

# Wybrane metaloproteinazy i ich inhibitory w przewidywaniu skuteczności tokolizy nifedypiną

Agnieszka Haratym-Maj<sup>1</sup>, Maria Bożena Warzycka<sup>2</sup>, Marta Andres-Mach<sup>3</sup>, Bartłomiej Warzycki<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Zakład Fizjopatologii, Instytut Medycyny Wsi, Lublin

<sup>2</sup> Oddział Położniczy i Trakt Porodowy, Samodzielny Publiczny Szpital Wojewódzki im. Jana Bożego, Lublin

<sup>3</sup> Samodzielna Pracownia Badań Izobolograficznych, Instytut Medycyny Wsi, Lublin

<sup>4</sup> Klinika Dermatologii, Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny, Lublin

Haratym-Maj A, Warzycka BM, Andres-Mach M, Warzycki B. Wybrane metaloproteinazy i ich inhibitory w przewidywaniu skuteczności tokolizy nifedypiną. *Med Og Nauk Zdr.* 2015; 21(1): 1–3. doi: 10.5604/20834543.1142349

## Streszczenie

**Wprowadzenie i cel pracy.** Za jedną z przyczyn wystąpienia porodu przedwczesnego uważa się zakażenie wewnątrzmaciczne. Metaloproteinazy oraz ich inhibitory pełnią istotną rolę w czasie ciąży, porodu i porożu. Umożliwiają migrację komórek odpowiedzi zapalnej do uszkodzonych tkanek, uwalniają cytokiny i ich receptory z błon komórkowych. Celem pracy była ocena zależności pomiędzy aktywnością: metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, ich inhibitorów TIMP-1 i TIMP-2 (u pacjentek z porodem przedwcześnie zagrażającym) oraz skutecznością tokolizy nifedypiną.

**Materiał i metoda.** Badaniem objęto 21 kobiet z porodem przedwczesnym oraz 35 zdrowych ciężarnych poniżej 37. tygodnia trwania ciąży. Pacjentki podzielono na trzy grupy: pierwszą grupę stanowiły pacjentki z porodem przedwczesnym z nieskuteczną tokolizą, grupę drugą kobiety z objawami porodu przedwczesnego, u których powiodła się tokoliza, grupę trzecią zdrowe ciężarne. Poziom MMP-2, MMP-9 oraz TIMP1 i TIMP2 w surowicy oceniano przy pomocy testu immunoenzymatycznego ELISA.

**Wyniki.** Średnie stężenie MMP-2 w surowicy badanych chorych nie różniło się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną. U kobiet z porodem przedwczesnym poziom MMP-9 był wyższy w porównaniu do zdrowych ciężarnych. Stężenie TIMP-1 i TIMP-2 w surowicach ciężarnych z porodem przedwczesnym było wyższe w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej. Stwierdzono, że u kobiet z porodem przedwczesnym z nieskuteczną tokolizą, poziom TIMP-1 był wyższy, natomiast poziom TIMP-2 był istotnie niższy w porównaniu do ciężarnych z objawami porodu przedwczesnego, u których powiodła się tokoliza.

**Wnioski.** Nieskuteczna tokoliza u kobiet z porodem przedwczesnym może wynikać z zaawansowania procesu zapalnego w momencie rozpoczęcia terapii. Pobudzenie aktywności proteolitycznej składowych układu żelatynazy/inhibitory może świadczyć o aktywnym procesie prowadzącym do skracania i rozwierania się szyjki macicy w przypadku porodu przedwczesnego, a nasilenie aktywności czynników hamujących stanowi mechanizm obronny.

## Słowa kluczowe

poród przedwczesny, metaloproteinazy, inhibitory metaloproteinaz

## WPROWADZENIE

W etiopatogenezie porodu przedwczesnego istotną rolę odgrywa związek pomiędzy występowaniem przedwczesnej czynności skurczowej macicy a obecnością zakażeń [1, 2, 3]. Odczyn zapalny inicjuje powstawanie prostaglandyn z estrów kwasu arachidonowego [4, 5], które pobudzają czynność skurczową mięśnia macicy [6], przyczyniając się do postępu porodu [7]. Prostaglandyny uczestniczą również w aktywacji metaloproteinaz (MMP) – grupy enzymów proteolitycznych uczestniczących w przebudowie tkanki łącznej i migracji komórkowej [8, 9, 10]. Podwyższoną aktywność metaloproteinaz, zwłaszcza 2 i 9, spotyka się w różnych stanach patologicznych, m.in. również w przypadku porodów przedwczesnych, przedwczesnym odpływananiu płynu owodniowego (PROM) [11, 12, 13]. W warunkach fizjologicznych poziom MMP jest regulowany przez specyficzne tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP) [14].

Adres do korespondencji: Agnieszka Haratym-Maj, Zakład Fizjopatologii, Instytut Medycyny Wsi, Lublin, ul. Jaczewskiego 2  
E-mail: agamaj3@poczta.onet.pl

Nadesłano: 18 października 2013 roku; Zaakceptowano do druku: 22 września 2014 roku

## CEL PRACY

Celem pracy była ocena zależności pomiędzy aktywnością: metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, ich inhibitorów TIMP-1 i TIMP-2 (u pacjentek z porodem przedwcześnie zagrażającym) oraz skutecznością tokolizy nifedypiną.

## MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 21 kobiet z porodem przedwczesnym oraz 35 zdrowych ciężarnych poniżej 37. tygodnia trwania ciąży. Do badań zakwalifikowano pacjentki, którym nie podawano preparatów hamujących czynność skurczową macicy co najmniej przez okres 7 dni przed pobraniem krwi do badań. Przyjęto następujące kryteria w celu oceny zagrożenia porodem przedwczesnym: ciąża pojedyncza, wiek ciążowy > 24 hbd i < 37 hbd, regularne skurcze mięśnia macicy (co najmniej 1/10 min.), rozwarcie kanału szyjki macicy < 4cm, zachowane wody płodowe, brak klinicznych objawów infekcji przy przyjęciu. Krew do badań biochemicznych pobierano z żyły łokciowej bezpośrednio po przyjęciu. Po odwirowaniu surowicę przechowywano w temperaturze -70 ° do momentu

oznaczeń. W celu relaksacji mięśnia macicy podawano nifedypinę (Cordafen, Polpharma) według schematu: 4 razy po 10mg nifedypiny *per os* w ciągu 1 godziny, następnie leczenie podtrzymujące – 40 mg/dobę w dawkach podzielonych. Pacjentki podzielono na trzy grupy: pierwszą grupę stanowiły pacjentki z porodem przedwczesnym z nieskuteczną tokolizą (grupa A), grupę drugą – kobiety z objawami porodu przedwczesnego, u których powiodła się tokoliza (grupa B), grupę trzecią (grupa C) – zdrowe ciężarne o podobnym zaawansowaniu ciąży jak w przypadku grupy badanej. W celu oznaczenia MMP-2, MMP-9 oraz TIMP1 i TIMP2 w próbach badanych wykorzystano testy Quantikine Human Immunoassay firmy R&D Systems. Wyniki badań podano jako średnią ( $\bar{x}$ )  $\pm$  odchylenie standardowe (SD). Różnice między wartościami średnimi oceniano testem t-Studenta.

## WYNIKI

**Tabela 1.** Poziomy MMP-2, MMP-9 i ich inhibitorów: TIMP-1 i TIMP-2 w surowicy ciężarnych

Poziom cytokin ng/ml	Grupa A (n=6)	Grupa B (n=15)	Grupa C (n=35)
MMP-2	246,3 $\pm$ 50,36	266,1 $\pm$ 73,79	219,4 $\pm$ 43,21
MMP-9	675,96 $\pm$ 161,05*	659,05 $\pm$ 317,22	420,1 $\pm$ 52,5
TIMP-1	363,95 $\pm$ 90,57*	204,19 $\pm$ 105,99*	70,94 $\pm$ 18,14
TIMP-2	82,5 $\pm$ 37,33	212,8 $\pm$ 56,88*	50,18 $\pm$ 15,13

\* $p < 0,05$

Średnie stężenie MMP-2 w surowicy badanych chorych nie różniło się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną. Porównanie średnich wartości stężenia MMP-2 w surowicy ciężarnych z porodem przedwczesnym, w zależności od skuteczności tokolizy, również nie wykazało istotnych różnic.

U kobiet z porodem przedwczesnym z nieskuteczną tokolizą poziom MMP-9 (675,96 $\pm$ 161,05 ng/ml) w surowicy krwi był wyższy w porównaniu do zdrowych ciężarnych (420,1 $\pm$ 52,5 ng/ml). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w grupach ciężarnych z porodem przedwczesnym, w zależności od skuteczności tokolizy.

Stężenie TIMP-1 w surowicach ciężarnych z porodem przedwczesnym (Grupa A i Grupa B) było znamienne wyższe w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej ( $p < 0,05$ ). Stwierdzono również, że u kobiet z porodem przedwczesnym z nieskuteczną tokolizą, poziom TIMP-1 (363,95 $\pm$ 90,57 ng/ml) był wyższy w porównaniu do ciężarnych z objawami porodu przedwczesnego, u których powiodła się tokoliza (204,19 $\pm$ 105,99 ng/ml) ( $p < 0,05$ ).

Stężenie TIMP-2 w surowicach ciężarnych z porodem przedwczesnym było znamienne wyższe w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,05$ ). Ponadto u kobiet z porodem przedwczesnym, u których powiodła się tokoliza, poziom TIMP-2 (212,8 $\pm$ 56,88 ng/ml) był istotnie wyższy w porównaniu do ciężarnych z objawami porodu przedwczesnego z nieskuteczną tokolizą (82,5 $\pm$ 37,33 ng/ml).

## DYSKUSJA

Metaloproteiny oraz ich inhibitory pełnią istotną rolę w czasie ciąży, porodu i połogu [12, 14]. Zmiany aktywności poszczególnych metaloprotein powodują zachwianie równowagi pomiędzy degradacją i syntezą macierzy

międzykomórkowej. W konsekwencji prowadzi to do powstania określonych procesów patologicznych [14]. Metaloproteiny umożliwiają migrację komórek odpowiedzi zapalnej do uszkodzonych tkanek, uwalniają cytokiny i ich receptory z błon komórkowych [14, 15]. W pracy Tu FF i wsp. wykazano wzrost poziomu MMP-9 w trakcie porodu, jakkolwiek nie może on stanowić istotnego wskaźnika zagrożenia porodem przedwczesnym [12]. W badaniach własnych nie obserwowano istotnych różnic w poziomie MMP-2 u ciężarnych z porodem przedwczesnym w porównaniu do zdrowych ciężarnych. Zanotowano natomiast istotny wzrost poziomu metaloproteiny 9 u ciężarnych z porodem przedwczesnym, u których nie powiodła się tokoliza nifedypiną. W przebiegu zakażenia w ciąży proces zapalny zostaje nasilony w wyniku stymulacji leukocytów przez endotoksyny bakteryjne [16, 17]. Leukocyty z kolei wytwarzają cytokiny, które stymulują produkcję prostaglandyn, w związku z tym pośredniczą w procesach mających wpływ na występowanie przedwczesnej czynności skurczowej macicy [18, 19]. Jak wykazano w pracy Maymon E i wsp., wysoki poziom TIMP-2 obserwowano u rodzących zarówno o czasie, jak i przed terminem porodu [20]. W badaniach własnych u kobiet z porodem przedwczesnie zagrażającym, zanotowano istotny wzrost poziomu TIMP-1 niezależnie od skuteczności tokolizy, natomiast poziom TIMP-2 był istotnie wyższy tylko w grupie kobiet, które pozytywnie odpowiedziały na leczenie. Pobudzenie aktywności proteolitycznej składowych układu żelatynazy/inhibitory może świadczyć o aktywnym procesie prowadzącym do skracania i rozwierania się szyjki macicy w przypadku porodu przedwczesnego, a nasilenie aktywności czynników hamujących stanowi mechanizm obronny. Odpowiednio wczesne wyselekcjonowanie kobiet znajdujących się w grupie ryzyka pozwoli na objęcie ich intensywnym nadzorem i wczesne wykrycie objawów zagrażającego porodu przedwczesnego.

## PIŚMIENICTWO

- Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. Clin Obstet Gynecol. 1988; 31: 554–584.
- Taylor D, Kenyon S, Tarnow-Mordi W. Infection and preterm labour. Br J Obstet Gynaecol. 1997; 104: 1338–1340.
- Foulon W, Van Liedekerke D, Demanet C, et al. Markers of infection and their relationship to preterm delivery. Am J Perinatol. 1995; 12: 208–211.
- Mitchel MD, Dudley DJ, Edwin SS. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. Eur J Pharmacol. 1991; 192: 189–191.
- Brown NL, Alvi SA, Elder MG, et al. A spontaneous induction of fetal membrane prostaglandin production precedes clinical labor. J Endocrinol. 1998; 157: R1–R6.
- Phillipe M, Saunders T, Basa A. Intracellular mechanisms underlying prostaglandin F2 $\alpha$ -stimulated phasic myometrial contractions. Am J Physiol. 1999; 273: 665–673.
- Palm M, Axelsson O, Wernroth L, Basu S. F(2)-Isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy. Free Radic Res. 2009; 22: 1–7.
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999; 274: 21491–21494.
- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem. 1997; 378: 151–160.
- Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med. 2000; 28: 505–513.
- Montagnana M, Lippi G, Albiero A, et al. Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy. J Clin Lab Anal. 2009; 23: 88–92.
- Tu FF, Goldenberg RL, Tamara T, et al. Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 levels to predict spontaneous preterm birth. Obstet Gynecol. 1998; 92: 446–449.

13. Yoon BH, Oh SY, Romero R, et al. An elevated amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 level at the time of mid-trimester genetic amniocentesis is a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185: 1162–1167.
14. Zucker S, Hymowitz M, Conner C, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 878: 212–227.
15. Wahl LM, Corcoran ML. Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. *J Periodontol.* 1993; 64: 467–473.
16. Foulon W, Van Liedekerke D, Demanet C, et al. Markers of infection and their relationship to preterm delivery. *Am J Perinatol.* 1995; 12: 208–211.
17. Greig PC, Murtha AP, Jimmerson CJ, et al. Maternal serum interleukin-6 during pregnancy and during term and pre-term labor. *Obstet Gynecol.* 1997; 90: 465–469.
18. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod.* 1996; 1: 89–96.
19. Mitchel MD, Dudley DJ, Edwin SS. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. *Eur J Pharmacol.* 1991; 192: 189–191.
20. Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. A role for the 72 kDa gelatinase (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in human parturition, premature rupture of membranes and intraamniotic infection. *J Perinat Med.* 2001; 29: 308–316.

## Selected metalloproteinases and their inhibitors in prediction of nifedypine tocolysis effectiveness

### Abstract

**Introduction.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors play an important role in pregnancy, childbirth and postpartum. This system allows inflammatory response cells migration to damaged tissues, release cytokines and cytokine receptors. Preterm cervical ripening is an inflammatory process, with cytokines as important mediators.

**Objective.** The purpose of this study was to evaluate the relationship between metalloproteinases MMP -2 and MMP -9 and their inhibitors TIMP -1 and TIMP -2 in patients with preterm labour in the prediction of nifedypine tocolysis efficacy.

**Material and Methods.** The study included 21 women with preterm labour and 35 healthy pregnant women below 37 weeks of gestation. The patients were divided into three groups: the first group consisted of patients with preterm labour with ineffective tocolysis, the second group of women with preterm labour responded to tocolysis, the third group consisted of healthy pregnant women. The level of serum MMP -2, MMP -9 and TIMP1 and TIMP2 was assessed using the ELISA kit.

**Results.** The concentration of MMP -2 in preterm labour patients was not significantly different compared to the control group. In women with a preterm labour level of MMP -9 was higher than in healthy pregnant women. The concentration of TIMP -1 and TIMP -2 in sera of pregnant women with preterm delivery was higher compared to the control group. It was found that in women with preterm labour with ineffective tocolysis, the level of TIMP -1 was higher, while the level of TIMP -2 was significantly lower compared to pregnant women with ineffective tocolysis.

**Conclusions.** Ineffective tocolysis may be due to the stage of inflammation at the start of therapy. Activation of the proteolytic activity of gelatinase / inhibitors system may indicate an active process leading to cervix shortening and dilating in preterm labour, and increased activity of metalloproteinase inhibitors is probably a defence mechanism, as noted.

### Key words

preterm delivery, metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinase