

# Krytyczne wartości TNF-alfa oraz IL-1-beta w ocenie ryzyka przedwczesnego pęknięcia błon płodowych

## Critical values of TNF-alpha and IL-1-beta in the risk of premature rupture of membranes

© GinPolMedProject 2 (20) 2011

Artykuł oryginalny/Original article

HUBERT HURAS<sup>1</sup>, REROŃ ALFRED<sup>1</sup>, KRZYSZTOF RYTLEWSKI<sup>1</sup>, ANNA WÓJTOWICZ<sup>1</sup>,  
KATARZYNA KUŚMIERSKA<sup>1</sup>, ROBERT JACH<sup>2</sup>, MAREK SAJEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika Położnictwa i Perinatologii UJ CM

Kierownik: prof. dr hab. med. Alfred Reroń

<sup>2</sup> Klinika Ginekologii i Onkologii

Kierownik: prof. dr hab. med. Antoni Basta

Adres do korespondencji/Address for correspondence:

Dr n. med. Hubert Huras

Klinika Położnictwa i Perinatologii UJ CM

ul. M. Kopernika 23, 31-501 Kraków

tel. 608-352-493; e-mail: huberthuras@wp.pl

### Statystyka/Statistic

Liczba słów/Word count 1439/1679

Tabele/Tables 1

Ryciny/Figures 0

Piśmiennictwo/References 14

Received: 01.03.2011

Accepted: 14.03.2011

Published: 10.04.2011

### Streszczenie

*Wstęp.* Jednym z czynników prowadzących do wystąpienia porodu przedwczesnego jest przedwczesne pęknięcie pęcherza płodowego. Dla prawidłowego funkcjonowania pęcherza owodniowego niezbędna jest prawidłowa stabilizacja macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych. Przedwczesne pęknięcie pęcherza owodniowego połączone z infekcją wewnątrzmaciczną związane jest ze znaczącym wzrostem średniego poziomu MMP-1. Wzrost ten spowodowany jest obecnością w płynie owodniowym mediatorów stanu zapalnego, a w szczególności: IL-1-beta, TNF-alfa, które mają zdolność nasilania ekspresji genowej MMP-1.

*Cel.* Celem pracy było określenie wartości poziomów TNF-alfa oraz IL-1-beta, które jednoznacznie wskazywałyby na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego.

*Material i metodyka.* Badanie miało charakter prospektywny, kohortowy i objęło 40 kobiet ciężarnych hospitalizowanych z powodu przedwczesnego odpływania płynu owodniowego w ciąży niedonoszonej oraz 40 osobową grupę kontrolną, ciężarnych rodzących w terminie porodu w Klinice Położnictwa i Perinatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w okresie od 1 stycznia do 30 grudnia 2009 roku. Oznaczeń TNF-alfa oraz IL-1-beta w surowicy krwi w grupie badanej dokonano dwukrotnie w trakcie hospitalizacji oraz podczas porodu, w grupie kontrolnej jednokrotnie - podczas porodu.

*Wyniki.* W przeprowadzonym badaniu wykazano, że wartości TNF-alfa powyżej 0,856 pg/ml oraz IL-1-beta powyżej 0,412 pg/ml jednoznacznie wskazują na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego.

**Słowa kluczowe:** TNF-alfa, Interleukina-1-beta, przedwczesne pęknięcie pęcherza owodniowego

### Summary

*Introduction.* One of the factors leading to the occurrence of preterm labor is premature rupture of membranes. For proper functioning of the amniotic sac is needed proper stabilization of the extracellular matrix of fetal membranes. Premature rupture of membranes combined with intrauterine infection is associated with a significant increase in the average level of MMP-1. This increase is due to the presence in amniotic fluid inflammatory mediators, particularly IL-1-beta, TNF-alpha, having the capacity deterioration in gene expression of MMP-1.

*Aim.* The aim of this study was to determine the levels of TNF-alpha and IL-1-beta, which clearly indicate the occurrence of premature rupture of membranes.

*Materials and methods.* The study was a prospective, controlled study of 40 pregnant women hospitalized due to premature rupture of membranes and control group of 40 pregnant women delivered on time in the Department of Obstetrics and Perinatology, Jagiellonian University in the period from January 1 to December 30, 2009 year. Serum level of TNF-alpha and interleukin-1-beta was measured twice during hospitalization and during labour in study group and in control group only during labour.

*Results.* The study showed that TNF-alpha values above 0.856 pg/ml and interleukin-1-beta than 0.412 pg/ml, clearly indicate the occurrence of premature rupture of membranes.

**Key words:** TNF-alpha, Interleukin-1-beta, preterm rupture of membranes

## WSTĘP

Porody przedwczesne stanowią w Polsce około 7,4 – 8,2% ogólnej liczby porodów [1]. Jednym z czynników prowadzących do wystąpienia porodu przedwczesnego jest przedwczesne pęknięcie pęcherza owodniowego (*preterm rupture of membranes – PROM*). Dla prawidłowego funkcjonowania pęcherza owodniowego niezbędna jest prawidłowa stabilizacja macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych. Główną składową macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych jest kolagen. Aktualnie w organizmie ludzkim wyróżnia się 19. różnych typów kolagenu, kodowanych przez 30. genów. W macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych występują następujące typy kolagenu: I, III, V, VI oraz VII – dominują typy I i III [2]. Ważną częścią macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych warunkującą jej integralność są metaloproteiny (MMP).

Wyróżnia się następujące metaloproteiny błon płodowych [3]:

- gelatynazy: MMP-2 i MMP-9,
- stromelyazy: MMP-3, MMP-7, MMP-10.

Metaloproteiny syntezowane są jako proenzymy, a ich aktywacja następuje w oparciu o interakcję z plazminą oraz innymi metaloproteinazami. Ponadto wyróżnia się metaloproteiny związane z komórkami błon płodowych (MT-MMPs): MMP-1, MMP-2, MMP-3 oraz MMP-4 (2,3,4). Metaloproteiny są enzymami o działaniu destrukcyjnym, dlatego w obrębie błon płodowych syntezowany jest tkankowy inhibitor metaloproteinaz (TIMP) [5]. Metaloproteiny odgrywają podstawową rolę w pęknięciu pęcherza owodniowego zarówno przedwczesnym, jak i o czasie. Przedwczesne pęknięcie pęcherza owodniowego połączone z infekcją wewnątrzmaciczną związane jest ze znaczącym wzrostem średniego poziomu MMP-1 w porównaniu do przypadków z zachowanym pęcherzem płodowym i bez cech infekcji. Wzrost ten spowodowany jest obecnością w płynie owodniowym mediatorów stanu zapalnego, a w szczególności: interleukiny-1-beta (IL-1-beta) oraz TNF-alfa, które mają zdolność nasilania ekspresji genowej MMP-1 [6].

## INTRODUCTION

Preterm deliveries constitute ca. 7.4-8.2% of all deliveries in Poland [1]. One of the factors contributing to a preterm delivery is preterm rupture of membranes (PROM). For the amniotic sac to function correctly, an adequate stability of extracellular matrix of fetal membranes is necessary. The main component of the extracellular matrix is collagen. So far, 19 different types of collagen coded by 30 genes have been identified in the human organism. In the extracellular matrix of fetal membranes, the following types of collagen occur: I, III, V, VI, VII - with the types I and III predominating [2]. Important components of the extracellular matrix are matrix metalloproteinases (MMP) that determine its integrity.

The following metalloproteinases of fetal membranes have been identified [3]:

- gelatinases: MMP-2 and MMP-9,
- stromelysins: MMP-3, MMP-7, MMP-10.

Metalloproteinases are synthesized as proenzymes, and their activation involves an interaction with plasmin and other metalloproteinases. There are also membrane-type metalloproteinases (MT-MMPs): MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-4 (2,3,4). Metalloproteinases are destructive enzymes, therefore tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) is synthesized in fetal membranes [5]. Metalloproteinases play the principal role in both preterm and full-term rupture of fetal membranes. Preterm rupture of membranes accompanied by an intrauterine infection is associated with a significant increase of the mean level of MMP-1 as compared to the cases with preserved membranes and without infections. The increase results from the presence of inflammatory mediators in the amniotic fluid, particularly of interleukin-1-beta, (IL-1-beta) and TNF-alpha, capable of intensifying gene expression of MMP-1 [6].

## CEL

Celem pracy było określenie wartości poziomów TNF-alfa oraz IL-1-beta, które jednoznacznie wskazywałyby na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego.

## MATERIAŁ I METODY

Badanie miało charakter prospektywny, kohortowy i objęło 40 kobiet ciężarnych hospitalizowanych z powodu przedwczesnego odpływania płynu owodniowego w ciąży niedonoszonej oraz 40 osobową grupę kontrolną, ciężarnych rodzących w terminie porodu w Klinice Położnictwa i Perinatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w okresie od 1 stycznia do 30 grudnia 2009 roku. Infekcyjną etiologię przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego w grupie badanej potwierdzono dodatnim wynikiem badania mikrobiologicznego wymazu z szyjki macicy. Oznaczeń TNF-alfa oraz IL-1-beta w surowicy krwi w grupie badanej dokonano dwukrotnie w trakcie hospitalizacji oraz podczas porodu, w grupie kontrolnej jednokrotnie - podczas porodu. Poziomy powyższych markerów stanu zapalnego oznaczono w Katedrze Fizjologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

## WYNIKI

Analizując dane demograficzne stwierdzono, że średni wiek ciężarnych z grupy badanej wyniósł 25,2 lat, natomiast z grupy kontrolnej 26,3 lat. Większość pacjentek z analizowanych grup zamieszkiwało miasto powyżej 100 000 mieszkańców (57,5% vs. 50%). Na podstawie analizy przeszłości położniczej stwierdzono, że w grupie badanej odsetek wieloródek wyniósł 65%, w grupie kontrolnej 52%. Grupy nie różniły się pod względem częstości PROM w poprzedniej ciąży, która wyniosła 5%. Analizując sposób ukończenia poprzedniej ciąży stwierdzono, że znamiennej częściej pacjentki z grupy badanej przeżyły poród drogami i siłami natury niż rozwiązywane były cięciem cesarskim w porównaniu do grupy kontrolnej (57,5% vs. 42,5%). Na podstawie analizy uzyskanych wyników, stwierdzono różnice pomiędzy grupami w liczbie przeżytych poronień – odsetek przeżytych poronień w grupie badanej wyniósł 10%, podczas gdy w grupie kontrolnej 5%.

Oceniając znaczenie czynnika infekcyjnego u pacjentek z grupy badanej analizie poddano wyniki mikrobiologiczne wymazów z szyjki macicy. Stwierdzono, że najczęstszym patogenem była infekcja grzybicza *Candida albicans* (57%), następnie w kolejności: *Escherichia coli* (30%), *Bacterioides species* (8%) oraz *Klebsiella pneumoniae* (5%).

Dokonując oceny TNF-alfa odnotowano statystycznie istotnie wzrastające wartości średnich podczas ciąży oraz w okresie porodu w grupie badanej (2,07pg/ml vs. 2,70pg/ml). Podobną relację zaobserwowano analizując stężenia IL-1-beta w grupie badanej podczas ciąży i porodu (1,53pg/ml vs. 1,91 pg/ml). Oceniając

## AIM

The aim of the study was to determine the levels of TNF-alpha and IL-1-beta that would clearly indicate preterm rupture of membranes.

## MATERIAL AND METHODS

A prospective cohort study included 40 pregnant women hospitalized due to preterm escape of amniotic fluid in preterm pregnancy, and a reference group of 40 full-term parturients at the Clinic of Obstetrics and Perinatology of the Jagiellonian University Medical College between January 1 and December 30, 2009. Infectious etiology of preterm rupture of membranes in the test group was confirmed by positive results of microbiological examination of uterine cervix swabs. The level of TNF-alpha and IL-1-beta in blood serum was determined twice in the test group: during hospitalization and in labour, and once in the reference group: in the course of labour. The levels of the two inflammatory markers were determined at the Department of Physiology of the Jagiellonian University Medical College.

## RESULTS

An analysis of demographic data revealed that the average age of the pregnant women in the test group was 25.2, while in the reference group it was 26.3. Most patients from both groups lived in cities of over 100,000 inhabitants (57.5% vs. 50%). As for obstetrical history, the rate of multiparas in the test group was 65%, and in the reference group: 52%. The groups did not differ with respect to the frequency of PROM in the previous pregnancy, which was 5%. An analysis of the previous delivery showed that the patients in the test group had had significantly more frequent vaginal deliveries than Caesarean sections as compared to the reference group (57.5% vs. 42.5%). An analysis of the results revealed a difference between the groups with respect to the number of previous miscarriages: in the test group the rate was 10% while in the reference group it was 5%.

To evaluate the role of the infectious factor in the test group, swabs from uterine cervix were examined microbiologically. The most frequent pathogen was found to be a mycotic infection with *Candida albicans* (57%), then *Escherichia coli* (30%), *Bacterioides species* (8%) and *Klebsiella pneumoniae* (5%).

An assessment of the TNF-alpha level revealed a statistically significant increase of the mean values in pregnancy and in labour in the test group (2.07 pg/ml vs. 2.70 pg/ml). A similar correlation was found for the IL-1-beta level in the test group in pregnancy and in labour (1.53 pg/ml vs. 1.91 pg/ml).

wartości TNF-alfa wykazano, że średnie wartości podczas porodu w grupie badanej były istotnie statystycznie wyższe niż w grupie kontrolnej (2,70pg/ml vs. 0,67pg/ml). Podobne zależności w średnich wartościach otrzymano w stosunku do IL-1-beta (1,91pg/ml vs. 0.28pg/ml).

The mean TNF-alpha values in the course of labour were statistically significantly higher in the test group than in the reference group (2.70 pg/ml vs. 0.67 pg/ml). A similar correlation occurred for the mean levels of IL-1-beta (1.91 pg/ml vs. 0.28 pg/ml).

**Tab. 1.** Charakterystyka badanych grup

	Grupa badana N = 40	Grupa kontrolna N = 40	p
Wiek, lata (średnia $\pm$ SD)	25,2 $\pm$ 5,2	26,3 $\pm$ 5,7	ns
BMI, kg/m <sup>2</sup> , (średnia $\pm$ SD)	25,8 $\pm$ 3,3	26,5 $\pm$ 2,8	ns
Wieloródki, n (%)	26 (65%)	21 (52%)	ns
Dane z wywiadu położniczego:			
- przebyty poród siłami natury, n (%)	24 (60,0%)	15 (37,5%)	0,044
- przebyte cięcia cesarskie, n (%)	16 (40,0%)	25 (62,5%)	0,044
- przedwczesne pęknięcie pęcherza płodowego w poprzedniej ciąży, n (%)	2 (5%)	2 (5%)	ns
- przebyte poronienie, n (%)	4 (10%)	2 (5%)	0,01
Sposób zakończenia obecnej ciąży:			
- poród siłami natury, n (%)	27 (67,5%)	27 (67,5%)	ns
- cięcie cesarskie, n (%)	13 (32,5%)	13 (32,5%)	ns
Wskazania do cięcia cesarskiego:			
- zagrażająca wewnątrzmaciczna zamartwica płodu	5 (38,5%)	6 (46,2%)	ns
- infekcja wewnątrzmaciczna	8 (61,5%)	0 (0%)	0,0006
- inne	0 (0,0%)	7 (53,8%)	0,002
Masa urodzeniowa noworodków, gramy (średnia $\pm$ SD)	1455 $\pm$ 580	3500 $\pm$ 725	0,001
Średni czas trwania ciąży podczas porodu, tygodnie (średnia $\pm$ SD)	28,7 $\pm$ 2,9	39,5 $\pm$ 1,9	0,02
Skala Apgar:			
- po 1.minucie, (średnia $\pm$ SD)	7,4 $\pm$ 1,1	9,7 $\pm$ 0,6	0,05
- po 3.minucie, (średnia $\pm$ SD)	8,1 $\pm$ 1,0	9,7 $\pm$ 0,4	ns

**Tab. 1.** Specification of groups examined

	Research group N = 40	Control group N = 40	p
Age, years (mean $\pm$ SD)	25,2 $\pm$ 5,2	26,3 $\pm$ 5,7	ns
BMI, kg/m <sup>2</sup> , (mean $\pm$ SD)	25,8 $\pm$ 3,3	26,5 $\pm$ 2,8	ns
Multiparous, n (%)	26 (65%)	21 (52%)	ns
Data from obstetric interview:			
- natural, n (%)	24 (60,0%)	15 (37,5%)	0,044
- past C-sections, n (%)	16 (40,0%)	25 (62,5%)	0,044
- premature rupture of amniotic sac in previous pregnancies, n (%)	2 (5%)	2 (5%)	ns
- past miscarriage, n (%)	4 (10%)	2 (5%)	0,01
Termination of current pregnancy:			
- natural, n (%)	27 (67,5%)	27 (67,5%)	ns
- Cesarean section, n (%)	13 (32,5%)	13 (32,5%)	ns
Indications for Cesarean section:			
- threatened intrauterine fetal asphyxia	5 (38,5%)	6 (46,2%)	ns
- intrauterine infection	8 (61,5%)	0 (0%)	0,0006
- other	0 (0,0%)	7 (53,8%)	0,002
Neonatal body mass, grams (mean $\pm$ SD)	1455 $\pm$ 580	3500 $\pm$ 725	0,001
Mean gestation duration at birth, weeks (mean $\pm$ SD)	28,7 $\pm$ 2,9	39,5 $\pm$ 1,9	0,02
Apgar scale:			
- after 1.minute, (mean $\pm$ SD)	7,4 $\pm$ 1,1	9,7 $\pm$ 0,6	0,05
- after 3.minutes, (mean $\pm$ SD)	8,1 $\pm$ 1,0	9,7 $\pm$ 0,4	ns

Kolejnym etapem analizy było określenie ryzyka wystąpienia przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego związanego z badanymi parametrami stanu zapalnego. W tym celu wykorzystano model regresji logistycznej. Na podstawie analizy stwierdzono, że wartość TNF-alfa powyżej 0,856pg/ml oraz IL-1-beta powyżej 0,412pg/ml jednoznacznie wskazywały na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego w badanej grupie kobiet.

W badaniu przeanalizowano, także sposób ukończenia ciąży oraz ewentualne wskazania do cięcia cesarskiego w badanych grupach. Nie wykazano różnic w odsetku cięć cesarskich w badanych grupach, który wyniósł 32,5%. Grupy różniły się natomiast wskazaniami do cięcia cesarskiego. W grupie badanej infekcja wewnątrzmaciczna stanowiła najczęstsze wskazanie do cięcia cesarskiego, natomiast najczęstszym wskazaniem do cięcia cesarskiego w grupie kontrolnej była zagrażająca wewnątrzmaciczna zmartwica płodu.

Analizując masę urodzeniową oraz stan ogólny noworodków w oparciu o skalę Apgar, stwierdzono, że noworodki urodzone przez kobiety z grupy badanej miały średnią masę urodzeniową 1455 gramów, 62,5 % noworodków z tej grupy uzyskało 6-7 punktów w skali Apgar. W grupie kontrolnej średnia masa urodzeniowa noworodków wyniosła 3500 gramów, 95% noworodków otrzymało 9-10 punktów w skali Apgar.

## DYSKUSJA

Pomimo znaczącego postępu w rozwoju metod diagnostycznych i terapeutycznych, jaki dokonał się w ostatnich latach, przedwczesne pęknięcie pęcherza owodniowego i związane z nim następstwa stanowią istotny problem w perinatologii. W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących wartości krytycznych dla TNF-alfa oraz IL-1-beta, które jednoznacznie wskazywałyby na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego. Podkreśla się jedynie udział tych dwóch parametrów stanu zapalnego w aktywacji metaloproteinaz macierzy błon płodowych, a w szczególności MMP-1. W badaniu Maymona E i wsp. określono udział MMP-1 w etiopatogenezie przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego. W tym celu przebadano 353 kobiety ciężarne, które przydzielono do następujących grup:

- grupa I (n=25) – ciężarne w 15-17. tygodniu ciąży, u których podczas zabiegu amniopunkcji genetycznej pobrano próbkę płynu owodniowego i oznaczono poziom MMP-1 – u wszystkich pacjentek ciąża i poród przebiegły bez powikłań,
- grupa II A (n=41) – pacjentki, które urodziły przedwcześnie w mechanizmie niezależnym od przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego,
- grupa II B (n=61) – pacjentki, które urodziły przedwcześnie, u których nie stwierdzono cech infekcji wewnątrzmacicznej,
- grupa II C (n=39) – ciężarne, które urodziły przedwcześnie, u których stwierdzono cechy infekcji wewnątrzmacicznej,

The next stage of analysis was to determine the risk of preterm rupture of membranes with relation to the analysed parameters of an inflammatory condition. For this purpose, a model of logistic regression was applied. The analysis showed that the TNF-alpha level of over 0.856 pg/ml and the IL-1-beta level of over 0.412 pg/ml clearly indicated an occurrence of preterm rupture of fetal membranes in the test group.

The analysis also included the way of delivery and possible indications for Caesarean section in both groups. No difference was discovered in the rate of Caesarean sections in both groups, which was 32.5%. However, there were differences with respect to indications for the Caesarean section. In the test group, the most frequent indication was an intrauterine infection, while in the reference group it was imminent fetal intrauterine asphyxia.

An analysis of the birth weight and Apgar score of the newborns showed that the newborns in the test group had an average birth weight of 1455 g, and 62.5% of them scored 6-7 Apgar points. In the reference group, the average birth weight was 3500 g, and 95% of the newborns scored 9-10 Apgar points.

## DISCUSSION

In spite of a considerable progress in diagnostics and therapy over the recent years, preterm rupture of fetal membranes and its consequences still pose a significant problem in perinatology. In the available literature there are no data on the critical values of TNF-alpha and IL-1-beta that would clearly indicate an occurrence of preterm rupture of fetal membranes. It has only been emphasized that both parameters of an inflammatory condition participate in activating matrix metalloproteinases of fetal membranes, particularly MMP-1. In their study, Maymon et al. determined the role of MMP-1 in etiopathogenesis of preterm rupture of fetal membranes. They examined 353 pregnant women and divided them into the following groups:

- group I (n=25) - pregnant women in 15th-17th gestational week, from whom a sample of amniotic fluid was collected in genetic amniocentesis and the level of MMP-1 was established - in all the patients, pregnancy and labour proceeded without complications,
- group II A (n=41) - patients who delivered before term due to a mechanism independent of premature rupture of fetal membranes,
- group II B (n=61) - patients who delivered before term, in whom no traits of intrauterine infection were discovered,
- group II C (n=39) - patients who delivered before term, in whom traits of intrauterine infection were discovered,

- grupa III (n=72) – pacjentki, u których doszło do przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego,
- grupa IV (n=75) – ciężarne, które urodziły o czasie,
- grupa V (n=40) – ciężarne, u których doszło do pęknięcia pęcherza owodniowego po 37. tygodniu trwania ciąży.

W przebiegu oznaczeń wykazano, że MMP-1 była obecna w 81% (287/353) próbek płynu owodniowego. Średnia wartość MMP-1 w terminie okołoporodowym była większa niż w 15-17. tygodniu ciąży (129,1ng/ml vs. 36,3ng/ml), co potwierdza hipotezę, że MMP-1 wzrasta wraz z zaawansowaniem ciąży, co spowodowane jest wzrostem całkowitej powierzchni macierzy błon płodowych. Przedwczesne pęknięcie pęcherza owodniowego połączone z infekcją wewnątrzmaciczną lub bez było związane ze znaczącym wzrostem średniego poziomu MMP-1 w porównaniu do przypadków z zachowanym pęcherzem owodniowym i bez cech infekcji (75,9ng/ml vs. 42,8ng/ml). Infekcja wewnątrzmaciczna sama w sobie powodowała wzrost poziomu MMP-1 niezależny od ciągłości pęcherza płodowego (42,8ng/ml vs. 20,8ng/ml). Wzrost ten spowodowany był obecnością w płynie owodniowym mediatorów stanu zapalnego, a w szczególności interleukiny-1-beta oraz TNF-alfa [7]. Fortunato SJ i wsp. wykazali istotną rolę TNF-alfa w aktywacji MMP-9 macierzy błon płodowych oraz procesu apoptozy komórek błon płodowych. Według autorów TNF-alfa oddziałuje na dwa receptory TNF-R1 i TNF-R2, zlokalizowane w błonach płodowych. Aktywacja receptora TNF R1 aktywuje molekułę TRADD (*TNF receptor-associated death domain*), co otwiera drogę dwóm procesom, które w konsekwencji prowadzą do przerwania ciągłości pęcherza owodniowego:

1. aktywacja FADD (*Fas-associated death domain*), która aktywuje proces apoptozy komórek błon płodowych,
2. aktywacja TRAF-2 (*TNF receptor-associated factor - 2*) oraz RIP (*receptor interacting protein*), która prowokuje z kolei aktywację jądrowego czynnika  $\kappa$ B, co stymuluje MMP-9, mediatory procesu zapalnego oraz cyklooksygenazę.

Stymulacja receptora TNF-R2 powoduje aktywację czynników TRAF-1 i TRAF-2 (*TNF receptor-associated factor*), co wywołuje wzrost cytokin oraz prostaglandyn, prowadząc do wystąpienia przedwczesnej czynności skurczowej mięśnia macicy. Natomiast aktywacja receptora TNF R2 nie uruchamia procesu apoptozy komórek błon płodowych, ani też nie aktywuje układu metaloproteinaz [8]. Rola TNF-alfa w indukcji apoptozy komórek błon płodowych została wykazana w badaniach Luo G i wsp. oraz Wang XJ i wsp. [9,10]. Luo G i wsp. dodatkowo wykazali rolę progesteronu w hamowaniu TNF-alfa zależnej apoptozy komórek błon płodowych [9]. Ponadto poziom TNF-alfa w płynie owodniowym oraz w obrębie łożyska silnie koreluje ze stopniem nasilenia infekcji błon płodowych, co

- group III (n=72) - patients who suffered from preterm rupture of fetal membranes,
- group IV (n=75) - patients who delivered on term,
- group V (n=40) - patients who suffered from rupture of fetal membranes after gestational week 37.

In the course of determinations, it was discovered that MMP-1 was present in 81% (287/353) of the amniotic fluid samples. The mean level of MMP-1 in the perinatal period was higher than in gestational week 15-17 (129.1 ng/ml vs. 36.3 ng/ml), which confirms the hypothesis that MMP-1 increases with the advancement of pregnancy due to an increase of the total area of the fetal membrane matrix. Preterm rupture of fetal membranes combined with an intrauterine infection or without an infection was associated with a significant increase of the mean MMP-1 level as compared to cases with preserved fetal membranes and without infection symptoms (75.9 ng/ml vs. 42.8 ng/ml). An intrauterine infection alone caused an increase of MMP-1 level irrespectively of the integrity of fetal membranes (42.8 ng/ml vs. 20.8 ng/ml). The increase resulted from inflammatory mediators being present in the amniotic fluid, particularly from interleukin-1-beta and TNF-alpha [7]. Fortunato SJ et al. demonstrated a significant role played by TNF-alpha in activating MMP-9 of fetal membrane matrix and the process of apoptosis of fetal membrane cells. According to the authors, TNF-alpha acts on the two receptors, TNF-R1 and TNF-R2, located in fetal membranes. The activation of TNF-R1 receptor activates the TRADD molecule (TNF Receptor-Associated Death Domain), which opens the way to two processes, eventually leading to the rupture of fetal membranes:

1. activating FADD (Fas-Associated Death Domain), which activates the process of apoptosis of fetal membrane cells,
2. activating TRAF-2 (TNF Receptor-Associated Factor - 2) and RIP (Receptor Interacting Protein), which induces an activation of the nuclear factor  $\kappa$ B, thus stimulating MMP-9, inflammatory mediators, and cyclooxygenase.

A stimulation of TNF-R2 receptor results in activating TRAF-1 and TRAF-2 (TNF Receptor-Associated Factors), which causes an increase of the level of cytokines and prostaglandins, leading to preterm contractile activity of the uterine muscle. An activation of TNF R2 receptor, on the other hand, does not trigger the apoptosis of fetal membrane cells and does not activate the metalloproteinase system [8]. The role of TNF-alpha in inducing apoptosis of fetal membrane cells was demonstrated in the studies conducted by Luo G et al. and Wang XJ et al. [9,10]. Moreover, Luo G et al. demonstrated the role of progesterone in inhibiting TNF-alpha-dependent apoptosis of fetal membrane cells [9]. Also, the level of TNF-alpha in the amniotic fluid and in the placenta is strongly correlated with the intensity

zostało potwierdzone w badaniach Roveran V i wsp. oraz El-Shazly S i wsp. [11,12]. Na podstawie przedstawionych danych nie można zgodzić się z opinią Bahar AM i wsp., którzy uważają, że nie obserwuje się wzrostu TNF- $\alpha$  w surowicy krwi matki w ciąży powikłanej przedwczesnym pęknięciem pęcherza owodniowego oraz porodem przedwczesnym [13]. Znaczenie TNF-alfa oraz IL-1-beta w etiopatogenezie przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego zostało także potwierdzone w badaniu Moora RM i wsp. [14]. Według tych autorów TNF-alfa oraz IL-1-beta aktywują MMP-9 oraz stymulują uwalnianie prostaglandyny E2, co indukuje przerwanie ciągłości pęcherza płodowego [14].

Na podstawie powyższych danych widać, jakie znaczenie w aktywacji metaloproteinaz macierzy błon płodowych mają TNF-alfa oraz interleukina-1-beta, dlatego określone w przeprowadzonym badaniu wartości, które jednoznacznie wskazują na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego mają istotne znaczenie w praktyce klinicznej.

## WNIOSKI

Wartości TNF-alfa powyżej 0,856pg/ml oraz IL-1-beta powyżej 0,412pg/ml jednoznacznie wskazują na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia pęcherza owodniowego.

of fetal membrane infection, which was confirmed by studies conducted by Roveran V et al. and El-Shazly S et al. [11,12]. The presented data contradict the opinion of Bahar AM et al. that no increase of TNF-alpha is found in blood serum of women in pregnancies complicated with preterm rupture of membranes and preterm delivery [13]. The role of TNF-alpha and IL-1-beta in etiopathogenesis of preterm rupture of membranes was also confirmed in the study by Moore RM et al. [14]. According to the authors, TNF-alpha and IL-1-beta activate MMP-9 and stimulate the release of E2 prostaglandin, which induces the rupture of fetal membranes [14].

The above data explain the role of TNF-alpha and interleukin-1-beta in activating matrix metalloproteinases of fetal membranes; therefore, the values determined in our study, clearly indicating preterm rupture of membranes, are of vital importance in clinical practice.

## CONCLUSIONS

The study demonstrated that the TNF-alpha level of over 0.856 pg/ml and the IL-1-beta level of over 0.412 pg/ml definitively indicate an occurrence of preterm rupture of fetal membranes.

## Piśmiennictwo / References:

1. **Reroń A, Huras H.** Przedwczesne pęknięcie błon płodowych w ciąży niedonoszonej. *Gin Prakt* 2002;6:33-36.
2. **Greenwood G.** The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998; 19:1-11.
3. **Huras H, Reroń A.** Znaczenie stabilizacji macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych w etiopatogenezie przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego. *Przegl Ginekol Pol* 2009;9:211-14.
4. **Matrisian G, Cockett M, Ward R, Docherty A.** Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-25.
5. **Visse R, Nagase H.** Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Cir Res* 2003;92:827-39.
6. **Birkedal-Hansen H, Moore W, Bodden M, Windsor L.** Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
7. **Maymon E, Romero R, Pacora P et al.** Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:914-20.
8. **Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ.** Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the premature rupture of the membranes and preterm labor pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:1159-62.
9. **Luo G, Abrahams VM, Tadesse S et al.** Progesterone inhibits basal and TNF-alpha-induced apoptosis in fetal membranes: a novel mechanism to explain progesterone-mediated prevention of preterm birth. *Reprod Sci* 2010;17:532-39.
10. **Wang XJ, Li L, Cui SH.** Role of collagen III, CTGF and TNF-alpha in premature rupture of human fetal membranes. *Sichuan Da Ban* 2009;40:658-61.
11. **Roveran V, Silva MA, Yamano L et al.** Local expression of TNF-alpha on premature rupture of membranes. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009;31:249-53.
12. **El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R.** Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:45-52.
13. **Bahar AM, Ghalib HW, Moosa RA et al.** Maternal serum IL-6, IL-8, TNF-alpha and interferon-gamma in preterm labor. *Acta Obstet Gynaecol Scand* 2003;82(6):543-49.
14. **Moore RM, Novak JB, Kumar D, Mercer BM.** Alpha-Lipoic Acids inhibits TNF-induced remodeling and weakening of human fetal membranes. *Biol Reprod* 2009;80:781-87.