

P R A C E O R Y G I N A L N E
położnictwoAnaliza stężenia prozapalnych interleukin
w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM
i we krwi pępowinowej ich noworodkówConcentration of pro-inflammatory interleukins in cervical secretions of
women with PROM and in the umbilical cord blood of their newbornsJana Skrzypczak¹, Przemysław K. Wirstlein¹, Magdalena Wróbel², Mateusz Mikołajczyk¹¹ Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Klinika Rozrodczości, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska² Ginekologiczno-Położniczy Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była analiza stężenia prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM w zależności od zakażenia *Ureaplasma spp.* i czasu jaki upłynął od pęknięcia błon płodowych oraz korelacja stężenia tych cytokin w wydzielinie szyjkowej i we krwi pępowinowej noworodka.

Materiał i metody: badaniami objęto 30 kobiet z PROM między 24 a 33+6 tygodniem ciąży. Materiał stanowiły wydzielina szyjkowa kobiet z potwierdzonym pęknięciem błon płodowych pobierana w określonych odstępach czasu oraz krew pępowinowa pozyskiwana po urodzeniu noworodka. Wydzielinę szyjkową poddawano ocenie mikrobiologicznej i wykorzystując metodę PCR. Stężenie prozapalnych interleukin IL-6, IL-19, IL-10 oraz TNF- α w wydzielinie szyjkowej i krwi pępowinowej badano metodą ELISA.

Wyniki: Najczęściej izolowanym drobnoustrojem w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM była *Ureaplasma spp.* W wydzielinie szyjkowej kobiet z *Ureaplasma spp.* stężenie IL-6 było wyższe, chociaż bez istotności statystycznej, niż u kobiet bez *Ureaplasma spp.* Stężenie analizowanych interleukin w wydzielinie szyjkowej nie zmieniło się, w zależności od czasu jaki upłynął od PROM. Porównując stężenie interleukin we krwi pępowinowej noworodków matek z i bez zakażenia *Ureaplasma spp.* stwierdzono istotnie wyższe stężenie IL-6 w przypadku *Ureaplasma spp.* niezależnie od czasu w jakim wystąpił poród. Uzyskano dodatnią korelację między stężeniem IL-6 i TNF- α w wydzielinie szyjkowej i we krwi pępowinowej matek z PROM i *Ureaplasma spp.*

Wnioski:

1. Dla wykrycia *Ureaplasma spp.* w szyjce macicy metoda hodowli wydaje się być wystarczająca.
2. Prozapalne interleukiny, zwłaszcza IL-6, pozyskane drogą nieinwazyjną mogą być wykorzystane do przewidywania reakcji zapalnej płodu.

Słowa kluczowe: **PROM / interleukiny prozapalne / wydzielina szyjkowa /
/ reakcja zapalna płodu /****Adres do korespondencji:**Przemysław K. Wirstlein
Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Klinika Rozrodczości,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Polska, 60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel.: +48 61 8419302; fax: +48 61 8419625;
e-mail: abys@wp.plOtrzymano: 02.09.2014
Zaakceptowano do druku: 15.11.2014

Jana Skrzypczak et al. Analiza stężenia prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM i we krwi pępowinowej ich noworodków.

Abstract

Objectives: The aim of the study was to analyze the levels of pro-inflammatory interleukins in cervical secretions of women with PROM, depending on *Ureaplasma spp.* infection and the time elapsed since the rupture of the membranes, and to correlate their concentration in cervical secretions and in cord blood of the newborns.

Material and methods: The study included 30 women with PROM between 24 and 33+6 weeks of gestation. Cervical swabs from women with confirmed rupture of membranes taken at certain intervals and umbilical cord blood of their newborns constituted the study material. Cervical secretions were evaluated microbiologically and by the PCR method. Concentrations of IL-6, IL-19, IL-10 and TNF- α were analyzed by ELISA.

Results: *Ureaplasma spp.* were the most frequently isolated microorganisms in cervical secretions of women with PROM. Secretion of interleukins in the cervix was not influenced by time elapsed since the PROM.

Comparison of interleukin levels in cord blood of newborns born to mothers with and without *Ureaplasma spp.* infection revealed significantly higher levels of IL-6 in the case of *Ureaplasma spp.* A positive correlation between IL-6 and TNF- α levels in cervical secretions and in cord blood of mothers with PROM and *Ureaplasma spp.* was detected.

Conclusions:

1. Cervical culture method appears to be sufficient for detecting *Ureaplasma spp.*
2. Pro-inflammatory interleukins, especially IL-6, obtained by non-invasive methods can be used to predict fetal inflammatory response.

Key words: **PROM / pro-inflammatory interleukins / cervical secretion / fetal inflammatory response syndrome /**

Wstęp

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych jest jednym z najpoważniejszych powikłań ciąży, ponieważ nie tylko jest związane w 30% z porodami przedwczesnymi, ale jest czynnikiem ryzyka reakcji zapalnej płodu (FIRS) i to tym większym im we wczesnej ciąży występuje.

Reakcja zapalna płodu jest odpowiedzią na wewnątrzmaciczne zakażenie, podczas którego dochodzi do aktywacji zapalnych mediatorów z równoczesnym obniżeniem ich funkcji. Z prozapalnych cytokin, których wysoki poziom określa FIRS należy wymienić interleukinę-6 (IL-6). Wiele badań potwierdza, że stężenie IL-6 we krwi pępowinowej jest jedynym niezależnym czynnikiem prognostycznym wczesnej sepsy noworodków [1, 2].

Również inne interleukiny biorą udział w reakcji zapalnej płodu, chociażby interleukina-10 (IL-10) czy interleukina-19 (IL-19).

Interleukina-10 jest silnym mediatorem przeciwzapalnym, produkowanym głównie przez monocyty. Działanie jej polega na hamowaniu transkrypcji prozapalnych cytokin [3]. Nowo odkrytą cytokiną jest IL-19, która należy do rodziny IL-10. Może ona indukować produkcję IL-10 z komórek jednojądrzastych krwi, a także aktywować monocyty do uwalniania IL-6, TNF- α , IL-8 i rodników tlenowych. Uzyskano przekonujące dowody, że kolonizacja i zapalenie przestrzeni kosmówkowo-doczesnowej indukuje kaskadę cytokin oraz innych białek aktywujących neutrofile.

Złotym standardem identyfikacji wewnątrzmacicznego zakażenia jest izolacja drobnoustrojów w płynie owodniowym. Izolacja każdego drobnoustroju w tym kompartmentcie jest określana jako inwazja bakteryjna płynu owodniowego.

Utarty pogląd, że mikroorganizmy z dolnych odcinków narządów płciowych drogą wstępującą dostają się do jamy owodniowej został zdominowany przez inny, który potencjalnego źródła drobnoustrojów penetrujących jamę owodniową upatruje

w przewodzie pokarmowym czy innych odległych miejscach jak np. w jamie ustnej [4, 5]. Jednak najczęściej izolowanym drobnoustrojem w płynie owodniowym u kobiet z przedwczesnie pękniętymi błonami płodowymi są genitalne mykoplazmy. Obecność w układzie rozrodczym i płynie owodniowym *Ureaplasma species* czy *Mycoplasma hominis* wiąże się z większym odsetkiem zarówno wczesnych jak i późnych powikłań ciąży [6, 7].

Ureaplasma spp. są najmniejszymi wolno-żyjącymi, bakteriami nie posiadają błony komórkowej, a ich cytoplazma zawiera sterole. Dzięki tym właściwościom *Ureaplasma spp.* są niewrażliwe na ten rodzaj antybiotyków, który zaburza syntezę ściany komórkowej, a więc m.in. na penicyliny czy cefalosporyny. *Ureaplasma spp.* są częścią fizjologicznej flory u 60% zdrowych, aktywnych seksualnie kobiet. Jednak zakażenie *Ureaplasma spp.* podczas ciąży stanowią duże ryzyko licznych powikłań m.in. przedwczesnego porodu, przedwczesnego pęknięcia błon płodowych a nawet wewnątrzmacicznej śmierci płodu. Diagnostyka *Ureaplasma spp.* tradycyjnie opiera się na metodach hodowli, ale według niektórych autorów metoda ta jest niedoskonała ponieważ wymaga określonego czasu, co opóźnia kliniczne postępowanie, czyli w przypadku przedwczesnego pęknięcia błon płodowych, indukcję porodu [4, 6].

Wprowadzenie reakcji łańcuchowej polimerazy zdecydowanie przyspieszyło rozpoznanie inwazji bakteryjnej płynu owodniowego a ponadto zwiększyło detekcję genitalnych mykoplazm w porównaniu do hodowli [8].

Współczesne badania zarówno w Europie jak i Stanach Zjednoczonych koncentrują się na ocenie stężenia cytokin i identyfikacji drobnoustrojów w płynie owodniowym pobranym drogą amniocentezy [4, 6, 8].

Trwają jednak poszukiwania mniej inwazyjnych metod poszukiwania płynu owodniowego do badania flory bakteryjnej i oceny prozapalnych mediatorów, o czym świadczą niedawno opublikowane prace [9, 10].

Jana Skrzypczak et al. Analiza stężenia prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM i we krwi pępowinowej ich noworodków.

Cel pracy

Celem naszej pracy była po pierwsze, analiza stężenia prozapalnych cytokin (IL-6, IL-10, IL-19, TNF- α) w wydzielinie szyjkowej w zależności od zakażenia *Ureaplasma spp.* i czasu jaki upłynął od pęknięcia błon płodowych, a po drugie korelacja stężenia tych cytokin w wydzielinie szyjkowej z ich stężeniem we krwi pępowinowej noworodków.

Materiał i metoda

Badaniami prospektywnymi objęto 30 ciężarnych z ciążą pojedynczą hospitalizowanych w Klinice Rozrodczości Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z powodu przedwczesnego pęknięcia błon płodowych między 24 a 33⁺⁶ tygodniem ciąży. Badania przeprowadzano od stycznia do grudnia 2014 roku.

Podstawą rozpoznania pękniętych błon płodowych był wywiad i obecność płynu owodniowego w tylnym sklepieniu pochwy podczas badania we wziernikach. W przypadkach wątpliwych posługiwano się testem AmniStrip (DIASource ImmunoAssays, Belgia). Wiek ciążowy obliczano na podstawie pierwszego dnia ostatniego krwawienia miesięczkowego oraz długości ciemieniowo-siedzeniowej, w badaniu ultrasonograficznym w 1. trymestrze ciąży. Z badania wykluczono pacjentki z ciążą wielopłodową, krwawieniem z pochwy, wadami strukturalnymi lub chromosomowymi płodów oraz klinicznymi objawami zakażenia wewnątrzrodniowego.

Przy przyjęciu pacjentki do kliniki, po podpisaniu zgody na udział w badaniach, pobierano krew do badania CRP i leukocytów oraz wydzielinę z szyjki macicy do oceny interleukin i badania mikrobiologicznego. Badania te powtarzano co 7 dni. Badanie mikrobiologiczne pozyskanego płynu szyjkowego przeprowadzano metodą hodowli na tlenowe i beztlenowe drobnoustroje oraz na *Ureaplasma urealiticum* i/lub *parvum* oraz *Mycoplasma hominis*. Dodatkowo wykonywano badanie metodą PCR w kierunku *Ureaplasma spp.* i *Mycoplasma hominis*.

Pacjentki podzielono na dwie grupy, jedną stanowiły ciężarne z obecnością *Ureaplasma spp.* w wydzielinie szyjkowej, drugą ciężarne u których tego drobnoustroju nie potwierdzono ani metodą hodowli ani metodą PCR.

Wszystkie pacjentki otrzymały kurs steroidów, w postaci betametasonu, w dawce 12 mg podanej dwukrotnie w odstępie 24 godzin oraz profilaktycznie antybiotyki o szerokim spektrum działania, które stosowały przez 7 dni.

Pacjentki z dodatnią hodowlą wydzieliny szyjkowej miały modyfikowane leczenie zgodnie z wrażliwością wyhodowanych mikroorganizmów na antybiotyki.

Tokoliza była stosowana tylko u pacjentek z potwierdzoną czynnością skurczową, bez klinicznych objawów *chorioamnionitis*. U żadnej z ciężarnych nie indukowano porodu. Zastosowano postępowanie wyczekujące, podczas którego ściśle monitorowano wykładniki zakażenia wewnątrzrodniowego u matki oraz płodu.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, nr 248/15.

Identyfikacja bakterii *Ureaplasma* i *Mycoplasma* metodą PCR.

Materiał z wydzieliny zawieszono w 1,5ml soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Z 200 μ l uzyskanej zawiesiny izolowano DNA przy zastosowaniu zestawu QIAamp MiniElute Virus Spin Kit

Qiagen (Hilden, Niemcy). W uzyskanym DNA, przy użyciu termocyklera RotorGene 3000 (Corbett Research, Australia) zestawu FTD Urethritis plus (Fast-track Diagnostic, Luksemburg), zawierającego specyficzne startery i sondy fluorescencyjne, zgodnie z protokołem i profilem termicznym reakcji dostarczone przez producenta odczynników, identyfikowano obecność bakterii *Ureaplasma parvum* i *Ureaplasma spp.* oraz *Mycoplasma hominis* i *Mycoplasma genitalium*.

Krew pępowinową pobierano zaraz po urodzeniu dziecka.

Ocena stężenia cytokin w wydzielinie z kanału szyjki macicy i krwi pępowinowej.

Ocenę stężenia IL-6, IL-10, IL-19, TNF- α , rozpuszczonych w zabezpieczonym wcześniej supernatancie z wydzieliny szyjkowej i osoczu krwi pępowinowej wykonano metodą ELISA, przy użyciu komercyjnych zestawów R&D Biosystems (Minneapolis, USA).

Analiza statystyczna

Do oceny statystycznej uzyskanych wyników użyto programu SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, USA). Rozkład parametryczności badanych zmiennych badano testem Kołmogorowa-Smirnowa, istotność statystyczną obserwowanych różnic oceniano testem rangowym Mann'a-Withneya dla rozkładów nieparametrycznych. Korelacje oceniono przy pomocy testu rangowego Spearmana. Za znamienne statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wyniki

Badaniami objęto 30 kobiet z pękniętymi błonami płodowymi (PROM) między 24 a 33⁺⁶ tygodniem ciąży. U żadnej z nich nie stwierdzono przy przyjęciu klinicznych wykładników wewnątrzrodniowego zakażenia.

Najczęstszym drobnoustrojem w wydzielinie szyjkowej analizowanych kobiet była *Ureaplasma spp.* (Tabela I). Metodą hodowli i PCR wyizolowana ją u 12 (40%) ciężarnych.

Wykrywalność *Ureaplasma spp.* była porównywalna przy użyciu metody hodowli i metody PCR. W naszych badaniach ani w jednej sytuacji nie uzyskaliśmy dodatniego wyniku *Ureaplasma spp.* metodą PCR przy ujemnym wyniku hodowli w tym kierunku.

W tabeli II przedstawiono dane kliniczne pacjentek z PROM. Wynika z niej, że ciężarne z PROM i obecnością *Ureaplasma spp.* w wydzielinie z szyjki macicy rodziły nieco wcześniej niż ciężarne z grupy referencyjnej (31 v 33 tydzień ciąży), a masa urodzeniowa ich dzieci była niższa w porównaniu z matkami bez *Ureaplasma spp.* w wydzielinie z szyjki macicy.

Tabela I. Rodzaj drobnoustrojów w wydzielinie z szyjki macicy u 30 ciężarnych z PROM.

Rodzaj drobnoustroju	Liczba pacjentek
<i>Ureaplasma spp.</i>	12
<i>Listeria monocytogenes</i>	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7
<i>Candida</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	9

Jana Skrzypczak et al. Analiza stężenia prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM i we krwi pępowinowej ich noworodków.

Tabela II. Dane kliniczne 30 ciężarnych z PROM.

	<i>Ureaplasma spp.</i> n=12 (mediana, zakres)	Bez <i>Ureaplasma spp.</i> n=18 (mediana, zakres)
Wiek ciężarnej (mediana, zakres)	31 (26-44)	33 (24-42)
Wieloródki	10	14
Liczba poprzednich ciąż (mediana, zakres)	2 (0-5)	1 (0-6)
Tydzień ciąży pobrania 1. oznaczenia (mediana, zakres)	30 (24-32) < 28tc – 4 28-32tc – 8 > 32tc – 0	31 (18-34) < 28tc – 4 28-32tc – 8 > 32tc – 6
Tydzień porodu (mediana, zakres)	31 (28-36)	32 (28-35)
Masa noworodka	1786,3 (+/- 437,7)	2033,6 (+/- 575,8)
Przedłużenie ciąży w dniach (mediana, zakres)	11 (3-53)	10 (3-79)
Liczba pacjentek, które urodziły w ciąży 7 dni od PROM	5	8
Liczba pacjentek, które urodziły przed 32 tc	8	6
Liczba pacjentek, które urodziły po 32 tc	4	12

Tabela III. Stężenie prozapalnych interleukin (pg/ml) w wydzielinie szyjkowej u kobiet z PROM (A). Korelacje stężenia interleukin w wydzielinie szyjkowej u kobiet z PROM (B).

A	<i>Ureaplasma spp.</i> , n=12 (mediana, zakres)	Bez <i>Ureaplasma spp.</i> , n=18 (mediana, zakres)	p	
IL-6	70,6 (8,7-333)	20,2 (6,3-74,2)	0,054	
IL-10*	NA	NA	-	
IL-19	254,9 (0-2000)	148,1 (0-1856,5)	0,274	
TNF- α	24,6 (9,87-23,9)	20,8 (0-94,5)	0,158	
B	<i>Ureaplasma spp.</i> , n=12		Bez <i>Ureaplasma spp.</i> , n=18	
	IL-19	TNF- α	IL-19	TNF- α
IL-6	rho=0,629 p=0,036	rho=0,736 p=0,008	rho=0,249 p=0,036	rho=0,439 p=0,076
IL-19	-	rho=0,683 p=0,017	-	rho= -0,111 p=0,666

* W wydzielinie z kanału szyjki macicy u 26 pacjentek pomiary stężenia IL-10 były poniżej czułości testu, dlatego stężenie tej interleukiny nie zostało umieszczone w tabeli.

Nie uzyskano istotności statystycznej w żadnym z analizowanych parametrów.

Stężenie prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej tuż po pęknięciu błon płodowych przedstawiono w tabeli III. Na granicy istotności statystycznej uzyskano wynik dotyczący stężenia IL-6, które było wyższe u kobiet z PROM i obecnością *Ureaplasma spp.*

Znaleziono natomiast korelację między stężeniem IL-19 i TNF- α w obu grupach kobiet. (Tabela IIIA).

Analizując stężenie IL-6, IL-19 i TNF- α w wydzielinie szyjkowej u pacjentek, u których wykonano przynajmniej 4 oznaczenia w 7. dniowych odstępach, nie znaleziono istotnych różnic. Zarówno u ciężarnych z *Ureaplasma spp.* jak i u ciężarnych bez *Ureaplasma spp.* stężenie analizowanych interleukin nie zmieniało się w zależności od czasu jaki upłynął od pęknięcia błon płodowych ani w zależności od leczenia. (Tabela IV).

Na rycinach 1, 2, i 3 przedstawiono wartości analizowanych interleukin u 4 pacjentek, u których wykonano 6 oznaczeń w odstępach 7. dniowych. Podczas gdy wartości IL-6 i IL-19 wykazywały tendencję obniżania się wraz z czasem trwania ciąży, to wartość TNF- α miały tendencję wzrostową. Na uwagę zasługuje pacjentka z *Ureaplasma spp.*, u której stężenie IL-6 i TNF- α w wydzielinie szyjkowej w 3 tygodniu od PROM osiągnęło odpowiednio 330 i 425 pg/ml po czym obniżyło się w kolejnym tygodniu aby ponownie wzrosnąć przed porodem. U dziecka tej pacjentki, urodzonego w 31 tygodniu ciąży rozpoznano zespół zaburzeń oddychania.

U kolejnej pacjentki z *Ureaplasma spp.* obserwowano wzrost stężenia IL-19 do 2000 pg/ml w 14 dniu po pęknięciu błon płodowych i powrót do wartości wyjściowych 4 tygodnie później. Jednak u noworodka urodzonego w 32 tygodniu ciąży rozpoznano wrodzone zapalenie płuc.

Jana Skrzypczak et al. Analiza stężenia prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM i we krwi pępowinowej ich noworodków.

Tabela IV. Analiza zmiany stężenia [pg/ml] badanych cytokiny w wydzielinie z kanału szyjki macicy, w ciągu kolejnych czterech oznaczeń u kobiet z PROM, u których zidentyfikowano *Ureaplasma spp.* (n=4) oraz u kobiet bez *Ureaplasma spp.* (n=5).

Pacjentki <i>Ureaplasma spp.</i> pozytywne						
Oznaczenia	IL-6 [pg/ml]	p	IL-19 [pg/ml]	p	TNF-α [pg/ml]	p
I	59,8 (15,2-124,3)	0,355	123,9 (0-524,3)	0,754	22,5 (22,5-158,2)	0,324
II	60,5 (45,8-333)		97,3 (0-178,5)		41,4 (22,9- 136,5)	
III	52,3 919,3- 333)		11,7 (0-245,3)		80,5 (24,2-423,9)	
IV	16,8 (10,1-34,4)		112,8 (0-503,6)		32,2 (14,6-172,6)	
Pacjentki <i>Ureaplasma spp.</i> negatywne						
Oznaczenia	IL-6 [pg/ml]	p	IL-19 [pg/ml]	p	TNF-α [pg/ml]	p
I	18,7 (6,3-58,8)	0,472	148,1 (0-588,65)	0,251	18,6 (0-46,9)	0,564
II	35,4 (12,8-163,1)		97,3 (0-214,4)		20,7 (11,4-207,6)	
III	37,8 (12,2-87,2)		110,7 (96,2-375,1)		21,2 (15,9-29,8)	
IV	30,8 (21,2-66,1)		198,9 (0-420,7)		39,7 (23,8-58,3)	

Tabela V. Porównanie stężenia analizowanych interleukin w wydzielinie szyjkowej i krwi pępowinowej u 13 kobiet, które urodziły w czasie 7 dni od PROM.

	Wydzielina szyjkowa (mediana, zakres)			Krew pępowinowa (mediana, zakres)		
	Ureaplazma n=5	Bez n=8	p	Ureaplazma n=4	Bez n=8	p
IL-6	105,9 (70,6-333)	20,2 (8,9-74,1)	0,005	78,6 (28,6 -107,9)	11,4 (7,4-160)	0,03
IL-10	NA	NA	/	35,4 (14,7-55,3)	22,5 (17,2-72,4)	0,93
IL-19	864,9 (0-2000)	93,7 (0-1856,5)	0,202	37,7 (0-62,9)	0 (0-136)	0,622
TNF-α	188 (9,9-423,9)	22,04 (15,4-81,5)	0,106	73 (34,3 -136,8)	23,4 (0-103,4)	0,011

U pacjentek bez *Ureaplasma spp.* we krwi pępowinowej korelacja IL-6 z TNF-α: rho = 0,715; p=0,038. W pozostałych zestawieniach brak korelacji.

Tabela VI. Porównanie stężenia analizowanych interleukin w wydzielinie szyjkowej i krwi pępowinowej u 17 kobiet, które urodziły w czasie powyżej 7 dni od PROM.

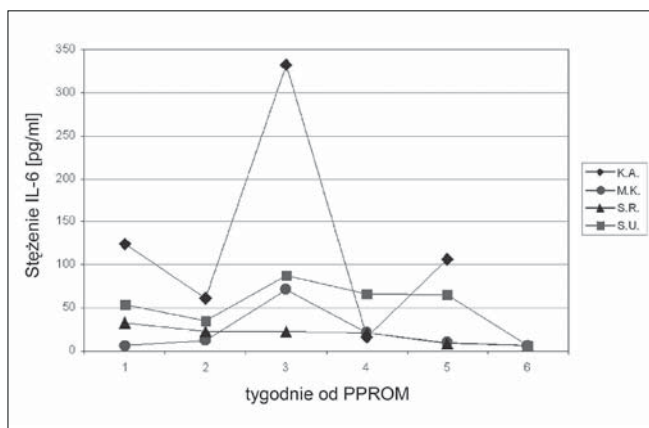
	Wydzielina szyjkowa (mediana, zakres)			Krew pępowinowa (mediana, zakres)		
	Ureaplazma n=7	Bez n=10	p	Ureaplazma n=6	Bez n=9	p
IL-6	32,81 (8,7-124,3)	30,14 (8,9-74,1)	0,591	108,8 (28,6-333)	7,58 (0-66,83)	0,003
IL-10	NA	NA	/	37,56 (9,93-105,1)	17,8 (0-60,4)	0,216
IL-19	168,5 (0-1385,88)	175,29 (0-588,7)	0,623	0 (14,7- 610,8)	0 (0-214,4)	0,833
TNF-α	21,1 (9,87-423,9)	25,1 (0-94,5)	0,526	42,82 (0 – 422,06)	17,48 (0-21,66)	0,157

U pacjentek z *Ureaplasma spp.* we krwi pępowinowej korelacja IL-6 z TNF-α: rho = 1,000; p=0,003 oraz IL-6 z IL-10: rho = 0,943; p=0,017. Także we krwi pępowinowej korelacja IL-10 z TNF-α: rho = 0,943; p=0,017. W wydzielinie, u pacjentek z *Ureaplasma spp.* korelacja IL-6 i IL-19: rho = 0,893; p<0,001.

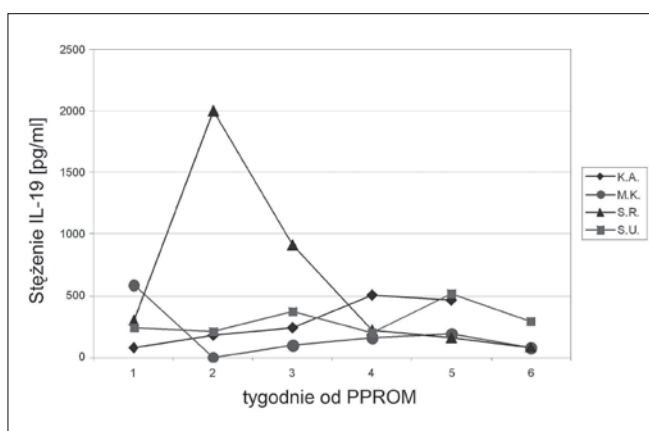
Kiedy odniesiono stężenie interleukin w wydzielinie szyjkowej do stężenia interleukin we krwi pępowinowej noworodków z ciąż zakończonych porodem w ciągu 7 dni od PROM to zaobserwowano istotne statystycznie różnice między badanymi grupami. W wydzielinie szyjkowej kobiet z *Ureaplasma spp.* stężenie IL-6 było istotnie wyższe (p=0,005) niż w wydzielinie szyjkowej bez *Ureaplasmy*; podobnie stężenie IL-6 we krwi pępowinowej było istotnie wyższe w grupie pierwszej niż w grupie referencyjnej (p=0,03). (Tabela V). Istotnie wyższe we krwi pępowinowej noworodków matek z *Ureaplasma spp.* było również stężenie innej prozapalnej interleukiny – TNF-α (p=0,011).

Porównując stężenie tych samych interleukin w wydzielinie szyjkowej i krwi pępowinowej noworodków z ciąż zakończonych w czasie późniejszym tj. między 8. a 70 dniem od PROM takich różnic nie stwierdzono. Jedynie w zakresie stężenia IL-6 we krwi pępowinowej noworodków matek z obecnością *Ureaplasma spp.* znaleziono istotnie statystycznie różnice (p=0,003). I mimo, że mediany stężenia IL-6 w wydzielinie szyjkowej matek, które urodziły po 7 dniach od PROM były podobne w obu grupach (32,81 v 30,14) to mediany stężenia IL-6 we krwi pępowinowej noworodków różniły się między sobą istotnie (108,8 v 7,58). (Tabela VI).

Jana Skrzypczak et al. Analiza stężenia prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM i we krwi pępowinowej ich noworodków.



Rycina 1. Zmiany stężenia IL-6 w ciągu kolejnych 6 tygodni od PPROM.



Rycina 2. Zmiany stężenia IL-19 w ciągu kolejnych 6 tygodni od PPROM.

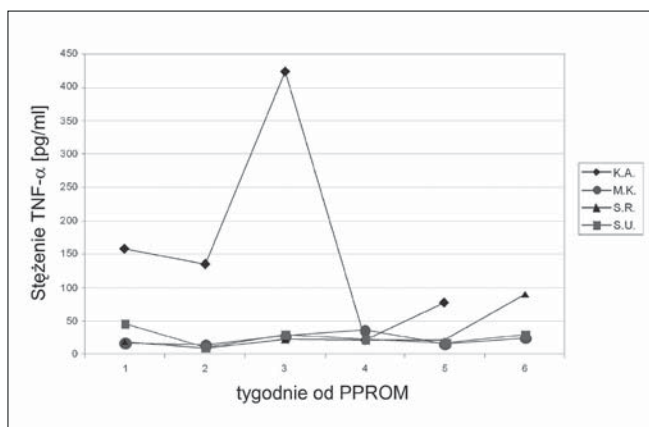


Figure 3. Zmiany stężenia TNF-α w ciągu kolejnych 6 tygodni od PPROM.

We krwi pępowinowej noworodków matek z obecnością *Ureaplasma spp.* zaobserwowano korelację stężenia IL-6 z TNF-α i dodatkowo IL-10 z TNF-α tam, gdzie poród następował po upływie przynajmniej 7 dni od pęknięcia błon płodowych. Uzyskano też dodatnią korelację między stężeniem IL-6 i TNF-α w wydzielinie szyjkowej i we krwi pępowinowej noworodków matek z PROM i *Ureaplasma spp.* (Tabela VII)

Dyskusja

Dążeniem współczesnej medycyny matczyno-płodowej jest poprawa wskaźników umieralności i zachorowalności przedwcześnie urodzonych noworodków, w następstwie m. in. pęknięcia błon płodowych. Przedwczesne pęknięcie błon płodowych jest nierozdzielnie połączone z reakcją zapalną płodu (FIRS), której następstwa, zwłaszcza dotyczące zapalenia mózgu, mogą pojawić się w odległym czasie. Dlatego też w ostatnich latach pojawiło się wiele prac na temat bakteryjnej inwazji płynu owodniowego i histologicznego *chorioamnionitis*.

Przedmiotem badań w zdecydowanej większości prac był płyn owodniowy lub rzadziej krew płodu [6, 11, 12].

Materiałem w naszych badaniach była wydzielina z szyjki macicy. Znaleźliśmy, że *Ureaplasma spp.* była najczęściej występującym w niej drobnoustrojem. Inni autorzy również najczęściej z drobnoustrojów wykrywali *Ureaplasma spp.* ale w płynie owodniowym [4, 10, 11].

Nasze badania mikrobiologiczne oparliśmy o metody hodowli i PCR. W żadnej sytuacji nie uzyskaliśmy dodatniego wyniku metodą PCR przy ujemnym wyniku hodowli i odwrotnie, wszystkie wyniki były zbieżne, podczas gdy Di Giulio i wsp. badając płyn owodniowy uzyskali 30% pozytywnych wyników metodą PCR tam, gdzie metodą hodowli nie stwierdzono drobnoustrojów [4]. Stoimy jednak na stanowisku, że metoda hodowli jest wystarczająca do detekcji genitalnych mykoplazm w wydzielinie szyjkowej i nie ma potrzeby rozszerzania jej o metodę łańcuchowej polimerazy chyba, że opóźnienie rozpoznania miałyby implikacje kliniczne.

Czy obecność drobnoustrojów w wydzielinie szyjkowej jest odzwierciedleniem ich inwazji w płynie owodniowym? Na to pytanie może odpowiedzieć praca Cobo i wsp., gdzie autorzy badali ogólną i lokalną odpowiedź zapalną u kobiet z przedwcześnie pękniętymi błonami płodowymi [10]. Zaskakującym jest, że w płynie owodniowym najczęściej izolowanym mikroorganizmem była *Ureaplasma urealyticum* (10/21), natomiast w wydzielinie z szyjki nie znaleziono jej u żadnej z 21 kobiet z inwazją bakteryjną płynu owodniowego.

Autorzy powyższego opracowania nie podzielają poglądu, że nieinwazyjne kompartmenty (wydzielina szyjkowa czy surowica) odzwierciedlają proces zapalny w jamie owodniowej. Inne stanowisko prezentują Holst i wsp., którzy w konkluzji swojej pracy dotyczącej analizy 27 prozapalnych markerów w płynie owodniowym i płynie szyjkowym podają, iż predykcja wewnątrzowodniowego zakażenia przy pomocy określonych białek w płynie szyjkowym była tak samo efektywna jak predykcja przy pomocy tych samych białek w płynie owodniowym [13]. Również Hitti i wsp. badając pacjentki z przedwczesnym porodem i zachowanymi błonami płodowymi zidentyfikowali w płynie pochwowym białka, które pozwoliły różnicować ciężarne z i bez bakteryjnej inwazji płynu owodniowego [14].

Innym spostrzeżeniem wynikającym z naszej pracy jest brak istotnych różnic w stężeniu prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej zakażonej *Ureaplasma spp.* w porównaniu do wydzieliny bez tych drobnoustrojów.

Wprawdzie mediany stężenia IL-6 i IL-19 są wyższe w wydzielinie z *Ureaplasma spp.* jednak istotności statystycznej nie uzyskano. Uzyskano natomiast korelację między IL-6 a TNF-α w wydzielinie szyjkowej z *Ureaplasma spp.*

Jana Skrzypczak et al. Analiza stężenia prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM i we krwi pępowinowej ich noworodków.

Tabela VII. Korelacje stężeń badanych cytokin w wydzielinie z kanału szyjki macicy i we krwi pępowinowej u kobiet z PROM.

Pacjentki, które urodziły w czasie do 7 dni od PROM					
Pacjentki <i>Ureaplasma spp.</i> pozytywne					
Wydzielina z kanału szyjki macicy (rho; p)					
Krew pępowinowa		IL-6	IL-19	TNF- α	
		IL-6	1; $p=0,017$	0,600; $p=0,350$	1; $p=0,017$
		IL-19	0,400; $p=0,517$	0,700; $p=0,233$	0,700; $p=0,233$
		IL-10	0,2; $p=0,783$	-0,1; $p=0,95$	-0,1; $p=0,95$
		TNF- α	0,9; $p=0,083$	0,8; $p=0,133$	0,9; $p=0,083$
Pacjentki <i>Ureaplasma spp.</i> negatywne					
Wydzielina z kanału szyjki macicy (rho; p)					
Krew pępowinowa		IL-6	IL-19	TNF- α	
		IL-6	0,273; $p=0,491$	-0,057; $p=0,843$	0,909; $p<0,001$
		IL-19	0,408; $p=0,341$	0,00; $p=0,968$	0,612; $p=0,121$
		IL-10	0,321; $p=0,438$	0,334; $p=0,438$	-0,429; $p=0,297$
		TNF- α	0,252; $p=0,545$	-0,75; $p=0,843$	0,883; $p<0,001$
Pacjentki, które urodziły w czasie >7 dni od PROM					
Pacjentki <i>Ureaplasma spp.</i> pozytywne					
Wydzielina z kanału szyjki macicy (rho; p)					
Krew pępowinowa		IL-6	IL-19	TNF- α	
		IL-6	0,964; $p<0,001$	-0,429; $p=0,297$	0,643; $p=0,096$
		IL-19	0,267; $p=0,545$	-0,223; $p=0,602$	0,134; $p=0,72$
		IL-10	0,964; $p<0,001$	-0,286; $p=0,491$	0,75; $p=0,39$
		TNF- α	0,893; $p<0,001$	-0,5; $p=0,217$	0,607; $p=0,121$
Pacjentki <i>Ureaplasma spp.</i> negatywne					
Wydzielina z kanału szyjki macicy (rho; p)					
Krew pępowinowa		IL-6	IL-19	TNF- α	
		IL-6	0,183; $p=0,612$	-0,31; $p=0,423$	-0,533; $p=0,124$
		IL-19	-0,02; $p=0,948$	0,191; $p=0,619$	0,317; $p=0,381$
		IL-10	0,611; $p=0,67$	-0,347; $p=0,353$	0,561; $p=0,99$
		TNF- α	0,183; $p=0,612$	-0,48; $p=0,885$	-0,1; $p=0,775$

Czy interleukina-19, która w naszych badaniach występowała w większym stężeniu w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM i *Ureaplasma spp.* niż u kobiet z PROM i bez *Ureaplasma spp.* jest związana z reakcją zapalną płodu?

Savason i wsp. znaleźli wyższe stężenie IL-19 we krwi dzieci z FIRS w porównaniu do noworodków bez FIRS, natomiast Kim i wsp. obserwowali wyższe stężenie IL-19 w płynie owodniowym w przypadku FIRS [3, 15]. W modelu zwierzęcym podanie do jamy otrzewnowej endotoksyn podwyższało ekspresję mRNA IL-19 i jego receptora w wielu narządach: sercu, wątrobie, płucach i nerkach. Wykazano, że IL-19 indukuje produkcję rodników tlenowych TNF- α i ekspresję COX-2, podobnie jak apoptozę w komórkach epitelialnych płuc i w hepatocytach [16]. Czy IL-19 jest ważnym ogniwem w układzie immunologicznym płodu i czy podwyższenie jej stężenia jest związane z uszkodzeniem narządów u płodów z FIRS na razie pozostaje bez odpowiedzi.

Jednym z ważniejszych wyników naszych badań jest brak istotnych zmian w stężeniu badanych interleukin, w zależności od czasu jaki wpłynął od pęknięcia błon płodowych. Powtarzane co 7 dni oznaczenia stężeń IL-6, IL-10, IL-19 i TNF- α nie wykazało istotnego wzrostu ich wartości w miarę upływu czasu od PROM ani zależności od wdrożonego leczenia antybiotykami, co ilustrują między innymi ryciny dotyczące 4 pacjentek u których pomiary wykonano przynajmniej 5 krotnie. W większości dostępnych prac pomiary stężeń prozapalnych interleukin w płynie owodniowym były wykonywane jednokrotnie, tuż przed podaniem antybiotyków i steroidów [4, 10, 17]. Powtórne oznaczenia były niemożliwe, ponieważ najczęściej indukowano porody; i tak w Czechach indukcja porodu następowała w ciągu 24 godzin gdy PROM miał miejsce w 34 tygodniu ciąży; w ciągu 48 godzin u tych pacjentek, u których PROM wystąpił między 32.0 i 33.6 tygodniem ciąży i w ciągu 72 godzin po pęknięciu błon płodowych między 28.0 i 31.6 tygodniem ciąży. Również

Jana Skrzypczak et al. Analiza stężenia prozapalnych interleukin w wydzielinie szyjkowej kobiet z PROM i we krwi pępowinowej ich noworodków.

w Hiszpanii indukuje się poród jeżeli PROM występuje w 31 tygodniu ciąży lub później. Natomiast przed 31 tygodniem ciąży powikłanej z PROM zleca się postępowanie wyczekujące. W Polsce postępowanie w przypadku PROM jest wyczekujące aż do 36-37 tygodnia ciąży, o ile pozwoli na to stan matki i dziecka. Czy uzyskujemy przez to gorsze wyniki w przeżywalności i zachorowalności noworodków z ciążą powikłanych PROM?

Myszę, że na to odpowiedzą dalsze badania, ale póki co, na postawie obserwacji stężeń prozapalnych interleukin nie można przesądzać o gorszym rokowaniu u noworodków, jako następstwa postępowania wyczekującego.

Ciekawe wyniki uzyskaliśmy porównując stężenie analizowanych interleukin w wydzielinie szyjkowej i krwi pępowinowej noworodków.

Znaleźliśmy istotną statystycznie różnicę w stężeniu IL-6 i TNF- α we krwi pępowinowej noworodków matek z i bez *Ureaplasma spp.*, które urodziły w ciągu 7 dni od PROM. Ponadto, co najważniejsze, zaobserwowaliśmy, że wysokie stężenie IL-6 i TNF- α we krwi pępowinowej korelowały dodatnio ze stężeniem tych interleukin w wydzielinie szyjkowej w przypadku zakażenia *Ureaplasma spp.*

Według wielu autorów niezależnym predyktorem reakcji zapalnej płodu oraz wczesnej sepsy noworodków przedwcześnie urodzonych jest stężenie IL-6 w płynie owodniowym i we krwi pępowinowej [1, 6, 12]. Z naszych badań wynika, że również stężenie IL-6 oraz TNF- α w wydzielinie szyjkowej może być brane po uwagę w ocenie ryzyka zakażenia u noworodka. Również Ryu i wsp. wnioskują, że prozapalne cytokiny, w ich pracy IL-6, IL-1 β , IL-8, w wydzielinie szyjkowo-pochwowej mogą służyć jako markery wewnątrzrodniowej infekcji u kobiet z PROM [18].

Nie znaleźliśmy natomiast różnicy w stężeniu IL-10 we krwi pępowinowej w odniesieniu do zakażenia *Ureaplasma spp.* ani korelacji między stężeniem IL-10 a IL-19, we krwi pępowinowej co wykazali Savasan i wsp [3]. Uważa się, że IL-19 i IL-10 są częścią immunologicznej odpowiedzi płodu, a protekcyjny efekt IL-10 został potwierdzony przez wielu autorów [19, 20]. Zastosowanie rekobinatu IL-10 zapobiegało porodem przedwczesnym i poronieniom u myszy pozbawionej genu, oraz zapobiegało uszkodzeniom mózgu spowodowanego zakażeniem [21].

W podsumowaniu należy podkreślić, że uzyskaliśmy dodatnią korelację między stężeniem IL-6 i TNF- α w wydzielinie szyjkowej a stężeniem tych cytokin we krwi pępowinowej noworodków matek z PROM i zakażeniem *Ureaplasma spp.* Tak więc stężenie IL-6 i TNF- α w wydzielinie szyjkowej pozyskiwanej nieinwazyjną metodą może stać się czynnikiem predykcyjnym reakcji zapalnej płodu (FIRS-u). Niewątpliwym ograniczeniem naszych badań jest mała liczba pacjentek i wynikające stąd trudności w uzyskiwaniu statystycznie istotnych różnic.

Wnioski

Metoda hodowli wydaje się być wystarczająca dla wykrycia *Ureaplasma spp* i nie ma potrzeby rozszerzania jej o metody łańcuchowej polimerazy, chyba że zależy nam na bardzo szybkim otrzymaniu wyniku.

Uzyskanie dodatniej korelacji między stężeniem IL-6 w wydzielinie szyjkowej a stężeniem IL-6 we krwi pępowinowej noworodków matek z PROM i *Ureaplasma spp.*, niezależnie od czasu przedłużenia ciąży, pozwala sądzić, iż prozapalne interleukiny pozyskane drogą nieinwazyjną mogą być wykorzystane w przewidywaniu reakcji zapalnej płodu.

Oświadczenie autorów:

1. Jana Skrzypczak – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Przemysław K. Wirstlein – oznaczenia laboratoryjne, analiza statystyczna, ilustracja wyników.
3. Magdalena Wróbel – przygotowanie, korekta ostatecznego kształtu manuskryptu.
4. Mateusz Mikołajczyk – współautor koncepcji i założeń pracy, protokołu, korekta, zebranie materiału.

Źródło finansowania:

Praca finansowana z badań statutowych Kliniki Rozrodczości nr: 502-01-01110142-00304.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

References

1. Cobo T, Kacerovsky M, Andrys C, [et al.]. Umbilical cord blood IL-6 as predictor of early-onset neonatal sepsis in women with preterm prelabour rupture of membranes. *PLoS One*. 2013, 8 (7), e69341.
2. Hofer N, Kothari R, Morris N, [et al.]. The fetal inflammatory response syndrome is a risk factor for morbidity in preterm neonates. *Am J Obstet Gynecol*. 2013, 209 (6), 542.e1-542.e11.
3. Savasan ZA, Chaiworapongsa T, Romero R, [et al.]. Interleukin-19 in fetal systemic inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012, 25 (7), 995-1005.
4. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, [et al.]. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2010, 64 (1), 38- 57.
5. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG*. 2002, 109 (5), 527- 533.
6. Kacerovsky M, Pliskova L, Bolehovska R, [et al.]. The microbial load with genital mycoplasmas correlates with the degree of histologic chorioamnionitis in preterm PROM. *Am J Obstet Gynecol*. 2011, 205 (3), 213.e1-7.
7. Tomusiak A, Heczko PB, Janeczko J, [et al.]. Bacterial infections of the lower genital tract in fertile and infertile women from the southeastern Poland. *Ginekol Pol*. 2013, 84, 352-358.
8. Rodríguez N, Fernandez C, Zamora Y, [et al.]. Detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in amniotic fluid: association with pregnancy outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011, 24 (1), 47-50.
9. Holst RM, Hagberg H, Wennerholm UB, [et al.]. Prediction of microbial invasion of the amniotic cavity in women with preterm labour: analysis of multiple proteins in amniotic and cervical fluids. *BJOG*. 2011, 118 (2), 240-249.
10. Cobo T, Jacobsson B, Kacerovsky M, [et al.]. Systemic and local inflammatory response in women with preterm prelabour rupture of membranes. *PLoS One*. 2014, 9 (1), e85277.
11. Lee SE, Romero R, Jung H, [et al.]. The intensity of the fetal inflammatory response in intraamniotic inflammation with and without microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 2007, 197 (3), 294.e1-294.e16.
12. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, [et al.]. The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol*. 2007, 50 (3), 652-683.
13. Holst RM, Hagberg H, Wennerholm UB, [et al.]. Prediction of microbial invasion of the amniotic cavity in women with preterm labour: analysis of multiple proteins in amniotic and cervical fluids. *BJOG*. 2011, 118 (2), 240-249.
14. Hitti J, Lapidus J A, Lu X, [et al.]. Noninvasive diagnosis of intraamniotic infection: proteomic biomarkers in vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol*. 2010, 203 (1), 32.e1-8.
15. Kim CJ, Yoon BH, Park SS, [et al.]. Acute funisitis of preterm but not term placentas is associated with severe fetal inflammatory response. *Hum Pathol*. 2001, 32 (6), 623-629.
16. Hsing CH, Chiu CJ, Chang LY, [et al.]. IL-19 is involved in the pathogenesis of endotoxin shock. *Shock*. 2008, 29 (1), 7-15.
17. Kacerovsky M, Pliskova L, Bolehovska R, [et al.]. The impact of the microbial load of genital mycoplasmas and gestational age on the intensity of intraamniotic inflammation. *Am J Obstet Gynecol*. 2012, 206 (4), 342.e1-8.
18. Ryu A, Park KH, Oh KJ, [et al.]. Predictive value of combined cervicovaginal cytokines and gestational age at sampling for intra-amniotic infection in preterm premature rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2013, 92 (5), 517-524.
19. Robertson SA, Skinner RJ, Care AS. Essential role for IL-10 in resistance to lipopolysaccharide-induced preterm labor in mice. *J Immunol*. 2006, 177 (7), 4888-4896.
20. Terrone DA, Finehart BK, Granger JP, [et al.]. Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model. *Obstet Gynecol*. 2001, 98 (3), 476-480.
21. Frøen JF, Munkeby BH, Stray-Pedersen B, Sangstad OD. Interleukin-10 reverses acute detrimental effects of endotoxin-induced inflammation on perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res*. 2002, 942 (1-2), 87-94.