniać się do patofizjologii endometriozy podczas zjawiska wstecznej menstruacji, ponieważ receptor RAGE jest obecny zarówno w eutopowym endometrium, jak i w zmianach endometriotycznych na otrzewnej [50]. Kolejną alarminą powiązaną z omawianą chorobą jest interleukina-33 (IL-33) [51, 52]. Zaobserwowano, że IL-33 w surowicy i płynie otrzewnowym kobiet z endometriozą głęboko naciekającą [52] oraz w zmianach endometriotycznych [51] wykazuje podwyższone stężenie w porównaniu do zdrowych pacjentek kontrolnych.

Zauważono podwyższony poziom limfocytów T pomocniczych typu 2 (Th2) w osoczu i płynie otrzewnowym pacjentek z endometriozą w porównaniu do grupy kontrolnej [53, 54] oraz istotnie wyższy odsetek limfocytów T pomocniczych produkujących interleukinę-17 (Th17) w płynie otrzewnowym u pacjentek z endometriozą III i IV stopnia w porównaniu do pacjentek z I i II stopniem endometriozy [55]. Co więcej, podwyższoną liczbę limfocytów T regulatorowych (Treg) odnotowano w płynie otrzewnowym kobiet z grupy badanej [56, 57] w porównaniu do pacjentek zdrowych, podczas gdy poziom Treg we krwi obwodowej był istotnie zmniejszony [56]. Ponadto, w metaanalizie przeprowadzonej przez Riccio i wsp. [58] obejmującej 22 badania dotyczące roli limfocytów B w omawianym schorzeniu, autorzy większości prac zaobserwowali zwiększoną obecność lub aktywację limfocytów B u pacjentek z endometriozą. Zaledwie w 7 badaniach objętych metaanalizą nie zaobserwowano różnic w liczbie tych komórek między grupą badaną a grupą kontrolną [58].

Jak wynika z przytoczonych danych, zarówno pobudzenie makrofagów otrzewnowych, zwiększone poziomy cytokin prozapalnych i regulujących naczynia krwionośne, zahamowanie

aktywności komórek NK, jak i nieprawidłowa aktywacja limfocytów T i B w omawianej chorobie mogą przyczyniać się do nieprawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego [59, 60].

1.1.2 Epidemiologia endometriozy

Szacuje się, że na endometriozę choruje około 10% kobiet w wieku rozrodczym [7], jednak prawdziwa liczba nie jest znana [61], ponieważ statystyki obejmują jedynie pozytywnie zdiagnozowane pacjentki. Światowe dane dotyczące endometriozy znacznie się od siebie różnią [62]. Częstość występowania choroby waha się od 2 do 11% wśród kobiet bezobjawowych, od 5 do 50% w populacji kobiet bezpłodnych oraz od 5 do 21% wśród pacjentek hospitalizowanych z powodu bólu miednicy mniejszej [7]. Wśród nastolatek, u których występują objawy mogące sugerować endometriozę, pozytywną diagnozę otrzymuje od 49% pacjentek z przewlekłym bólem miednicy mniejszej aż do 75% pacjentek z bólem niereagującym na leczenie [7].

Znajomość rozmieszczenia populacji kobiet chorujących na endometriozę, objawów choroby oraz czynników ryzyka jest ograniczona jedynie do danych dotyczących pomyślnie zdiagnozowanych przypadków. Faktyczna liczba i charakterystyka niezdiagnozowanych osób ciągle nie jest znana [61], ponieważ w wielu przypadkach przebieg choroby jest nietypowy (np. niewyjaśnione okresowe krwawienie z przewodu pokarmowego czy niedrożność jelita). Poza tym, dotychczas nie określono typowych markerów endometriozy, które pozwoliłyby na wczesną, swoistą i nieinwazyjną lub małoinwazyjną diagnostykę.

1.1.3 Klasyfikacja endometriozy

Endometrioza jest chorobą charakteryzującą się obecnością czynnego nabłonka i/lub podścieliska podobnego do endometrium poza błoną śluzową i mięśniową macicy [6]. Schorzenie to może przyjmować postać torbieli endometrialnej jajnika, być zlokalizowane na otrzewnej (endometrioza otrzewnowa) albo sięgać 5 mm lub więcej w głąb otrzewnej (endometrioza głęboko naciekająca) [6].

Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu (ASRM – *American Society for Reproductive Medicine*) opracowało klasyfikację stopnia zaawansowania zmian chorobowych w przebiegu endometriozy [20]. Choroba ta klasyfikowana jest na podstawie punktów przyznanych według protokołu opracowanego przez ASRM. Suma poszczególnych punktów dzieli zaawansowanie choroby na cztery stopnie:

- I stopień – minimalny (1-5 punktów),
- II stopień – łagodny (6-15 punktów),
- III stopień – umiarkowany (16-40 punktów),
- IV stopień – ciężki (powyżej 40 punktów).

Mimo, iż opracowany protokół umożliwia indywidualne podejście do każdej pacjentki, klasyfikacja ta budzi wątpliwości, ponieważ nie zawsze jej wynik koreluje z zaawansowaniem choroby czy częstością występowania objawów klinicznych [63]. Okazuje się, że odnotowano przypadki pacjentek z wyższą sumą punktów, ale mniejszymi dolegliwościami bólowymi, które częściej zachodziły w ciążę niż pacjentki z niższą punktacją [21].

1.1.4 Diagnostyka endometriozy

Szczegółowy wywiad z pacjentką oraz standardowe badanie ginekologiczne nie zawsze są wystarczające do rozpoznania endometriozy. Przepochwowe badanie ultrasonograficzne wykonane przez doświadczonego operatora może być pomocnym narzędziem, szczególnie w przypadku dużych zmian, pomagającym w kwalifikacji pacjentki do leczenia operacyjnego [21].

Mimo licznych badań prowadzonych w ośrodkach naukowych na całym świecie, pracujących nad nieinwazyjnymi metodami diagnostyki tej choroby, złotym standardem do tej pory pozostawała ocena laparoskopowa, która umożliwiała zwizualizowanie zmian oraz ich usunięcie, a następnie ocenę histopatologiczną.

Według najnowszych rekomendacji ESHRE z 2022 roku zaleca się odejście od laparoskopii jako „złotego standardu” w diagnostyce endometriozy na rzecz empirycznych terapii farmakologicznych oraz badań obrazowych. Zgodnie z nowymi wytycznymi biomarkery surowicy (np. CA-125) nie są zalecane do diagnozowania lub wykluczania

endometriozy. Co więcej, sugeruje się, że klinicyści nie powinni stawiać jednoznacznej diagnozy na podstawie wyników oznaczeń biomarkerów w tkance endometrium, płynie menstruacyjnym lub popłuczynach z jamy macicy, ale mogą korzystać z tych parametrów jako dodatkowego narzędzia diagnostycznego [64].

Reasumując, nie zaleca się diagnozowania omawianej choroby jedynie w oparciu o wyniki biomarkerów dlatego, że ich przydatność w ocenie schorzenia jest niewielka, o czym świadczy duże, wieloośrodkowe badanie retrospektywne, które polegało na przeglądzie dokumentacji medycznej 267 młodych kobiet z endometriozą i 235 nastolatek z innymi łagodnymi torbielami przydatków [65]. Mimo, iż stwierdzono istotną różnicę w poziomie hemoglobiny, liczbie płytek krwi, stosunku płytek krwi do limfocytów czy CA-125 pomiędzy nastolatkami z endometriozą a nastolatkami z innymi łagodnymi torbielami, autorzy doszli do wniosku, że parametry te dają niską wartość diagnostyczną [65].

1.1.5 Leczenie endometriozy

Leczenie endometriozy można podzielić na farmakologiczne i operacyjne, a wybór metody zależy od wspólnie obranych przez lekarza oraz pacjentkę celów terapii. Do głównych celów możemy zaliczyć: złagodzenie bólu, usunięcie ognisk endometriozy i przywrócenie płodności. Najlepsze wyniki osiąga się w leczeniu skojarzonym: operacja laparoskopowa oraz uzupełniająca terapia hormonalna [21].

Leczenie operacyjne endometriozy stosuje się w celu wyeliminowania zmian endometriotycznych i zrostów. W ostatnich dziesięcioleciach preferowaną techniką operacyjną jest laparoscopia [64].

Leczenie farmakologiczne obejmuje farmakoterapię hormonalną, której celem jest zahamowanie syntezy estrogenów oraz farmakoterapię przeciwbólową z zastosowaniem głównie leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) [21]. Ze względu na fakt, że endometrioza jest chorobą zapalną, leki z tej grupy wydawałyby się istotne w leczeniu bólu. Jednak dowody potwierdzające ich skuteczność w analgezji w endometriozie są bardzo niskiej jakości [64, 66].

Terapię hormonalną często rozpoczyna się, gdy zachodzi podejrzenie endometriozy u pacjentki jeszcze przed chirurgicznym potwierdzeniem choroby, a także proponuje się

po operacji, gdy objawy się utrzymują (np. w przypadku nawracającej endometriozy). Najczęściej zalecane leki modyfikują środowisko hormonalne przez hamowanie czynności jajników lub bezpośrednie działanie na receptory steroidowe i enzymy znajdujące się w zmianach. Należą do nich: progestageny, antyprogestageny, agoniści i antagoniści gonadoliberyny (GnRH), domaciczny system lewonorgestrelu, danazol oraz inhibitory aromatazy. Warto podkreślić, że wszystkie wymienione leki hormonalne prowadzą do istotnego klinicznie zmniejszenia bólu u kobiet cierpiących na endometriozę [64].

1.1.6 Endometrioza a płodność

Szacuje się, że aż 50% kobiet chorujących na endometriozę cierpi również z powodu niepłodności [2], a mimo to, mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska wciąż nie są w pełni poznane. W celu wyjaśnienia tej kwestii przeprowadzono badania, których autorzy sugerują różne potencjalne mechanizmy związane z upośledzeniem płodności [3]. W przypadkach zaawansowanej endometriozy (rASRM: III i IV) jako czynniki ograniczające płodność wymieniane są zrosty okołojajnikowe oraz zniekształcenia w obrębie miednicy, które mogą upośledzać wychwytywanie oocyta przez strzępki jajowodu [67, 68]. Postulowano również mniejszą rezerwę jajnikową u kobiet z zaawansowaną endometriozą [69, 70]. Uważa się, że tkanka jajnika może być celem dla substancji toksycznych zawartych w torbielach/guzach endometriotycznych, które mogą dyfundować do sąsiednich tkanek i doprowadzać do zmniejszenia rezerwy jajnikowej [70]. Z drugiej strony niektórzy naukowcy zwracają uwagę na fakt, że chirurgiczne leczenie endometriozy sprzyja uszkodzeniu tkanki jajnika, predysponując do niskiej liczby pęcherzyków [71, 72].

Mimo to, niepłodność prezentowana przez kobiety z wczesną endometriozą (rASRM: I i II), u których nie występują zniekształcenia anatomiczne miednicy i zrosty, oraz u których nie były wykonywane operacje, rodzi pytania o udział innych mechanizmów w upośledzeniu płodności u tych pacjentek. Uważa się, że mikrośrodowisko otrzewnej, pęcherzyków jajnikowych i endometrium jest zmienione u kobiet chorujących na endometriozę, co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia folikulogenezy, owulacji, jakości oocytów, a nawet funkcji plemników [3, 73, 74].

1.2 Chromogranina A

W połowie lat sześćdziesiątych XX wieku zaobserwowano współdzielanie z ziarnistości chromochłonnych rdzenia nadnerczy katecholamin (CA) oraz specyficznego, rozpuszczalnego w wodzie białka [75]. To jednocześnie uwalnianie hormonów aminowych o niskiej masie cząsteczkowej wraz z białkiem o dużej masie cząsteczkowej było pierwszym naukowym potwierdzeniem zjawiska egzocytozy [75, 76].

W kolejnych badaniach *in vivo* podczas stymulacji bydlących nadnerczy zaobserwowano sekrecję z komórek chromafinowych: CA, adenozy-5'-trifosforanu (ATP) oraz rozpuszczalnych białek, które ze względu na miejsce identyfikacji nazwano chromograninami, a dominujące białko – chromograniną A (CgA) [77]. Od tego czasu cała rodzina wyjątkowo kwaśnych hydrofilowych białek została skojarzona z magazynowaniem oraz uwalnianiem szerokiej gamy hormonów.

1.2.1 Rodzina granin

Rodzina granin składa się z dziewięciu kwaśnych białek znajdujących się w ziarnistościach wydzielniczych większości prawidłowych i nowotworowych komórek nerwowych, neuroendokrynowych i endokrynnych [78]. Rodzina ta obejmuje: CgA, chromograninę B (CgB), sekretograninę II (SgII), sekretograninę III (SgIII), HSL-19, 7B2, NESP55, VGF oraz proSAAS, a pięć ostatnich zostało nazwanych kolejno sekretograninami IV-VIII. [79].

Rodzinę granin tworzy odrębna grupa białek, które w porównaniu do innych prekursorów peptydów charakteryzują się dużą masą cząsteczkową. U ssaków największe białka prekursorowe osiągają masę około 30 kDa (proopiomelanokortyna – POMC, proenkefalina), podczas gdy pozostałe są stosunkowo niewielkie (10-15 kDa). Natomiast wszystkie proteiny z rodziny granin są większe niż 20 kDa, przy czym znaczna ich część osiąga masę powyżej 45 kDa (Tabela 1). Białka z tej rodziny w porównaniu do innych białek prekursorowych różnią się także wartością punktu izoelektrycznego (pI). Wartości pI dla prekursorów peptydów mieszczą się w zakresie 5,1-11,4 średnia 7,1, natomiast dla granin są niższe, bowiem ich zakres wynosi 4,5-6,1 ze średnią 4,9 [80].

Tabela 1. Zestawienie białek należących do rodziny granin [79].

Nazwa	Liczba aminokwasów	Masa molekularna [kDa]
Chromogranina A	439	49
Chromogranina B	657	77
Sekretogranina II	587	68
Sekretogranina III	449	51
HISL-19*	-	-
7B2	186	21
NESP55	201	23
VGF	593	65
proSAAS	227	24

*Białko HISL-19 zostało potwierdzone jedynie przy pomocy przeciwciał monoklonalnych, izolacja *in vivo* jak dotąd nie powiodła się.

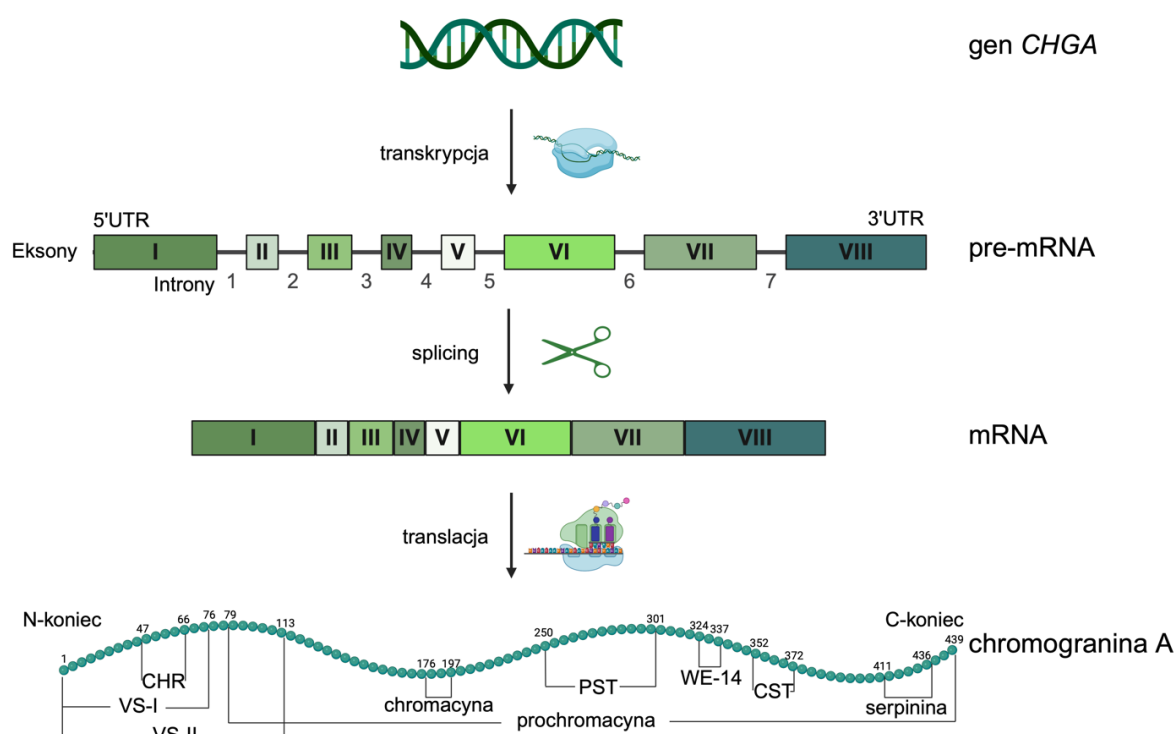
Najliczniej i najpowszechniej występującymi członkami granin są CgA, CgB oraz SgII, podczas gdy dystrybucja pozostałych białek należących do tej grupy jest ograniczona. Zarówno CgA, jak i inne proteiny z rodziny granin są białkami prekursorowymi i mogą być przetwarzane proteolitycznie przez enzymy w wielu miejscach cięcia w celu wytworzenia dużej liczby małych, aktywnych biologicznie peptydów o szerokim zakresie działania [81].

Dowody na aktywność biologiczną peptydów pochodzących z tej rodziny są sukcesywnie gromadzone od czasu, gdy w 1986 roku po raz pierwszy wykazano, że pochodna CgA, powstająca w wyniku jej rozpadu – pankreastatyna (PST), hamuje wydzielanie insuliny z komórek β wysp trzustkowych [82].

Graninom przypisuje się udział w wielu procesach zachodzących wewnątrz komórki oraz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [80]. Ich kluczową rolą jest udział w biogenezie, magazynowaniu, dojrzewaniu i pakowaniu ziarnistości wydzielniczych [83], ale równie istotną jest funkcja związana z wytwarzaniem peptydów biorących udział w regulacji bilansu energetycznego, poziomu glukozy [79, 84] oraz szlaków neuronalnych czy uwalniania CA [85, 86]. Rola i funkcje CgA oraz najważniejszych peptydów pochodzących z jej degradacji proteolitycznej szczegółowo zostały opisane w rozdziałach 1.2.3 oraz 1.2.4 niniejszej dysertacji.

1.2.2 Struktura chromograniny A

Chromogranina A jest kwaśną hydrofilową glikoproteiną o masie 49 kDa, zbudowaną z 439 aminokwasów [79, 80]. Należy do rodziny granin, a pierwotnie została zidentyfikowana w ziarnistościach chromafinowych rdzenia nadnerczy u bydła [77]. U człowieka gen kodujący CgA (*CHGA*) zlokalizowany jest na chromosomie 14 (14q32.12) i zawiera osiem eksonów oddzielonych siedmioma sekwencjami intronowymi [87] (Rycina 1).



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie struktury genu ludzkiej chromograniny A oraz peptydów pochodzących z jej rozpadu (CHR – chromofungina, CST – katestatyna, PST – pankreastatyna, VS-I – wazostatyna I, VS-II – wazostatyna II); wygenerowano w programie BioRender.

CgA jest białkiem o spiralnej strukturze składającym się z peptydu sygnałowego zawierającego 18 aminokwasów oraz regionu 5'UTR oraz 3'UTR nieulegających translacji. Region 5'UTR wraz z większością peptydu sygnałowego jest kodowany przez ekson I, podczas gdy C-końcowy fragment białka oraz region 3'UTR przez ekson VIII [87]. Eksony II-VI kodują wazostatyny, a ekson III – reszty cysteiny niezbędne do utworzenia pętli disiarczkowej CgA. Ekson VII koduje większość biologicznie aktywnych peptydów, w tym PST oraz katestatynę (CST) [80].

W strukturze CgA znajduje się 8 – 10 miejsc dwuzasadowych [79, 88], które są potencjalnymi miejscami cięcia proteolitycznego [80] przez endogenne proteazy takie jak: konwertaza prohormonu 1/3 (PC1/3), konwertaza prohormonu 2 (PC2) czy karboksypeptydaza H, katepsyna-L, plazmina [89], trombina [90] lub inne, egzogenne proteazy, zlokalizowane zarówno po zewnętrznej stronie błony komórkowej, jak i obecne w osoczu [91]. Regiony końcowe CgA zawierają amfipatyczne α -helisy, które najprawdopodobniej są odpowiedzialne za związanie CgA z błoną sieci *trans* aparatu Golgiego (TGN) (zjawisko to jest jednym z niezbędnych elementów umożliwiających prawidłowy proces sortowania hormonów i biogenezy pęcherzyków wydzielniczych) [92].

Podsumowując, CgA była pierwszą graniną, która została scharakteryzowana jako prohormon dla wielu biologicznie aktywnych peptydów, z których najważniejsze i najszerzej zbadane to: wazostatyna I (1-76), wazostatyna II (1-113), chromofungina (47-66), chromacyna (176-197), prochromacyna (79-439), pankreastatyna (250-301), katestatyna (352-372), serpinina (411-436) oraz WE-14 (324-337) [91, 93] (Rycina 1).

1.2.3 Biosynteza, wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe przetwarzanie chromograniny A

CgA jest syntezowana w jądrze komórkowym, następnie przetwarzana w szorstkim retikulum endoplazmatycznym i pakowana do cystern za pośrednictwem peptydu sygnałowego. W dalszej kolejności transportowana jest do aparatu Golgiego (AG), gdzie zostaje oddzielona od innych białek i w TGN, poprzez konstytutywne lub regulatorowe szlaki wydzielnicze, jest pakowana do niedojrzałych pęcherzyków wydzielniczych (ISG) [94].

Początkowo twierdzono, że CgA, która jest silnie kwaśnym białkiem, w niskim pH i w obecności jonów wapnia (Ca^{2+}) tworzy wielkie agregaty, które w sposób pasywny wchodzą do pączkującej ziarnistości [95]. W 2000 roku Cowley i wsp. w swoim opracowaniu przedstawili odmienną teorię dotyczącą sortowania i kierowania CgA do szlaku wydzielniczego [96]. Autorzy tych badań zasugerowali, że N-końcowy, konserwatywny fragment CgA, składający się z pętli disiarczkowej jest niezbędny do kierowania CgA do szlaku wydzielniczego w komórkach PC12 (linia komórkowa pozyskana z guza chromochłonnego nadnerczy szczura), ale nie jest konieczny do sortowania w komórkach GH4C1 (linia komórkowa pozyskana z guza przysadki mózgowej szczura). Odnotowali oni również, że C-

końcowy, także konserwatywny fragment CgA, stanowi krytyczny punkt w segregacji w komórkach GH4C1, a nie odgrywa istotnej roli w komórkach PC12 [96].

W późniejszych badaniach [97] zgłoszono, że N-końcowy fragment CgA silnie oddziałuje z SgIII w komórkach PC12, AtT-20 (linia komórkowa pozyskana z guza przysadki mózgowej myszy) oraz w komórkach β trzustki. Okazało się, że interakcja CgA z SgIII jest niezbędna do skierowania omawianego hormonu do szlaku wydzielniczego.

SgIII jest białkiem wykazującym wysokie powinowactwo do cholesterolu, dlatego w błonach bogatych w cholesterol, czyli w TGN, działa jak receptor sortujący i kierujący agregaty CgA do szlaku wydzielniczego. Warto wspomnieć, że właściwości SgIII, jako receptora sortującego dotyczą także innych prohormonów, np. POMC [97].

Obecnie wiadomo, że graniny stanowią siłę napędową, indukującą pączkowanie błony TGN i tworzenie granulek wydzielniczych o gęstym rdzeniu [80]. Mechanizm regulujący powstawanie pęcherzyków wydzielniczych w TGN, ze szczególnym uwzględnieniem CgA, został dokładnie opisany przez Laguerre i wsp. [93]. Autorzy tego opracowania przedstawili czynniki niezbędne do agregacji neuropeptydów/hormonów w błonie TGN przy udziale CgA. Są to między innymi: wysokie stężenie jonów Ca^{2+} (15nM) oraz kwaśne środowisko (pH 6-6,5) utrzymywane przez H^+ -V-ATPazę i receptory trifosforanu inozytolu. Co ciekawe, wytworzone agregaty za pośrednictwem białek błonowych (takich jak karboksypeptydaza E (CPE), SgIII czy PC) wchodzi w interakcję z błoną TGN, wynikiem czego jest molekularna przebudowa tej błony.

Taki proces przebudowy błony obejmuje kilka etapów, mianowicie: pierwotnie powstaje mikrodomena, wzbogacona o fosfolipidy przyjmujące stożkowy kształt oraz o agregaty CgA i innych współwystępujących białek, a następnie zachodzi rekrutacja białek cytozolowych. W rezultacie powstają zakrzywienia błony TGN i pęcherzyk wydzielniczy zostaje uwolniony [93]. W dalszej kolejności w ISG dochodzi do kondensacji CgA i związania jej z receptorami (o niskim powinowactwie) błony takiego pęcherzyka. Zjawiska te inicjują proces sortowania pozostałych składników ziarnistości i kierowanie ich do odpowiednich szlaków regulatorowych [94].

Należy podkreślić, że wiele ISG zawierających białka nieasygnowane do szlaków regulatorowych łączy się i pączkuje, w wyniku czego powstają pęcherzyki pokryte klatryną, które przemieszczają się do wczesnych endosomów i albo ulegają degradacji, albo wracają do TGN, gdzie są ponownie przetwarzane [94]. Rozwój ISG w dojrzałe pęcherzyki wydziel-

nicze (MSG) jest kilkustopniowy i obejmuje: napływ jonów Ca^{2+} , obniżenie pH wewnątrz pęcherzyków, następnie „obróbkę prohormonów” oraz wychwyt amin biogennych (np. serotoniny) [94].

W przeciwieństwie do innych prohormonów, CgA wewnątrz ziarnistości przetwarzana jest jedynie w niewielkim stopniu, być może dlatego, że jej agregaty są słabo rozpuszczalne w kwaśnym środowisku panującym w ziarnistościach [81]. W wewnątrzkomórkowym cięciu CgA biorą udział enzymy takie jak: PC1/3, PC2 oraz katepsyna-L i CPE, które obecne są między innymi w ziarnistościach chromafinowych [98]. W dalsze przetwarzanie pociętych już fragmentów CgA zaangażowane są endopeptydazy charakterystyczne dla poszczególnych wiązań [97]. Tak wytworzone MSG są kierowane do błony plazmatycznej, gdzie przy udziale jonów Ca^{2+} łączą się z błoną komórkową [83]. Synteza i fuzja ziarnistości wydzielniczych z błoną plazmatyczną jest wieloetapowym i wysoce złożonym procesem zależnym od jonów Ca^{2+} oraz od grupy białek transbłonowych, które biorą udział w rozpoznawaniu i fuzji pęcherzyków z błoną komórkową (SNARE – *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein (SNAP) receptor*). Bezpośrednim rezultatem takich interakcji jest powstanie wąskiego poru o średnicy około 2-3 nm, umożliwiającego powolne uwalnianie małych cząsteczek (np. katecholamin), ale nie białek, które są znacznie większymi cząsteczkami [94]. Wkrótce po tym, pory fuzyjne ulegają poszerzeniu, dzięki czemu dochodzi do szybszego uwalniania zarówno małych molekuł, jak i białek. Szybkość rozszerzania porów jest głównym czynnikiem kontrolującym uwalnianie cząsteczek, dlatego ekspansja porów fuzyjnych podlega regulacji nie tylko przez SNARE, ale również przez wiele innych białek, takich jak: syntaksyna, synaptotagmina 7, synaptotagmina 1 czy dynamina [94]. Wszystkie wymienione substancje regulatorowe zlokalizowane są po cytozolowej stronie pęcherzyka wydzielniczego, dlatego dosyć nieoczekiwane było odkrycie, że obecność białka w świetle ziarnistości (np. CgA czy SgIII) może wpływać na ekspansję porów fuzyjnych [99].

Na chwilę obecną wiadomo, że CgA może ulegać przetwarzaniu proteolitycznemu zarówno wewnątrz, jak i poza komórką [94, 100, 101]. Wewnątrz pęcherzyków wydzielniczych główną rolę w cięciu CgA odgrywają PC z rodziny proteaz serynowych. PC1/3 oraz PC2 rozszczepiają pojedyncze lub podwójne pary zasad aminokwasowych i są specyficzne dla procesów zachodzących w komórkach neuroendokrynowych. Innymi, również ważnymi enzymami wewnątrzkomórkowej proteolizy CgA są furyna i katepsyna-L [102, 103].

CgA jest też celem dla kilku zewnątrzkomórkowych proteaz, np. plazminy czy trombiny [90, 104, 105]. Komórki chromafinowe ekspresyjnie produkują tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA), który po uwolnieniu z komórki wiąże się do jej powierzchni po zewnętrznej stronie błony, promując cięcie CgA przez plazminę [104, 106]. Co więcej, plazmina reguluje antyadhezyjną i proadhezyjną aktywność omawianego białka poprzez rozpad proteolityczny N-końca [107], podczas gdy trombina reguluje jego aktywność antyangiogenną lub proangiogenną poprzez cięcie C-końca [90].

Mimo licznych dowodów popartych badaniami, dotyczących endoproteolitycznego (wewnątrz pęcherzyków magazynujących hormony) i egzoproteolitycznego (po uwolnieniu do krwi) przetwarzania CgA, nie udowodniono jednoczesnego działania kilku enzymów proteolitycznych na CgA.

Do dzisiaj wiele pytań na temat omawianej glikoproteiny pozostaje bez odpowiedzi. Nie wiadomo, czy badany hormon i jego pochodne działają jednocześnie w różnych miejscach i różnym/tym samym czasie oraz czy faktycznie działają w sposób specyficzny dla tkanki. Nadal nie poznano odpowiedzi na pytanie, czy pochodne CgA są generowane w równych ilościach molowych oraz czy stężenie jest zależne od zapotrzebowania fizjologicznego tkanek [108].

1.2.4 Biologiczna rola chromograniny A oraz jej pochodnych

W wielu badaniach wykazano, że CgA obecna jest nie tylko w komórkach chromochłonnych. Wbrew wcześniejszym przypuszczeniom CgA jest nie tylko produktem neuronalnych i gruczołowych elementów układu neuroendokrynnego, ale dodatkowo ulega ekspresji w keratynocytach [109], komórkach mięśnia sercowego [110], komórkach śródbłonna [111, 112] i komórkach wysp trzustkowych [113] u wielu gatunków kręgowców, w tym u człowieka.

Wraz z hormonami, przekąźnikami i aminami CgA bierze udział w sortowaniu i tworzeniu ziarnistości wydzielniczych czy pęcherzyków synaptycznych [105]. Jest wysoce naładowaną cząsteczką, dlatego inne cząsteczki łatwo wchodzi z nią w interakcje i są transportowane do ziarnistości wydzielniczych. Mimo że CgA ma niskie powinowactwo do jonów Ca^{2+} , to posiada zdolność do związania dużej ich ilości oraz tworzenia agregatów [108].

Jak wspomniano w poprzednim podrozdziale, prohormon ten jest jednym z elementów siły napędowej indukującej pączkowanie błony TGN do tworzenia pęcherzyków wydzielniczych [83, 94], a jakiegokolwiek zaburzenie granulogenezy zależnej od tego białka negatywnie wpływa na sortowanie prohormonów do szlaku sekrecyjnego [83]. Warto podkreślić, że CgA uczestniczy również w fuzji ziarnistości wydzielniczych z błoną komórkową, wydłużając czas utrzymywania się krzywizny porów fuzyjnych, co pozwala na uwolnienie większej ilości cząsteczek poza komórkę [99].

Oprócz wewnątrzkomórkowej funkcji opiekuńczej CgA dotyczącej sortowania i przechowywania CA w komórkach chromochłonnych nadnerczy, zasugerowano funkcje zewnątrzkomórkowe związane głównie z produktami jej rozpadu [91]. Reasumując, CgA jest zarówno „białkiem granulogennym”, jak i prekursorem biologicznie aktywnych peptydów.

Pierwszy polipeptyd pochodzący od CgA został zidentyfikowany w świńskiej trzustce stymulowanej glukozą. Nazwano go pankreastatyną, a jego główna funkcja to inhibicja wydzielania insuliny [82].

Od tamtego odkrycia przeprowadzono liczne badania, w których udowodniono, że CgA jest prohormonem dla wielu innych polipeptydów wykazujących między innymi przeciwdrobnoustrojowe oraz pro- i antyangiogenne działanie [89]. Funkcja peptydów pochodzących z CgA jest także związana z homeostazą wapnia i glukozy, przepuszczalnością śródbłonna, kurczliwością mięśnia sercowego, wrodzoną odpornością czy działaniem anty- i proadrenergicznym [88, 89, 112]. Jak przedstawiono na Rycinie 1, proteolityczne przetwarzanie CgA daje początek szerokiej gamie peptydów.

CgA jest wyjątkową cząsteczką, ponieważ pochodzące z jej rozpadu peptydy wykazują antagonistyczne działania w zakresie utrzymywania homeostazy w organizmie [78, 81]. CgA pełnej długości jest regulatorem angiogenezy oraz prekursorem peptydów działających proangiogennie (np. CST, VS-II) oraz antyangiogennie (VS-I). Z kolei homeostaza glukozy utrzymywana jest przez PST, będącą peptydem antyinsulinowym oraz CST, wykazującą działanie proinsulinowe.

W badaniach przeprowadzonych na gryzoniach udokumentowano, że czynność serca jest regulowana przez proadrenergiczny peptyd serpininę oraz dwa antyadrenergiczne peptydy: VS-I i CST [108].

W 1988 roku Simon i wsp. [114] opisali proteolityczną hydrolizę CgA otrzymanej z komórek chromafinowych wyhodowanego rdzenia nadnerczy bydłęcych. Zaobserwowali, że jeden z produktów rozpadu CgA jest zdolny do zahamowania uwalniania CA [114]. W 1997 roku Mahata i wsp. [85] udowodnili, że tylko jeden peptyd otrzymany z rozpadu CgA hamuje wydzielanie CA indukowane przez nikotynę. Nazwano go katestatyną ze względu na wysoką zdolność do hamowania uwalniania CA [85]. Udowodniono, że efekt ten jest osiągany poprzez blokowanie acetylocholiny, która działa na cholinergiczne receptory nikotynowe w neuronach [85, 86].

Katestatyna (CgA352-372, CST) to wielofunkcyjny peptyd neuroendokrynnny, składający się z 21 aminokwasów, pochodzący z proteolitycznego rozszczepienia (głównie za pomocą kalikreiny [115]) związku prekursorowego, czyli CgA, biorący udział w regulacji systemu sercowo-naczyniowego [116], odpornościowego oraz w homeostazie organizmu [108]. Poprzez hamowanie wydzielania CA, CST łagodzi szkodliwą, nadmierną aktywność układu nerwowego [85].

W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* wykazano, że CST zmniejsza ilość tkanki tłuszczowej [117], hamuje odpowiedź zapalną [108], zapobiega miażdżycy wywołanej przez makrofagi [118] oraz reguluje produkcję i uwalnianie cytokin [118].

Peptyd ten pośrednio jest związany z cukrzycą i metabolizmem węglowodanów, a przez to z otyłością i zespołem metabolicznym [119, 120].

Na chwilę obecną wiadomo, że CST wykazuje również działanie przeciwzapalne, przyspiesza metabolizm [108], hamuje lipogenezę i zwiększa lipolizę w tkance tłuszczowej poprzez hamowanie receptora α_2 -adrenergicznego i wzmacnianie sygnalizacji leptyny oraz stymuluje wychwyt i rozpad kwasów tłuszczowych w wątrobie, co odzwierciedla zwiększona ekspresja genów zaangażowanych w utlenianie kwasów tłuszczowych po dootrzewnowym wstrzyknięciu CST u myszy [117].

Zasugerowano, że peptyd ten promuje przepływ lipidów z tkanki tłuszczowej do wątroby w celu ich utleniania, co może wyjaśniać często obserwowany przyrost masy ciała u pacjentów z chorobami zapalnymi, u których ujawniono niższy poziom CST w osoczu [118].

Oprócz wpływu na metabolizm lipidów, CST podana dootrzewnowo poprawia tolerancję glukozy i insuliny u myszy z otyłością indukowaną dietą oraz u myszy opornych na działanie insuliny [118]. Stan ten można tłumaczyć hamującym wpływem CST

na glukoneogenezę w wątrobie, co skutkuje obniżoną sekrecją glukozy i tym samym obniżonym jej poziomem we krwi [118].

Z kolei w badaniach przeprowadzonych na grupie otyłych dzieci i młodzieży wykazano niższy poziom CST w ich surowicy w porównaniu z dziećmi zdrowymi [121]. Warto zaznaczyć, że najniższe poziomy badanego peptydu odnotowano u dzieci wykazujących objawy zespołu metabolicznego lub zwiększonego ryzyka sercowo-naczyniowego [121].

Ponadto, CST wykazuje działanie kardiosupresyjne zarówno ośrodkowo, jak i obwodowo. Efekty ośrodkowe są wywołane przez poprawę wrażliwości baroreceptorów i zmienność rytmu serca [122-124], z kolei efekty obwodowe polegają na obniżeniu ciśnienia krwi poprzez stymulowanie uwalniania histaminy [125], której zwiększony poziom indukuje produkcję tlenku azotu działającego rozszerzająco na naczynia krwionośne.

Kolejną udowodnioną właściwością CST jest działanie przeciwdrobnoustrojowe, które wiąże się z jej strukturą zawierającą aktywny fragment o nazwie katechina, hamujący wzrost bakterii, grzybów i drożdży. Katechina, poprzez penetrację ściany komórkowej i akumulację w wewnętrznej części komórek, prawdopodobnie inaktywuje enzymy wewnątrzkomórkowe oraz działa hamująco na syntezę ściany komórkowej drobnoustrojów [102, 126-128].

Pankreastatyna (CgA250-301, PST) była pierwszą poznaną, biologicznie aktywną pochodną CgA wyizolowaną z trzustki świni w 1968 roku [82]. Nazwa tego peptydu pochodzi od zaobserwowanego efektu jej działania, czyli zahamowania stymulowanego glukozą uwalniania insuliny z komórek β wysp Langerhansa, co skutkuje wzrostem glukoneogenezy w hepatocytach [129], zmniejszeniem syntezy tłuszczów oraz regulacją ekspresji leptyny w adipocytach [130].

Obecnie wiadomo, że inhibitorem dla PST jest PSTi8, który redukuje wywołaną przez PST oporność na insulinę, zwiększa przechodzenie do powierzchni komórki transportera GLUT4 w hepatocytach i adipocytach oraz obniża uwalnianie glukozy [131].

Udowodniono, że PST w komórkach wysp trzustkowych współwystępuje z insuliną, glukagonem i somatostatyną [132] oraz z histaminą w komórkach chromochłonnych odźwiernika [133]. Przetwarzanie proteolityczne CgA do PST zachodzi zarówno wewnątrz ziarnistości, jak i na zewnątrz komórki [134].

Wyniki badań dotyczące poziomu PST są szczególnie ważne w fizjologicznych badaniach dotyczących homeostazy glukozy i insuliny we krwi oraz w stanach patologicznych,

takich jak cukrzyca [135]. W nadciśnieniu pierwotnym, schorzeniu związanym z zespołem metabolicznym, ujawniono podwyższony poziom PST w osoczu. Podobne wyniki uzyskano u pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz u pacjentów z guzami neuroendokrynnymi [136].

Wazostatyny (CgA1-76, VS-I oraz CgA1-113, VS-II). Dwa N-końcowe peptydy CgA: CgA1-76 (wazostatyna I, VS-I) oraz CgA1-113 (wazostatyna II, VS-II) zostały nazwane wazostatynami [137]. Swoją nazwę zawdzięczają hamującemu działaniu na skurcze izolowanych naczyń ludzkich [138]. Wazostatynom przypisuje się szeroki zakres aktywności biologicznej.

Na chwilę obecną wiadomo, że VS-I działa jako regulator wapnia w osoczu, napięcia naczyniowego, integralności śródbłonna oraz funkcji serca [113]. Bierze udział w pierwszej linii obrony przed mikroorganizmami [139], w reakcjach zapalnych [102], łagodzeniu bólu oraz hamowaniu perystaltyki przewodu pokarmowego [113]. VS-I, w przeciwieństwie do VS-II wykazuje również działanie antyangiogenne [102].

Natomiast VS-II bierze udział w promowaniu angiogenezy, działając poprzez enzym – konwertazę angiotensyny II [140]. VS-II, a konkretnie jej C-końcowemu fragmentowi (CgA79-113), przypisuje się rolę czynnika hamującego zwężanie naczyń (VIF – *vasoconstriction inhibiting factor*), który hamuje *in vitro* działanie angiotensyny II (polegające na zwężaniu naczyń za pomocą receptora dla angiotensyny II typu 2) [141].

1.2.5 Chromogranina A w różnych stanach patologicznych

Na chwilę obecną wiadomo, że CgA ulega ekspresji w wielu guzach endokrynnych i neuroendokrynnych. Ponadto, niektóre nowotwory, takie jak rak płuc, rak piersi czy gruczolakorak żołądka i okrężnicy mogą ulegać różnicowaniu neuroendokrynnemu i wykazywać ogniskową ekspresję CgA [80, 142].

Jak wiadomo, guzy neuroendokrynnne składają się (przynajmniej częściowo) z wyspecjalizowanych komórek, które mają zdolność wytwarzania, przechowywania i wydzielania CgA wraz z bioaktywnymi aminami i innymi hormonami peptydowymi. Uwalniana glikoproteina może przedostać się do krwioobiegu, osiągając w surowicy lub osoczu wyższe poziomy niż u osób zdrowych i tym samym nabywając potencjał markera nowotworu [80, 142].

Podwyższony poziom CgA we krwi towarzyszy też niektórym stanom nienowotworowym: niewydolności narządów, stanom zapalnym, chorobom autoimmunizacyjnym (np. reumatoidalnemu zapaleniu stawów czy chorobie Crohna), pierwotnej nadczynności przytarczyc, przewlekłemu zanikowemu zapaleniu błony śluzowej żołądka i niektórym chorobom sercowo-naczyniowym (np. niewydolności serca, nadciśnieniu tętniczemu, miażdżycy) [143].

Warto wspomnieć, że u pacjentów z cukrzycą typu 1 badanych wiele lat po wystąpieniu choroby, poziom omawianej graniny jest także podwyższony [144, 145]. Ponadto, u tych pacjentów zaobserwowano dodatnią korelację między poziomami CgA a hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) w surowicy, z nieznacznym, ale stałym wzrostem CgA wraz z wydłużaniem czasu trwania cukrzycy [144].

Co więcej, należy zwrócić uwagę, że przyjmowanie leków z grupy inhibitorów pompy protonowej może powodować wzrost stężenia CgA w wyniku zwiększonej produkcji gastryny [146].

1.3 Związek chromograniny A oraz jej pochodnych z endometriozą

Do tej pory związek pomiędzy chromograniną A oraz jej pochodnymi a endometriozą nie został opisany. W badaniach Tsao i wsp. [147] opublikowanych w 2007 roku zauważono podwyższony poziom CgA, CA 125 oraz CA 19-9 w surowicy u pacjentek chorujących, m. in. na endometriozę i inne schorzenia układu rozrodczego [147], ale sami autorzy stwierdzili, że potrzeba dalszych badań na większej grupie osób.

2. ZAŁOŻENIA I CELE

Badania wstępne wykonane w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dały podstawę do stwierdzenia, że CgA może uczestniczyć w patogenezie endometriozy.

W niniejszej pracy spróbowano określić rolę CgA poprzez:

- 1) Identyfikację CgA we fragmentach tkanek zmienionych chorobowo, tj. torbielach jajnikowych i zmianach otrzewnowych (od kobiet z endometriozą) oraz we fragmentach endometrium eutopowego (od pacjentek grupy kontrolnej) za pomocą reakcji immunohistochemicznych.
- 2) Określenie obecności, stężenia oraz wzajemnej korelacji CgA i produktów jej degradacji: CST, PST i VS-II w surowicy oraz płynie otrzewnowym w grupie badanej i kontrolnej.
- 3) Ocenę i porównanie ekspresji mRNA *CHGA* we fragmentach tkanek zmienionych chorobowo, tj. torbielach jajnikowych (od kobiet z endometriozą – grupy badanej) oraz we fragmentach endometrium eutopowego (od pacjentek, u których nie potwierdzono endometriozy – grupy kontrolnej).
- 4) Próbie określenia potencjalnego mechanizmu odpowiedzialnego za ekspresję CgA w tkance endometrialnej z wykorzystaniem linii komórkowych 12Z (linia komórek endometrialnych) oraz Ishikawa (rak endometrialny).

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Uczestnicy badania

Do badania zakwalifikowano 125 pacjentek hospitalizowanych w dwóch warszawskich szpitalach: I Katedrze i Klinice Położnictwa i Ginekologii Uniwersyteckiego Centrum Zdrowia Kobiety i Noworodka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz II Katedrze i Klinice Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego znajdującej się w szpitalu im. ks. Anny Mazowieckiej w Warszawie. Materiał pobrany do analiz stanowiło: endometrium eutopowe i ektopowe (fragmenty torbieli i zmiany otrzewnowe), surowica oraz płyn otrzewnowy.

W czasie hospitalizacji wszystkie pacjentki były w fazie folikularnej cyklu miesięczkowego. U każdej kobiety z grupy badanej zarówno laparoskopowo, jak i histopatologicznie potwierdzono endometriozę, którą sklasyfikowano według kryterium rASRM [20]. Grupę kontrolną stanowiły pacjentki hospitalizowane i operowane w wyżej wymienionych klinikach ginekologicznych z innych przyczyn niż endometrioza, u których nie zdiagnozowano tego schorzenia. Wszystkie uczestniczki badania były w wieku rozrodczym, nie miały chorób przewlekłych i co najmniej 6 miesięcy przed rozpoczęciem hospitalizacji nie były poddane terapii hormonalnej.

Na przeprowadzenie badań otrzymano pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (nr decyzji KB/257/2016). Każda z pacjentek wyraziła świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu.

Szczegółową charakterystykę grup pacjentek przedstawia Tabela 2.

Tabela 2. Charakterystyka badanych grup.

Charakterystyka		Grupa kontrolna	Grupa badana
Liczba przypadków		60	65
Wiek, [lata] (średnia $\pm$ SD)		33,19 $\pm$ 8,03	32,92 $\pm$ 5,74
BMI, [kg/m ²] (średnia $\pm$ SD)		24,61 $\pm$ 5,33	22,38 $\pm$ 3,66
rASRM	I/II (minimalna/łagodna)	nie dotyczy	25 (38,46%)
	III/IV (umiarkowana/ciężka)	nie dotyczy	40 (61,54%)
Lokalizacja zmian	jajnikowa	nie dotyczy	20
	otrzewnowa	nie dotyczy	25
	jajnikowa + otrzewnowa	nie dotyczy	20
Dzietność (średnia $\pm$ SD)		1,24 $\pm$ 1,15	0,23 $\pm$ 0,44
Niepłodność		33,33%	83,30%

3.2 Immunohistochemia

Materiał do prezentowanych badań stanowiły fragmenty tkanek pobrane w trakcie operacji, pochodzące z I i II Katedry i Kliniki Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Do analizy wykorzystano zmiany z torbieli endometrialnych i otrzewnej pobrane od pacjentek z endometriozą oraz endometrium eutopowe od pacjentek z innymi zmianami (nieendometriotycznymi), utrwalone w 10% buforowanej formalinie (pH 7,4 – 7,6) i zatopione w parafinie. Wszystkie preparaty histologiczne wstępnie poddano standardowej reakcji z użyciem hematoksyliny i eozyny w celu sprawdzenia jakości pobranego materiału.

W dalszej kolejności parafinowe skrawki o grubości 4 μ m naklejono na mikroskopowe szkiełka podstawowe FLEX IHC Microscope Slides (Dako, Glostrup, Dania, nr katalogowy: K8020), które suszono w cieplarni przez co najmniej godzinę w temperaturze nieprzekraczającej 60°C. Następnie skrawki poddano odparafinowaniu i uwodnieniu poprzez zanurzanie kolejno w:

- ksylen I, ksylen II, ksylen III – po 5 minut w każdym,
- etanol $\geq 99,8\%$ I, etanol $\geq 99,8\%$ II – po 3 minuty w każdym,
- etanol 96% I; etanol 96% II, etanol 96% III – po 3 minuty w każdym,
- woda destylowana/dejonizowana – 5 minut.

Po odparafinowaniu i nawodnieniu skrawki tkankowe poddano procedurze cieplnego odmaskowania epitopu (HIER) przy użyciu naczyń Coplin.

W łaźni wodnej umieszczono naczynia (Coplin) do barwienia z uprzednio rozcieńczonym (50 razy w wodzie destylowanej/dejonizowanej) roztworem roboczym, czyli EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (bufor Tris/EDTA) (Dako, nr katalogowy: K8004). Łaźnię wodną i naczynia z roztworem roboczym doprowadzono do temperatury 97°C, które, w celu ustabilizowania temperatury i eliminacji parowania roztworu, osłaniano pokrywkami. Skrawki tkankowe osadzone na szkiełkach (o temperaturze pokojowej) zanurzano we wstępnie podgrzanym roztworze roboczym (znajdującym się w naczyniach Coplin), a następnie inkubowano przez 20 ± 1 minut w łaźni wodnej w temperaturze 97°C.

W dalszej kolejności naczynia barwiące zawierające preparaty, po wyjęciu z łaźni wodnej, pozostawiono w temperaturze pokojowej na 20 ± 1 minut.

Przygotowane w ten sposób skrawki poddano procedurze barwienia manualnego EnVision FLEX poprzez:

1. Płukanie w Wash Buffer – 5 minut.

Wash Buffer DM831, Dako, nr katalogowy: K8007; roztwór soli fizjologicznej z buforem Tris o pH = 7,6 zawierający preparat Tween 20; przed użyciem rozcieńczony 20 razy wodą destylowaną/dejonizowaną.

2. Blokowanie endogennej peroksydazy w EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (RTU) – 5 minut.

EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, Dako, nr katalogowy: SM801; bufor fosforanowy zawierający nadtlenek wodoru oraz detergent.

3. Przemycie Wash Buffer – 3 razy po 5 minut.
4. Inkubację z przeciwciałem pierwotnym Polyclonal rabbit anti-CgA – 20 minut w temperaturze pokojowej.

Polyclonal rabbit anti-CgA, Abcam, nr katalogowy: ab15160; przed użyciem przeciwciało rozcieńczono w stosunku 1:200 w odczynniku EnVision FLEX Antibody Diluent DM830, Dako, nr katalogowy: K8006).

5. Ponowne przemycie w Wash Buffer – 3 razy po 5 minut.
6. Inkubację z EnVision FLEX/HRP – 20 minut.

EnVision FLEX/HRP, Dako, nr katalogowy: SM802; dekstran sprzężony z peroksydazą i wtórnymi przeciwciałami kozimi przeciwko immunoglobulinom mysim, umieszczony w buforowanym roztworze zawierającym białko stabilizujące i konserwant.

7. Przemycie tkanki w Wash Buffer – 3 razy po 5 minut.
8. Barwienie chromogenem w roztworze EnVision FLEX Substrate Working Solution – 3 – 10 minut.

EnVision FLEX Substrate Working Solution przygotowano mieszając 1 kroplę odczynnika EnVision FLEX DAB+ Chromogen, Dako, nr katalogowy: DM827; roztworu

diaminobenzyny (DAB) o wysokim stężeniu z 1 mL odczynnika EnVision FLEX Substrate Buffer SM803, Dako, nr katalogowy SM803; zawierającego nadtlenu wodny.

9. Przemycie tkanki w Wash Buffer – 5 minut.

10. Barwienie kontrastowe jąder komórkowych przy użyciu EnVision FLEX Hematoxylin – 5 minut.

EnVision FLEX Hematoxylin, Dako, nr katalogowy: K8008.

11. Przemycie kolejno: wodą destylowaną – 1 minuta, Wash Buffer – 5 minut, wodą destylowaną – 5 minut.

12. Odwodnienie skrawków tkankowych w 96% etanolu II i III oraz etanolu 99,8% I i II – po 3 minuty w każdym.

13. Przeprowadzenie przez szereg ksylenów (I, II, III) – po 2 minuty w każdym.

14. Zatopienie preparatów przy użyciu medium Dako Glycergel Mounting Medium oraz szkiełek nakrywkowych.

Dako Glycergel Mounting Medium, nr katalogowy: C0563.

Kontrolę jakości przeprowadzono stosując dodatnią próbkę kontrolną na tkance rekomendowanej przez producenta przeciwciała (trzustka oraz/lub jelito grube). Zgodnie z zaleceniami wykonano także kontrolę ujemną służącą weryfikacji odczynów nieswoistych i wspomagania interpretacji odczynów swoistych w miejscu występowania antygenu.

Roztwór roboczy substratów zawierający diaminobenzynę powoduje intensywne brązowe zabarwienie zlokalizowane w miejscach występowania wykrywanych antygenów rozpoznawanych przez przeciwciała pierwotne, co oznacza, że takie zabarwienie powinno zostać zwizualizowane w dodatniej próbce kontrolnej w oczekiwanych miejscach występowania wykrywanego antygenu. Z kolei odczyn nieswoisty będzie rozpoznawany jako rozmyte, brązowe zabarwienie na szkiełkach poddanych działaniu odczynnika kontroli ujemnej. Jądra komórkowe natomiast w barwieniu kontrastowym hematoksyliną będą wybarwiały się na kolor niebieski.

3.3 Testy immunoenzymatyczne (ELISA)

Wykrywanie oraz ilościowe oznaczenie CgA i produktów jej degradacji: CST, PST oraz VS-II wykonano testami immunoenzymatycznymi ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) fazy stałej, których metoda działania polega na tworzeniu się wiązań pomiędzy antygenem a przeciwciałem uwidocznionych reakcją barwną zachodzącą dzięki enzymom (skoniugowanym z immunoglobulinami) i dedykowanymi dla nich substratami. W metodzie tej intensywność uzyskanej barwy odpowiada ilości powstałych wiązań antygen-przeciwciało i oznaczana jest najczęściej kolorymetrycznie przy użyciu spektrofotometru.

Do oznaczenia obecności i stężenia badanych związków w surowicy i płynie otrzewnowym (pobranych od pacjentek grupy badanej i kontrolnej) użyto testów ELISA wymienionych w zamieszczonej poniżej Tabeli 3.

Tabela 3. Zestawy użyte do wykonania testów immunoenzymatycznych ELISA.

Badany związek	Nazwa testu	Numer katalogowy	Producent
Chromogranina A	Human Chromogranin-A ELISA Kit	E1730Hu	Bioassay Technology Laboratory
Katestatyna	Human Catestatin ELISA Kit	E4996Hu	Bioassay Technology Laboratory
Pankreastatyna	Human Pancreastatin ELISA Kit	E0983Hu	Bioassay Technology Laboratory
Wazostatyna II	Human Vasostatin-2(VS-2) ELISA Kit	EIA07184h	Wuhan Xinqidi Biological Technology Co.,Ltd

Badany materiał biologiczny do momentu wykonania doświadczeń przechowywano w temperaturze -80°C. Przed wykonaniem testów wszystkie próbki rozmrożono i odwirowano w temperaturze pokojowej. Następnie postępowano według protokołu producenta każdego z testów ELISA. Wynik absorbancji odczytano przy pomocy czytnika płytek Omega (długość fali 450 nm) i poddano analizie statystycznej.

3.4 Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

Fragmenty tkanek otrzymane z wyżej wymienionych klinik ginekologicznych przetrzymywano w buforze chroniącym RNAlater (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA, nr katalogowy: AM7021) w temperaturze -80°C do czasu wykonania eksperymentów.

Po rozmrożeniu materiał zważono, zhomogenizowano i przeniesiono do buforu RL, a następnie oczyszczono z DNA i białek zgodnie z protokołem testu Gene Matrix Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Polska, nr katalogowy: E3598) w celu izolacji całkowitego komórkowego RNA. Po serii reakcji otrzymano 50 μ L RNA rozpuszczonego w sterylnej wodzie wolnej od rybonukleaz. Następnie oznaczono stężenia RNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Wykonano trzykrotne pomiary każdej z próbek, a jako próby zerowej użyto wody wolnej od rybonukleaz.

Do reakcji odwrotnej transkrypcji (przeprowadzonej w celu uzyskania cDNA potrzebnego do reakcji PCR) wykorzystano zestaw High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific, Cheshire, UK, nr katalogowy: 4368814). W tym celu mieszano 10 μ L roztworu RNA (o znanym stężeniu) z 10 μ L mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji (skład mieszaniny podano w Tabeli 4). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono inkubując przygotowane próbki w termocyklerze Mastercycler Eppendorf w następujących warunkach: 10 minut w 25°C, 120 minut w 37°C, 5 minut w 85°C, następnie schłodzono do 4°C (Tabela 5). Przygotowane w ten sposób cDNA przechowywano, zgodnie z zaleceniami producenta, w temperaturze -20°C do czasu dalszych badań.

Tabela 4. Skład mieszaniny reakcyjnej w zestawie High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Składnik	Objętość/reakcję [μL]
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0
Woda wolna od nukleaz	4,2
Razem/reakcję	10,0

Tabela 5. Warunki reakcji syntezy cDNA.

	Temperatura	Czas trwania reakcji
Inkubacja wstępna	25°C	10 minut
Odwrotna transkrypcja	37°C	120 minut
Degradacja RNA i inaktywacja odwrotnej transkryptazy	85°C	5 minut

3.5 Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym

Ocenę ekspresji genu *CHGA* zarówno w tkankach, jak i w badanych liniach komórkowych dokonano przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym. Badanie wykonano używając podwójnie znakowanych sond TaqMan. W doświadczeniu użyto 20 ng (5 μ L) wcześniej przygotowanego roztworu cDNA oraz 5 μ L mieszaniny reakcyjnej składającej się z 4,5 μ L SensiFAST Probe Lo-ROX Kit (Bioline, Luckenwalde, Niemcy, nr katalogowy: BIO-84005) oraz 0,5 μ L roztworu gotowych starterów (TaqMan, ThermoFisher Scientific): genu *CHGA* (Hs00900370_m1) lub kontroli endogennej, którą stanowił gen referencyjny *GAPDH* (Hs02758991_g1). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze ABI 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) w następujących warunkach: 2 minuty w 50°C, 20 sekund w 95°C, 40 powtórzeń naprzemiennie: 3 sekundy w 95°C, 30 sekund w 60°C (Tabela 6). Każdą próbkę wykonano w co najmniej dwóch powtórzeniach.

Tabela 6. Warunki przeprowadzania reakcji PCR.

	liczba cykli	temperatura	czas trwania
Denaturacja wstępna	1	50°C	2 minuty
Denaturacja	1	95°C	20 sekund
Przyłączanie starterów,	40	95°C	3 sekundy
elongacja i pomiar fluorescencji	40	60°C	30 sekund

Analizę wyników przeprowadzono w programie Real-Time PCR Data Analysis (ThermoFisher Scientific).

Wyniki dla fragmentów tkanek przedstawiono według wzoru: $R = 2^{-\Delta C_t}$,

gdzie:

$$\Delta C_t = C_t \text{ genu badanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}$$

Wyniki ekspresji *CHGA* dla linii komórkowych przedstawiono, używając jako próby kontrolnej komórek hodowanych w warunkach standardowych, według wzoru:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t},$$

gdzie:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ próby nieznanej} - \Delta C_t \text{ próby kontrolnej}$$

3.6 Hodowla komórkowa

Doświadczenia przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych: 12Z oraz Ishikawa. Linia komórkowa 12Z (pozyskana dzięki uprzejmości Pana Profesora Martina Goette z Uniwersytetu w Muenster) to linia immortalizowanych ludzkich komórek endometrialnych, wygenerowana przez zainfekowanie wirusem SV40 komórek pobranych od poddanej laparoskopii 37-letniej kobiety [148]. Z uwagi na fakt, że komórki linii 12Z wykazują ekspresję markerów zmian endometriotycznych obserwowanych *in vivo*, mogą być stosowane do charakterystyki i identyfikacji genów/markerów związanych z endometriozą. Z kolei linia komórkowa Ishikawa (ECACC – *European Collection of Authentic Cell Cultures*) została wyodrębniona z gruczolakoraka endometrium od 39-letniej kobiety. Na powierzchni tych komórek obecne są receptory estrogenowe i progesteronowe [149].

Komórki obu linii inkubowano w standardowej pożywce przeznaczonej do hodowli komórkowych DMEM/F-12 (Gibco, Carlsbad, CA, USA, nr katalogowy: 11320033) zawierającej 10% (v/v) dodatek FBS – płodowej surowicy bydlęcej (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Niemcy, nr katalogowy: FBS-22A) oraz antybiotyki: penicylinę G (10000000 j.m./L), siarczan streptomycyny (10000 mg/L) i amfoterycynę B (25 mg/L) (Capricorn Scientific, nr katalogowy: AAS-B). Komórki hodowano w 25 cm² butelkach hodowlanych w inkubatorze Sanyo w warunkach standardowych, tj. w temperaturze 37°C oraz w 5% atmosferze CO₂ i wilgotności 100%.

Komórki pasażowano po uzyskaniu około 70% pokrycia dna naczynia hodowlanego za pomocą 0,25% roztworu trypsyny-EDTA (Gibco, nr katalogowy: 15090046). Przed dodaniem trypsyny każdorazowo, dwukrotnie płukano je roztworem DPBS (Capricorn Scientific, nr katalogowy: PBS-1A).

Po trzecim pasażu komórki wysiewano na 12-studzienkowe płytki w gęstości 1x10⁵ komórek na jeden dołek. Następnie, po upływie 24 godzin inkubacji standardową pożywkę hodowlaną zastępowano medium zawierającym odpowiednie stężenia (10 ng/mL oraz 20

ng/mL) badanych cytokin (IL-1, IL-6, TGF β , TNF). Każdą próbkę wykonano w co najmniej trzech powtórzeniach. Tak przygotowane komórki inkubowano przez okres 24 godzin w warunkach standardowych. Po tym czasie z każdego dołka odciągnięto pożywkę, a przyklejone do dna płytki komórki dwukrotnie przepłukano roztworem DPBS, odklejono za pomocą 0,25% roztworu trypsyny-EDTA, odwirowano przez 5 minut 1200 rpm, odrzucono supernatant i zawieszono w buforze stabilizującym RNA (bufor RL, Gene Matrix Universal RNA Purification Kit, EURx, nr katalogowy: E3598). Tak przygotowany materiał przechowywano zgodnie z zaleceniami producenta testu w temperaturze -20°C do momentu dalszych badań.

Opisane wyżej doświadczenie wykonano trzykrotnie.

3.7 Analiza statystyczna

Wszystkie analizy statystyczne oraz prezentowane w pracy wykresy (Ryciny 4-31) wygenerowano w programie GraphPad Prism ver 10.2.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Różnice między badanymi grupami określono za pomocą testu U Manna-Whitneya. Do porównania więcej niż dwóch grup zastosowano test Kruskala-Wallisa oraz test post-hoc Dunna. Wyniki przedstawiono jako wykresy punktowe z medianą i zakresem międzykwartylowym.

Analizę korelacji przeprowadzono wyliczając współczynnik Pearsona lub Spearmana. Wyniki zaprezentowano jako wykresy rozrzutu z linią regresji.

W celu ustalenia mocy predykcyjnej badanych związków w kierunku diagnozy endometriozy wygenerowano krzywe ROC (*receiver operating characteristics*) wraz z wartościami pól powierzchni pod krzywą (AUC) oraz 95% przedziałami ufności (95% CI). Następnie, w arkuszu kalkulacyjnym Microsoft Excel, obliczono współczynnik Youden'a oraz wartości PPV (*positive predictive value*) oraz NPV (*negative predictive value*).

Za wartość istotną statystycznie przyjęto $p < 0,05$.

4. WYNIKI

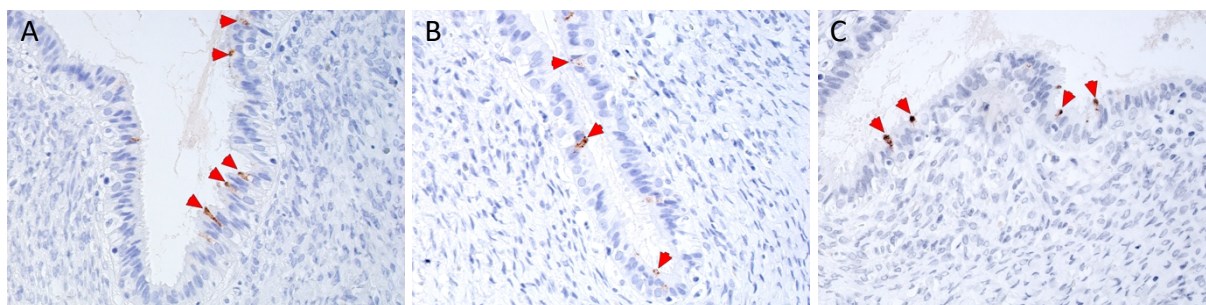
4.1 Identyfikacja chromograniny A w endometrium eutopowym oraz we fragmentach tkanek zmienionych chorobowo

Obecność CgA we fragmentach tkanek identyfikowano za pomocą metody immunohistochemicznej. Badany skrawek poddano szeregowi reakcji chemicznych i fizycznych, których efektem było intensywne brązowe zabarwienie zlokalizowane w miejscach występowania wykrywanych antygenów rozpoznawanych przez przeciwciała pierwotne.

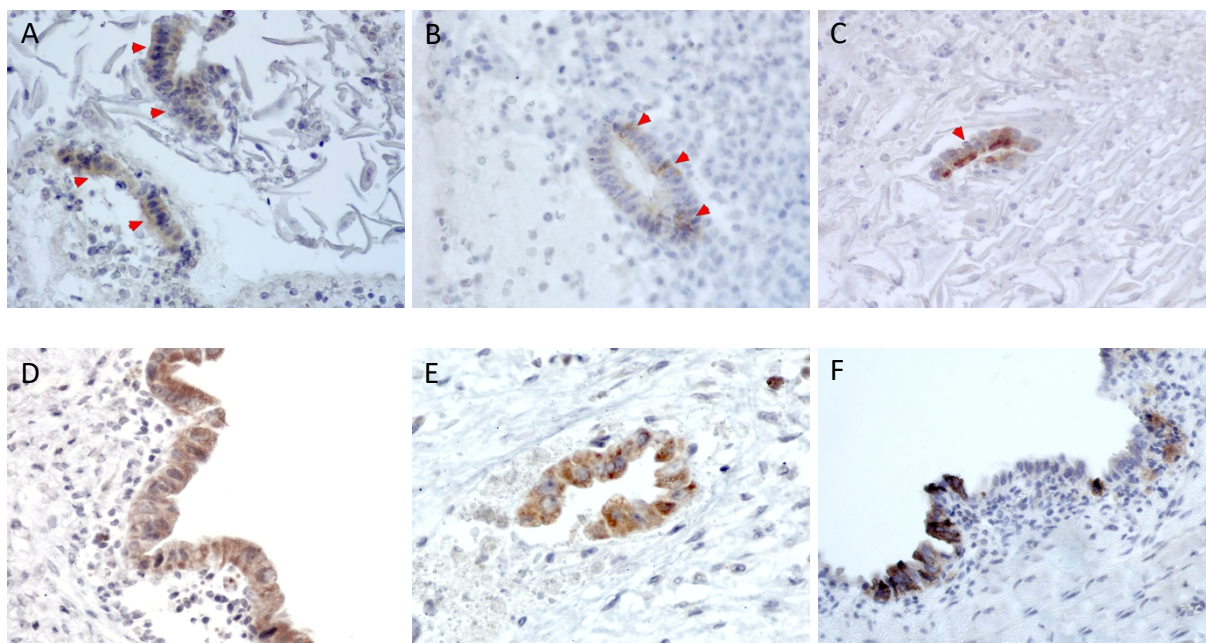
Obrazy (Rycina 2-3) zostały uchwycone za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse E400 oraz aparatu Nikon Coolpix 995.

W endometrium eutopowym pobranym od pacjentek, u których nie zdiagnozowano endometriozy (grupa kontrolna) uwidoczono pojedyncze komórki występujące w nabłonku gruczołowym, wykazujące chromograninopozytywną reakcję (Rycina 2A-C).

W zmianach endometrioidalnych zlokalizowanych na otrzewnej (Rycina 3A-C) oraz we fragmentach torbieli endometrialnych (Rycina 3D-F) zidentyfikowano grupy komórek wykazujących intensywne brązowe zabarwienie, co świadczy o obecności CgA.



Rycina 2. Lokalizacja immunohistochemiczna chromograniny A w endometrium eutopowym pobranym od pacjentek z grupy kontrolnej. Strzałkami zaznaczono przykładowe miejsca występowania pojedynczych komórek zawierających CgA. Powiększenie 400x (A-C).



Rycina 3. Lokalizacja immunohistochemiczna chromograniny A w zmianach endometrioidalnych na otrzewnej (A-C) oraz we fragmentach torbieli endometrialnych (D-F) pobranych od pacjentek z grupy badanej. Strzałkami zaznaczono miejsca występowania skupisk komórek zawierających CgA. Powiększenie: 400x (A-F).

4.2 Występowanie chromograniny A i jej pochodnych w płynach ustrojowych

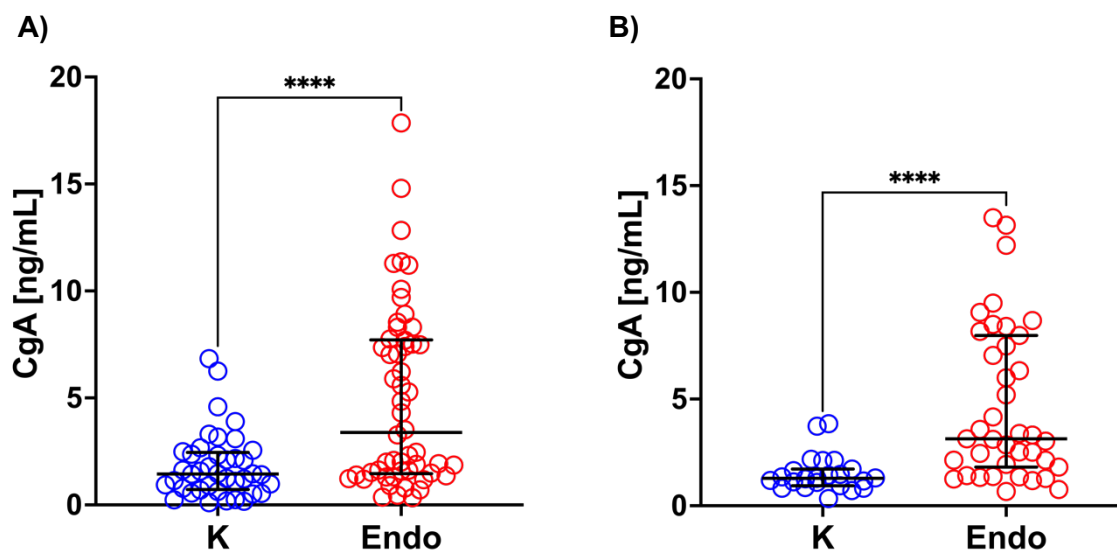
Stężenie chromograniny A oraz jej pochodnych: katestatyny, pankreastatyny i wazostatyny II w płynach ustrojowych (surowica, płyn otrzewnowy) oznaczano przy pomocy testów immunoenzymatycznych ELISA.

4.2.1 Porównanie stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym w grupie badanej i kontrolnej

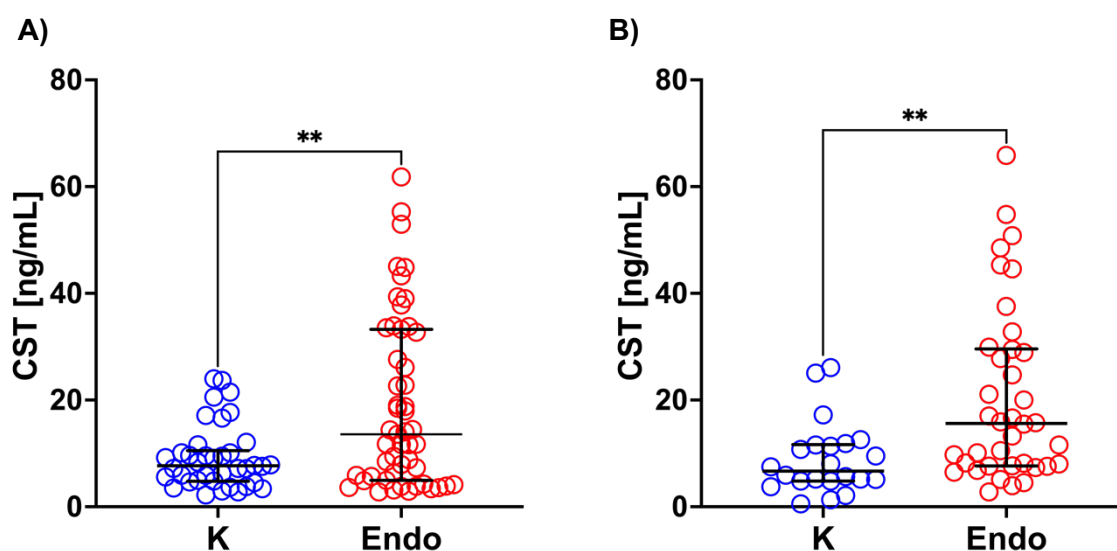
W surowicy pobranej od pacjentek z endometriozą zaobserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia CgA ($p < 0,0001$; Rycina 4A), CST ($p = 0,0089$; Rycina 5A) oraz PST ($p = 0,0194$; Rycina 6A) w porównaniu do surowicy kobiet bez endometriozы (grupa kontrolna). W przypadku VS-II nie zaobserwowano takiego efektu (brak istotności statystycznej; Rycina 7A). Podobnie, w płynie otrzewnowym wykazano znacząco wyższe stężenie CgA ($p < 0,0001$; Rycina 4B), CST ($p = 0,0015$, Rycina 5B) oraz PST ($p = 0,0003$; Rycina 6B) u kobiet z grupy badanej w porównaniu do pacjentek z grupy kontrolnej. Dla VS-II,

podobnie jak w przypadku surowicy, nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy pacjentkami z grupy badanej i grupy kontrolnej (brak istotności statystycznej; Rycina 7B).

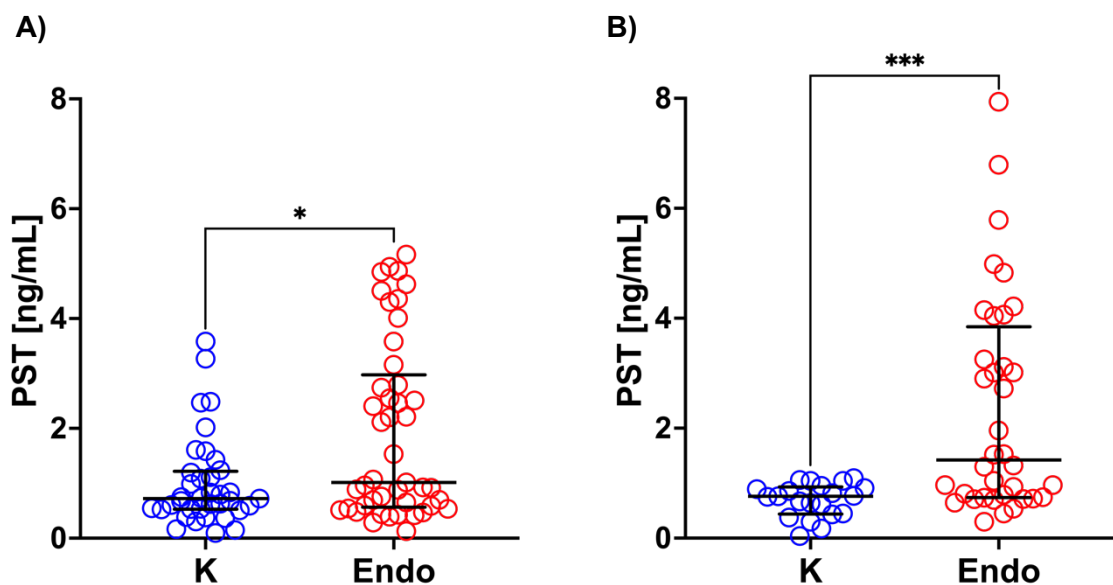
Podczas analizy danych wykazano także brak istotnych statystycznie różnic w stężeniach badanego białka oraz jego pochodnych pomiędzy surowicą a płynem otrzewnowym zarówno w grupie badanej (pacjentki z endometriozą), jak i kontrolnej (pacjentki bez endometriozy; Tabela 7).



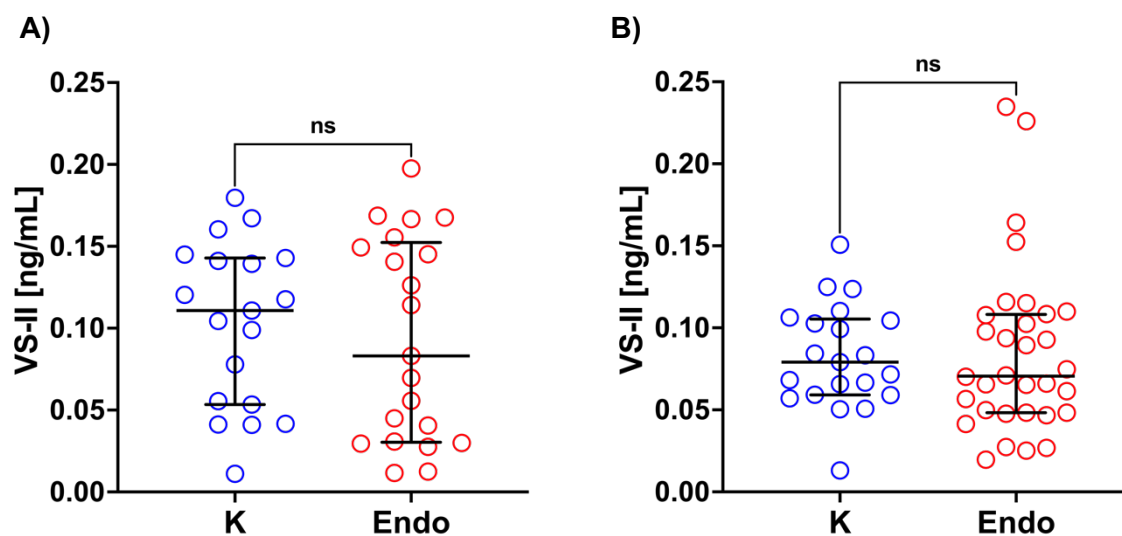
Rycina 4. Stężenie chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą (Endo) w porównaniu do kobiet bez endometriozy (grupa kontrolna; K). Stężenie CgA każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu U Manna-Whitneya; A, B: $p < 0,0001$.



Rycina 5. Stężenie katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą (Endo) w porównaniu do kobiet bez endometriozy (grupa kontrolna; K). Stężenie CST każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu U Manna-Whitneya; A: $p = 0,0089$; B: $p = 0,0015$.



Rycina 6. Stężenie pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą (Endo) w porównaniu do kobiet bez endometriozy (grupa kontrolna; K). Stężenie PST każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu U Manna-Whitneya; A: $p=0,0194$; B: $p=0,0003$.



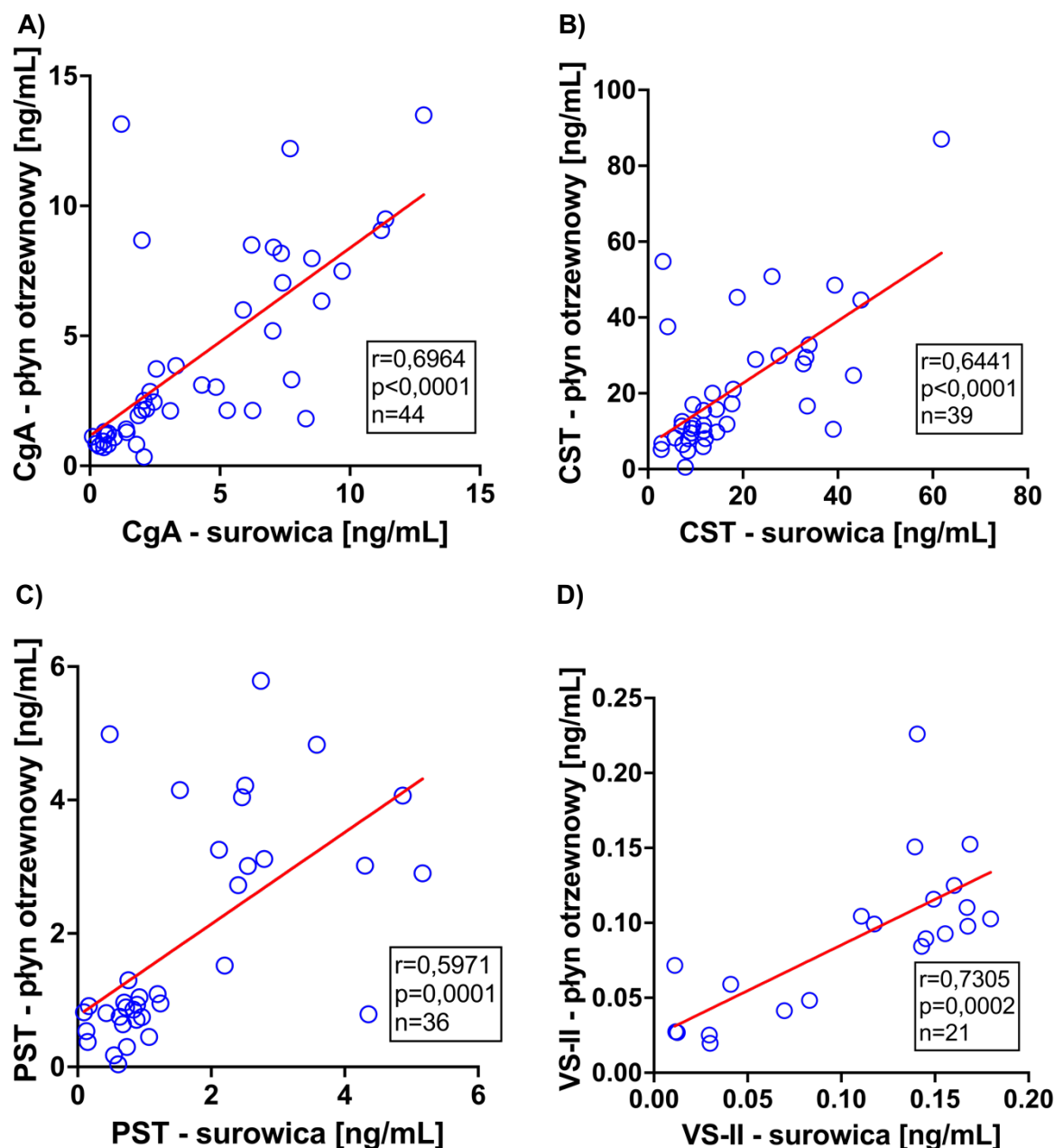
Rycina 7. Stężenie wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą (Endo) w porównaniu do kobiet bez endometriozy (grupa kontrolna; K). Stężenie VS-II każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu U Manna-Whitneya; brak istotności statystycznej (ns).

Tabela 7. Porównanie stężeń chromograniny A (CgA), katestatyny (CST), pankreastatyny (PST) oraz wazostatyny II (VS-II) w surowicy i płynie otrzewnowym w grupie badanej (Endo) oraz w grupie kontrolnej (K). Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu U Manna-Whitneya.

	Endo/K	Wartość p
CgA	Endo	0,7714
	K	0,7499
CST	Endo	0,4548
	K	0,8492
PST	Endo	0,2233
	K	0,5742
VS-II	Endo	0,7388
	K	0,2283

4.2.2 Korelacja stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym

U pacjentek z grupy badanej i kontrolnej, u których stężenie CgA i jej pochodnych oznaczano zarówno w surowicy, jak i w płynie otrzewnowym zaobserwowano silną (CgA, CST, PST) oraz bardzo silną (VS-II) dodatnią korelację pomiędzy stężeniami badanych peptydów w obu wyżej wymienionych płynach ustrojowych (Rycina 8).

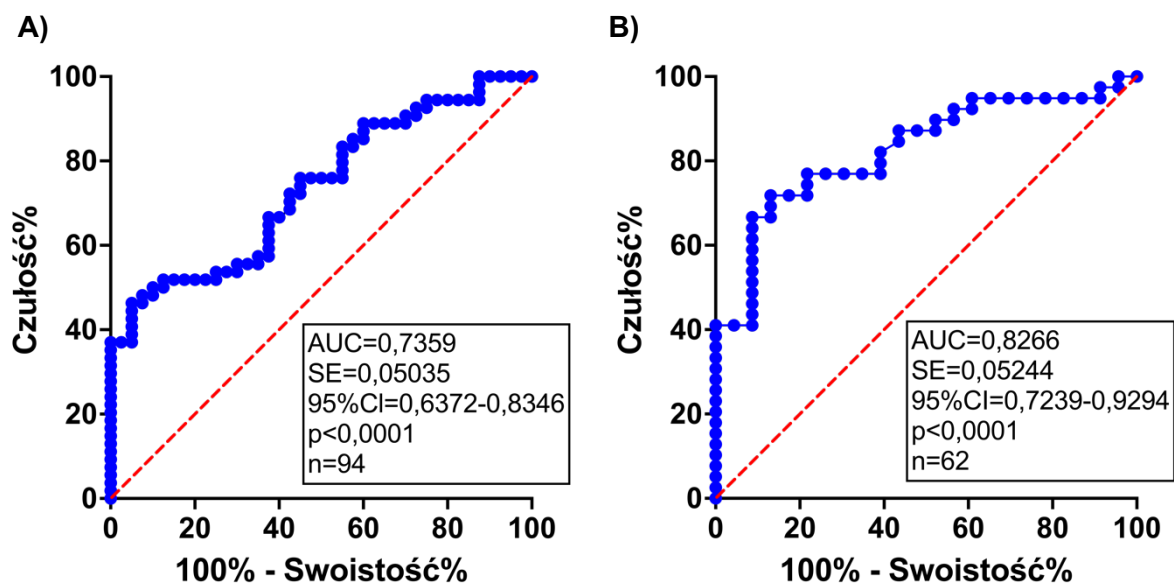


Rycina 8. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA, A), katestatyny (CST, B), pankreastatyny (PST, C) oraz wazostatyny II (VS-II, D) w surowicy i płynie otrzewnowym u pacjentek z grupy badanej i kontrolnej. Stężenie każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono jako wykresy rozrzutu z linią regresji. Współczynniki korelacji Pearsona (r), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.

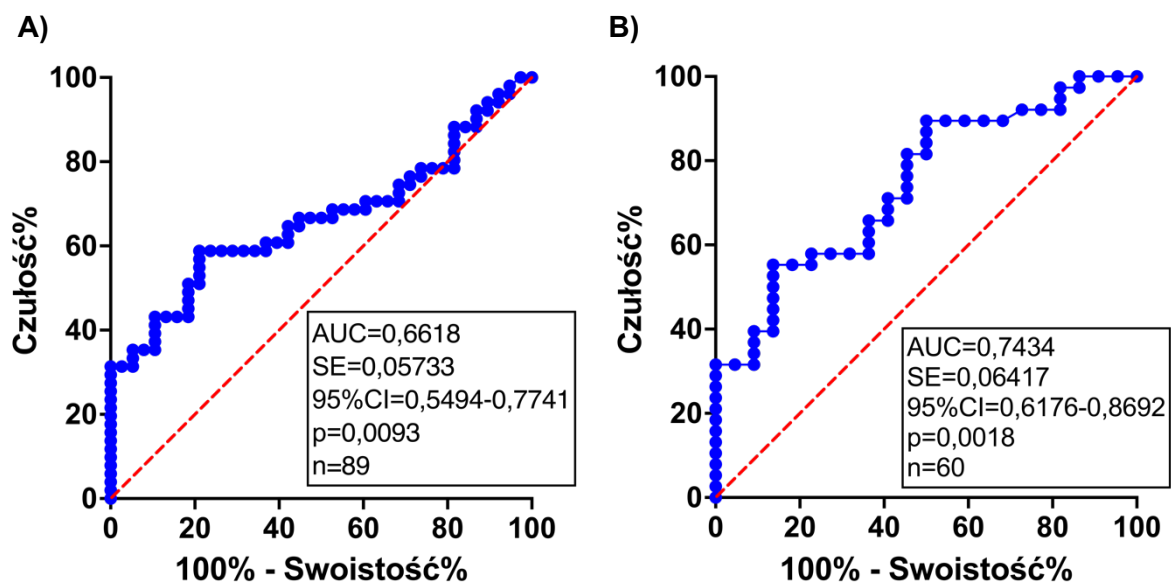
4.2.3 Analiza ROC stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym

Skuteczność danej metody w wykrywaniu choroby w badanej populacji można opisać przy pomocy krzywej ROC. W tym celu zestawiono wszystkie wyniki w formie krzywych, określono najważniejsze parametry (Rycina 9-12) oraz obliczono wartości: indeksów Youdena, PPV i NPV (Tabela 8).

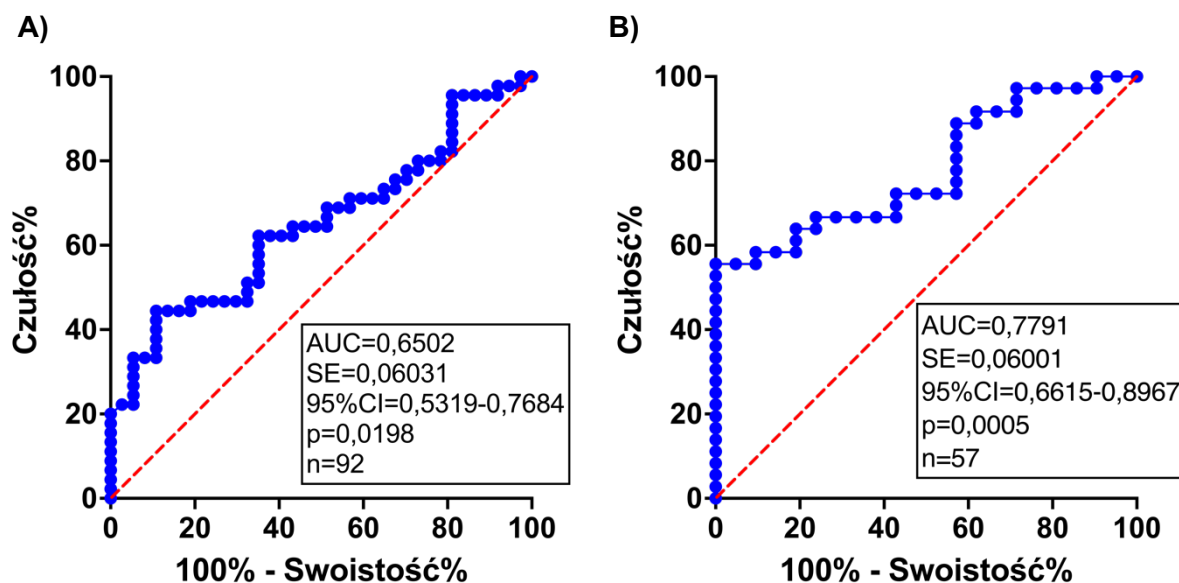
Analiza krzywych ROC wykazała najwyższe wartości liczbowe dla oznaczeń stężeń CgA (Rycina 9), przy czym były one wyższe w płynie otrzewnowym (Rycina 9B), aniżeli w surowicy (Rycina 9A). Podobne obserwacje, jednak niższe wartości liczbowe dotyczą CST (Rycina 10) oraz PST (Rycina 11). Natomiast dla oznaczeń stężeń VS-II nie wykazano istotności statystycznej w analizie krzywych ROC ani w surowicy, ani w płynie otrzewnowym (Rycina 12).



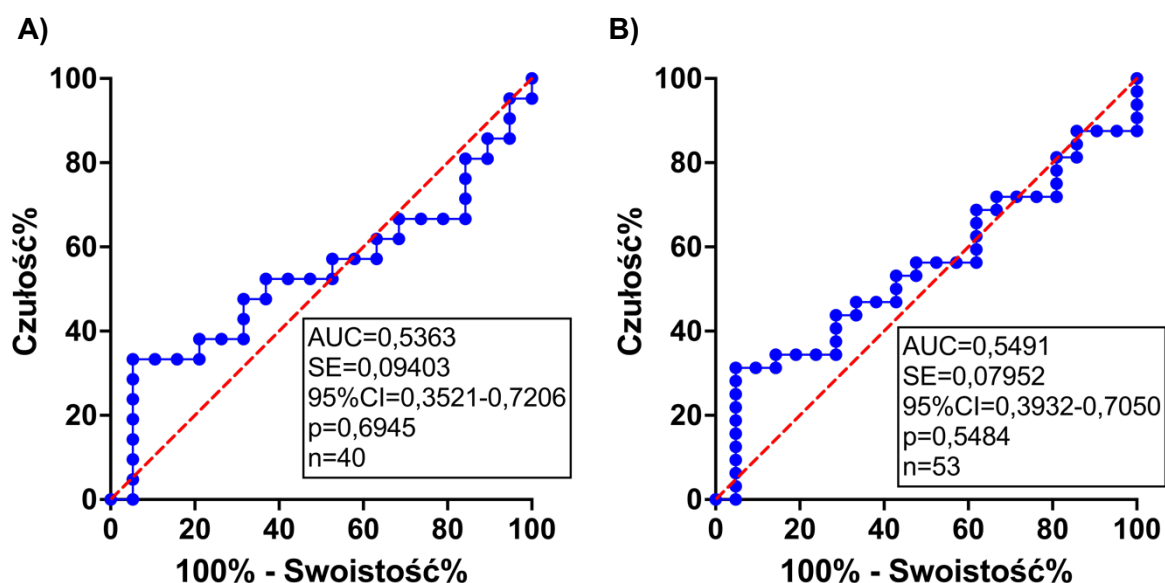
Rycina 9. Analiza ROC stężenia chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w porównaniu do kobiet bez endometriozy. Wartości pól pod krzywą (AUC), błędów standardowych (SE), 95% przedziałów ufności (95%CI), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramach obok wykresów.



Rycina 10. Analiza ROC stężenia katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w porównaniu do kobiet bez endometriozy. Wartości pól pod krzywą (AUC), błędów standardowych (SE), 95% przedziałów ufności (95%CI), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramach obok wykresów.



Rycina 11. Analiza ROC stężenia pankreatatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w porównaniu do kobiet bez endometriozy. Wartości pól pod krzywą (AUC), błędów standardowych (SE), 95% przedziałów ufności (95%CI), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.



Rycina 12. Analiza ROC stężenia wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w porównaniu do kobiet bez endometriozy. Wartości pól pod krzywą (AUC), błędów standardowych (SE), 95% przedziałów ufności (95%CI), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.

Tabela 8. Wartości indeksów Youdena, *positive predictive value* (PPV) oraz *negative predictive value* (NPV) obliczone na podstawie analizy krzywych ROC. Wszystkie wartości liczbowe podano w procentach [%].

	Material	index Youdena	PPV	NPV
CgA	surowica	41,3	92,59	56,72
	płyn otrzewnowy	58,75	90,32	64,51
CST	surowica	37,77	78,95	58,82
	płyn otrzewnowy	41,62	87,5	52,77
PST	surowica	33,63	83,33	56,89
	płyn otrzewnowy	55,56	100	56,76
VS-II	surowica	28,07	87,51	56,25
	płyn otrzewnowy	26,49	90,91	47,62

4.2.4 Porównanie stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym według stopnia rASRM

Porównano stężenia chromograniny A i jej pochodnych surowicy i płynie otrzewnowym u pacjentek sklasyfikowanych wg skali rASRM jako:

- I lub II stopień endometriozy (I/II) – zmiany powierzchowne, łagodne,
 - III lub IV stopień endometriozy (III/IV) – zmiany głębokie,
- ze stężeniem u kobiet z grupy kontrolnej.

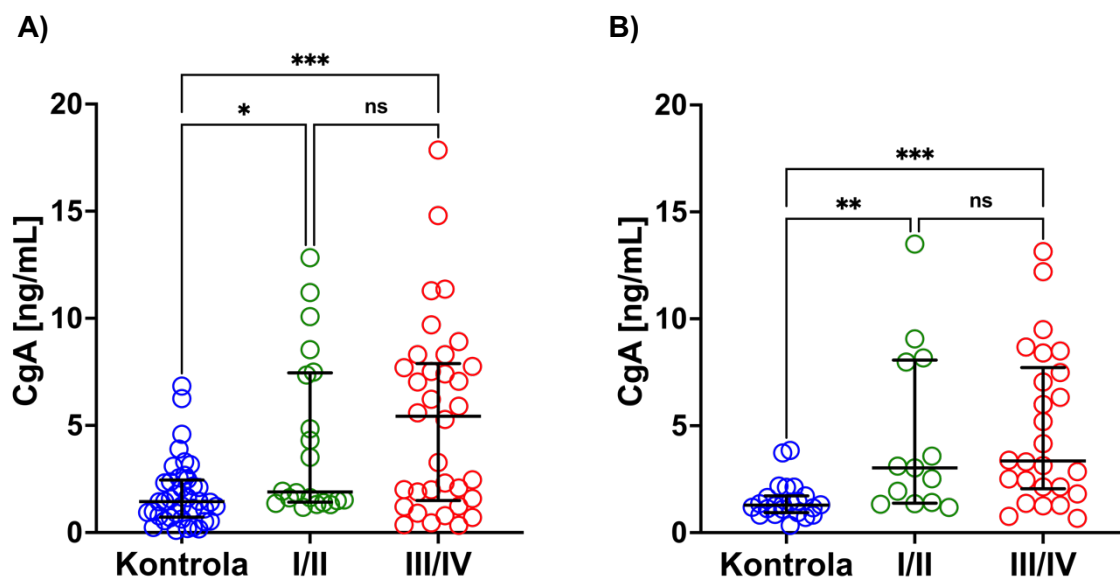
W przypadku CgA, zarówno w surowicy, jak i w płynie otrzewnowym zaobserwowano istotne statystycznie różnice pomiędzy kontrolą a pacjentkami z endometriozą I i II stopnia oraz kontrolą a pacjentkami z endometriozą III i IV stopnia. Surowica (Rycina 13A): $p=0,0231$ (kontrola vs. I/II), $p=0,0007$ (kontrola vs. III/IV); płyn otrzewnowy (Rycina 13B): $p=0,0073$ (kontrola vs. I/II), $p=0,0002$ (kontrola vs. III/IV).

Dla CST zaobserwowano istotną statystycznie różnicę jedynie pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentek z III i IV stopniem endometriozy zarówno w surowicy (Rycina 14A; $p=0,0059$), jak i w płynie otrzewnowym (Rycina 14B; $p=0,0008$).

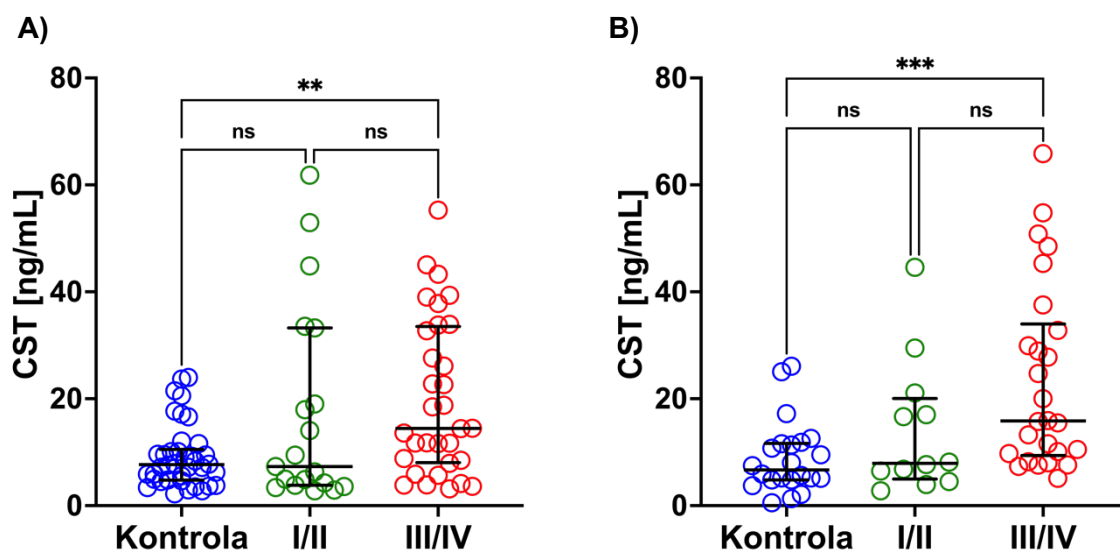
W przypadku PST w surowicy statystycznie wyższe stężenie odnotowano u pacjentek z III i IV stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (Rycina 15A; $p=0,0467$). Natomiast w płynie otrzewnowym taką istotność ujawniono zarówno u kobiet z I i II, jak i z III i IV stopniem choroby w porównaniu do kobiet bez endometriozy (Rycina 15B): $p=0,0320$ (kontrola vs. I/II), $p=0,0035$ (kontrola vs. III/IV).

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniu VS-II pomiędzy kobietami z grupy badanej i kontrolnej (Rycina 16A, B).

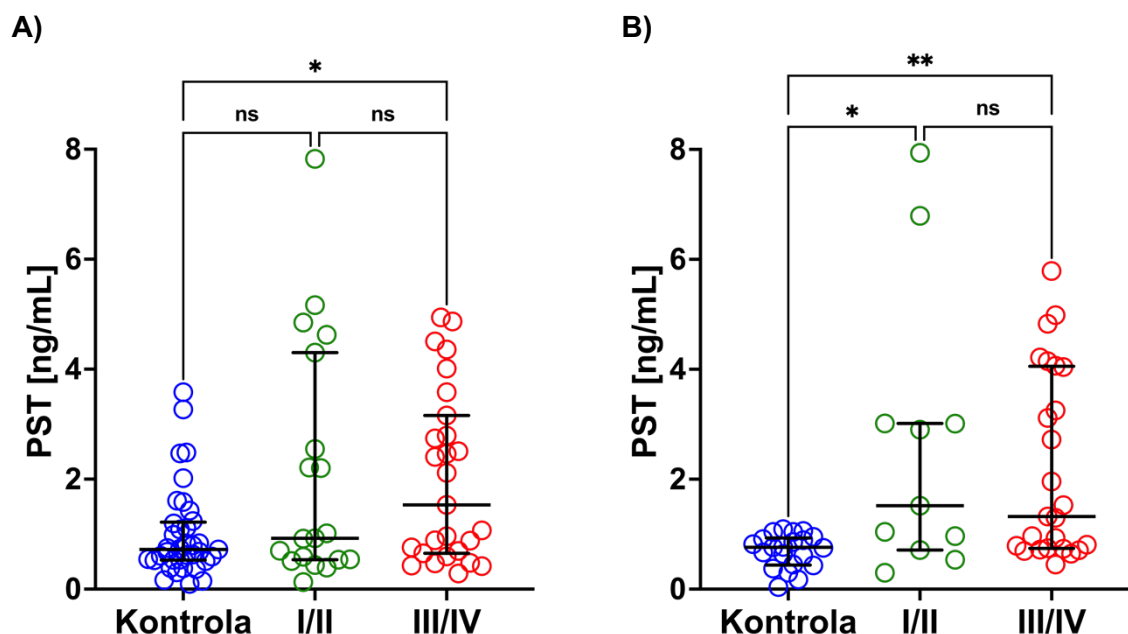
Ponadto, nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami I/II a III/IV ani dla CgA, ani dla żadnej z jej pochodnych (Rycina 13-16).



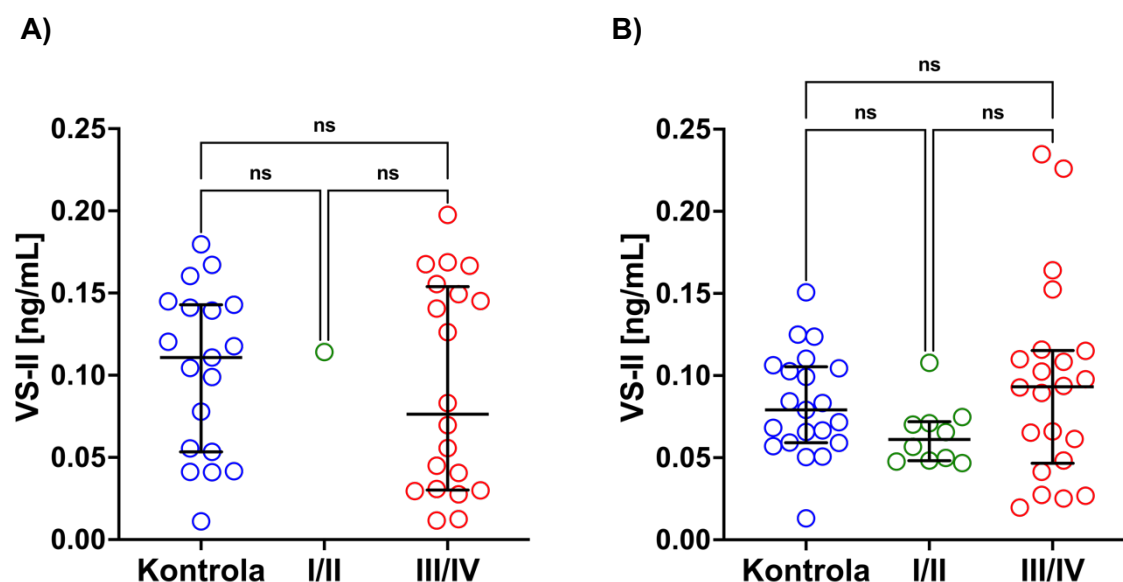
Rycina 13. Stężenie chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z I i II (I/II) oraz III i IV (III/IV) stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Stężenie CgA każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartyłowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; A: $p=0,0007$ (Kontrola vs. III/IV), $p=0,0231$ (Kontrola vs. I/II); B: $p=0,0002$ (Kontrola vs. III/IV), $p=0,0073$ (Kontrola vs. I/II); brak istotności statystycznej (ns).



Rycina 14. Stężenie katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z I i II (I/II) oraz III i IV (III/IV) stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Stężenie CST każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartyłowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; A: $p=0,0059$ (Kontrola vs. III/IV); B: $p=0,0008$ (Kontrola vs. III/IV); brak istotności statystycznej (ns).



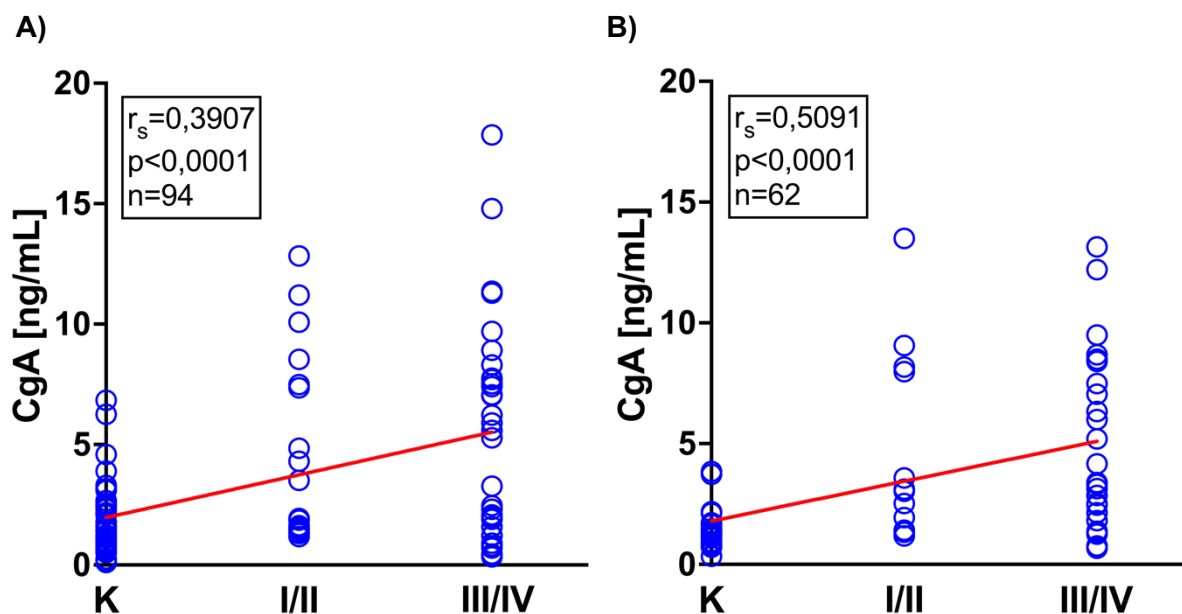
Rycina 15. Stężenie pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z I i II (I/II) oraz III i IV (III/IV) stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Stężenie PST każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; A: $p=0,0467$ (Kontrola vs. III/IV); B: $p=0,0035$ (Kontrola vs. III/IV), $p=0,0320$ (Kontrola vs. I/II); brak istotności statystycznej (ns).



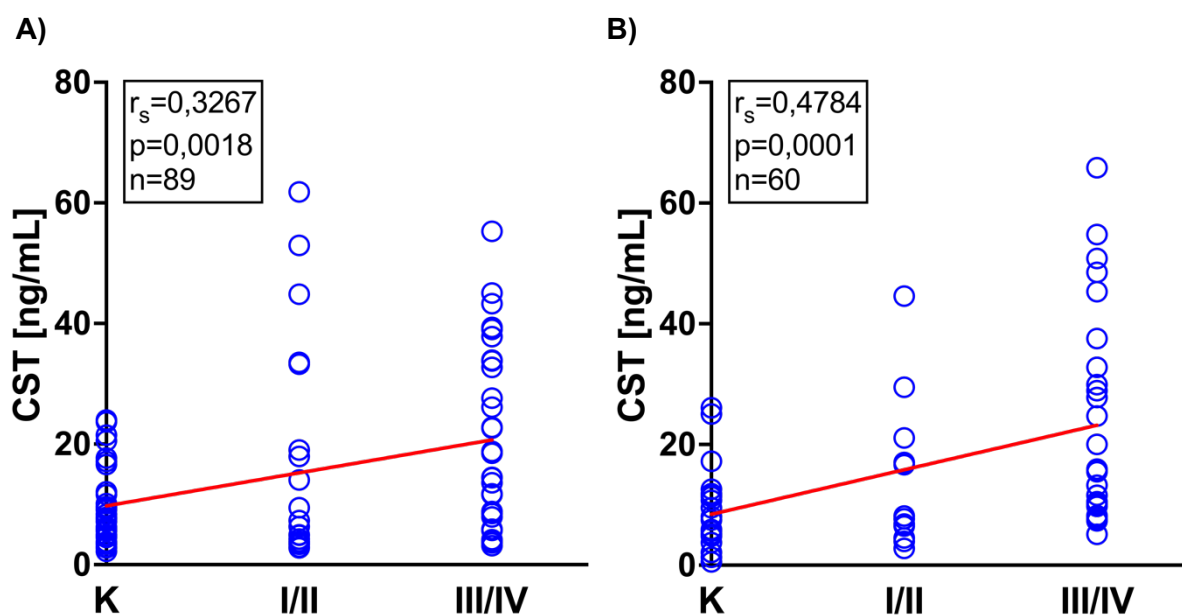
Rycina 16. Stężenie wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z I i II (I/II) oraz III i IV (III/IV) stopniem endometriozy w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Stężenie VS-II każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; brak istotności statystycznej (ns).

4.2.5 Korelacja stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym ze skalą rASRM

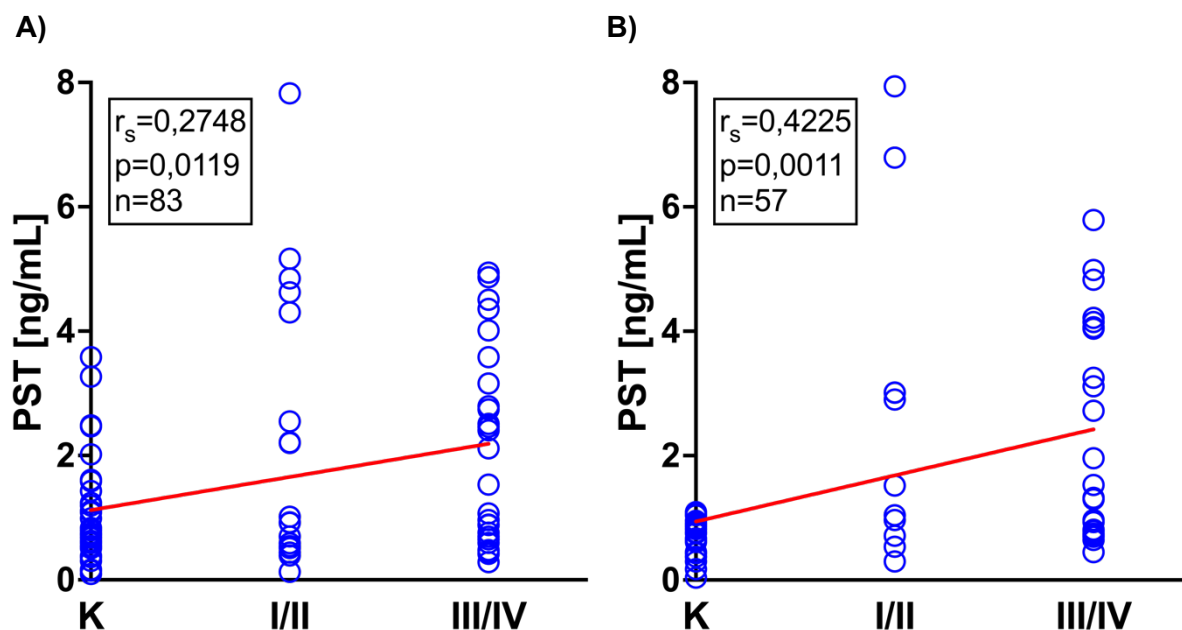
W analizie korelacji stężeń badanych substancji z pacjentkami podzielonymi wg skali rASRM (K – grupa kontrolna, I/II – pacjentki z I lub II stopniem endometriozy, III/IV – pacjentki z III lub IV stopniem endometriozy) wykazano słabą dodatnią korelację dla CgA ($r_s=0,3907$, $p<0,0001$ (surowica; Rycina 17A); $r_s=0,5091$, $p<0,0001$ (płyn otrzewnowy; Rycina 17B)), CST ($r_s=0,3267$, $p=0,0018$ (surowica; Rycina 18A); $r_s=0,4784$, $p=0,0001$ (płyn otrzewnowy; Rycina 18B)) oraz PST ($r_s=0,4225$, $p=0,0011$ (płyn otrzewnowy; Rycina 19B)). Natomiast dla PST oznaczanej w surowicy ($r_s=0,2748$, $p=0,0119$; Rycina 19A) oraz dla VS-II zarówno w surowicy ($r_s=0,0670$, $p=0,6813$; Rycina 20A), jak i w płynie otrzewnowym ($r_s=0,0223$, $p=0,8740$; Rycina 20B) nie ujawniono korelacji.



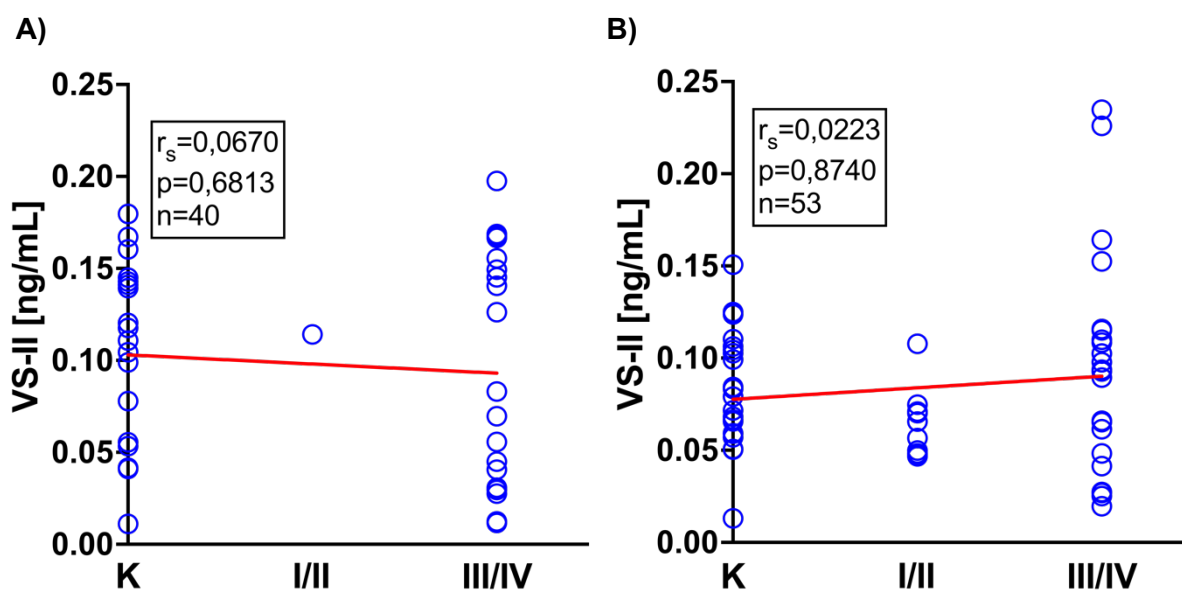
Rycina 17. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) ze skalą rASRM (I/II, III/IV) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K). Stężenie CgA każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono jako wykresy rozrzutu z linią regresji. Współczynniki korelacji Spearmana (r_s), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.



Rycina 18. Korelacja stężenia katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) ze skalą rASRM (I/II, III/IV) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K). Stężenie CST każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono jako wykresy rozrzutu z linią regresji. Współczynniki korelacji Spearmana (r_s), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.



Rycina 19. Korelacja stężenia pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) ze skalą rASRM (I/II, III/IV) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K). Stężenie PST każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono jako wykresy rozrzutu z linią regresji. Współczynniki korelacji Spearmana (r_s), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.



Rycina 20. Korelacja stężenia wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) ze skalą rASRM (I/II, III/IV) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K). Stężenie VS-II każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono jako wykresy rozrzutu z linią regresji. Współczynniki korelacji Spearmana (r_s), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.

4.2.6 Porównanie stężenia chromograniny A i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych

Porównano stężenia CgA i jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych. W tym celu grupę badaną podzielono na trzy podgrupy: pacjentki, u których zdiagnozowano torbiele endometrialne, pacjentki, u których zmiany endometriotyczne znajdowały się na otrzewnej oraz pacjentki, u których zmiany występowały jednocześnie w obu wymienionych lokalizacjach.

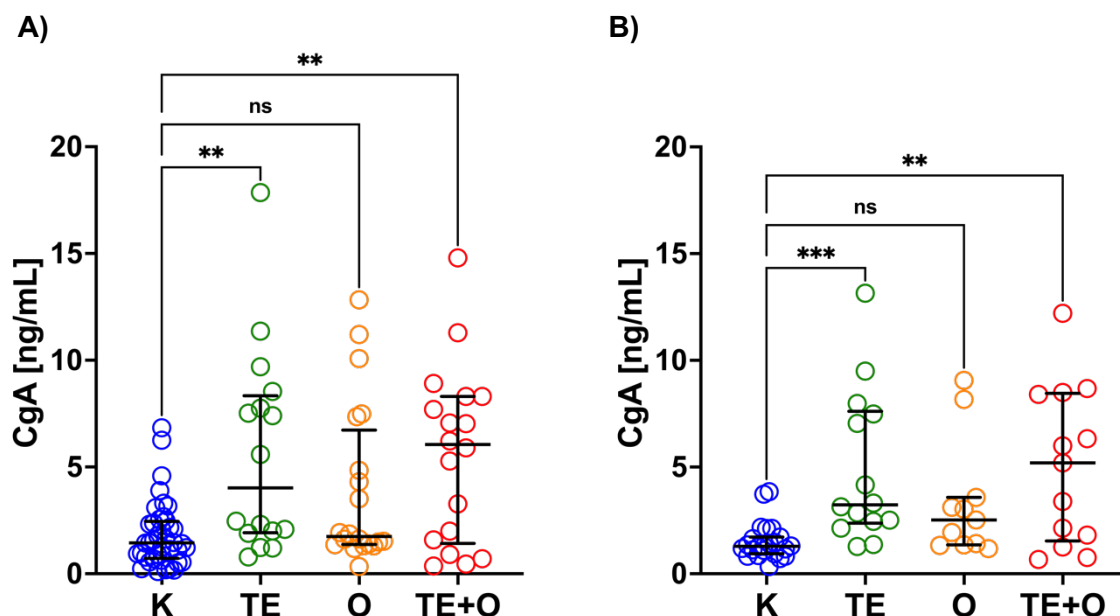
Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie CgA zarówno w surowicy ($p=0,0054$; Rycina 21A), jak i w płynie otrzewnowym ($p=0,0007$; Rycina 21B) u kobiet z torbielami endometrialnymi oraz w surowicy ($p=0,0076$; Rycina 21A) i w płynie otrzewnowym ($p=0,0090$; Rycina 21B) u pacjentek, u których odnotowano zmiany w obu lokalizacjach w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy stężeniami CgA ani w surowicy (Rycina 21A), ani w płynie otrzewnowym (Rycina 21B) u pacjentek ze zmianami endometriotycznymi na otrzewnej w porównaniu do grupy kontrolnej.

W przypadku CST istotnie zwiększone stężenie tego peptydu w porównaniu do grupy kontrolnej odnotowano w surowicy ($p=0,0278$; Rycina 22A) i w płynie otrzewnowym ($p=0,0081$; Rycina 22B) u pacjentek z torbielami endometrialnymi oraz w płynie otrzewnowym ($p=0,0055$; Rycina 22B) u kobiet posiadających jednocześnie torbiele endometrialne i zmiany na otrzewnej. Nie zaobserwowano istotności statystycznej pomiędzy stężeniami CST w surowicy u kobiet ze zmianami na otrzewnej, a także ze zmianami w obu lokalizacjach (Rycina 22A) oraz płynie otrzewnowym kobiet ze zmianami na otrzewnej (Rycina 22B) w porównaniu do pacjentek z grupy kontrolnej.

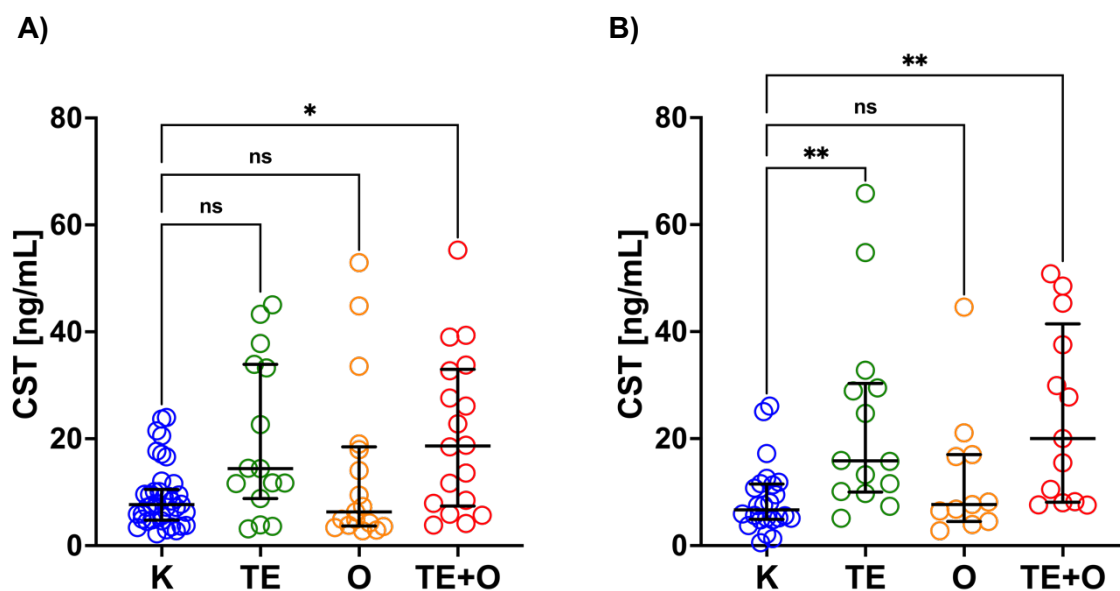
Zaobserwowano również istotnie wyższe stężenie PST w surowicy ($p=0,0338$; Rycina 23A) i w płynie otrzewnowym ($p=0,0155$; Rycina 23B) u pacjentek posiadających zmiany endometriotyczne w obu lokalizacjach w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach PST w porównaniu do kobiet zdrowych ani w surowicy (Rycina 23A), ani w płynie otrzewnowym (Rycina 23B) u pacjentek z torbielami i u pacjentek ze zmianami na otrzewnej.

W przypadku VS-II nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniem badanego peptydu w surowicy i płynie otrzewnowym pacjentek z torbielami endometrialnymi,

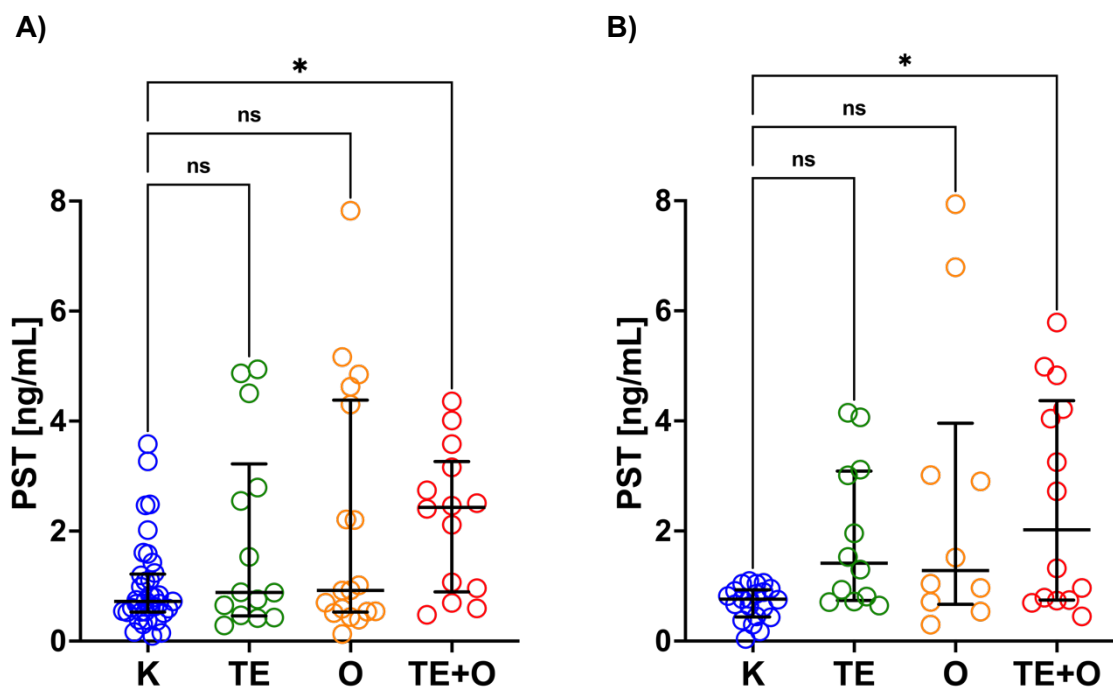
ze zmianami na otrzewnej oraz ze zmianami w obu lokalizacjach w porównaniu do kobiet bez endometriozy (Rycina 24).



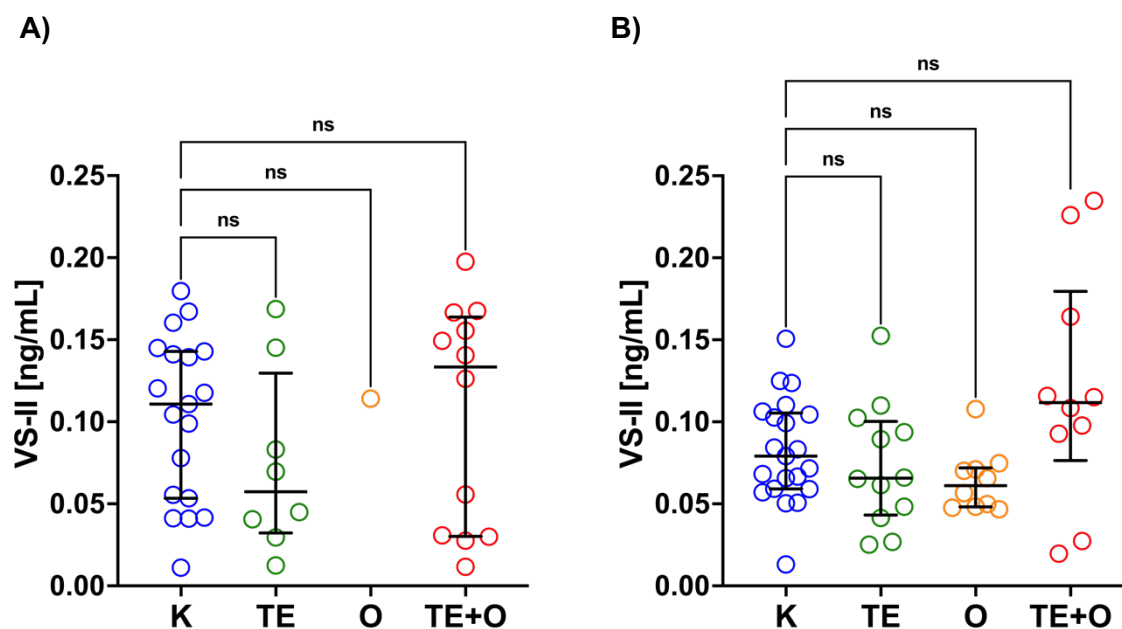
Rycina 21. Stężenie chromograniny A (CgA) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych: torbiele endometrialne (TE), zmiany na otrzewnej (O), zmiany w obu tych lokalizacjach (TE+O) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K). Stężenie CgA każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; A: $p=0,0054$ (K vs. TE), $p=0,0076$ (K vs. TE+O); B: $p=0,0007$ (K vs. TE), $p=0,0090$ (K vs. TE+O); brak istotności statystycznej (ns).



Rycina 22. Stężenie katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych: torbiele endometrialne (TE), zmiany na otrzewnej (O), zmiany w obu tych lokalizacjach (TE+O) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K). Stężenie CST każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; A: $p=0,0278$ (K vs. TE+O); B: $p=0,0081$ (K vs. TE), $p=0,0055$ (K vs. TE+O); brak istotności statystycznej (ns).



Rycina 23. Stężenie pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych: torbiele endometrialne (TE), zmiany na otrzewnej (O), zmiany w obu tych lokalizacjach (TE+O) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K). Stężenie PST każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; A: $p=0,0338$ (K vs. TE+O); B: $p=0,0155$ (K vs. TE+O); brak istotności statystycznej (ns).



Rycina 24. Stężenie wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z endometriozą w odniesieniu do lokalizacji zmian endometriotycznych: torbiele endometrialne (TE), zmiany na otrzewnej (O), zmiany w obu tych lokalizacjach (TE+O) w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (K). Stężenie VS-II każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; brak istotności statystycznej (ns).

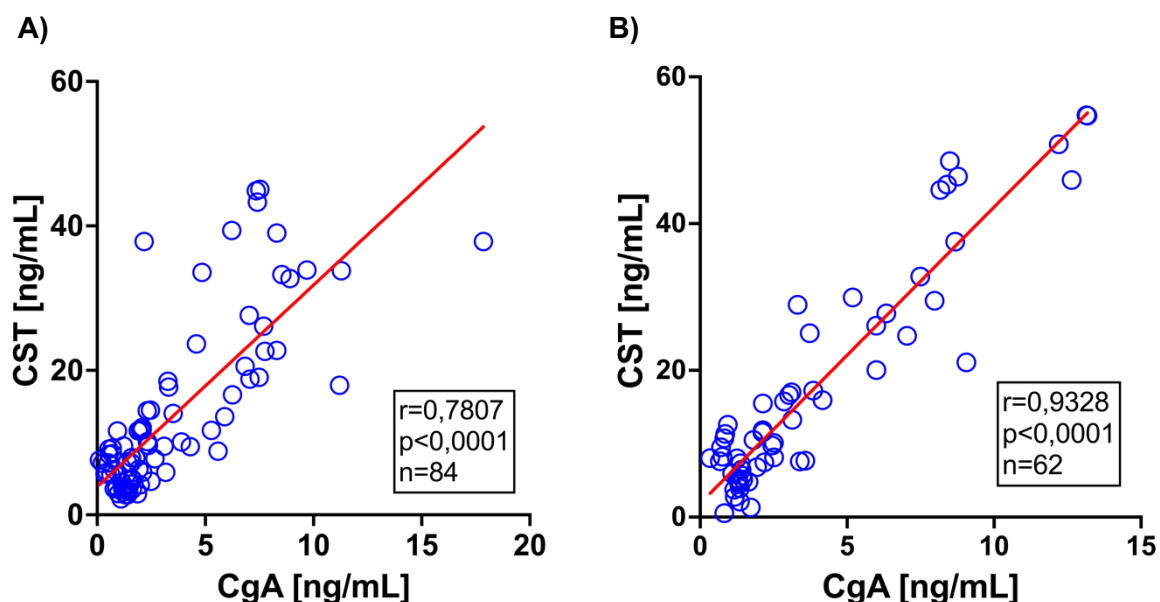
4.2.7 Korelacja stężenia chromograniny A ze stężeniami jej pochodnych w surowicy i płynie otrzewnowym

W analizie korelacji wykazano silną (w surowicy: $r=0,7807$, $p<0,0001$; Rycina 25A) oraz bardzo silną (w płynie otrzewnowym: $r=0,9328$, $p<0,0001$; Rycina 25B) korelację pomiędzy stężeniami CgA i CST.

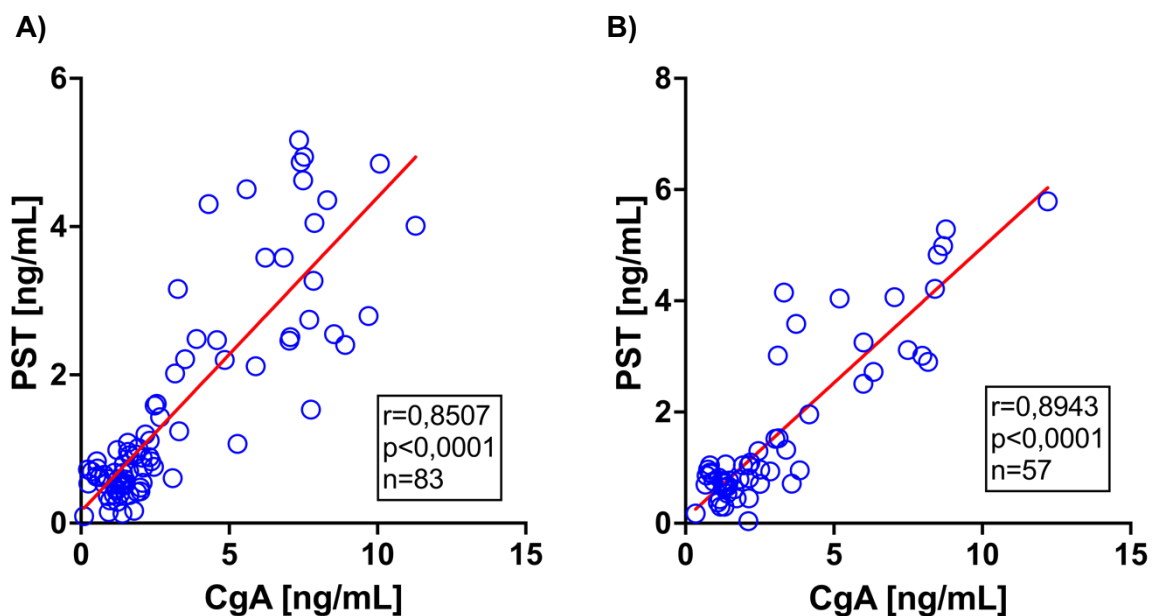
Zaobserwowano również silną korelację zarówno w surowicy ($r=0,8507$, $p<0,0001$; Rycina 26A), jak i w płynie otrzewnowym ($r=0,8943$, $p<0,0001$; Rycina 26B) pomiędzy stężeniami CgA i PST.

Nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem CgA i VS-II w surowicy ($r=0,0806$, $p=0,6210$; Rycina 27A) i w płynie otrzewnowym ($r=0,0016$, $p=0,9913$; Rycina 27B).

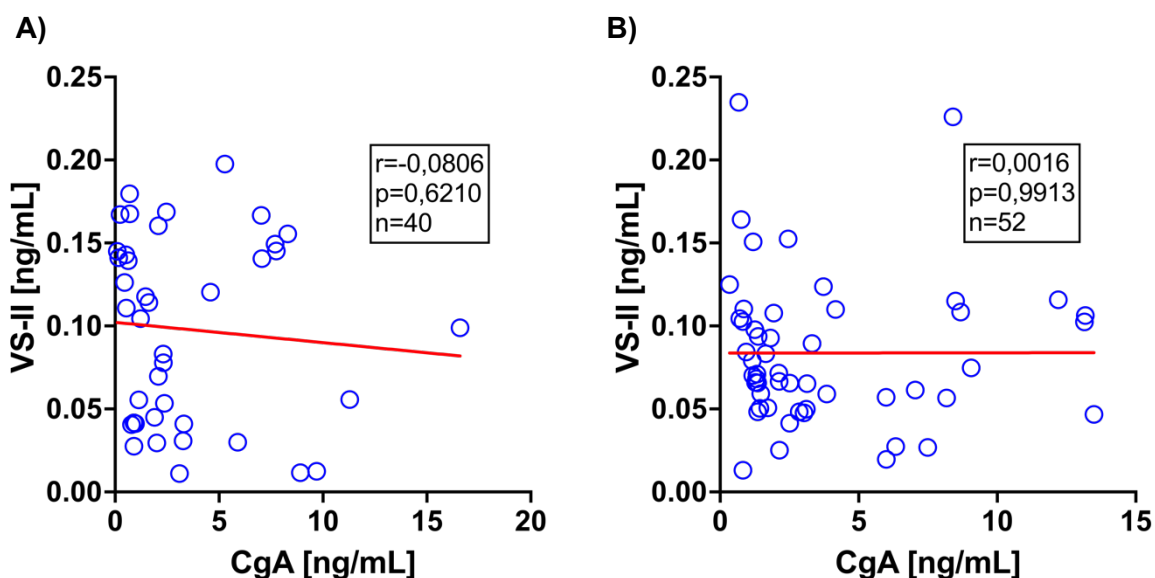
Dodatkowo, na mapie cieplnej macierzy korelacji, silne dodatnie korelacje odnotowano pomiędzy stężeniami CST i PST zarówno w surowicy ($r=0,9350$, $p<0,0001$; Rycina 28A), jak i w płynie otrzewnowym ($r=0,8340$, $p<0,0001$; Rycina 28B). Dodatkowo wykazano, że ani w surowicy (Rycina 28A), ani w płynie otrzewnowym (Rycina 28B) stężenia VS-II nie korelują ze stężeniami CgA oraz żadnej innej jej pochodnej.



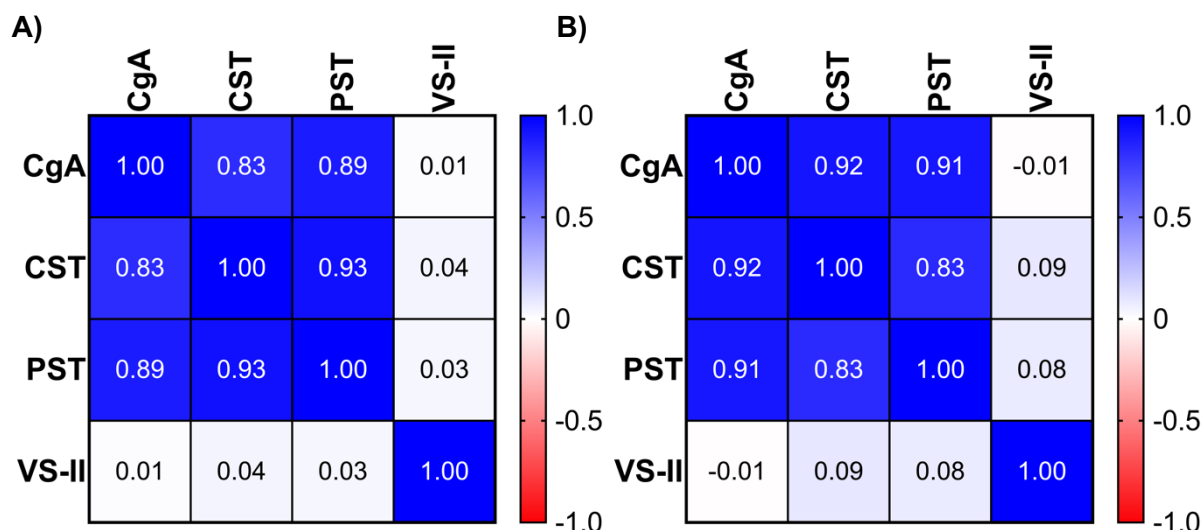
Rycina 25. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA) i katestatyny (CST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z grupy kontrolnej oraz badanej. Stężenie każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono jako wykresy rozrzutu z linią regresji. Współczynniki korelacji Pearsona (r), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.



Rycina 26. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA) i pankreastatyny (PST) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z grupy kontrolnej oraz badanej. Stężenie każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono jako wykresy rozrzutu z linią regresji. Współczynniki korelacji Pearsona (r), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.



Rycina 27. Korelacja stężenia chromograniny A (CgA) i wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z grupy kontrolnej oraz badanej. Stężenie każdej próbki oznaczono przy pomocy testów ELISA. Wyniki przedstawiono jako wykresy rozrzutu z linią regresji. Współczynniki korelacji Pearsona (r), wartości p (p) oraz liczby pacjentek (n) podano w ramkach obok wykresów.

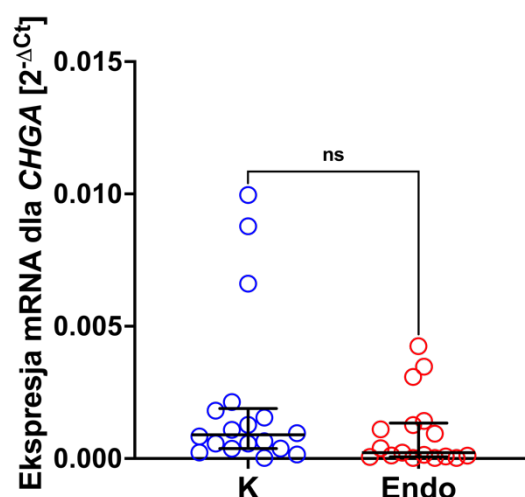


Rycina 28. Mapy cieplne macierzy korelacji pomiędzy stężeniami chromograniny A (CgA) i jej pochodnych katestatyny (CST), pankreastatyny (PST) i wazostatyny II (VS-II) w surowicy (A) i płynie otrzewnowym (B) u pacjentek z grupy kontrolnej oraz badanej. Wartości liczbowe przedstawiają współczynniki korelacji Pearsona.

4.3 Ekspresja mRNA dla genu *CHGA* we fragmentach tkanki zmian endometriotycznych oraz w endometrium eutopowym

Ocenę ekspresji genu kodującego chromograninę A (*CHGA*) dokonano przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym. Do analizy poziomu ekspresji genu *CHGA* użyto kontroli endogennej, genu referencyjnego *GAPDH*.

Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w poziomie ekspresji genu *CHGA* w tkance pobranej ze zmiany endometrioidalnej (torbiel endometrialna) w porównaniu do endometrium eutopowego od kobiet z grupy kontrolnej (Rycina 29).

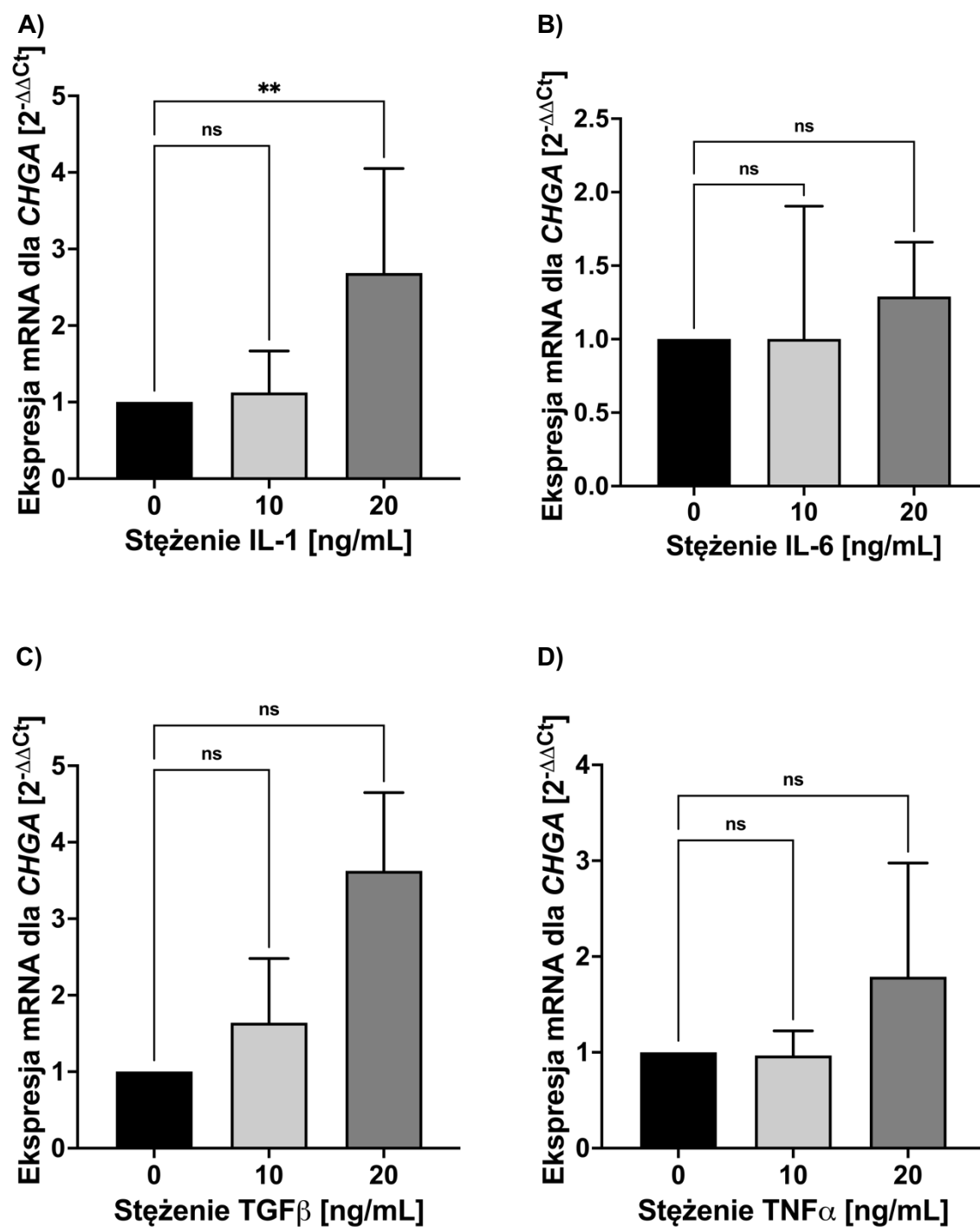


Rycina 29. Porównanie ekspresji mRNA dla genu *CHGA* we fragmentach torbieli endometrialnych pobranych od kobiet z grupy badanej (Endo) z ekspresją tego genu w endometrium eutopowym pobranym od kobiet z grupy kontrolnej (K). Poziomą ekspresję mRNA *CHGA* oceniono za pomocą reakcji RT-PCR. Wyniki przedstawiono z medianą i zakresem międzykwartylowym. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu U Manna-Whitneya; brak istotności statystycznej (ns).

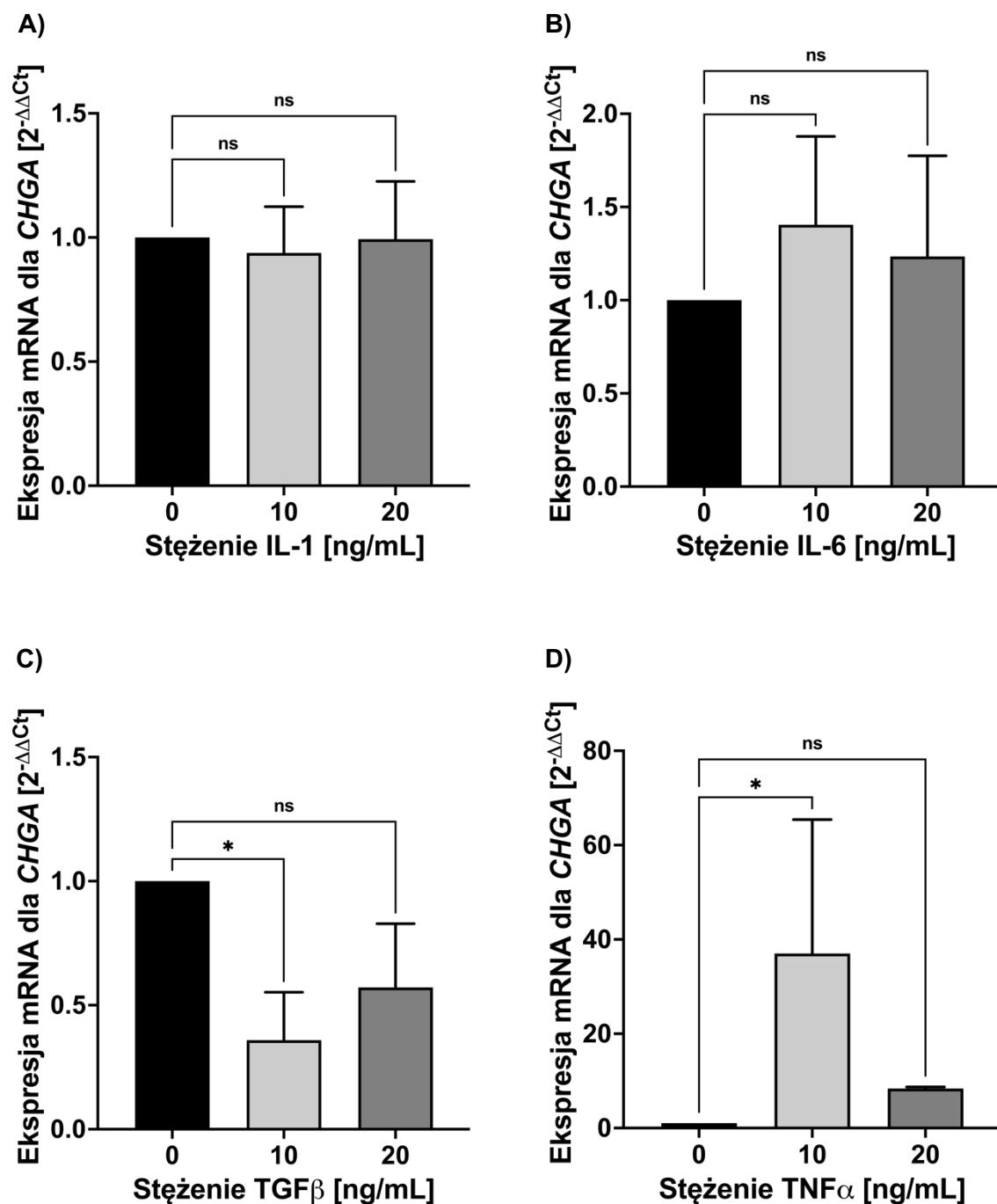
4.4 Ekspresja mRNA dla genu *CHGA* w liniach komórkowych 12Z oraz Ishikawa po stymulacji cytokinami

Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *CHGA* w komórkach linii 12Z po stymulacji IL-1 w stężeniu 20 ng/mL ($p=0,0036$; Rycina 30A), ale dla stężenia 10 ng/mL nie odnotowano takiego efektu (Rycina 30A). Po inkubacji komórek 12Z z IL-6 (Rycina 30B), TGF β (Rycina 30C) oraz TNF (Rycina 30D) nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji mRNA dla genu *CHGA* w porównaniu do komórek, które hodowano w warunkach standardowych.

W komórkach Ishikawa zmniejszenie ekspresji badanego genu zaobserwowano po stymulacji TGF β w stężeniu 10 ng/mL ($p=0,0114$; Rycina 31C), a dla stężenia 20 ng/mL wartość p jest na granicy istotności statystycznej. Natomiast wzrost poziomu ekspresji mRNA dla genu *CHGA* odnotowano po inkubacji z TNF w stężeniu 10 ng/mL ($p=0,0178$; Rycina 31D). Dla stężenia 20 ng/mL nie wykazano takiego efektu, ponieważ większość komórek po 24 godzinach inkubacji było martwych. Po stymulacji komórek Ishikawa IL-1 (Rycina 31A) oraz IL-6 (Rycina 31B) dla żadnego stężenia nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji mRNA dla genu *CHGA* w porównaniu do komórek, które hodowano w warunkach standardowych.



Rycina 30. Ekspresja mRNA dla genu chromograniny A (*CHGA*) w komórkach linii 12Z pod wpływem stymulacji wybranymi cytokinami: IL-1 (A), IL-6 (B), TGFβ (C), TNF (D) w stężeniach 10 ng/mL oraz 20 ng/mL. Poziom ekspresji mRNA *CHGA* oceniono za pomocą reakcji qRT-PCR oraz pokazano w porównaniu do komórek rosnących tylko w pożywce hodowlanej (0 ng/mL). Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; A: $p=0,0036$ (0 vs. 20); brak istotności statystycznej (ns).



Rycina 31. Ekspresja mRNA dla genu chromograniny A (*CHGA*) w komórkach linii Ishikawa pod wpływem stymulacji wybranymi cytokinami: IL-1 (A), IL-6 (B), TGFβ (C), TNF (D) w stężeniach 10 ng/mL oraz 20 ng/mL. Poziom ekspresji mRNA *CHGA* oceniono za pomocą reakcji qRT-PCR oraz pokazano w porównaniu do komórek rosnących tylko w pożywce hodowlanej (0 ng/mL). Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna; C: $p=0,0114$ (0 vs. 10); D: $p=0,0178$ (0 vs. 10); brak istotności statystycznej (ns).

5. DYSKUSJA

Niniejsza praca jest pierwszą, w której wykazano ekspresję CgA w ogniskach tkanki endometriotycznej. W przeprowadzonych badaniach immunohistochemicznych udowodniono, że CgA wykazuje ekspresję w nabłonku gruczołowym (w zmianach endometrioidalnych u pacjentek z endometriozą), w którym zaobserwowano grupy komórek chromograninopozytywnych. U kobiet z grupy kontrolnej jedynie pojedyncze komórki endometrium wykazują chromograninopoztywne barwienie. Pozostaje zadać pytanie, z jakiego powodu komórki gruczołowe w tkance endometrioidalnej produkują dużo więcej CgA? Być może zwiększoną ekspresję CgA w komórkach nabłonkowych można powiązać ze zjawiskiem konwersji neuroendokrynnej, które wcześniej zostało opisane w nowotworach piersi [150, 151], guzach skóry [152] oraz w raku prostaty [153-155]. Co więcej, Wang i wsp. w 2009 roku zaobserwowali obecność pojedynczych komórek neuroendokrynnych (oznaczając immunohistochemicznie synaptofizynę oraz enolazę swoistą dla neuronów) w endometrium eutopowym kobiet bez endometriozy w wydzielniczej i menstruacyjnej fazie cyklu, a nie, jak w niniejszej pracy – w fazie proliferacyjnej. Wykazali oni również zwiększoną liczbę komórek neuroendokrynnych (przy pomocy wyżej wymienionych markerów) w tkance endometrium u kobiet z endometriozą [156], ale nie badali obecności omawianych komórek w zmianach endometriotycznych.

W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach, z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym, nie dowiedziono istotnych różnic w ekspresji CgA na poziomie mRNA w torbielach endometrialnych w porównaniu do endometrium eutopowego pobranego od pacjentek kontrolnych. Na podstawie przeprowadzonych reakcji immunohistochemicznych wiadomo jednak, że w zmianach endometrioidalnych ekspresja CgA jest ograniczona jedynie do komórek nabłonkowych. Zmiany endometriotyczne charakteryzują się wysokim stopniem zwłóknienia, co powoduje, że ich budowa histologiczna jest znacząco odmienna od endometrium eutopowego. Dlatego można przypuszczać, że brak istotnej różnicy w poziomie ekspresji genu *CHGA* pomiędzy grupą badanych i kontrolnych pacjentek może wynikać z faktu, że proporcje pomiędzy komórkami nabłonkowymi a pościeliskiem są inne niż w tkance eutopowej.

W literaturze dostępna jest jedna publikacja, w której autorzy opisują podwyższone stężenie CgA w surowicy w odniesieniu do endometriozy [147]. Tsao i wsp. w 2007 roku, próbując wykryć raka we wczesnym stadium w populacji bezobjawowej, oznaczyli markery

nowotworowe (w tym CgA) u 12100 osób. Spośród tej liczby pacjentów, zaledwie u jednej kobiety z endometriozą (bez dodatkowych chorób) zauważono podwyższone stężenie CgA [147]. Warto podkreślić, że w przeprowadzonych w niniejszej pracy analizach skoncentrowano się tylko na pacjentkach z potwierdzoną laparoskopowo oraz histopatologicznie endometriozą, a wyniki porównano do grupy kontrolnej (kobiet hospitalizowanych/operowanych z innych przyczyn niż endometrioza). Oprócz CgA zbadano też jej pochodne: CST, PST i VS-II oraz poszerzono analizę o badanie stężenia tych peptydów w płynie otrzewnowym. Wykazano podwyższone stężenia CgA, CST oraz PST, ale nie VS-II, w surowicy i płynie otrzewnowym u pacjentek z diagnozą endometriozy w porównaniu do grupy kontrolnej.

Na podstawie wyników, które otrzymano, można wnosić, że wzrost stężenia CgA jest wynikiem wydzielania tego białka przez tkankę endometrioidalną. Co więcej, wzrost stężenia CgA korelował ze stopniem zaawansowania choroby, co może sugerować, że pochodzi ona z ognisk endometriozy. Istnieją doniesienia, w których wykazano podwyższone stężenie urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA) w endometrium [157, 158] oraz w płynie otrzewnowym [157] u kobiet z endometriozą. Jak wiadomo, plazmina jest enzymem biorącym udział w proteolitycznym rozkładzie CgA [104, 106]. CgA pełnej długości ma właściwości antyadhezyjne, ale plazmina zmienia je na promujące adhezję [107], co może być czynnikiem ułatwiającym implantację komórek pochodzących ze wstecznej miesiączki wg teorii patogenezy endometriozy Sampsona [22] oraz odgrywać kluczową rolę w powstawaniu zmian endometriotycznych. Jak wspomniano we wstępie, t-PA jest wyraźnie powiązany z komórkami produkującymi CgA. W stanach patofizjologicznych charakteryzujących się zwiększoną produkcją CgA, takich jak chociażby omawiana w niniejszej pracy choroba, zrozumienie interakcji między CgA a mikrośrodowiskiem wokół zmian endometriotycznych bogatym w plazminogen/plazminę może rzucać nowe światło na mechanizmy odpowiedzialne za implantację komórek endometriotycznych w miejscach ectopowych. Zjawisko to jednak nie jest dobrze poznane i wymaga dalszych badań.

W oparciu o analizę literatury istnieją także przesłanki wskazujące, że w patogenezie endometriozy istotną rolę odgrywają czynniki regulujące pobór i wydatek energii: leptyna, grelina, adiponektyna czy rezystyna [159-166]. Biorą one udział w kilku mechanizmach uczestniczących w patofizjologii zmian chorobowych, takich jak: wzrost komórek endometriotycznych, proliferacja, angiogeneza czy/i lokalna odpowiedź immunologiczna/zapalna [162, 163]. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zgromadzono dowody na to,

że w grupie tych czynników znajdują się również, będące przedmiotem badań, pochodne CgA: katestatyna i pankreastatyna.

Katestatyna, biologicznie aktywny fragment CgA jest silnym, endogennym inhibitorem uwalniania katecholamin [127, 167]. Oprócz znanych funkcji związanych z regulacją układu sercowo-naczyniowego oraz działania przeciwdrobnoustrojowego, reguluje ona migrację i proliferację komórek, produkcję i uwalnianie cytokin oraz uczestniczy w regulacji angiogenezy [117, 118, 127, 167, 168]. W literaturze naukowej nie odnotowano danych skupiających się na obecności CST w tkankach endometrium pochodzącego od pacjentek bez endometriozy i kobiet z endometriozą. Jedynie w dwóch pracach przedstawiono wyniki dotyczące występowania zarówno CgA, jak i CST w układzie rozrodczym żeńskim [169, 170]. Warto jednak zaznaczyć, że prace te dotyczą pacjentek z zaburzeniami w przebiegu ciąży. Z kolei w jednej pracy przeglądowej Bralewska i wsp., w oparciu o analizę najnowszych i najbardziej istotnych badań *in vitro*, *in vivo* oraz klinicznych, próbują wyjaśnić wpływ CST na procesy molekularne związane ze stanem przedrzucawkowym u kobiet ciężarnych [171].

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach, po raz pierwszy wykazano podwyższone stężenie CST w surowicy oraz w płynie otrzewnowym pochodzących od kobiet z endometriozą. Istotnie wyższe jej stężenie w obu wymienionych płynach odnotowano w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej i co ciekawe, w obu grupach zaobserwowano wyższe wartości stężeń CST niż CgA. Wykazano, że zarówno w surowicy, jak i w płynie otrzewnowym istotnie wyższe stężenie CST występuje w grupie kobiet z III i IV stopniem endometriozy w porównaniu do grupy kontrolnej. W analizie korelacji stężenia CST i stopnia zaawansowania choroby odnotowano słabą dodatnią korelację w obu oznaczanych płynach. Po podziale grupy badanej ze względu na lokalizację zmian endometriotycznych, w surowicy pobranej od pacjentek z torbielami i zmianami na otrzewnej oznaczono istotnie wyższe stężenie CST, a w płynie otrzewnowym zarówno kobiety z torbielami, jak i z torbielami oraz zmianami na otrzewnej miały podwyższone stężenie CST.

Brak opracowań w tym zakresie uniemożliwia przeprowadzenie dyskusji, dlatego mechanizm i znaczenie zwiększonego stężenia CST pozostaje do wyjaśnienia. Biorąc jednak pod uwagę właściwości biologiczne tego peptydu, jest prawdopodobne, że odgrywa on istotną rolę w rozwoju i przebiegu endometriozy. W literaturze zmniejszone stężenia krążącej CST opisano u otyłych pacjentów [172] oraz u osób z nadciśnieniem pierwotnym [173]. Theurl i wsp. sugerują, że obniżony poziom CST może zwiększać ryzyko późniejszego rozwoju

nadciśnienia [174]. Istotnym jest, że w badaniach *in vivo* wykazano, że CST promuje angiogenezę [90, 174] oraz zwiększa perfuzję krwi i liczbę naczyń włosowatych, działając poprzez podstawowy mechanizm zależny od czynnika wzrostu fibroblastów [174]. Theurl i wsp. w badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* dodatkowo udowodnili, że peptyd ten w dawce 1 nmol/L hamuje apoptozę oraz indukuje chemotaksję, migrację i proliferację ludzkich komórek śródbłona żyły pępowinowej [174]. Egger i wsp. w 2008 roku udokumentowali, że CST indukuje ukierunkowaną migrację ludzkich monocytów krwi, co zalicza ją do grupy cytokin prozapalnych [175]. Z drugiej strony Rabbi i wsp. wykazali, że leczenie CST w dawce 1,5 mg/kg/dzień znacząco zmniejszyło poziom prozapalnych cytokin w jelicie grubym [176]. Badacze dodatkowo, aby potwierdzić swoje obserwacje *in vivo* dotyczące przeciwzapalnego działania CST wywieranego na populację makrofagów M1, przeprowadzili eksperymenty *in vitro*, w których w obecności CST zaobserwowali znaczący spadek ekspresji markerów makrofagów M1 (*iNOS*, *Mcp1*) związany z obniżeniem ekspresji cytokin prozapalnych (IL-6, IL-16, IL-1 β i TNF) [176]. Obserwacje te wspierają pogląd, że CST wywiera działanie przeciwzapalne poprzez zmniejszenie nie tylko uwalniania cytokin prozapalnych, ale także poprzez regulację makrofagów M1. Uzyskane wyniki sugerują, iż CST może pełnić ochronną rolę w endometriozie, stanowiąc interesujący punkt wyjścia do dalszych badań.

Pankreastatyna pełni różnorodne funkcje biologiczne, między innymi reguluje wydzielanie insuliny oraz wpływa na metabolizm glukozy i lipidów, które są ściśle powiązane z procesami zapalnymi [88, 177]. W przeprowadzonych badaniach zarówno w surowicy, jak i w płynie otrzewnowym u pacjentek z endometriozą odnotowano istotnie wyższe stężenie PST w porównaniu do grupy kontrolnej. Co istotne, w surowicy kobiet chorujących na endometriozę zaobserwowano istotnie wyższe stężenie badanego peptydu, które korespondowało z III i IV stopniem zaawansowania choroby, co sugeruje, że zwiększony poziom PST najprawdopodobniej jest spowodowany wstępowaniem wielu ognisk endometriozy. Z kolei w płynie otrzewnowym istotnie wyższe stężenie badanego peptydu odnotowano zarówno u pacjentek z łagodniejszą postacią choroby (I i II stopień), jak i z bardziej zaawansowaną chorobą. Zwiększone stężenie PST u pacjentek z endometriozą można tłumaczyć jej właściwościami prozapalnymi. Wyniki te korespondują z ostatnio udokumentowanymi badaniami, w których wykazano, że zwiększenie fizjologicznego poziomu PST znacznie zwiększa ekspresję genów prozapalnych (np. IL-1 β , i in.), zmniejsza ekspresję genów przeciwzapalnych (takich jak: IL-10 czy arginaza-1) oraz ma związek z rekrutacją makrofagów

otrzewnowych [88]. Rola PST w rozwoju i przebiegu omawianego schorzenia pozostaje do zbadania, jednak uzyskane wyniki wskazują na jej udział w patogenezie endometriozy.

Ponadto, w niniejszej pracy wykonano oznaczenia wazostatyny II, która jest N-końcowym fragmentem CgA [113, 178]. Wywiera ona szerokie spektrum działań na układ sercowo-naczyniowy [140]. Jest szczególnie znana ze swojego silnego proangiogenego, przeciwmiażdżycowego oraz przeciwzapalnego działania, a jej obniżone poziomy są związane z obecnością i ciężkością choroby niedokrwiennej serca [179, 180] czy cukrzycą typu II [179].

Jak dotąd, nigdy nie zbadano poziomu VS-II u pacjentek z endometriozą. W oznaczeniach wykonanych w niniejszej pracy, w surowicy i płynie otrzewnowym u pacjentek z endometriozą ujawniono brak różnic w stężeniu tej substancji w porównaniu do grupy kontrolnej. Obserwacja ta wydaje się być niezwykle ciekawa, ponieważ wiadomo, że patogeneza omawianego schorzenia jest ściśle związana z angiogenezą, która umożliwia wzrost tkanki endometrioidalnej [179], a jak przytoczono wcześniej, badany peptyd promuje angiogenezę [140] poprzez zwiększenie gęstości naczyń włosowatych i tętniczek [181]. Jak wspomniano wyżej, w endometriozie obserwowany jest podwyższony poziom uPA [157, 158], a Colombo i wsp. udowodnili, że enzym ten rozkłada zarówno CgA, jak i VS-II do proadhezyjnego peptydu N-końcowego, odpowiadającego VS-I [107]. Rozkład VS-II w środowisku bogatym w plazminę może być powodem otrzymanych wyników. Poza tym w badaniach, które przedstawiono w niniejszej dysertacji, nie zaobserwowano korelacji ani pomiędzy poziomem VS-II a stopniem endometriozy, ani pomiędzy stężeniem VS-II i innych pochodnych. Ujawniono natomiast, że stężenie VS-II w surowicy wykazuje bardzo silną korelację ze stężeniem VS-II w płynie otrzewnowym u pacjentek zarówno z grupy badanej, jak i kontrolnej, co tym bardziej utwierdza nas w przekonaniu, że otrzymane wyniki są wiarygodne. Brak różnicy w stężeniach omawianego fragmentu CgA pomiędzy grupami potwierdza, że pacjentki zostały wybrane z największą starannością, gdyż obniżony poziom VS-II zaobserwowano w wielu powszechnych schorzeniach, m.in. w miażdżycy [180, 182], chorobie niedokrwiennej serca [179], niewydolności serca [183] czy cukrzycy typu 2 [179], a kwalifikując pacjentki do badania wyeliminowano te, u których zdiagnozowano jakiekolwiek choroby przewlekłe.

Mikrośrodowisko zmian endometriotycznych jest niezwykle istotne i pozostaje przedmiotem badań nad tą jednostką chorobową. Dlatego w niniejszej pracy próbowano określić znaczenie podwyższonego poziomu CgA w przebiegu endometriozy. W tym celu

sprawdzono jak wybrane cytokiny prozapalne, takie jak: IL-1, IL-6, TGF β oraz TNF działają na komórki 12Z (immortalizowane ludzkie komórki endometrialne) oraz Ishikawa (gruczolakorak endometrium). Zwiększoną ekspresję genu dla CgA w linii komórkowej 12Z zaobserwowano po inkubacji z IL-1, a w komórkach Ishikawa po inkubacji z TNF. Natomiast zmniejszona ekspresja CgA na poziomie mRNA wystąpiła po inkubacji komórek Ishikawa z TGF β . We wcześniejszych badaniach potwierdzono, że IL-1 oraz TNF pełnią rolę w patogenezie endometriozy [40, 184]. Mimo to niektórzy badacze raportowali, że stężenia tych cytokin nie różnią się od tych z płynu otrzewnowego grupy kontrolnej [32, 36, 185]. Zarówno IL-1 jak i TNF są silnymi induktorami IL-6 [186]. Udowodniono, że stężenie IL-6 w płynie otrzewnowym pobranym od pacjentek z endometriozą jest podwyższone i koreluje dodatnio z zaawansowaniem choroby [35]. Wzrost ekspresji CgA może być zatem spowodowany środowiskiem prozapalnym występującym wokół zmian endometriotycznych. Postulowano też, że jednym z istotnych elementów etiopatogenezy endometriozy jest autofagia [187]. Istnieje doniesienie [188], w którym udowodniono, że jej indukcja może być związana ze wzrostem ekspresji CgA, co pozwala przypuszczać, że w komórkach endometriotycznych te dwa procesy również są ze sobą powiązane, jednak sprawdzenie i potwierdzenie tego zjawiska wymaga dalszych badań.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. W skupiskach komórek nabłonka gruczołowej tkanki pobranej od pacjentek z endometriozą zidentyfikowano obecność chromograniny A. Natomiast w endometrium eutopowym u pacjentek z grupy kontrolnej białko to występuje tylko w pojedynczych komórkach.
2. Zarówno w surowicy, jak i w płynie otrzewnowym pacjentek ze zdiagnozowaną endometriozą zaobserwowano istotnie wyższe stężenia chromograniny A oraz jej pochodnych: katestatyny i pankreastatyny, ale nie wazostatyny II w porównaniu do surowicy i płynu otrzewnowego pobranych od pacjentek z grupy kontrolnej.
3. Nie wykazano istotnych różnic ekspresji mRNA dla genu *CHGA* we fragmentach torbieli endometrialnych pobranych od pacjentek z endometriozą w porównaniu do endometrium eutopowego pacjentek zdrowych.
4. Podwyższoną ekspresję genu *CHGA* zaobserwowano w komórkach 12Z po stymulacji IL-1 oraz w komórkach Ishikawa po stymulacji TNF. Obniżoną ekspresję wykazano po inkubacji komórek Ishikawa z TGF β .
5. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można przypuszczać, że chromogranina A może odgrywać istotną rolę w etiopatogenezie endometriozy oraz że zarówno CgA, jak i jej pochodne obecne w płynach ustrojowych mogą być obiecującym wskaźnikiem w małoinwazyjnej diagnostyce tej choroby oraz/lub potencjalnym celem terapeutycznym.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Benagiano, G., I. Brosens, and D. Lippi, *The history of endometriosis*. Gynecol Obstet Invest, 2014. **78**(1): p. 1-9.
2. Giudice, L.C. and L.C. Kao, *Endometriosis*. Lancet, 2004. **364**(9447): p. 1789-99.
3. Broi, M.G.D., R.A. Ferriani, and P.A. Navarro, *Ethiopathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility*. JBRA Assist Reprod, 2019. **23**(3): p. 273-280.
4. Vercellini, P., et al., *Endometriosis: pathogenesis and treatment*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(5): p. 261-75.
5. Zondervan, K.T., et al., *Endometriosis*. Nat Rev Dis Primers, 2018. **4**(1): p. 9.
6. Zegers-Hochschild, F., et al., *The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017*. Hum Reprod, 2017. **32**(9): p. 1786-1801.
7. Shafrir, A.L., et al., *Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018. **51**: p. 1-15.
8. Taylor, H.S., A.M. Kotlyar, and V.A. Flores, *Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations*. Lancet, 2021. **397**(10276): p. 839-852.
9. Farquhar, C.M., *Extracts from the "clinical evidence". Endometriosis*. Bmj, 2000. **320**(7247): p. 1449-52.
10. Dubernard, G., et al., *Quality of life after laparoscopic colorectal resection for endometriosis*. Hum Reprod, 2006. **21**(5): p. 1243-7.
11. Collin, G.R. and J.C. Russell, *Endometriosis of the colon. Its diagnosis and management*. Am Surg, 1990. **56**(5): p. 275-9.
12. Sonavane, S.K., K.P. Kantawala, and C.O. Menias, *Beyond the boundaries-endometriosis: typical and atypical locations*. Curr Probl Diagn Radiol, 2011. **40**(6): p. 219-32.
13. Basta, A., et al., *Stanowisko Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące diagnostyki i metod leczenia endometriozy*. Ginekologia Polska, nr 11, 2012, 2012.
14. Fuldeore, M.J. and A.M. Soliman, *Prevalence and Symptomatic Burden of Diagnosed Endometriosis in the United States: National Estimates from a Cross-Sectional Survey of 59,411 Women*. Gynecol Obstet Invest, 2017. **82**(5): p. 453-461.
15. Agarwal, S.K., W.G. Foster, and E.J. Groessl, *Rethinking endometriosis care: applying the chronic care model via a multidisciplinary program for the care of women with endometriosis*. Int J Womens Health, 2019. **11**: p. 405-410.
16. Della Corte, L., et al., *The Burden of Endometriosis on Women's Lifespan: A Narrative Overview on Quality of Life and Psychosocial Wellbeing*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(13).
17. Skręt, A., et al., *Endometrioza o potrójnej lokalizacji: w przegrodzie odbytniczo-pochwowej, w bliźnie po cięciu cesarskim oraz w jajniku – opis przypadku*. Przegląd menopauzalny, 2011. **15**(5): p. 412-414.
18. Soliman, A.M., et al., *Real-World Evaluation of Direct and Indirect Economic Burden Among Endometriosis Patients in the United States*. Adv Ther, 2018. **35**(3): p. 408-423.
19. Casalechi, M., et al., *Endometriosis and related pelvic pain: association with stress, anxiety and depressive symptoms*. Minerva Obstet Gynecol, 2021. **73**(3): p. 283-289.
20. Canis, M., et al., *Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996*. Fertil Steril, 1997. **67**(5): p. 817-21.
21. Wielgoś, M.Z., *Endometrioza*. 2010: Gdańsk.

22. Sampson, J.A., *Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation*. Am J Pathol, 1927. **3**(2): p. 93-110.43.
23. *Retrograde menstruation*. Lancet, 1983. **2**(8340): p. 25-6.
24. Meyer, R., *Über den staude der frage der adenomyosites adenomyoma in allgemeinen und adenomyometritis sarcomastosa*. Zentralb Gynakol, 1919. **43**:745-50.
25. Halban, J., *Hysteroadenosis metastica (die lyphogene genes dersog, adenofibromatosis hetertopica)*. Vein. Klin. Wochenschr., 1924. **37**: 1205.
26. Parente Barbosa, C., et al., *The effect of hormones on endometriosis development*. Minerva Ginecol, 2011. **63**(4): p. 375-86.
27. Greaves, E., et al., *Estradiol is a critical mediator of macrophage-nerve cross talk in peritoneal endometriosis*. Am J Pathol, 2015. **185**(8): p. 2286-97.
28. Tran, L.V., et al., *Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis*. Hum Reprod, 2009. **24**(4): p. 835-41.
29. Bulun, S.E., *Endometriosis*. N Engl J Med, 2009. **360**(3): p. 268-79.
30. Attia, G.R., et al., *Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2897-902.
31. Matarese, G., et al., *Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(7): p. 2483-7.
32. Dziunycz, P., et al., *Elevated ghrelin levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: associations with vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory cytokines*. Fertil Steril, 2009. **92**(6): p. 1844-9.
33. Scutiero, G., et al., *Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the Literature*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 7265238.
34. Huang, Q., et al., *Dioxin-like rather than non-dioxin-like PCBs promote the development of endometriosis through stimulation of endocrine-inflammation interactions*. Arch Toxicol, 2017. **91**(4): p. 1915-1924.
35. Cheong, Y.C., et al., *Peritoneal healing and adhesion formation/reformation*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(6): p. 556-66.
36. Cheong, Y.C., et al., *IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions*. Hum Reprod, 2002. **17**(1): p. 69-75.
37. Chegini, N., et al., *Peritoneal fluid cytokine and eicosanoid levels and their relation to the incidence of peritoneal adhesion*. J Soc Gynecol Investig, 1999. **6**(3): p. 153-7.
38. Barcz, E., et al., *Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis: an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration*. Fertil Steril, 2012. **97**(6): p. 1380-6.e1.
39. Ulukus, M. and A. Arici, *Immunology of endometriosis*. Minerva Ginecol, 2005. **57**(3): p. 237-48.
40. Matarese, G., et al., *Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease?* Trends Mol Med, 2003. **9**(5): p. 223-8.
41. Milewski, Ł., et al., *Increased levels of human neutrophil peptides 1, 2, and 3 in peritoneal fluid of patients with endometriosis: association with neutrophils, T cells and IL-8*. J Reprod Immunol, 2011. **91**(1-2): p. 64-70.
42. Monsanto, S.P., et al., *Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients*. Fertil Steril, 2016. **105**(4): p. 968-977.e5.
43. Bacci, M., et al., *Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease*. Am J Pathol, 2009. **175**(2): p. 547-56.

44. Sugamata, M., T. Ihara, and I. Uchiide, *Increase of activated mast cells in human endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 2005. **53**(3): p. 120-5.
45. Wu, M.Y., et al., *Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis*. Fertil Steril, 2000. **74**(6): p. 1187-91.
46. Maeda, N., et al., *Aberrant expression of intercellular adhesion molecule-1 and killer inhibitory receptors induces immune tolerance in women with pelvic endometriosis*. Fertil Steril, 2002. **77**(4): p. 679-83.
47. Matsuoka, S., et al., *Expression of inhibitory-motif killer immunoglobulin-like receptor, KIR2DL1, is increased in natural killer cells from women with pelvic endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 2005. **53**(5): p. 249-54.
48. Moretta, A., et al., *Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells*. J Exp Med, 1995. **182**(3): p. 875-84.
49. Symons, L.K., et al., *The Immunopathophysiology of Endometriosis*. Trends Mol Med, 2018. **24**(9): p. 748-762.
50. Shimizu, K., et al., *High Expression of High-Mobility Group Box 1 in Menstrual Blood: Implications for Endometriosis*. Reprod Sci, 2017. **24**(11): p. 1532-1537.
51. Miller, J.E., et al., *Interleukin-33 modulates inflammation in endometriosis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17903.
52. Santulli, P., et al., *Serum and peritoneal interleukin-33 levels are elevated in deeply infiltrating endometriosis*. Hum Reprod, 2012. **27**(7): p. 2001-9.
53. Podgaec, S., et al., *Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component*. Hum Reprod, 2007. **22**(5): p. 1373-9.
54. Antsiferova, Y.S., et al., *Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis*. Fertil Steril, 2005. **84**(6): p. 1705-11.
55. Gogacz, M., et al., *Increased percentage of Th17 cells in peritoneal fluid is associated with severity of endometriosis*. J Reprod Immunol, 2016. **117**: p. 39-44.
56. Olkowska-Truchanowicz, J., et al., *CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis*. Hum Reprod, 2013. **28**(1): p. 119-24.
57. Olkowska-Truchanowicz, J., et al., *Endometriotic Peritoneal Fluid Stimulates Recruitment of CD4(+)CD25(high)FOXP3(+) Treg Cells*. J Clin Med, 2021. **10**(17).
58. Riccio, L.G.C., et al., *The role of the B lymphocytes in endometriosis: A systematic review*. J Reprod Immunol, 2017. **123**: p. 29-34.
59. Ścieżyńska, A., et al., *NK Cells as Potential Targets for Immunotherapy in Endometriosis*. J Clin Med, 2019. **8**(9).
60. Sikora, J., A. Mielczarek-Palacz, and Z. Kondera-Anasz, *Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis*. Curr Med Chem, 2011. **18**(2): p. 200-8.
61. Zondervan, K.T., C.M. Becker, and S.A. Missmer, *Endometriosis*. N Engl J Med, 2020. **382**(13): p. 1244-1256.
62. Agarwal, S.K., et al., *Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action*. Am J Obstet Gynecol, 2019. **220**(4): p. 354.e1-354.e12.
63. Cornillie, F.J., et al., *Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance*. Fertil Steril, 1990. **53**(6): p. 978-83.
64. Becker, C.M., et al., *ESHRE guideline: endometriosis*. Hum Reprod Open, 2022. **2022**(2): p. hoac009.
65. Seckin, B., et al., *Usefulness of hematological parameters for differential diagnosis of endometriomas in adolescents/young adults and older women*. Int J Adolesc Med Health, 2018. **33**(2).

66. Brown, J., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **1**(1): p. Cd004753.
67. Schenken, R.S., et al., *Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: luteinized unruptured follicles, luteal phase defects, pelvic adhesions, and spontaneous abortions*. Fertil Steril, 1984. **41**(1): p. 122-30.
68. Catenacci, M. and T. Falcone, *The effect of endometriosis on in vitro fertilization outcome*. Minerva Ginecol, 2008. **60**(3): p. 209-21.
69. Seyhan, A., B. Ata, and G. Uncu, *The Impact of Endometriosis and Its Treatment on Ovarian Reserve*. Semin Reprod Med, 2015. **33**(6): p. 422-8.
70. Sanchez, A.M., et al., *The distinguishing cellular and molecular features of the endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the potential endometrioma-mediated damage to the ovary*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(2): p. 217-30.
71. Goodman, L.R., et al., *Effect of surgery on ovarian reserve in women with endometriomas, endometriosis and controls*. Am J Obstet Gynecol, 2016. **215**(5): p. 589.e1-589.e6.
72. Cranney, R., G. Condous, and S. Reid, *An update on the diagnosis, surgical management, and fertility outcomes for women with endometrioma*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2017. **96**(6): p. 633-643.
73. Agarwal, A., et al., *The effects of oxidative stress on female reproduction: a review*. Reprod Biol Endocrinol, 2012. **10**: p. 49.
74. Gupta, S., et al., *Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility*. Fertil Steril, 2008. **90**(2): p. 247-57.
75. Banks, P. and K. Helle, *The release of protein from the stimulated adrenal medulla*. Biochem J, 1965. **97**(3): p. 40c-41c.
76. Helle, K.B., *Chromogranins: Universal proteins in secretory organelles from paramecium to man*. Neurochem Int, 1990. **17**(2): p. 165-75.
77. Blashko, G., *[Structure and function of chromaffin cells]*. Farmakol Toksikol, 1967. **30**(1): p. 3-7.
78. Taupenot, L., K.L. Harper, and D.T. O'Connor, *The Chromogranin–Secretogranin Family*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(12): p. 1134-1149.
79. Herold, Z., M. Doleschall, and A. Somogyi, *Role and function of granin proteins in diabetes mellitus*. World J Diabetes, 2021. **12**(7): p. 1081-1092.
80. Bartolomucci, A., et al., *The extended granin family: structure, function, and biomedical implications*. Endocr Rev, 2011. **32**(6): p. 755-97.
81. Zhao, E., et al., *New insights into granin-derived peptides: evolution and endocrine roles*. Gen Comp Endocrinol, 2009. **164**(2-3): p. 161-74.
82. Tatemoto, K., et al., *Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion*. Nature, 1986. **324**(6096): p. 476-8.
83. Modlin, I.M., et al., *Chromogranin A--biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(9): p. 2427-43.
84. Schmid, G.M., et al., *Inhibition of insulin secretion by betaagranin, an N-terminal chromogranin A fragment*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12717-24.
85. Mahata, S.K., et al., *Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist*. J Clin Invest, 1997. **100**(6): p. 1623-33.
86. Sahu, B.S., et al., *Molecular interactions of the physiological anti-hypertensive peptide catestatin with the neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 9): p. 2323-37.
87. Montero-Hadjadje, M., et al., *Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects*. Acta Physiol (Oxf), 2008. **192**(2): p. 309-24.

88. Garg, R., et al., *Chromogranin A-derived peptides pancreastatin and catestatin: emerging therapeutic target for diabetes*. Amino Acids, 2023.
89. Mahata, S.K. and A. Corti, *Chromogranin A and its fragments in cardiovascular, immunometabolic, and cancer regulation*. Ann N Y Acad Sci, 2019. **1455**(1): p. 34-58.
90. Crippa, L., et al., *A new chromogranin A-dependent angiogenic switch activated by thrombin*. Blood, 2013. **121**(2): p. 392-402.
91. Bourebaba, Y., et al., *Catestatin peptide of chromogranin A as a potential new target for several risk factors management in the course of metabolic syndrome*. Biomed Pharmacother, 2021. **134**: p. 111113.
92. Montero-Hadjadje, M., et al., *Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides*. J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 12420-31.
93. Laguerre, F., Y. Anouar, and M. Montero-Hadjadje, *Chromogranin A in the early steps of the neurosecretory pathway*. IUBMB Life, 2020. **72**(4): p. 524-532.
94. Feldman, S.A. and L.E. Eiden, *The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia*. Endocr Pathol, 2003. **14**(1): p. 3-23.
95. Elias, S., et al., *Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules*. Cell Mol Neurobiol, 2010. **30**(8): p. 1189-95.
96. Cowley, D.J., et al., *N- and C-terminal domains direct cell type-specific sorting of chromogranin A to secretory granules*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7743-8.
97. Koshimizu, H., et al., *Chromogranin A: a new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis*. Regul Pept, 2010. **160**(1-3): p. 153-9.
98. Rehfeld, J.F. and J.P. Goetze, *Processing-independent analysis (PIA): a method for quantitation of the total peptide-gene expression*. Peptides, 2021. **135**: p. 170427.
99. Abbineni, P.S., et al., *Chromogranin A, the major lumenal protein in chromaffin granules, controls fusion pore expansion*. J Gen Physiol, 2019. **151**(2): p. 118-130.
100. Eskeland, N.L., et al., *Chromogranin A processing and secretion: specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 148-56.
101. Dobliger, A., et al., *Proteolytic processing of chromogranin A by the prohormone convertase PC2*. Regul Pept, 2003. **111**(1-3): p. 111-6.
102. Troger, J., et al., *Granin-derived peptides*. Prog Neurobiol, 2017. **154**: p. 37-61.
103. Muller, L. and I. Lindberg, *The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1999. **63**: p. 69-108.
104. Parmer, R.J., et al., *Processing of chromogranin A by plasmin provides a novel mechanism for regulating catecholamine secretion*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): p. 907-15.
105. Helle, K.B., *Chromogranins A and B and secretogranin II as prohormones for regulatory peptides from the diffuse neuroendocrine system*. Results Probl Cell Differ, 2010. **50**: p. 21-44.
106. Jiang, Q., et al., *Proteolytic Cleavage of Chromogranin A (CgA) by Plasmin: selective liberation of a specific bioactive CgA fragment that regulates catecholamine release*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(27): p. 25022-25029.
107. Colombo, B., et al., *Cleavage of chromogranin A N-terminal domain by plasmin provides a new mechanism for regulating cell adhesion*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 45911-9.
108. Muntjewerff, E.M., et al., *Catestatin as a Target for Treatment of Inflammatory Diseases*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2199.

109. Radek, K.A., et al., *The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(6): p. 1525-34.
110. Pieroni, M., et al., *Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function*. Eur Heart J, 2007. **28**(9): p. 1117-27.
111. Kojima, M., et al., *Catestatin Prevents Macrophage-Driven Atherosclerosis but Not Arterial Injury-Induced Neointimal Hyperplasia*. Thromb Haemost, 2018. **118**(1): p. 182-194.
112. Helle, K.B., et al., *Chromogranins: from discovery to current times*. Pflugers Arch, 2018. **470**(1): p. 143-154.
113. Helle, K.B., et al., *The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(22): p. 2863-86.
114. Simon, J.P., M.F. Bader, and D. Aunis, *Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(5): p. 1712-6.
115. Benyamin, B., et al., *Identification of novel loci affecting circulating chromogranins and related peptides*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(1): p. 233-242.
116. Gallo, M.P., et al., *Catestatin Induces Glucose Uptake and GLUT4 Trafficking in Adult Rat Cardiomyocytes*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 2086109.
117. Bandyopadhyay, G.K., et al., *Catestatin (chromogranin A(352-372)) and novel effects on mobilization of fat from adipose tissue through regulation of adrenergic and leptin signaling*. J Biol Chem, 2012. **287**(27): p. 23141-51.
118. Ying, W., et al., *Catestatin Inhibits Obesity-Induced Macrophage Infiltration and Inflammation in the Liver and Suppresses Hepatic Glucose Production, Leading to Improved Insulin Sensitivity*. Diabetes, 2018. **67**(5): p. 841-848.
119. Mahapatra, N.R., et al., *Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1942-52.
120. Bandyopadhyay, G.K. and S.K. Mahata, *Chromogranin A Regulation of Obesity and Peripheral Insulin Sensitivity*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 20.
121. Simunovic, M., et al., *Serum catestatin concentrations are decreased in obese children and adolescents*. Pediatr Diabetes, 2019. **20**(5): p. 549-555.
122. Gayen, J.R., et al., *Global disturbances in autonomic function yield cardiovascular instability and hypertension in the chromogranin a null mouse*. Endocrinology, 2009. **150**(11): p. 5027-35.
123. Mahata, S.K., M. Kiranmayi, and N.R. Mahapatra, *Catestatin: A Master Regulator of Cardiovascular Functions*. Curr Med Chem, 2018. **25**(11): p. 1352-1374.
124. Dev, N.B., et al., *Chromogranin a and the autonomic system: decomposition of heart rate variability and rescue by its catestatin fragment*. Endocrinology, 2010. **151**(6): p. 2760-8.
125. Krüger, P.G., S.K. Mahata, and K.B. Helle, *Catestatin (CgA344-364) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides*. Regul Pept, 2003. **114**(1): p. 29-35.
126. Deng, Z. and C. Xu, *Role of the neuroendocrine antimicrobial peptide catestatin in innate immunity and pain*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017. **49**(11): p. 967-972.
127. Briolat, J., et al., *New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(3): p. 377-85.
128. Aslam, R., et al., *Chromogranin A-derived peptides are involved in innate immunity*. Curr Med Chem, 2012. **19**(24): p. 4115-23.
129. Sánchez, V., et al., *Glycogenolytic effect of pancreastatin in isolated rat hepatocytes is mediated by a cyclic-AMP-independent Ca(2+)-dependent mechanism*. Biochem J, 1992. **284** (Pt 3)(Pt 3): p. 659-62.

130. González-Yanes, C. and V. Sánchez-Margalet, *Pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, inhibits leptin and enhances UCP-2 expression in isolated rat adipocytes*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(12): p. 2749-56.
131. Hossain, Z., et al., *Discovery of pancreastatin inhibitor PSTi8 for the treatment of insulin resistance and diabetes: studies in rodent models of diabetes mellitus*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 8715.
132. Schmidt, W.E. and W. Creutzfeldt, *Pancreastatin--a novel regulatory peptide?* Acta Oncol, 1991. **30**(4): p. 441-9.
133. Håkanson, R., et al., *Circulating pancreastatin is a marker for the enterochromaffin-like cells of the rat stomach*. Gastroenterology, 1995. **108**(5): p. 1445-52.
134. Metz-Boutigue, M.H., et al., *Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites*. Eur J Biochem, 1993. **217**(1): p. 247-57.
135. O'Connor, D.T., et al., *Pancreastatin: multiple actions on human intermediary metabolism in vivo, variation in disease, and naturally occurring functional genetic polymorphism*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(9): p. 5414-25.
136. Rustagi, S., R.R. Warner, and C.M. Divino, *Serum pancreastatin: the next predictive neuroendocrine tumor marker*. J Surg Oncol, 2013. **108**(2): p. 126-8.
137. Helle, K.B., et al., *Chromogranin A: secretion of processed products from the stimulated retrogradely perfused bovine adrenal gland*. J Neuroendocrinol, 1993. **5**(4): p. 413-20.
138. Aardal, S., et al., *Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments*. J Neuroendocrinol, 1993. **5**(4): p. 405-12.
139. Lugardon, K., et al., *Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10745-53.
140. Bao, X.L., et al., *Vasostatin-2 associates with coronary collateral vessel formation in diabetic patients and promotes angiogenesis via angiotensin-converting enzyme 2*. Eur Heart J, 2023.
141. Salem, S., et al., *Identification of the Vasoconstriction-Inhibiting Factor (VIF), a Potent Endogenous Cofactor of Angiotensin II Acting on the Angiotensin II Type 2 Receptor*. Circulation, 2015. **131**(16): p. 1426-34.
142. Corti, A., F. Marcucci, and T. Bachetti, *Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers*. Pflugers Arch, 2018. **470**(1): p. 199-210.
143. Glinicki, P. and W. Jeske, *Chromogranin A (CgA)--the influence of various factors in vivo and in vitro, and existing disorders on it's concentration in blood*. Endokrynol Pol, 2010. **61**(4): p. 384-7.
144. Herold, Z., et al., *Serum chromogranin A level continuously rises with the progression of type 1 diabetes, and indicates the presence of both enterochromaffin-like cell hyperplasia and autoimmune gastritis*. J Diabetes Investig, 2020. **11**(4): p. 865-873.
145. Ebert, A., et al., *Chromogranin Serves as Novel Biomarker of Endocrine and Gastric Autoimmunity*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(8).
146. Sanduleanu, S., et al., *Serum chromogranin A as a screening test for gastric enterochromaffin-like cell hyperplasia during acid-suppressive therapy*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(9): p. 802-11.
147. Tsao, K.C., et al., *Elevation of CA 19-9 and chromogranin A, in addition to CA 125, are detectable in benign tumors in leiomyomas and endometriosis*. J Clin Lab Anal, 2007. **21**(3): p. 193-6.

148. Zeitvogel, A., R. Baumann, and A. Starzinski-Powitz, *Identification of an invasive, N-cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model*. Am J Pathol, 2001. **159**(5): p. 1839-52.
149. Lessey, B.A., et al., *Characterization of the functional progesterone receptor in an endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa): progesterone-induced expression of the alpha1 integrin*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996. **59**(1): p. 31-9.
150. Tsang, J.Y. and G.M. Tse, *Breast cancer with neuroendocrine differentiation: an update based on the latest WHO classification*. Mod Pathol, 2021. **34**(6): p. 1062-1073.
151. Nesland, J.M., et al., *Neuroendocrine differentiation in breast lesions*. Pathol Res Pract, 1988. **183**(2): p. 214-21.
152. Hamie, L., O. Abbas, and J. Bhawan, *Neuroendocrine Differentiation of Skin Tumors: A Comprehensive Review*. Am J Dermatopathol, 2020. **42**(12): p. 899-910.
153. Hansson, J. and P.A. Abrahamsson, *Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma*. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2003(212): p. 28-36.
154. di Sant'Agnese, P.A. and A.T. Cockett, *Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy*. Cancer, 1996. **78**(2): p. 357-61.
155. Rodarte, K.E., et al., *Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Requires ASCL1*. Cancer Res, 2024.
156. Wang, G., et al., *Neuroendocrine cells in eutopic endometrium of women with endometriosis*. Human Reproduction, 2009. **25**(2): p. 387-391.
157. Gilabert-Estellés, J., et al., *Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis*. Hum Reprod, 2003. **18**(7): p. 1516-22.
158. Bruse, C., et al., *Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women*. Fertil Steril, 1998. **70**(5): p. 821-6.
159. Wójtowicz, M., et al., *Evaluation of adipokines concentrations in plasma, peritoneal, and endometrioma fluids in women operated on for ovarian endometriosis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1218980.
160. Zhao, Z., et al., *Association of leptin and adiponectin levels with endometriosis: a systematic review and meta-analysis*. Gynecol Endocrinol, 2021. **37**(7): p. 591-599.
161. Kalaitzopoulos, D.R., et al., *Leptin concentrations in endometriosis: A systematic review and meta-analysis*. J Reprod Immunol, 2021. **146**: p. 103338.
162. Bohlouli, S., et al., *Adiponectin effect on the viability of human endometrial stromal cells and mRNA expression of adiponectin receptors*. Int J Fertil Steril, 2013. **7**(1): p. 43-8.
163. Bohlouli, S., et al., *in vitro Anti-Proliferative Effect of Adiponectin on Human Endometriotic Stromal Cells through AdipoR1 and AdipoR2 Gene Receptor Expression*. Iran Biomed J, 2016. **20**(1): p. 12-7.
164. Yi, K.W., et al., *Resistin concentration is increased in the peritoneal fluid of women with endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 2010. **64**(5): p. 318-23.
165. Osuga, Y., *Current concepts of the pathogenesis of endometriosis*. Reprod Med Biol, 2010. **9**(1): p. 1-7.
166. Barcz, E., et al., *A relationship between increased peritoneal leptin levels and infertility in endometriosis*. Gynecol Endocrinol, 2008. **24**(9): p. 526-30.
167. Helle, K.B., *The chromogranin A-derived peptides vasostatin-I and catestatin as regulatory peptides for cardiovascular functions*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(1): p. 9-16.
168. Dasgupta, A., et al., *Catestatin improves insulin sensitivity by attenuating endoplasmic reticulum stress: In vivo and in silico validation*. Comput Struct Biotechnol J, 2020. **18**: p. 464-481.

169. Bralewska, M., et al., *Chromogranin A demonstrates higher expression in preeclamptic placentas than in normal pregnancy*. BMC Pregnancy Childbirth, 2021. **21**(1): p. 680.
170. Bralewska, M., T. Pietrucha, and A. Sakowicz, *The Role of Catestatin in Preeclampsia*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(5).
171. Bralewska, M., T. Pietrucha, and A. Sakowicz, *Chromogranin A: An Endocrine Factor of Pregnancy*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(5).
172. Zalewska, E., P. Kmiec, and K. Sworczak, *Role of Catestatin in the Cardiovascular System and Metabolic Disorders*. Front Cardiovasc Med, 2022. **9**: p. 909480.
173. O'Connor, D.T., et al., *Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension*. J Hypertens, 2002. **20**(7): p. 1335-45.
174. Theurl, M., et al., *The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism*. Circ Res, 2010. **107**(11): p. 1326-35.
175. Egger, M., et al., *Monocyte migration: a novel effect and signaling pathways of catestatin*. Eur J Pharmacol, 2008. **598**(1-3): p. 104-11.
176. Rabbi, M.F., et al., *Reactivation of Intestinal Inflammation Is Suppressed by Catestatin in a Murine Model of Colitis via M1 Macrophages and Not the Gut Microbiota*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 985.
177. Sánchez-Margalet, V., et al., *Metabolic effects and mechanism of action of the chromogranin A-derived peptide pancreastatin*. Regul Pept, 2010. **161**(1-3): p. 8-14.
178. O'Connor, D.T., *Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum*. Regul Pept, 1983. **6**(3): p. 263-80.
179. Lu, L., et al., *Reduced serum levels of vasostatin-2, an anti-inflammatory peptide derived from chromogranin A, are associated with the presence and severity of coronary artery disease*. European Heart Journal, 2012. **33**(18): p. 2297-2306.
180. Xiong, W., et al., *The anti-inflammatory vasostatin-2 attenuates atherosclerosis in ApoE(-/-) mice and inhibits monocyte/macrophage recruitment*. Thromb Haemost, 2017. **117**(2): p. 401-414.
181. Fleming, I., *Vasostatin-2, angiogenesis and collateral function*. Eur Heart J, 2023. **44**(19): p. 1745-1747.
182. Hou, J., X. Xue, and J. Li, *Vasostatin-2 inhibits cell proliferation and adhesion in vascular smooth muscle cells, which are associated with the progression of atherosclerosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **469**(4): p. 948-53.
183. Pan, W.Q., et al., *Association of decreased serum vasostatin-2 level with ischemic chronic heart failure and with MACE in 3-year follow-up: Vasostatin-2 prevents heart failure in myocardial infarction rats*. Int J Cardiol, 2016. **221**: p. 1-11.
184. Harada, T., T. Iwabe, and N. Terakawa, *Role of cytokines in endometriosis*. Fertil Steril, 2001. **76**(1): p. 1-10.
185. Oral, E., D.L. Olive, and A. Arici, *The peritoneal environment in endometriosis*. Hum Reprod Update, 1996. **2**(5): p. 385-98.
186. Bauer, J., et al., *Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages*. Blood, 1988. **72**(4): p. 1134-40.
187. Yang, H.L., et al., *Autophagy in endometriosis*. Am J Transl Res, 2017. **9**(11): p. 4707-4725.
188. Hernández-Trejo, J.A., et al., *The pro-inflammatory cytokines IFN γ /TNF α increase chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium*. Biochem J, 2016. **473**(21): p. 3805-3818.