

Ocena stężenia wybranych parametrów biochemicznych w surowicy kobiet ciężarnych z zakażeniem HPV 16 i 18

Concentration of selected biochemical parameters in blood of pregnant women infected by HPV 16 and 18

Karowicz-Bilińska Agata, Brzozowska Maria, Estemberg Dorota,
Kuś Ewa, Berner-Trąbska Marlena, Kowalska-Koprek Urszula

Klinika Patologii Ciąży, I Katedra Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi

Streszczenie

Bezobjawowe zakażenie HPV u kobiet ciężarnych może być związane ze zmianami stężeń cytokin prozapalnych oraz enzymów proteolitycznych. Może być to czynnikiem warunkującym przetrwanie zakażenia podczas ciąży.

Cel pracy: *Celem pracy była ocena wybranych parametrów biochemicznych u kobiet ciężarnych z zakażeniem HPV typów onkogennych.*

Materiał i metoda: *Badania zostały przeprowadzone w latach 2008-2009 w I Katedrze Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wśród kobiet ciężarnych w III trymestrze ciąży. Grupę badaną stanowiło 19 kobiet ciężarnych zakażonych onkogennymi typami wirusa HPV-16, 18. Grupę kontrolną stanowiły 34 ciężarne w takim samym wieku ciążowym, u których nie stwierdzono zakażenia HPV. W krwi żyłnej oceniano stężenia interleukiny-1, TNF- α oraz α -1 antytrypsyny.*

Wyniki: *Wartości stężeń ocenianych parametrów nie różniły się w porównywanych grupach kobiet.*

Wnioski: *Zakażenie HPV wysokiego ryzyka nie wpływa na wartości stężeń cytokin prozapalnych. W zakażeniu HPV podczas ciąży nie obserwuje się obniżenia obrony antyproteolitycznej.*

Słowa kluczowe: **ciąża / zakażenie HPV / TNF- α / interlukina-6 /**

Summary

Asymptomatic HPV infection in pregnant women may be connected with changes of pro-inflammatory cytokines and proteolytic enzymes which may condition the persistence of infection during pregnancy.

Aim: *The main aim of the study was to evaluate the concentration of interleukin-1, TNF- α and α -1 antitrypsin in pregnant women infected by oncogenic types HPV.*

Materials and method: *The study was conducted in 2008-2009 at the Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University Lodz, on pregnant women in the third trimester of pregnancy. The study group consisted on 19 pregnant women HPV-16, -18 infected. The control group consisted on 34 pregnant women at the same gestational age, HPV-negative. The concentration of interleukin-1, TNF- α and α -1 antitrypsin was estimated in blood.*

Results: *The results of concentration interleukin-1, TNF- α and α -1 antitrypsin were similar in both groups of pregnant women.*

Conclusions: *High risk HPV infection has no influence on the concentration of pro-inflammatory cytokines. In HPV infection during pregnancy the anti proteolytic defense did not decrease.*

Key words: **pregnancy / HPV infection / TNF-alfa / interlukin-6 /**

Adres do korespondencji:

Agata Karowicz-Bilińska
Klinika Patologii Ciąży, I Katedra Ginekologii i Położnictwa U. M. w Łodzi
94-029 Łódź, ul. Wileńska 37
tel./fax. 42 6804725
e-mail: agakar@interia.pl

Otrzymano: 15.01.2010
Zaakceptowano do druku: 20.06.2010

Wstęp

Infekcja onkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego może wywoływać zmiany dysplastyczne i raka szyjki macicy. Zakażenie może zostać wyeliminowane z organizmu dzięki odporności organizmu i przy braku dodatkowych czynników ryzyka. W przypadku osłabionej odporności, obecności dodatkowych czynników ryzyka rozwoju raka szyjki macicy dochodzi do przetrwania zakażenia. Zakażenie przetrwałe zanim doprowadzi do zmian dysplastycznych nie może być wykryte w badaniu cytologicznym.

Ciąża jest czynnikiem ryzyka zakażenia wirusem HPV sprzyjając również jego przetrwaniu. Zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego jest procesem miejscowym, co nie powinno mieć wpływu na stężenie związków np. o działaniu prozapalnym we krwi. Obecność infekcji może jednak być uzależniona od stężeń tych związków mogących mieć wpływ na możliwość ustąpienia zakażenia. Jednym z takich związków jest interleukina 6 [11-6], która jest cytokiną o działaniu prozapalnym hamującą wytwarzanie czynnika martwicy guza – *tumor necrosis factor* [TNF- α]. Jest również czynnikiem pirogennym, stymuluje różnicowanie limfocytów B, pobudza limfocyty T do produkcji interleukiny-2 oraz aktywuje limfocyty T rozpoznające antygeny i działa cytotoksyczne. Il-6 syntetyzowana jest przez monocyty, makrofagi, limfocyty T i B, keratynocyty, komórki owodni. Wzrost syntezy Il-6 powoduje interleukina-1, interferon, lipopolisacharydy, TNF oraz DNA i RNA wirusów [1, 2, 3].

Inną braną pod uwagę cytokiną jest TNF- α – kachektyna występująca w formie rozpuszczalnej odpowiadającej za większość jej funkcji biologicznych oraz prekursorowej – białka transblonowego biorącego udział w procesach zapalnych, proliferacji, apoptozy [4, 5]. Jego synteza zachodzi głównie w makrofażach i monocytach, neutrofilach, keratynocytach i komórkach tucznych. Uwalnianie i produkcja stymulowana jest przez lipopolisacharydy ścian bakteryjnych, IFN- γ (*interferon gamma*), interleukinę-1 oraz TNF- α [6]. Wpływa na limfocyty T, B i NK (*natural killer*), zwiększa właściwości żerne neutrofilii i ich uwalnianie ze szpiku kostnego. Ma działanie przeciwnowotworowe przez indukcję odpowiedzi immunologicznej, indukcję apoptozy, hamowanie proliferacji, działa pirogennie [7].

Alfa-1-antytrypsyna- alfa-1-antyproteaza jest jednym z najważniejszych inhibitorów proteaz serynowych hamującym działanie proteinazy-3, elastazy, katepsyny, trypsyny. Prawidłowa inhibicja proteaz serynowych chroni ustój przed nadmiernym rozpadem tkanki łącznej. Zabezpiecza również w ten sposób tkankę płucną przed procesami proteolizy. Jest syntetyzowana głównie w wątrobie oraz przez makrofagi [8, 9]. Spadek jej syntezy wpływa na wzrost zagrożenia rozpadu kolagenu w ten sposób podnosząc ryzyko przedwczesnego zakończenia ciąży [10, 11].

Cel pracy

Celem pracy była ocena stężeń interleukiny-1, TNF- α oraz α -1 antytrypsyny u kobiet ciężarnych z zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego.

Materiał i metoda

Badania zostały przeprowadzone w latach 2008-2009 w I Katedrze Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wśród kobiet ciężarnych znajdujących się w trzecim trymestrze ciąży.

Grupę badaną stanowiło 19 kobiet, u których podczas badania przesiewowego stwierdzono zakażenie onkogennymi typami wirusa HPV – typem 16 i/lub 18.

Grupę kontrolną/porównawczą stanowiły 34 ciężarne w takim samym wieku ciążowym, u których nie stwierdzono zakażenia HPV. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Uczelnianej Komisji Bioetycznej RNN/8/05/KE- 2005.

Do badania zakwalifikowano kobiety ciężarne w 38-40 tygodniu ciąży, będące pod opieką ambulatoryjną, u których nie stwierdzano powikłań ciąży. Warunkiem włączenia do badania była ustna deklaracja o 30 tygodniowej abstynencji seksualnej, co w przypadku wykrycia zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego może wskazywać na nabycie zakażenia przed ciążą.

Wszystkie kobiety ciężarne miały również prawidłowy wynik badania cytologicznego ocenianego w systemie Bethesda przed ciążą. U wszystkich kobiet ciężarnych pobierano materiał z szyjki macicy na obecność DNA HPV typów onkogennych oraz krew żylną dla wykonania oznaczeń biochemicznych.

Materiał na obecność DNA HPV pobrany za pomocą jałowej szpatułki umieszczany był w sterylnym pojemniku.

Oceny obecności DNA onkogennych typów HPV dokonywano za pomocą zestawu PCR *Human Papilloma Typing Set* (TaKaRa). W przypadku wykrycia DNA HPV przeprowadzono analizę jego typu- ocenając, czy jest to typ 16 i 18.

Krew do badań biochemicznych pobierana była rano, na czczo z żył zgięcia łokciowego w ilości 20 mililitrów i pozostawiana na około 20 minut do uzyskania skrzepu. Następnie krew poddawana została wirowaniu z prędkością 10000xg przez 10 minut. Uzyskaną w ten sposób surowicę dzielono na 3 części i umieszczano w plastikowych probówkach typu Eppendorf. Każde oznaczenie wykonywane było ze świeżo rozmrożonej próbki.

Badanie stężenia interleukiny-6, TNF- α , α -1 antytrypsyny przeprowadzano spektrofotometrycznie używając gotowych zestawów z firmy Biokom metodą Elisa.

Charakterystykę grup przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka grup badanych.

Grupa	Wiek ciężarnych w latach	Odsetek wieloródek	Średni czas trwania ciąży w tygodniach	Liczebność ogółem
badana	27±9	36,6%	39±1	19
kontrolna	25±8	38,1%	38±1	34
ogółem	25±9	37,7%	39±2	53

Ocena stężenia wybranych parametrów biochemicznych w surowicy kobiet ciężarnych z zakażeniem HPV 16 i 18.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Oceniono wartość średnią, odchylenie standardowe, wartość maksymalną i minimalną. Wartości średnie porównano za pomocą testu nieparametrycznego Manna-Whitneya.

Obliczenia wykonano w oparciu o program STATISTICA PL. (Nr licencji SN:SP7105488009G51).

Przyjęto istotność statystyczną na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

Na podstawie przeprowadzonego badania na obecność DNA HPV typów onkogennych, które było pozytywne u wszystkich pacjentek grupy badanej (kryterium włączenia) stwierdzono u 15 (78%) kobiet obecność DNA wirusa typu 16 a u 4 (22%) obecność DNA 18 typu wirusa HPV. Nie stwierdzono wśród badanych kobiet zakażenia jednocześnie obydwojema tymi typami wirusa.

Na rycinie 1 przedstawiono wartości średnie i odchylenie standardowe stężenia interleukiny-6 surowicy kobiet ciężarnych w pg/ml. (Rycina 1).

Maksymalna wartość stężenia interleukiny-6 w surowicy kobiet ciężarnych grupy badanej wynosiła 0,150pg/ml a minimalna 0,084pg/ml. Średnia wartość dla całej grupy wynosiła 0,1035 z odchyleniem standardowym wynoszącym 0,0157. W grupie porównawczej maksymalna wartość stężenia IL-6 wynosiła 0,181 pg/ml, minimalna 0,083 pg/ml a średnia wartość 0,1527pg/ml $\pm 0,0125$. Porównując wartości stężeń interleukiny-6 uzyskane w porównywanych grupach nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy grupami ($p < 0,05$).

Ocenie poddano również stężenia TNF- α w surowicy kobiet porównywanych grup. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 2. (Rycina 2).

Średnia wartość stężenia tego parametru wynosiła w grupie badanej 0,119 $\pm 0,038$ pg/ml, wartość maksymalna 0,195pg/ml, minimalna 0,094 pg/ml. W grupie porównawczej średnia wartość stężenia TNF- α wynosiła 0,115 $\pm 0,022$, maksymalna 0,148pg/ml, minimalna 0,092pg/ml.

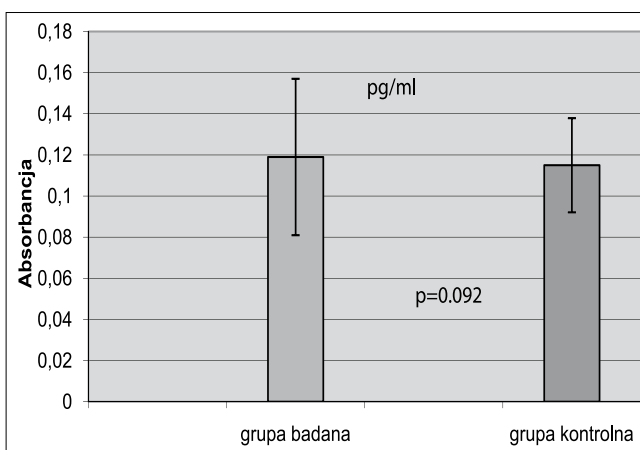
Średnia wartość α -1 antytypsyny w grupie badanej wynosiła 0,222 $\pm 0,088$ μ g/l, maksymalna wartość to 0,438 μ g/l, a minimalna 0,110 μ g/l. W grupie porównawczej średnia wartość stężenia α -1 antytypsyny wyniosła 0,220 $\pm 0,049$ μ g/l, maksymalna wartość to 0,317 μ g/l, a minimalna 0,156 μ g/l. (Rycina 3).

Dyskusja

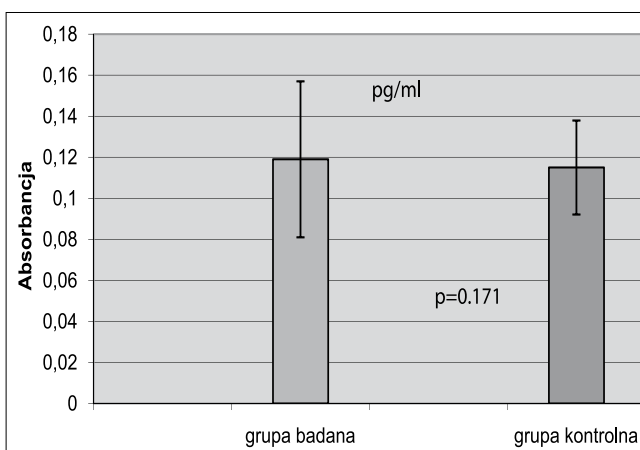
Ciąża stanowi jeden z czynników ryzyka zakażenia HPV oraz przetrwania zakażenia, co może być przyczyną powstania zmian dysplastycznych na szyjce macicy. Uzyskany wynik typowania wśród grupy ciężarnych z prawidłową cytologią wskazuje na dominujący udział zakażeń typem 16 powodującym raka płaskonabłonkowego szyjki macicy [12].

Według Brandão najczęściej występującym wśród kobiet ciężarnych typem HPV jest 16, ale drugi, co do częstości jest typ 58 [13]. Infekcja HPV podczas ciąży stanowi zagrożenie zakażeniem wertykalnym płodu, co może wpływać na dalsze życie tych dzieci [14, 15, 16].

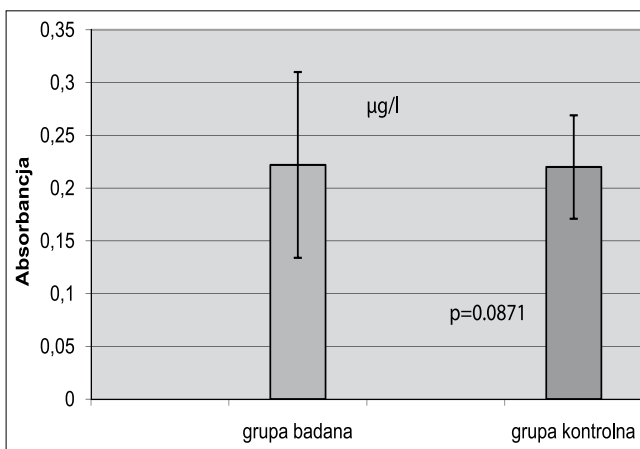
Badanie cytologiczne wykonane przed lub na początku ciąży, bez cech infekcji HPV oraz zmian dysplastycznych stwarzało możliwość zakwalifikowania pacjentek do grupy zakażeń przetrwałych [17, 18].



Rycina 1. Średnie wartości stężeń interleukiny-6 w surowicy w porównywanych grupach.



Rycina 2. Średnie wartości stężeń TNF- α w surowicy w porównywanych grupach.



Rycina 3. Średnie wartości stężeń α -1 antytypsyny w surowicy w porównywanych grupach.

Badanie stężenia interleukiny-6 we krwi obwodowej może wskazać na to, czy istnieje różnica między jej stężeniem u osób zakażonych wirusem HPV i niezakażonych. Aby uzyskać optymalizację wyników badania w obydwu grupach wykonywano je w takim samym stanie zaawansowania ciąży- między 38 a 40 tygodniem jej trwania. Nie uzyskano istotnych różnic między porównywanymi grupami, co może sugerować, że stężenie interleukiny-6 nie ma wpływu na możliwość przetrwania infekcji. IL-6 jest czynnikiem ułatwiającym proliferację komórek nowotworów, zwłaszcza o wysokim stopniu zróżnicowania [19]. Stężenie może korelować z przeżywalnością i stanem zaawansowania zmian a jej podwyższone stężenia stwierdzano w nowotworach macicy [20]. Jak stwierdzono obecność zakażenia HPV typów onkogennych nie ma wpływu na wzrost stężenia interleukiny-6 we krwi obwodowej u kobiet ciężarnych. Jak podaje Tjiong u kobiet z rakiem szyjki macicy wzrasta miejscowa sekrecja interleukiny 6 i jest również uzależniona od stopnia zaawansowania zmian [21]. Podwyższone wartości stężeń interleukiny-6 oraz TNF- α obserwowano również u kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym oraz cukrzycą [22, 23].

W przedstawionym badaniu nie było kobiet ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą, zespołem ograniczonego wzrostania płodu, co pozwoliło na uzyskanie miarodajnych wyników, zależnych jedynie od obecności zakażenia HPV. Porównując uzyskane wyniki stężeń TNF- α w porównywanych grupach nie stwierdzono również istotnych różnic. Innego zdania jest Bais, który uzyskał wyższe wartości stężeń cytokin prozapalnych we krwi obwodowej nie tylko u kobiet z dodatnim wynikiem obecności DNA HPV ale również u kobiet z różnymi stopniami zaawansowania zmian dysplastycznych [24]. Uzyskany w naszym badaniu wynik może wynikać z tego, że na poziom stężeń cytokin mogła mieć wpływ zaawansowana ciąża.

Uzyskane w obydwu porównywanych grupach wartości stężeń α -1 antytrypsyny w surowicy krwi nie wykazywały istotnych różnic statystycznych. Ta obserwacja zgodna jest z badaniami innych autorów odnoszącymi się do zmian w stężeniach tego parametru u dzieci leczonych z powodu infekcji HPV typów nieonkogennych w drogach oddechowych [24]. Sugeruje to również brak obecności odczynu zapalnego w przebiegu tego zakażenia. Zaobserwowano spadek stężeń α -1 antytrypsyny u kobiet ciężarnych z GDM w porównaniu ze zdrowymi ciężarnymi, co może być spowodowane glikozylacją lub uszkodzeniem oksydacyjnym α -1 antytrypsyny [25]. Wartości stężeń α -1 antytrypsyny uzależnione są podobnie jak TNF α od czasu trwania ciąży i stąd konieczne jest wykonywanie badań w podobnym wieku ciążowym. [11]. Brak istotnych zmian w stężeniach cytokin prozapalnych oraz α -1 antytrypsyny sugeruje brak wpływu tych parametrów na przebieg zakażenia HPV podczas ciąży.

Wnioski

1. Zakażenie HPV wysokiego ryzyka nie wpływa na wartości stężeń cytokin prozapalnych.
2. W zakażeniu HPV podczas ciąży nie obserwuje się obniżenia obrony antyproteolitycznej.

Piśmiennictwo

1. Gołąb J, Jakóbiński M, Zagożdżon J, [i wsp.]. Cytokiny. Immunologia. Warszawa: Wyd Nauk PWN. 2002, 15, 198-205.
2. Jędrzejczak W. Cytokiny. Zastosowanie kliniczne. Wrocław: Volumed. 1997, 3, 33-50.
3. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S, [et al.]. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immuno.* 2006, 63, 321-329.
4. Pupek-Musiałik D, Bogdański P. Rola adiponektyny i czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) w patogenezie nadciśnienia tętniczego związanego z otyłością. *Post Nauk Med.* 2004, 4, 12-19.
5. Bourma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2003, 3, 521-533.
6. Tumanov A, Grivennikov S, Kruglov A, [et al.]. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. *Blood.* 2010, 5, 78-83.
7. Maltesen H, Nielsen C, Dalbøge C, [et al.]. Methylprednisolone prevents tumor necrosis factor- α -dependent multinucleated giant cell formation. *Rheumatology.* 2010, 15, 234-238.
8. Stockley R. Alpha-1-antitrypsin deficiency: What next? *Thorax.* 2000, 55, 614-618.
9. Needham M, Stockley R. Alpha 1-antitrypsin deficiency 3. Clinical manifestations and natural history. *Thorax.* 2004, 59: 441-445.
10. Izumi-Yoneda N, Toda A, Okabe M, [et al.]. Alpha 1 antitrypsin activity is decreased in human amnion in premature rupture of the fetal membranes. *Mol Hum Reprod.* 2009, 15, 49-57.
11. Larsson A, Palm M, Hansson L, [et al.]. Reference values for alpha1-acid glycoprotein, alpha1-antitrypsin, albumin, haptoglobin, C-reactive protein, IgA, IgG and IgM during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008, 87, 1084-1088.
12. Kędzia W, Schmidt M, Poreba E, [i wsp.]. Identyfikacja wirusa brodawczaka w 414 przypadkach raka szyjki macicy w Wielkopolsce. *Ginekol Pol.* 2005, 76, 548-554.
13. Brandão Vda C, Lacerda H, Lucena-Silva N, [et al.]. Frequency and types of human papillomavirus among pregnant and non-pregnant women with human immunodeficiency virus infection in Recife determined by genotyping. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009, 104, 755-763.
14. Castellsagué X, Drudis T, Cañadas M, [et al.]. Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis.* 2009, 9, 74.
15. Karowicz-Bilińska A. Zakażenie latentne wirusem brodawczaka ludzkiego kobiet ciężarnych a kolonizacja łożyska HPV- doniesienie wstępne. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 966-970.
16. Loomis D, Pastore P, Rejman K, [et al.]. Cervical cytology in vulnerable pregnant women. *J Am Acad Nurse Pract.* 2009, 21, 287-294.
17. Freitas L, Pereira C, Checon R. Adeno-associated virus and human papillomavirus types in cervical samples of pregnant and non-pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009, 145, 41-44.
18. Tarka A, Szczepańska M, Raczynska D, [i wsp.]. Risk factors and frequency of occurrence of HPV DNA of high oncogenic types in paraepidermal epithelium cells of the uterine cervix, in the trophoblast, and in the peripheral blood of pregnant patients. *Ginekol Pol.* 2008, 79, 871-876. Polish.
19. Bellone S, Watts K, Cane S, [et al.]. High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2005, 98, 92-98.
20. Songur N, Kuru B, Kalkan F, [et al.]. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Tumor.* 2004, 90, 196-200.
21. Tjiong M, van der Vange, ten Kate F, [et al.]. Increased IL-6 and IL-8 levels in cervicovaginal secretions of patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 1999, 73, 285-291.
22. Tosun M, Celik H, Avci B, [et al.]. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010, 23, 880-886.
23. Konukoglu D, Hatemi H, Bayer H, [et al.]. Relationship between serum concentrations of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in female Turkish subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Horm Metab Res.* 2006, 38, 34-37.
24. Bais A, Beckmann I, Ewing P, [et al.]. Cytokine release in HR-HPV(+) women without and with cervical dysplasia (CIN II and III) or carcinoma, compared with HR-HPV(-) controls. *Mediators Inflamm.* 2007, 2007, 24147.
25. Szydłowski J, Sobieska M, Grzegorzowski M, [i wsp.]. Some acute phase proteins in children suffering from recurrent laryngeal Papillomatosis. *Otolaryngol Pol.* 2005, 59, 505-509. Polish.
26. Yaghmaei M, Hashemi M, Shikhzadeh A, [et al.]. Serum trypsin inhibitory capacity in normal pregnancy and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009, 84, 201-204.