

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

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 kilkadziesiąt 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, przekaznikami 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.