

INSTYTUT CENTRUM ZDROWIA MATKI POLKI
w Łodzi

Lek. Aleksandra Krokocka

**Udział wybranych metaloproteinaz i prolidazy
w występowaniu zjawiska przedwczesnego pęknięcia
błon płodowych u kobiet ciężarnych**

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk
o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor:

dr hab. n.med. prof. ICZMP

Miłosz Wilczyński

Klinika Ginekologii Operacyjnej, Endoskopowej i Ginekologii
Onkologicznej ICZMP

Łódź, 2023 r.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1. WSTĘP	6
1.1 Definicja i klasyfikacja przedwczesnego pęknięcia błon płodowych.....	7
1.2 Epidemiologia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych oraz znaczenie tej patologii w etiologii porodu przedwczesnego	7
1.3 Etiopatogeneza i czynniki ryzyka przedwczesnego pęknięcia błon płodowych	8
1.4 Diagnostyka przedwczesnego pęknięcia błon płodowych.....	12
1.5 Czas trwania pęknięcia błon płodowych oraz konsekwencje PROM i PPRM	14
1.6 Postępowanie w przypadku przedwczesnego pęknięcia błon płodowych	15
1.6.1 Postępowanie zachowawcze.....	16
1.6.2 Postępowanie aktywne – zakończenie ciąży	20
1.7 Błony płodowe.....	21
1.8 Metaloproteinazy.....	25
1.8.1 Budowa MMPs.....	25
1.8.2 Mechanizm działania MMPs	26
1.8.3 Klasyfikacja MMPS	28
1.8.4 Metaloproteinaza-1 (MMP-1).....	29
1.8.5 Metaloproteinaza-2 (MMP-2).....	30
1.8.6 Metaloproteinaza-8 (MMP-8).....	31
1.8.7 Metaloproteinaza-9 (MMP-9).....	31
1.8.9 Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i prolidaza w medycynie perinatalnej	32
2. CEL PRACY	37
3. MATERIAŁY I METODY	37
3.1 Charakterystyka pacjentek włączonych do badania oraz kryteria podziału badanych pacjentek z uzasadnieniem	37

3.2 Kryteria włączenia do grupy badanej	41
3.3 Kryteria wyłączenia z badania.....	42
3.4 Metodyka	44
3.4.1 Izolacja RNA z błon płodowych	44
3.4.2 Ocena ekspresji genów metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym.....	45
3.4.3 Ocena stężenia MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu	47
3.5 Analiza statystyczna.....	47
4. WYNIKI	49
4.1 Charakterystyka grup	49
4.2.1 Ekspresja mRNA MMP-1 w błonach płodowych	60
4.2.2 Ekspresja mRNA MMP-2 w błonach płodowych	62
4.2.3 Ekspresja mRNA MMP-8 w błonach płodowych	63
4.2.4 Ekspresja mRNA MMP-9 w błonach płodowych	66
4.2.5 Ekspresja mRNA prolidazy w błonach płodowych	67
4.3 Wyniki stężenia MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu. II etap realizacji projektu.....	67
4.3.1 Stężenie MMP-8 w osoczu ciężarnych	69
4.3.2 Stężenie prolidazy w osoczu ciężarnych	75
4.4 Wyniki ekspresji mRNA badanych enzymów obrębie grupy badanej (grupie PPRM n=32 i grupie PROM n=24)	77
4.5 Korelacje	79
4.5.1 Korelacje między ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, prolidazy w błonach płodowych oraz stężeniem MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu w poszczególnych grupach	79
4.5.2 Korelacje pomiędzy osoczym stężeniem MMP-8 a wiekiem ciążowym, wiekiem ciężarnych kobiet i masą urodzeniową noworodka	87

4.6.1 Analiza krzywych ROC w oparciu o podział na grupę badaną z PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 1 ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych w trakcie terminowego porodu (Grupa 1)	90
4.6.2 Analiza krzywych ROC w oparciu o podział na grupę badaną z PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 2 z ciężarnymi w ciąży donoszonej bez czynności skurczowej (Grupa 2).....	92
4.6.3 Analiza krzywych ROC w oparciu o podział grupę badaną z PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 3 z ciężarnymi z zachowaną ciągłością błon płodowych mimo regularnej, porodowej czynności porodowej (Grupa 3)	94
4.6.4 Analiza krzywych ROC w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 2+3 z ciężarnymi z zachowaną ciągłością błon płodowych (zarówno podczas porodu jak i bez) (Grupa 2+3) .	96
5. DYSKUSJA	98
6. WNIOSKI	116
7. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	117
8. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	121
9. SPIS TABEL, RYCIN I RYSUNKÓW.....	125
10. PIŚMIENNICTWO	129

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACOG	Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (American Congress of Obstetricians and Gynecologist)
ACTH	adrenokortykotropina (AdrenoCorticoTropic hormone)
AFI	wskaźnik płynu owodniowego (Amniotic Fluid Index)
AUC	pole pod krzywą ROC (Area Under Curve)
BMI	indeks masy ciała (Body Mass Index)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (Deoxyribonucleic Acid)
cDNA	komplementarny DNA (Complementary DNA)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (Extracellular Matrix)
ELISA	test immunoenzymatyczny (The Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EMMPRIN	czynnik indukujący metaloproteinazy macierzowe (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer)
FLM	badanie oceny dojrzałości płuc płodu (Fetal Lung Maturity)
GBS	paciorkowiec grupy B (Group B Streptococcus agalactiae)
IAI	zakażenie wewnątrzowodniowe (Intraamniotic Infection)
IL-1β	interleukina 1 beta (Interleukin-1 beta)
IUGR	wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastanie płodu (Intrauterine Growth Restriction)
IQR	rozstęp ćwiartkowy (InterQuartile Range)
KTG	kardiotokografia
M	średnia arytmetyczna (Medium)
Mdn	mediana (Median)
MMP-1	metaloproteinaza-1 (Metalloproteinase-1)
MMP-2	metaloproteinaza-2 (Metalloproteinase-2)
MMP-8	metaloproteinaza-8 (Metalloproteinase-8)
MMP-9	metaloproteinaza-9 (Metalloproteinase-9)
MT-MMPs	metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej typu błonowego (Membrane Type Matrix Metalloproteinases)
PBS	buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej (Phosphate Buffered Saline)
PIH	nadciśnienie indukowane ciążą (Pregnancy Induced Hypertension)
PMK	przedział międzykwartyłowy
PROM	przedwczesne pęknięcie błon płodowych (Premature Rupture of Membranes)

PPROM	przedwczesne pęknięcie błon płodowych przed terminem tj. przed ukończeniem 37.tygodnia ciąży (Preterm Premature Rupture of Membranes)
PTD	poród przedwczesny (Preterm Delivery)
RCOG	Królewskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists)
ROC	ocena jakości klasyfikacji (Receiver Operating Characteristic)
ROM	pęknięcie błon płodowych (Rupture of Membranes)
RNA	kwasy rybonukleinowe (Ribonucleic Acid)
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RT-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time Polymerase Chain Reaction)
SD	odchylenie standardowe (Statistic Deviation)
TIMPs	tkankowe inhibitory metaloproteinaz (Tissue Inhibitors Of Metalloproteinases)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu beta (Transforming Growth Factor beta)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworów alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłoka naczyńowego (Vascular Endothelial Growth Factor)

1. WSTĘP

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych (ang. *Premature Rupture of Membranes*, PROM) to przerwanie ciągłości błon płodowych przed wystąpieniem porodowej czynności skurczowej macicy, skutkujące wyciekami płynu owodniowego [1, 2, 3]. Patologia ta może pojawić się w ciąży donoszonej tj. powyżej 37. tygodnia ciąży albo przedwcześnie, przed ukończeniem 37. tygodnia ciąży. Dotyczy od 3 do ok. 10 % wszystkich ciąż, 8 % ciąż donoszonych oraz komplikuje przebieg ok. 3 % ciąż przed ukończonym 37. tygodniem [103]. Szacuje się, że przerwanie ciągłości błon płodowych jest przyczyną od 30 do ok. 40 % porodów przedwczesnych [4, 5, 6, 16]. Konsekwencje tej położniczej patologii, zarówno w ciąży donoszonej jak i niedonoszonej, mogą być bardzo poważne tj. przedwczesne oddzielenie się łożyska, ucisk sznura pępowinowego, wypadnięcie pępowiny, infekcja u matki i noworodka, zapalenie błon płodowych, zwiększone ryzyko ukończenia ciąży na drodze zabiegowej, zespół niewydolności oddechowej u noworodka czy zwiększona śmiertelność okołoporodowa [7-11].

Pomimo dostępności testów potwierdzających rozpoznanie PROM, nie jest dostępna dotychczas żadna metoda wiarygodnego przewidywania tej patologii. Wynika to głównie z faktu, iż do chwili obecnej etiologia oraz czynniki ryzyka tego zjawiska nie są do końca jasne, a w konsekwencji zbadane. Wpływa to bezpośrednio na brak efektywnego testu przesiewowego kwalifikującego pacjentki do grupy ryzyka wystąpienia przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego oraz odpowiednio dobranych schematów terapeutycznych.

Pomimo wieloczynnikowej etiologii badacze są zgodni co do faktu, iż nasilona degradacja kolagenu, stanowiącego główną składową macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych, jest jednym z najistotniejszych czynników prowadzącym do PROM/PPROM [22, 23, 24]. Odpowiednio wczesne rozpoznanie nasilonej degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych oraz identyfikację czynnika (np. farmakologicznego), który zapobiegłby owej degradacji, być może przyczyniłoby się do redukcji liczby przypadków PROM i PPROM oraz wszelkich konsekwencji z nim związanych.

Dane literaturowe wskazują na zwiększoną ekspresję niektórych przedstawicieli enzymów z grupy metaloproteinaz (MMPs) w błonach płodowych oraz zwiększone stężenie owych MMPs we krwi ciężarnych kobiet w przypadku wystąpienia patologii

położniczej jaką jest przedwczesne pęknięcie błon płodowych [12-14]. Zachęca to do poszukiwań zależności pomiędzy MMPs a występowaniem zjawiska PROM i PPRM.

1.1 Definicja i klasyfikacja przedwczesnego pęknięcia błon płodowych

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych definiowane jest jako przerwanie ciągłości pęcherza płodowego pojawiające się przynajmniej godzinę przed porodową czynnością skurczową [1, 2, 16]. Piśmiennictwo różnicuje przedwczesne pęknięcie pęcherza płodowego uwzględniając czas trwania ciąży. Pęknięcie błon płodowych w ciąży donoszonej tj. po ukończeniu 37. tygodnia ciąży, a przed rozpoczęciem czynności skurczowej definiowane jest jako PROM, ang. *Premature Rupture of Membranes*. Przerwanie ciągłości błon płodowych przed ukończeniem 37. tygodnia ciąży określa się mianem PPRM, ang. *Preterm Premature Rupture of Membranes*. Dodatkowo eksperci z Amerykańskiego Kolegium Położników i Ginekologów, ang. *American Congress of Obstetricians and Gynecologist*, wśród PPRM wyróżnili trzy kategorie [3]:

- 1- PPRM w późnej ciąży niedonoszonej (34.⁺⁰-36.⁺⁶), ang. *Near term PPRM*
- 2- PPRM we wczesnej ciąży niedonoszonej (24.⁺⁰-33.⁺⁶), ang. *Early PPRM*
- 3- PPRM w ciąży skrajnie niedonoszonej, przed uzyskaniem przez płód zdolności do życia poza macicą (<24.tc.), ang. *Mid trimester PPRM*

Kryterium tygodni ciąży oznacza zupełnie inne rokowanie zarówno dla matki jak i płodu, a także odmienne strategie postępowania terapeutycznego [1, 58].

1.2 Epidemiologia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych oraz znaczenie tej patologii w etiologii porodu przedwczesnego

Pomimo rozwoju medycyny perinatalnej i ciągłej poprawy opieki położniczej, częstość występowania PROM w krajach wysoko rozwiniętych nie zmienia się od wielu lat. PROM dotyczy około 3–10% wszystkich ciąż. Przedwczesne pęknięcie błon płodowych przed terminem (PPRM) stwierdzane jest w około 1–3% przypadków [4-6, 16]. Zebrano dane ukazujące, iż w samych Stanach Zjednoczonych opisywany problem położniczy dotyka ok. 120 000 ciężarnych rocznie [28]. Częstość występowania tego powikłania w Kanadzie oceniono na 2,3 % [27], podobnie w Nigerii - 2,5% [26]. Szacuje się, że

PROM po 37. tygodniu ciąży jest ponad dwukrotnie częstszy (ok. 8%). Natomiast PPRM w drugim trymestrze ciąży dotyczy tylko 0,65% wszystkich ciąż [18].

Piśmiennictwo światowe podaje, że PPRM stanowi ok. 65-70% całkowitej liczby porodów przedwczesnych [21, 25], z kolei polskie badanie opisują, iż PPRM stanowi 32,6 % ogólnej liczby porodów odbywających się przed ukończonym 37. tygodniu ciąży [19, 20].

1.3 Etiopatogeneza i czynniki ryzyka przedwczesnego pęknięcia błon płodowych

Etiologia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych jest złożona i wieloczynnikowa. Mechanizmy, które doprowadzają do opisywanej patologii położniczej nie są w pełni poznane [7, 16].

Na skutek szeregu czynników zewnętrznych (np. nieprawidłowa mikroflora pochwy, zakażenie wewnątrzmaciczne, urazy, przedwczesne odklejanie się łożyska) może dochodzić do wystąpienia lokalnego odczynu zapalnego w obrębie dróg rodnych kobiety.

W piśmiennictwie jest wiele danych wskazujących na udział stanu zapalnego w etiologii PROM i PPRM. Obecne zarówno w doczesnej jak i w błonach płodowych oraz łożysku makrofagi mogą ulec aktywacji pod wpływem samych drobnoustrojów lub pojawiających się produktów ich przemiany materii. W konsekwencji następuje uwolnienie licznych cytokin prozapalnych, głównie IL-1 (interleukina-1), IL-6 (interleukina-6), IL-8 (interleukina-8), IL-10 (interleukina-10) oraz TNF- α (czynnik martwicy nowotworów alfa). Cytokiny, głównie IL-1 i IL-6, indukują także aktywność kolagenaz obecnych w szyjce macicy oraz błonach płodowych. Zmiany w obrębie szyjki macicy (centralizacja oraz skracanie się), zarówno w trakcie porodu o czasie jak i podczas porodu przedwczesnego, uwarunkowane są zmianą właściwości kolagenu oraz glikozaminoglikanów. Zaktywowane przez cytokiny prozapalne kolagenazy (należące do rodziny metaloproteinaz) oraz zdezaktywowane inhibitory tkankowe tych enzymów, odpowiedzialne są za proces przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. Najważniejsze w tym mechanizmie wydaje się być działanie metaloproteinazy MMP-1 (metaloproteinaza-1), MMP-2 (metaloproteinaza-2) oraz MMP-9 (metaloproteinaza-9), które dokonują proteolitycznego rozkładu kolagenu typu I, II, III, IV, V, VII, X i elastyny. Aktywność enzymów proteolitycznych obecnych w błonach płodowych modulowana jest

także przez trypsynę, elastazę neutrofili oraz trombinę. Zwiększone stężenie cytokin w płynie zewnątrzkomórkowym stymuluje ponadto syntezę i wydzielanie przez okoliczne tkanki prostaglandyn mogących inicjować wystąpienie przedwczesnej czynności skurczowej macicy [211, 212].




Większość badaczy podziela pogląd, że fizjologiczne pęknięcie błon płodowych po 37. tygodniu ciąży jest konsekwencją dokonującego się osłabienia struktury błon płodowych. Przyjmuje się, że pęknięcie błon płodowych o czasie jest najprawdopodobniej rezultatem działania siły, która powstaje w trakcie skurczu mięśnia macicy i działającej na błony płodowe o zmniejszonej (fizjologicznie w tym okresie ciąży) wytrzymałości mechanicznej. Ma to przede wszystkim związek z występującym praktycznie od początku III trymestru ciąży wzrostem napięcia błon płodowych oraz spadkiem jakości kolagenu tworzącego błony płodowe [59-62]. Z kolei najistotniejsze dla wystąpienia PPROM jest występowanie kilku patologicznych procesów (samodzielnie lub nakładających się na siebie) na poziomie molekularno-komórkowym [63].

Chociaż czynniki ryzyka takie jak historia PPROM/PROM w poprzednich ciążach, krwawienie z dróg rodnych w drugim lub trzecim trymestrze, niedobór witamin, układowe choroby tkanek łącznych, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, niski wskaźnik masy ciała (BMI) są dobrze znane, to jednak ich etiopatologia nadal nie jest w pełni zrozumiała [1, 58].

Proces zapalny toczący się w obrębie jaja płodowego oraz błon płodowych (*ang. Intraamniotic Infection, IAI*) istotnie zwiększa ryzyko wystąpienia PPROM/PROM [109]. Do pozostałych czynników ryzyka związanych ze zwiększoną częstością występowania przedwczesnego pęknięcia błon płodowych należą: niski status socjoekonomiczny ciężarnej, krwawienie z dróg rodnych w drugim oraz trzecim trymestrze ciąży, BMI (body mass index) < 19,8, niedobór miedzi lub witaminy C, choroby tkanki łącznej, palenie tytoniu w trakcie ciąży, przebyta konizacja szyjki macicy, założenie szwu okrężnego na część pochwową szyjki macicy, infekcje układu oddechowego w trakcie ciąży, nadmierne rozciągnięcie macicy (np. ciąża wielopłodowa, wielowodzie) oraz przebyta amniopunkcja [31, 34, 37].

Tabela 1

Czynniki ryzyka przedwczesnego pęknięcia błon płodowych [58]

CZYNNIKI RYZYKA PRZEDWCZESNEGO PĘKNIĘCIA BŁON PŁODOWYCH	
 MATCZYNE	
<ul style="list-style-type: none"> - PPRM w wywiadzie - przedporodowe krwawienie z dróg rodnych - przewlekłe stosowanie steroidów w trakcie ciąży - wrodzone zaburzenia struktury kolagenu (np. zespół Ehlers-Danlos, toczeń rumieniowaty) - palenie papierosów -inwazyjne procedury wewnątrzmaciczne (amniopunkcja, biopsja kosmówki, fetoskopia) - niedokrwistość - niedobór masy ciała ($BMI < 19,8 \text{ kg/m}^2$) - niedobór witaminy C, miedzi (składniki niezbędne do syntezy kolagenu) - niedobory żywieniowe - niski status socjoekonomiczny - bezpośredni uraz w jamę brzuszną 	
 MACICZNO-ŁOŻYSKOWE	
<ul style="list-style-type: none"> - wady anatomiczne macicy - patologia łożyska (przedwczesne oddzielenie łożyska) - niewydolność cieśniowo-szyjkowa - zabiegi wykonane w obrębie szyjki macicy (konizacja szyjki macicy, założenie szwu okrężnego na część pochwową szyjki macicy) - skrócenie szyjki $< 2,5 \text{ cm}$ w drugim trymestrze ciąży - nadmierne rozciągnięcie macicy (wielowodzie, ciąża wielopłodowa) - zakażenie dróg rodnych matki - infekcje wewnątrzrodniowe (chorioamnionitis) - wielowodzie 	
 PŁODOWE	
<ul style="list-style-type: none"> - ciąża wielopłodowa 	

Dane literaturowe ukazują, iż czynniki genetyczne pełnią istotną rolę w etiologii przedwczesnego przerwania ciągłości błon płodowych. Lee i wsp. ocenili ryzyko wystąpienia PROM w kolejnej ciąży u kobiet z dodatnim wywiadem w kierunku

występowania tej patologii w poprzedniej ciąży i stwierdzili, że wynosi ono od 16 do 32 % [120].

Poród przedwczesny powikłany wcześniejszym pęknięciem błon płodowych wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powtórzenia się tej patologii w następnej ciąży. Obserwacje kliniczne pokazują, iż ciężarne (pomiędzy 23 a 27. tygodniem ciąży) z rozpoznaniem przedwczesnym pęknięciem błon płodowych prezentują 13,5% zwiększone ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego powikłanego PPRM w kolejnej ciąży oraz kilkunastokrotnie większą szansę na to, iż do PPRM dojdzie przed rozpoczęciem III trymestru ciąży [64, 65]. Rodność determinuje występowanie odmiennych czynników ryzyka dla pierwiastek oraz wieloródek. Praca fizyczna w trakcie trwania ciąży, przedwczesna czynność skurczowa macicy, infekcja bakteryjna dróg rodnych oraz niski indeks masy ciała bardziej predysponują do wystąpienia PPRM w pierwszej ciąży, natomiast w kolejnych ciążach najistotniejsze znaczenie ma dodatni wywiad w kierunku PPRM, niski BMI, dodatni wynik badania przesiewowego w kierunku obecności fibronektyny w wydzielinie pochwowej (ok. 17% pierwiastek z takim dodatnim wynikiem wraz ze skróconą szyjką macicy w badaniu USG miało zwiększone ryzyko PPRM, z kolei aż 25% wieloródek z takimi samymi wynikami doświadczyło PPRM) [64, 65].

Możliwość dokładnej analizy czynników ryzyka wystąpienia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych u każdej ciężarnej kobiety w ramach opieki perinatalnej, stwarza szansę na ich identyfikację, a w konsekwencji modyfikację i ewentualną eliminację z następowym wdrożeniem odpowiedniego postępowania diagnostyczno-terapeutycznego.

W związku z tym, że na dzień dzisiejszy nadal mechanizmy doprowadzające do przedwczesnego pęknięcia błon płodowych (zarówno po skończonym 37. tygodnia ciąży jak i przedwcześnie) nie są do końca poznane, istnieje konieczność stałego poszerzania wiedzy na temat etiologii PROM i PPRM. Przyczynić się to może do stworzenia efektywnego testu przesiewowego kwalifikującego pacjentki do grupy ryzyka wystąpienia przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego, co w przyszłości może zaowocować odwróceniem niekorzystnych trendów epidemiologicznych obserwowanych w tym obszarze medycyny matczyno-płodowej.

1.4 Diagnostyka przedwczesnego pęknięcia błon płodowych

Diagnostyka przedwczesnego pęknięcia błon płodowych powinna obejmować ocenę czynników ryzyka wystąpienia takiego powikłania u każdej kobiety ciężarnej z uwzględnieniem przeszłości położniczej. Jeśli pęknięcie błon płodowych jest oczywiste, to diagnostyka PROM i PPRM nie jest szczególnym wyzwaniem dla położników. Rozpoznanie omawianej patologii może narażać jednak pewnych problemów w sytuacji, kiedy uszkodzenie membran płodowych jest minimalne. Należy pamiętać, że pewna diagnoza ma duże znaczenie, bowiem przeoczenie problemu podczas badania ginekologicznego może doprowadzić do szeregu powikłań łącznie z wystąpieniem ciężkiego zakażenia wewnątrzodniowego i zgonu noworodka. Z kolei rozpoznanie fałszywie dodatnie prowadzi może do ekspozycji kobiety ciężarnej na stres, niepotrzebnej hospitalizacji a w konsekwencji nawet zbędnej indukcji porodu [91].

Większość przypadków przedwczesnego pęknięcia błon płodowych zostaje rozpoznana na podstawie wywiadu uzyskanego od ciężarnej oraz badania ginekologicznego z użyciem wziernika. Pacjentki zgłaszające się z podejrzeniem przedwczesnego odpływania płynu owodniowego podają, że wystąpił nagły wyciek dużej ilości płynu bądź skarżą się na ciągły wyciek niewielkiej ilości płynu z dróg rodnych. Dobrze zebrany wywiad charakteryzuje się dokładnością rzędu około 90% [1]. Badanie przy użyciu wziernika stwarza możliwość oceny obecności płynu w pochwie, pobrania posiewów z tylnego sklepienia pochwy oraz potwierdza, że nie doszło do groźnego powikłania pod postacią wypadnięcia pępowiny lub części drobnych ciała płodu. Wizualizacja płynu owodniowego przechodzącego z kanału szyjki macicy i gromadzącego się w pochwie zwykle potwierdza rozpoznanie pęknięcia błon płodowych. Palpacyjne badanie ginekologiczne, jako istotny czynnik ryzyka zakażenia wewnątrzodniowego, należy ograniczyć do minimum i stosować go tylko w sytuacjach absolutnie koniecznych tj. kiedy poród wydaje się bliski lub pacjentka wydaje się być w trakcie porodu. Piśmiennictwo przedstawia dowody, że pełne badanie ginekologiczne istotnie zwiększa ryzyko infekcji wewnątrzodniowej. Ponadto skraca ono czas latencji w każdym wieku ciążowym i dlatego nie zaleca się go stosować w każdym przypadku PROM/PPROM [92, 94-96].

W sytuacji pojawienia się jakichkolwiek wątpliwości w ustaleniu jednoznacznego rozpoznania należy wesprzeć się badaniami dodatkowymi. Ocena odczynu pH śluzu pochwowego w teście z nitrazyną jest badaniem powszechnym, ale pamiętać należy o ograniczeniach tej metody. Niestety zasadowy charakter wydzieliny pochwowej w tylnym sklepieniu pochwy stanowi tylko pośredni dowód na obecność alkalicznego płynu owodniowego (pH 7,1-7,3) w fizjologicznie kwaśnym środowisku pochwy. Nitrazyna jest związkiem o żółtej barwie, a zmiana barwy dokonuje się pod wpływem zmiany pH. Na skutek przzerwania ciągłości błon płodowych płyn owodniowy wycieka z worka owodniowego do pochwy. W konsekwencji dochodzi do wzrostu odczynu pH wydzieliny pochwowej. W zależności od uzyskanego stopnia zasadowości wydzieliny następuje zmiana barwy identyfikatora z żółtej na różne odcienie niebieskiego. Wziąć należy pod uwagę, że metoda ta obarczona jest dużym ryzykiem uzyskania wyniku fałszywie dodatniego ze względu na współistnienie między innymi bakteryjnej waginozy, użycie przez ciężarną zasadowych środków higieny osobistej, obecności nasienia lub krwi w drogach rodnych. Z kolei jeśli wyciek płynu owodniowego jest niewielki lub występuje zaawansowane małowodzie lub bezwrodzie w przypadku przedłużonego pęknięcia błon, to mogą w takiej sytuacji zdarzyć się wyniki fałszywie ujemne (choć obserwowane jest to dużo rzadziej) [99].

Do tradycyjnych pomocnych narzędzi diagnostycznych zaliczamy również test krystalizacji płynu owodniowego, który opiera się na obserwacji zmiany proporcji mukopolisacharydów i soli mineralnych w pobranej próbce [92, 93]. Polega na wykonaniu rozmazu wydzieliny pochwowej na szkiełku laboratoryjnym. Czas schnięcia takiego preparatu to minimum 10 minut. Krótszy czas może spowodować uzyskanie wyniku fałszywie ujemnego. Dodatni wynik testu jest bardzo charakterystyczny. Uzyskany na szkiełku obraz przypomina liście paproci. Fałszywie dodatnie wyniki mogą wystąpić w sytuacji zanieczyszczenia pobranego śluzu szyjkowego. Niewielka ilość krwi, obecność smółki czy zmiana odczynu pochwy nie wpływa na wynik testu. Należy mieć na uwadze, że całkowity brak krystalizacji może nastąpić w sytuacji zmieszania krwi i płynu owodniowego w równych proporcjach [99]. Dodatkowym badaniem, które może być pomocne w diagnostyce PROM i PPRM jest badanie immunochromatograficzne przy użyciu przeciwciał monoklonalnych (Test Amnisure). Zdolne jest ono wykryć mikroglobulinę łożyskową alfa-1. W tym teście wykrywana jest cząsteczka białka, która jest obecna w wydzielinie pochwowej po pęknięciu błon płodowych. Progowa wartość

stężenia przy którym możliwa jest detekcja badanego białka w wydzielinie pochwowej wynosi 5 ng/ml. Wynik uzyskujemy po upływie ok. 5-10 min. Omawiany test charakteryzuje się bardzo wysoką czułością (99%) i specyficznością (99%) przy dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej wynoszącej 99% [196].

W dobie powszechnej dostępności nieinwazyjnych technik obrazowania rutyną stała się ultrasonograficzna ocena indeksu płynu owodniowego AFI. Przy użyciu aparatu ultrasonograficznego należy uwidocznić płyn owodniowy w ciężarnej macicy, a następnie zsumować jego głębokość w czterech kieszeniach płynowych. Wynik otrzymujemy w centymetrach. O małowodziu (w kontekście omawianej pracy) mówimy w sytuacji, gdy wynik indeksu AFI ma wartość poniżej 5 cm [101-103]. Wziąć należy pod uwagę, że badanie ultrasonograficzne jest badaniem dynamicznym i wartość indeksu AFI zależna jest od czasu, jaki upłynął od przerwania ciągłości błon płodowych. Metoda ta jest jedynie dodatkowym narzędziem diagnostycznym potwierdzającym zmniejszoną ilość płynu owodniowego lub jego brak [92, 97, 98].

W diagnostyce różnicowej PROM/PPROM należy uwzględnić: niekontrolowane oddawanie moczu, obfite upławy, obfite wydzielanie śluzu, przetokę odbytniczo-pochwową, przetokę pęcherzowo-pochwową [58].

1.5 Czas trwania pęknięcia błon płodowych oraz konsekwencje PROM i PPROM

PROM w ciąży donoszonej wiąże się z poważnymi powikłaniami okołoporodowymi, takimi jak przedwczesne oddzielenie się łożyska, ucisk pępowiny, wypadnięcie sznura pępowinowego czy infekcja u matki i noworodka. Ponadto stwarza zwiększone ryzyko ukończenia ciąży na drodze zabiegowej [4, 7, 110, 115, 116].

Okres utajony to okres między wystąpieniem PROM a początkiem samoistnego porodu i jest on odwrotnie skorelowany z wiekiem ciążowym [104]. Badania pokazują, że większość kobiet z PROM w ciąży donoszonej doświadczy porodu samoistnego. Szacuje się, że w ciągu doby od pęknięcia błon płodowych urodzi 70% ciężarnych, 85% w ciągu 48 godzin i ponad 90% w ciągu 72 godzin [105, 106]. U prawie co dziesiątej ciężarnej z PROM istnieje ryzyko rozwoju zakażenia wewnątrzowodniowego, którego

wystąpienie dodatnio koreluje wraz z przedłużającym się czasem od pęknięciem błon płodowych [107, 108, 109]. Definicja przedłużającego się pęknięcie błon płodowych odnosi się do sytuacji, kiedy to PROM utrzymuje się powyżej 24 godzin. Sytuacja taka jest związana z udowodnionym zwiększonym ryzykiem zapalenia błon płodowych i poporodowego zapalenia błony śluzowej macicy [58, 110-113]. Ryzyko zakażenia noworodka wzrasta ok. dwukrotnie, jeśli pęknięcie błon płodowych trwa 24-48 godzin lub dłużej w ciąży donoszonej [114].

Uważa się, że statystycznie PPRM związany jest z 4-krotnym wzrostem śmiertelności oraz 3-krotnym wzrostem zachorowalności płodu (w konsekwencji noworodka), bez względu na wiek ciążowy, w którym dochodzi do wystąpienia omawianej patologii [58, 102, 117, 118].

Konsekwencje w przypadku PPRM są powiązane z wiekiem ciążowym, w którym to dochodzi do wystąpienia owej patologii. Wiadomym jest, że skutki pęknięcia błon płodowych przed terminem w zaawansowanym trzecim tryestrze np. w 36. tygodniu ciąży nie będą równały się z tymi, które pojawią się w przypadku PPRM na początku drugiego tryestru ciąży. Te ostatnie będą zdecydowanie bardziej nasilone i częściej obserwowane.

W piśmiennictwie częstość występowania zakażenia wewnątrzrodniowego w przypadku ciąży powikłanej PPRM mieści się w przedziale od 13 do nawet 60% i wzrasta wraz z okresem latencji oraz liczbą wykonywanych przezpochwowych badań ginekologicznych. Z kolei połogowe zapalenie błony śluzowej macicy spotykane jest w 2–13% przypadków [58, 102, 119].

1.6 Postępowanie w przypadku przedwczesnego pęknięcia błon płodowych

Kluczem do ograniczenia działań niepożądanych PROM czy PPRM jest szybkie postawienie diagnozy oraz dobór odpowiedniego postępowania, które zależy od wieku ciążowego, w którym doszło do przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. W praktyce klinicznej postępowanie aktywne, czyli skierowanie ciężarnej do porodu, zazwyczaj jest wdrażane w przypadku zaistnienia PPRM powyżej 34 tygodnia ciąży. Postępowanie zachowawcze bądź wyczekujące, połączone z odpowiednim leczeniem (antybiotyki, sterydy) i monitorowaniem, dotyczy najczęściej ciężarnych z PPRM przed ukończonym

34. tygodniem ciąży. Poza kryterium wieku ciążowego, ogromne znaczenie w wyborze rodzaju postępowania jest fakt zdiagnozowania (bądź nie) infekcji wewnątrzmacicznej. Optymalny moment do ukończenia ciąży pojawia się w sytuacji, kiedy ryzyko wynikające z wcześniactwa jest mniejsze niż ryzyko wynikające z obecności zakażenia wewnątrzowodniowego. Niestety żadna z dotychczas stosowanych metod diagnostycznych nie cechuje się wystarczająco wysoką czułością i specyficznością pozwalającą na odpowiednio wczesne wykrycie rozpoczynającej się infekcji wewnątrzmacicznej.

1.6.1 Postępowanie zachowawcze

W postępowaniu zachowawczym pacjentek z PPROM istotą jest obserwacja w kierunku zakażenia wewnątrzowodniowego (IAI). Do kryteriów klinicznych oraz laboratoryjnych umożliwiających rozpoznanie IAI u ciężarnej zalicza się: (a) temperatura ogólna ciała $>37,8^{\circ}\text{C}$, (b) częstość matczynej czynności serca ≥ 100 uderzeń serca/min, (c) częstość płodowej czynności serca – FHR ≥ 160 uderzeń serca/min, (d) nieprawidłowy zapach płynu owodniowego, (e) leukocytoza >15 G/l, (f) przesunięcie obrazu rozmazu krwi obwodowej w stronę lewą – wzrost stężenia granulocytów obojętnochłonnych, (g) CRP ≥ 25 mg/l.

W przypadku wyboru postępowania zachowawczego, według wytycznych RCOG do rutynowej obserwacji ciężarnych z pęknięciem błon płodowych w kierunku zakażenia wewnątrzowodniowego w warunkach szpitalnych wystarczy wykonywanie co 4 do 8 godzin pomiaru ciepłoty ciała oraz częstości pracy serca ciężarnej z równoczesną oceną czynności serca płodu [175]. Podkreślony jest fakt, iż istotne w monitorowaniu okresu latencji PROM i PPROM jest badanie kardiograficzne. Wystąpienie tachykardii u płodu zwiastuje w 20 do 40 % przypadków wystąpienia zakażenia wewnątrzowodniowego (niska dodatnia wartość predykcijna). Jeśli tachykardia pojawia się w zapisie KTG, to jest ona najczęściej późnym objawem zakażenia. Brak tachykardii wyklucza w zasadzie zakażenie w obrębie błon płodowych, gdyż odsetek wyników fałszywie ujemnych jest niski i wynosi tylko 3 % [171]. Przydatność testu biofizycznego płodu (spadek punktacji w teście oraz nieprawidłowe przepływy krwi w tętnicy pępowinowej) w identyfikacji pacjentek z rozpoczynającym się zakażeniem wewnątrzowodniowym oceniono na 30–80% przy 2–9% wyników fałszywie pozytywnych [82, 175].

Czułość wzrostu stężenia leukocytów we krwi obwodowej ciężarnej w rozpoznaniu IAI wynosi od 29 do 47% przy współwystępowaniu 5–18% wyników fałszywie pozytywnych [172, 175]. W przypadku białka C-reaktywnego (CRP) specyficzność waha się pomiędzy 38 a 55% [172, 173, 175]. Ponadto powtarzane w odstępstwie 7 dni badanie bakteriologiczne wydzieliny pochwowej pozwala na wykrycie zaledwie 53% przypadków IAI, przy 25% wyników fałszywie dodatnich. W piśmiennictwie pojawiają się niespójne dane co do użyteczności oceny leukocytozy i podwyższonych wartości białka C-reaktywnego (CRP) oraz wykonywania regularnych posiewów z dróg rodnych w diagnostyce IAA [174, 176]. W wytycznych RCOG nie ma zaleceń dotyczących rutynowego i regularnego powtarzania co 7 dni badania bakteriologicznego wydzieliny pochwowej, ani oceny leukocytozy matczynej i poziomu białka C-reaktywnego, jednak w praktyce klinicznej metody te nadal są rutynowo stosowane.

Równolegle, oprócz hospitalizacji i obserwacji ciężarnej w kierunku IAI, możliwe jest także podanie leków tokolitycznych, kortykosteroidów oraz zastosowanie profilaktycznej antybiotykoterapii [177].

Korzyści z podania kortykosteroidów w sytuacji przedwczesnego odpłynięcia błon płodowych zostały dowiedzione w licznych pracach. Analizując piśmiennictwo zauważalne jest to, że wokół tego tematu nie ma niespójnych informacji i kontrowersji. Przyjmuje się, że przez pierwsze 48 godzin od PPRM toczące się infekcja wewnątrzrodniowa wzmacnia produkcję surfaktantu w płucach płodu (poprzez adrenokortykotropinę i kortyzol w odpowiedzi na wzrost stężenia cytokin prozapalnych). Istotne jest, że jednak po upływie tego czasu zaczyna dominować negatywny wpływ zwiększonego stężenia cytokin prozapalnych. Wraz z toksynami bakteryjnymi uszkadzają pneumocyty płodu i nasilają syntezę macierzy międzykomórkowej, powodując tym samym zwiększone ryzyko wystąpienia włóknienia tkanki płucnej płodu oraz dysplazji oskrzelowo-płucnej u noworodka [177].

Metaanaliza obejmująca 15 randomizowanych badań wykazała, że poza przyspieszeniem dojrzewania płuc u płodu steroidoterapia prenatalna zmniejsza ryzyko wystąpienia niewydolności oddechowej, krwawień wewnątrzczaszkowych, martwiczego zapalenia jelit, a tym samym przyczynia się do zmniejszenia umieralności okołoporodowej noworodków [178]. Dlatego zastosowanie kursu sterydoterapii w przypadku ciężarnych z PPRM pomiędzy 24 a 34 tygodniem ciąży jest

rekomendowane u każdej pacjentki z tym powikłaniem [175]. Zalecane jest podawanie 24 mg Betametazonu w dwóch dawkach podzielonych co 24 godziny lub 24 mg Deksametazonu w 4 dawkach podzielonych co 6 godzin [180]. Nie znaleziono wystarczających mocnych dowodów potwierdzających zasadność prenatalnej stymulacji dojrzałości płuc płodu po 34. tygodniu ciąży [58]. Nie jest rekomendowane powtarzanie kursu steroidoterapii, aczkolwiek zaleca się rozważenie takiego postępowania w przypadku, gdy stymulowano dojrzałość płuc płodu przed 28. tygodniem ciąży [58, 119, 180]. Dowiedziono, że korzystne działanie sterydoterapii ujawnia się już po 4–6 godzinach od podania. Na pełny efekt terapeutyczny trzeba poczekać minimum 24 godziny od pierwszej dawki leku. Działanie kortykosteroidów utrzymuje się przez co najmniej 7 dni [58, 178-180].

Jak podaje piśmiennictwo okres latencji (czas jaki upływa pomiędzy pęknięciem błon płodowych a porodem) jest na ogół krótki. W pracy Mercer'a i wsp. z 1997 roku okres latencji u pacjentek zakwalifikowanych do postępowania zachowawczego wynosił w większości tylko 3 dni. Okres ten ulegał wydłużeniu do 6 dni w przypadku zastosowania antybiotykoterapii [181]. Ponadto w tej pracy zostało udowodnione, że zastosowanie antybiotyków oprócz zmniejszenia ryzyka wystąpienia zgonu noworodka, to wpływa także na ograniczenie ryzyka wystąpienia ciężkich powikłań takich jak zespół niewydolności oddechowej, krwawienia do OUN, martwiczego zapalenia jelit czy sepsy. Łączne ryzyko wystąpienia wszystkich powikłań zmalało o 9 % (z 53% do 44%) [181]. Kenyon i wsp. w swojej metaanalizie z 2003 roku oceniającej użyteczność antybiotykoterapii stwierdzili, że zastosowanie antybiotykoterapii niezwłocznie po wystąpieniu PPRM zmniejsza odsetek porodów dokonujących się w przeciągu 48 godzin. Ryzyko wystąpienia IAI redukuje się blisko o 1/3. Ponadto okazało się, że antybiotykoterapia zmniejsza ryzyko ciężkiej infekcji u noworodków [182]. Spośród stosowanych 21 antybiotyków najbezpieczniejsze w stosowaniu są: Ampicylina, Amoksycylina oraz Erytromycyna. Jedynym antybiotykiem, którego z pewnością trzeba unikać w terapii to Amoksycyliny wraz z inhibitorem beta laktamaz (kwasem klawulonowym). Zaobserwowano zwiększony odsetek martwiczego zapalenia jelit u noworodków po jego użyciu [182]. Aktualnie, według ACOG u ciężarnych z PPRM z wdrożonym postępowaniem zachowawczym, zaleca się stosowanie profilaktycznej antybiotykoterapii (do wyboru Ampicylina, Amoksycylina lub Erytromycyna) przez okres 7 dni [180] lub podążając za wytycznymi RCOG należy wdrożyć 10-dniowy kurs

Erytromycyny [175]. Profilaktyka transmisji GBS (ang. *group B Streptococcus agalactiae*) powinna być wdrożona nawet w sytuacji zastosowania profilaktycznej antybiotykoterapii PPRM [175, 180].

Wiele kontrowersji budzi temat zastosowania leków hamujących czynność skurczową w przypadku ciężarnych z PPRM. W pracy Weiner'a i wsp. nie wykazano istotniej statystycznie różnicy w długości okresu od pęknięcia błon do porodu pomiędzy grupami pacjentek otrzymującymi leki tokolityczne oraz tymi, którym ich nie podawano [184]. Combs i wsp. wykazali, że stosowanie leków hamujących czynność skurczową macicy przez wszystkie dni od momentu pęknięcia błon płodowych lub tylko przez 48 godzin w porównaniu z niestosowaniem ich w ogóle, nie przynosi istotnych różnic w długości okresu od pęknięcia błon płodowych. Ponadto nie wpływa istotnie na współczynnik zachorowalności lub śmiertelności noworodków [183].

Dwa ginekologiczno-położnicze towarzystwa (zarówno RCOG jak i ACOG) w swoich zaleceniach nie rekomendują stosowania tokolizy w przypadku PPRM. W sytuacji PPRM z towarzyszącą czynnością skurczową macicy RCOG utrzymuje swoje stanowisko, a ACOG sygnalizuje, że nie wypracowano jednoznacznego konsensusu w przypadku stosowania tokolizy w przypadku PPRM z towarzyszącą czynnością skurczową macicy [175, 180].

W 2013 roku pojawił się konsensus Grupy Koordynacyjnej ds. Wzajemnego Uznawania i Zdecentralizowanych Procedur u Ludzi ograniczający stosowanie krótko działających agonistów typu beta w położnictwie. Zgodnie z nim tokoliza może być stosowana poniżej 32. tygodnia przez maksymalnie 48 godzin w celu wyhamowania czynności skurczowej macicy, celem umożliwienia wdrożenia w tym czasie kursu steroidoterapii [190].

Przed zakwalifikowaniem pacjentki do leczenia tokolitycznego istotnym jest wzięcie pod uwagę bezwzględnych przeciwwskazań do jego zastosowania, należą do nich m.in: zgon wewnątrzmaciczny płodu, wady wrodzone płodu o niepomyślnym rokowaniu, zagrażająca zmartwica wewnątrzmacicznej płodu, ukończony 37. tydzień ciąży, ciężki stan przedrzucawkowy lub rzucawka, ciężkie nadciśnienie tętnicze, obfite krwawienia z dróg rodnych, w tym z łożysko przodujące lub przy podejrzeniu przedwczesnego

oddzielania się łożyska, zapalenie błon płodowych, obecność chorób matki stanowiące przeciwwskazanie do użycia leku ze względu na jego działanie uboczne [187]. Lekami zaś posiadającymi rejestrację w hamowaniu przedwczesnej czynności skurczowej są antagonisty receptora oksytocyny–wazopresyny V1a - atosiban oraz krótkodziałające betamimetyki – fenoterol, salbutamol podawane drogą dożylną w warunkach szpitalnych [188, 189, 191]

U ciężarnych z PPRM (zarówno z towarzyszącą czynnością skurczową jak i bez) tokoliza stwarza potencjalną szansę na zastosowanie pełnego kursu steroidoterapii oraz transport ciężarnej do wyższego ośrodka referencyjnego [58, 183, 185, 186].

1.6.2 Postępowanie aktywne – zakończenie ciąży

Postępowanie aktywne wobec ciężarnych z rozpoznaniem PROM lub PPRM oznacza, iż w momencie postawienia diagnozy powyższej patologii, pacjentka kierowana jest w następnym kroku do zakończenia ciąży. Istnieją kontrowersje dotyczące wieku ciążowego przy wyborze takiego postępowania.

RCOG zaleca rutynową indukcję porodu w każdej sytuacji PROM >36. tygodnia ciąży [175]. Sformułowanie tych rekomendacji oparte było m.in. na pracy Dare i wsp., którzy w przeprowadzonej metaanalizie 12 badań dotyczącej wyboru sposobu postępowania w sytuacji PROM >36. tygodnia ciąży stwierdzili, że ryzyko wystąpienia IAI oraz łagodnego zapalenia błony śluzowej macicy w sytuacji postępowania aktywnego jest istotnie niższe. Pomimo, że autorzy tej pracy nie wykazali różnic pomiędzy obiema grupami w częstości wrodzonego zakażenia noworodka, to jednoznacznie zalecają indukcję porodu w przypadku PROM>36. tygodnia ciąży po przedstawieniu wyczerpującej informacji pacjentce [193].

O ustalenie niższej granicy wieku ciążowego przy wyborze aktywnego postępowania w przypadku patologii PPRM postuluje w swojej pracy Aaron. Zaleca on ukończenie ciąży w każdym przypadku w sytuacji PPRM >34. tygodnia. Argumentowane jest to wysokim ryzykiem rozwoju IAI, niskim ryzykiem rozwoju powikłań związanych z wcześniactwem oraz brakiem korzyści z zastosowania steroidoterapii po ukończeniu 34. tygodnia ciąży [58]. Poniżej 34. tygodnia pomocny przy podejmowaniu decyzji o wyborze postępowania może okazać się test oceniający dojrzałość płodu. Wykonuje się go na podstawie analizy płynu owodniowego pobranego podczas amniocentezy

(FLM- Fetal Lung Maturity) i opiera się na ocenie zawartości surfaktantu. Dodatnia wartość predykcja jest wysoka ok. 95%, ujemna wartość predykcja jest prawie o połowę niższa i wynosi ok. 50% [192]. W swojej pracy Aaron i wsp., po potwierdzeniu dojrzałości płuc płodu, rekomendują indukcję porodu już od 32. tygodnia ciąży [58].

Neerhof i wsp. wykazali w pracy z 1999, że 34 tydzień ciąży jest czasem, powyżej którego wskaźnik zachorowalności noworodków wyraźnie ulega obniżeniu [194].

Tak więc punktem przełomowym odnośnie decyzji co do wyboru postępowania w przypadku PPRM wydaje się być 34 tydzień ciąży. Potwierdzają to między innymi wskaźniki częstości występowania niewydolności oddechowej u noworodków poddanej ocenie w pracy wspomnianego wyżej Neerhafa. Wśród noworodków urodzonych w 33. tygodniu częstość występowania niewydolności oddechowej wynosi 22,5%, w 34. tygodniu wyraźnie spada i wynosi 5,8 %, a w 36 tygodniu wynosi już tylko 1,5 % [194].

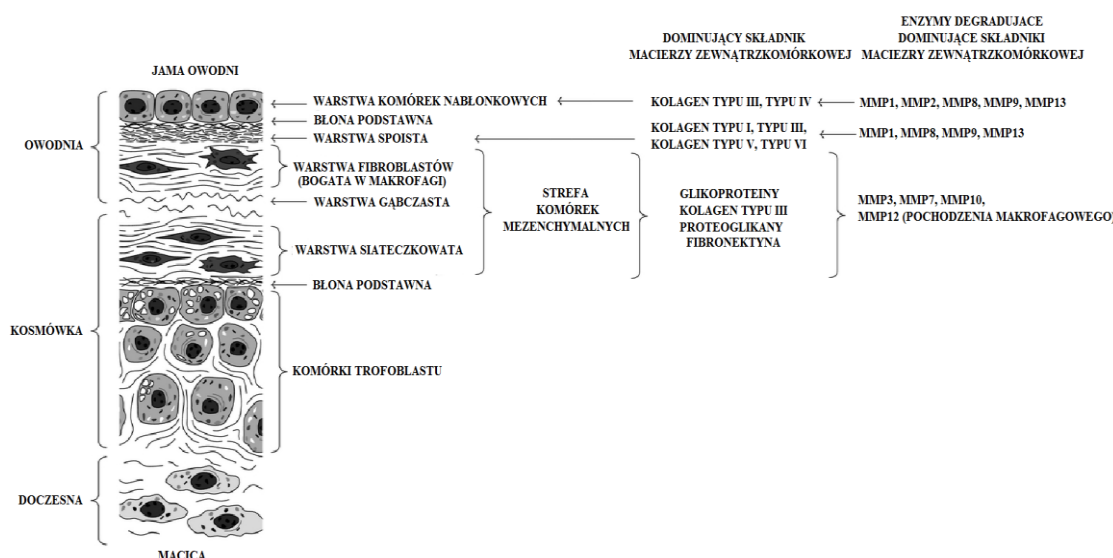
W sytuacji wystąpienia PPRM poniżej 34. tygodnia, decyzja o podjęciu aktywnego działania powinna być zawsze poprzedzona oceną ryzyka konsekwencji jakie niesie za sobą wcześniactwo w danym wieku ciążowym w stosunku do konsekwencji dla noworodka w przypadku rozwoju w okresie prenatalnym zakażenia wewnątrzrodniowego [175, 180]. W pracy Waters'a wykazano, że poniżej 32. tygodnia ciąży wobec przeważających konsekwencji związanych z wcześniactwem nie zaleca się indukcji porodu w chwili stwierdzenia PPRM [195]. RCOG rekomenduje postępowanie wyczekujące w każdym przypadku niepowikłanego PPRM<34. tygodnia ciąży [175]. Amerykańskie towarzystwo ACOG również nie zaleca indukcji porodu w przypadku przedwczesnego pęknięcia błon pomiędzy 24 a 31. tygodniem ciąży [180].

1.7 Błony płodowe

Błony płodowe to tkanki, które zapewniają wsparcie mechaniczne, kompartmentalizację i ochronę immunologiczną rozwijającego się płodu do czasu ich fizjologicznego przerwania oraz pęknięcia podczas porodu. Rozwijają się równolegle z płodem, stając się w pełni uformowane pod koniec 15 tygodnia ciąży z chwilą fuzji owodni i kosmówki [150]. Błony płodowe są lepkosprężystą, pozbawioną naczyń krwionośnych tkanką, składającą się z kilku odrębnych morfologicznie warstw połączonych macierzą zewnątrzkomórkową (Rysunek 1) [150].

Owodnia składa się z 5 warstw. Warstwa znajdująca się najbliżej płodu składa się z komórek nabłonka owodni, które to wydzielają kolagen typu III i IV i spoczywają na błonie podstawnej zawierającej kolagen IV i glikoproteiny. Pod błoną podstawną znajduje się warstwa spoista (zbita) złożona z kolagenu typu I, III i V. Kolejna warstwa fibroblastów jest najgrubsza i zawiera komórki mezenchymalne oraz makrofagi. Warstwa gąbczasta leży poniżej warstwy fibroblastów i składa się z proteoglikanów, glikoprotein oraz kolagenu typu III. Oddziela ona owodnię od kosmówki [150].

Kosmówka jest grubsza od owodni, ale ma mniejszą rozciągliwość oraz wytrzymałość. Składa się z warstwy siateczkowej zawierającej kolagen I, III, IV, V, VI. Poniżej występuje błona podstawna z kolagenem typu IV, fibronektyną i lamininą. Ostatnia warstwa zawiera komórki trofoblastu o polarności skierowanej w stronę doczesnej macicy. Mocno przylega do tkanki doczesnej macicy [150].



Rysunek 1. Budowa błon płodowych z wyszczególnieniem ich głównych składników macierzy zewnątrzkomórkowej i enzymów degradujących macierz zewnątrzkomórkową [150, 233].

Błony płodowe człowieka są jedną z lepiej zbadanych tkanek rozrodczych pod względem składu. Badania histopatologiczne błon płodowych wskazują, iż dominującym składnikiem ich macierzy zewnątrzkomórkowej, utrzymującej integralność i elastyczność błon, jest kolagen oraz elastyna (Rysunek 1).

Kolagen typu I i III stwierdzono w większości warstw błon płodowych, z wyjątkiem warstwy trofoblastu kosmówki. Fibronektyna, laminina oraz kolageny typu I i IV

znajdują się w sieci ECM, która otacza komórki cytotrofoblastów w kosmówce. Kolagen typu V znaleziono również w warstwach siateczkowej i trofoblastu. Kolagen typu VI znajdował się głównie w owodni i warstwie siateczkowej.

Kolagen ECM podlega ciągłej rotacji przez cały okres trwania ciąży, aby dostosować się do rosnącej objętości i napięcia w miarę postępu ciąży. Dowodem na to jest udowodniony spadek zawartości kolagenu w owodniach w ostatnich 8 tygodniach trwania ciąży [201-203].

Ze względu na to, iż włókna kolagenowe kolagenu typu I, typu, III, typu IV, typu V i typu VI oraz fibronektyna, fibrylina, elastyna i proteoglikany stanowią dominujący składnik macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych, zatem enzymy degradujące te składniki (Tabela 2) są upatrywane jako potencjalne markery wystąpienia zjawiska PROM lub PPRM.

Tabela 2

Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej i ich enzymy degradujące. Opracowanie własne.

Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej	
Enzymy	Substraty
MMP 1	Kolagen typu I, II, III, VII, VIII, X, proteoglikany łączące białka
MMP 2	Kolagen I, IV, V, VII, X, XI, XIV, proteoglikany, fibronektyna, laminina
MMP 3	Kolagen I, II, III, IV, IX, X, XIV, proteoglikany, fibronektyna
MMP 7	Kolagen IV, fibronektyna, laminina, proteoglikany elastyna
MMP 8	Kolagen I, II, III, VIII, X, fibronektyna, laminina
MMP 9	Kolagen IV, V, VII, X, IV, fibronektyna, fibrilina, laminina
MMP 10	Kolagen II, IV, V, proteoglikany, fiblinina, elastyna
MMP 12	Kolagen IV, proteoglikany, fibrylina, fibronektyna, elastyna, laminina
MMP 13	Kolagen I, II, III, IV, IX, X, XIV, fibronektyna, fibrylina, serpina, laminina
Czynnik równoważący rozkład i syntezę kolagenu	
Prolidaza	odzyskiwanie proliny z degradujących włókien kolagenu celem ponownego włączenia proliny do sieciowania włókien fibrylarnych do kolagenu

Najczęstszym miejscem pęknięcia błon owodniowych w PROM/PPROM jest okolica nadszyjkowa (błona pokrywająca ujście wewnętrzne szyjki macicy) [206, 207]. Błona owodniowa w tej lokalizacji jest strukturalnie zmieniona, narażona na kontakt z drobnoustrojami [208]. Doświadczenie kliniczne wykazało, że nie zawsze PROM/PPROM podąża klasycznym wzorcem pęknięć. Istnieją przypadki potwierdzonego PROM/PROM, gdzie w badaniu ultrasonograficznym uwidoczniona zostaje prawidłowa ilość płynu owodniowego. Podstawową wówczas etiologią jest mechaniczne przerwanie błon (podobnie jak w przypadku PPRM pojawiający się jako powikłanie operacji fetoskopowych) bez towarzyszącej etiologii zapalnej i/lub zakaźnej obserwowanej w przypadku klasyczny PPRM. W takich sytuacjach rokowanie jest bardziej pomyślne [209].

W przypadku PROM/PPROM z klasycznym wzorcem pęknięcia błon, zmiana morfologii błony jest związana z wyraźnym obrzękiem i przerwaniem sieci kolagenu w obrębie warstwy spojistej, warstwy fibroblastów i warstwy gąbczastej [210].

Wysunięto hipotezę, że pęknięcie błon płodowych obejmuje sekwencję zdarzeń, które rozpoczynają się od rozděcia i utraty elastyczności, oddzielenia kosmówki i owodni, przerwania kosmówki, rozděcia i przepukliny owodni, aż w końcowym etapie dochodzi do pęknięcia owodni [148]. Ta proponowana kolejność wydaje się być wynikiem zmian strukturalnych zachodzących w ECM oraz wynikającymi z nich zmian biomechanicznymi w błonach, głównie owodni, która jest najsilniejszym składnikiem błon płodowych [149]. Ponieważ niewydolność szyjki macicy jest często związana z PPRM, prawdopodobne jest, że przedwczesne zmiany szyjki macicy ułatwiają nieplanowane pęknięcie błon płodowych w PPRM.

Scharakteryzowano biochemiczne i mechaniczne właściwości błon płodowych od 23. do 41. tygodnia ciąży oraz błon, które pękają przedwcześnie [151-157]. W niektórych badaniach stwierdzono zmniejszenie zawartości kolagenu w ECM w błonach płodowych w przypadku PPRM. W próbkach PPRM proporcje kolagen typu III/typu I, typu III/typu V i typu III/kolagen całkowity były znacznie niższe niż w próbkach bez PPRM. Stosunki typ I/typ V, typ I/kolagen całkowity i typ V/kolagen całkowity nie wykazały zmian w ciążach z i bez PPRM. Te zmiany w ECM błony płodowej odzwierciedlają zmiany w syntezie i obrocie składników.

1.8 Metaloproteinazy

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), nazywane również kolagenazami lub matryksynami, są to metalozależne enzymy proteolityczne należące do klasy hydrolaz, zawierające w swoim centrum aktywnym jon cynku. Odpowiedzialne są za katalizowanie procesu hydrolizy wiązań peptydowych białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Extracellular matrix*, ECM). Z uwagi na to, iż proces ten przebiega wewnątrz łańcucha polipeptydowego zaklasyfikowano je do endopeptydaz. Od czasu odkrycia pierwszej MMP u kręgowców w roku 1962, dotychczas zidentyfikowano i opisano 28 metaloproteinaz. U ludzi odkryto 24 metaloproteinazy, przy czym wyróżniono dwie identyczne postacie MMP-23 z uwagi, iż są kodowane przez dwa różne geny tj. MMP-23A oraz MMP-23B [30-33].

Metaloproteinazy macierzowe posiadają duży stopień podobieństwa strukturalno-czynnościowego, są zdolne do degradacji i przebudowy białek przestrzeni pozakomórkowej i błony podstawnej, tj. kolagenu, lamininy, fibronektyny, elastyny oraz proteoglikanów [49, 50]. Działając mniej lub bardziej selektywnie na białka ECM, mają znaczny wpływ na przebudowę i odnowę tkanek zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych [30-37].

1.8.1 Budowa MMPs

Metaloproteinazy macierzowe mają budowę wielodomenową. Pomimo, iż MMPs są enzymami o zróżnicowanej budowie, niemniej można wyróżnić charakterystyczne domeny, które są wspólne dla całej rodziny. O odmiennych właściwościach poszczególnych enzymów decyduje fakt występowania kombinacji różnych dodatkowych domen.

Powtarzającym się komponentem w budowie matryksyn jest:

- A. peptyd sygnałowy** - pełni rolę podczas transportu cząsteczki enzymu przez siateczkę śródplazmatyczną i ulega proteolizie na błonie komórkowej.
- B. propeptyd** (inaczej prodomena hamująca) - liczy ok. 80 aminokwasów i utrzymuje MMPs w postaci nieaktywnej. Propeptyd zawiera sekwencję PRCGXPDV (Pro, Arg, Cys, Gly, X, Pro, Asp, Val), która jest zachowana w toku ewolucji w całej rodzinie białek MMPs.

C. domena katalityczna - składa się z ok. 170 aminokwasów i odpowiedzialna jest za aktywność proteolityczną. W domenie tej znajduje się centrum aktywne zawierające jeden katalityczny i jeden strukturalny jon cynku oraz najczęściej trzy jony wapniowe.

1.8.2 Mechanizm działania MMPs

Metaloproteinazy w przestrzeniach komórkowych wszystkich tkanek utrzymywane są w postaci nieaktywnej, w formie proenzymu (latentnej, proMMP) [41-43]. Synteza MMPs w postaci zymogenu, który jest prekursorem aktywnej postaci enzymu, jest możliwa dzięki zablokowaniu cynku w centrum aktywnego proenzymu wiązaniem koordynacyjnym z grupą tiolową cysteiny w propeptydzie. Aktywacja następuje z chwilą odszczepienia cysteiny oraz odsłonięcia miejsca aktywnego z zawartym atomem cynku, co prowadzi do zmiany konformacji cząsteczki [39, 40]. Aktywacja proenzymu może zachodzić na dwa sposoby:

- autokatalityczny - wiązanie Cys-Zn zostaje przerwane przy udziale enzymów proteolitycznych. Następnym krokiem jest autokatalityczne odcięcie propeptydu.
- przy udziale błonowych MMPs (MT-MMPs, metaloproteinazy macierzy typu błonowego). W tym przypadku proenzym jest aktywowany przez MT-MMP [44].

Metaloproteinazy są aktywne w obojętnym lub lekko zasadowym pH w obecności jonów wapnia.

Niezbędnym warunkiem do utrzymania homeostazy w obrębie tkanek jest istnienie mechanizmów regulatorowych wpływających na aktywność poszczególnych związków. W przypadku MMPs ich działalność jest kontrolowana na poziomie ekspresji genów kodujących, aktywacji zymogenu oraz za sprawą swoistych inhibitorów [37-40].

Na etapie transkrypcji ich wydzielanie może być regulowane przez czynniki wzrostu, cytokiny, hormony, różnego rodzaju interakcje międzykomórkowe i komórek z macierzą zewnątrzkomórkową oraz przez niektóre czynniki fizyczne, między innymi promieniowanie ultrafioletowe [37, 38]. Nadmiernemu pobudzeniu ekspresji MMPs zapobiegają ich naturalne tkankowe inhibitory TIMPs (ang. *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases*) oraz α 2-makroglobulina (proteina produkowana w wątrobie), która pełni rolę inhibitora wszystkich metaloproteinaz. Aktywność proteolityczna metaloproteinaz regulowana jest poprzez stosunek poziomu ich ekspresji do poziomu

czynników hamujących. Znane są cztery klasy inhibitorów metaloproteinaz, występujące w przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz płynach ustrojowych (TIMPs-1, 2, 3 i 4). W tkankach najczęściej występuje TIMP-1 i 2. Hamowanie proteolitycznej aktywności MMPs zachodzi poprzez tworzenie kompleksów między aktywnymi formami metaloproteinaz lub proenzymów a ich tkankowymi inhibitorami.

Na etapie aktywacji formy proenzymu wydzielanie metaloproteinaz jest pobudzane przez śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), czynnik martwicy nowotworów α (ang. *Tumor Necrosis Factor alpha*, TNF- α), interleukinę 1 (IL-1), prostanglandyny E2, D2, F2- α oraz procesy fagocytozy [37, 38].

Ponadto w badaniach oceniających udział MMPs w rozwoju chorób nowotworów odkryto jeszcze jedną formę regulacji działania metaloproteinaz macierzowych. Mowa tu o EMMPRIN (ang. *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*) - czynnika indukującym metaloproteinazy macierzowe, produkowanym między innymi przez komórki nowotworowe, który pobudza fibroblasty do produkcji do syntezy metaloproteinaz [131, 132].

Na pytanie czy analogicznie jak w procesach nowotworowych, embriogenezy, spermatogenezy [128-132], czynnik indukujący metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (EMMPRIN) odgrywa kluczową rolę lokalnego regulatora także w stymulowaniu produkcji MMP w ludzkim łożysku oraz błonach płodowych, próbowali w swoim badaniu w 2004 roku odpowiedzieć Li i współpracownicy. Podjęli się oni wysiłku oceny ekspresji EMMPRIN w łożysku w terminie porodu oraz w błonach płodowych w ciąży donoszonej przed wystąpieniem czynności skurczowej jak i w trakcie porodu. Wykazano, że zarówno w łożysku jak i w błonach płodowych dochodzi do ekspresji EMMPRIN. Jego potencjał do stymulacji produkcji MMPs ułatwia pęknięcie błon płodowych oraz oddzielenia się łożyska podczas porodu. Zmiany w ekspresji EMMPRIN mogą pośrednio wpływać na działanie MMPs w celu zwiększenia degradacji tkanek podczas procesów składających się na akt porodu [138].

1.8.3 Klasyfikacja MMPS

Białka MMP wykazują dużą zmienność na poziomie struktury czwartorzędowej. Zmienność ta wynika z różnic w budowie podjednostek, co wpływa na ich właściwości. Budowa strukturalna oraz swoistość substratowa matryksyn jest podstawą ich klasyfikacji. Biorąc pod uwagę wyżej wymienione czynniki metaloproteinazy zaszeregowano do czterech grup [17].

1. Archetypowe MMPs:

- Kolagenazy: **MMP-1 (Kolagenaza-1)**, **MMP-8 (Kolagenaza-2)**, MMP-13 (Kolagenaza-3)
- Stromielizyny: MMP-3 (Stromielizyna-1), MMP-10 (Stromielizyna-2), MMP-11 (Stromielizyna-3)
- Inne MMPs: MMP-12 (Metaloelastaza), MMP-19, MMP-20 (Enamelizyna), MMP-27

2. Żelatynazy: **MMP-2 (Żelatynaza A)**, **MMP-9 (Żelatynaza B)**,

3. Matrylizyny: MMP-7 (Matrylizyna), MMP-26 (Matrylizyna-2),

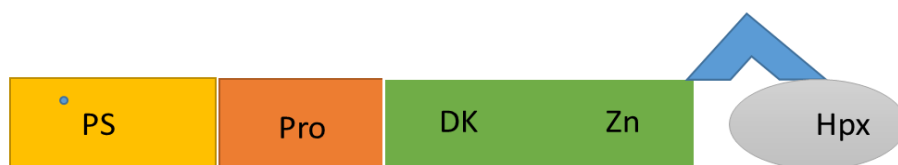
4. MMPs aktywowane przez furyny:

- MMP wydzielane jako formy aktywne: MMP-11 (Stromielizyna-3), MMP-28 (Epilizyna),
- Metaloproteinazy I typu błonowego (ang. Membrane-type MMP, MT-MMP): MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT5-MMP (MMP-24),
- MMP zakotwiczone przez glikozylofosfatydilinozyl: MT4-MMP (MMP-17), MT6-MMP (MMP-25),
- Metaloproteinazy II typu błonowego: MMP-23A, MMP-23B

Kolagenazy degradują kolagen włóknikowy (głównie kolagen I, II i III), **żelatynazy** mają za zadanie rozkład zdenaturowanego kolagenu i kolagenu typu IV. Natomiast **stromielizyny** odpowiedzialne są za degradację składników macierzy pozakomórkowej, takich jak laminina, fibronektyna, witronektyna, proteoglikany oraz niektóre typy kolagenu. Z kolei **matrylizyny** rozkładają fibronektynę, kolagen IV i fibrynogen. Funkcją **metaloproteinaz transbłonowych** jest aktywacja innych metaloproteinaz podczas transportu przez błonę komórkową do środowiska pozakomórkowego za sprawą domenyzakotwiczonej MT-MMP w błonie komórkowej [29].

1.8.4 Metaloproteinaza-1 (MMP-1)

Metaloproteinaza macierzowa 1 (MMP-1) nazwana jest również kolagenazą-1, kolagenazą śródmiąższową lub fibroblastową o numerze EC 3.4.24.7. Z uwagi na specyficzność substratową należy do podrodziny kolagenaz. Gen kodujący MMP-1 zawiera 10 egzonów i jest zlokalizowany na chromosomie 11q22.2-22.3. Częsteczka MMP-1, poza stałym układem domen występującym w tej grupie, posiada także domenę hemopeksynową (nazwa wynika z podobieństwa do hemopeksyny - białka odpowiedzialnego za wiązanie oraz transport hemu), która połączona jest z domeną katalityczną za pomocą łącznika tj. regionu zawiasowego [47].



Rycina 1. Schemat budowy strukturalnej MMP-1. Opracowanie własne.

PS – peptyd sygnałowy, PP – propeptyd, DK– domena katalityczna, Zn-jon cynku, Hpx – domena hemopeksynowa,

Udowodniono, że MMP-1 może być syntetyzowana przez różne rodzaje komórek między innymi fibroblasty, makrofagi, śródbłonek naczyniowy czy nabłonki [66, 68]. W tkankach w warunkach fizjologicznych MMP-1 jest niewykrywalna [70]. Wzrost stężenia białka odnotowuje się w sytuacji remodelingu tkankowego tj. w trakcie procesów związanych z embriogenezą, morfogenezą, angiogenezą czy regeneracją [67].

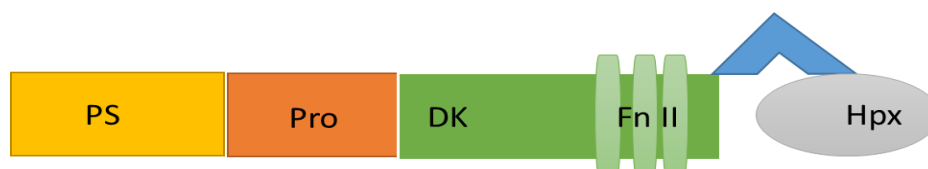
Grupa substratów kolagenazy fibroblastowej jest obszerna. Pozwala to traktować MMP-1 jako jedną z głównych proteaz odpowiedzialnych za wspomniany wyżej fizjologiczny remodeling ECM [66]. Badania wykazały, że do substratów kolagenazy-1 należy m.in. kolagen typu I, II, III, VII, VIII, X, XI. Rozkład helisy kolagenu przez MMP-1 powoduje utratę stabilności termicznej i formy włókienkowej, co umożliwia dalszy rozkład enzymatyczny [67, 68]. Ponadto MMP-1 ma zdolność rozkładu innych cząsteczek macierzy pozakomórkowej takich jak: żelatyna (zdenaturowany kolagen), wpływający na spoistość chrząstki stawowej agrekan, składnik błony podstawnej entaktyna, laminina, fibronektyna, fibrynogen, fibryna, perlekan, wersekan, kazeina, nidogen czy tenascyna-C. MMP-1 posiada możliwość bezpośredniej modyfikacji aktywności cytokin, chemokin, czynników wzrostu, antychymotrypsyny, antytrypsyny,

białek wiążących insulinopodobny czynnik wzrostu, interleukin, czynnika martwicy nowotworu TNF-alfa [48, 66, 69].

Z uwagi na udowodnioną rolę MMP-1 w procesie włóknienia [71, 72], migracji komórkowej [73, 74, 75], przewlekłym stanie zapalnym [76, 77, 78], regeneracji i wzroście włókien nerwowych [79] oraz powszechność występowania tych zjawisk w różnych patologiach podjęto wysiłek przeprowadzenia badań oceniających funkcje MMP-1 w poszczególnych jednostkach chorobowych. Uzyskane wyniki wykazały istotną rolę enzymu w przebiegu chorób nowotworowych takich jak raka jelita grubego, płuc, trzustki, raków płaskonabłonkowych oraz czerniak, chorób autoimmunologicznych, miażdżycy czy chorób związanych z nasilonym włóknieniem [80-85].

1.8.5 Metaloproteinaza-2 (MMP-2)

Metaloproteinaza macierzowa 2 (MMP-2) o zamiennej nazwie żelatynaza A jest białkiem o masie cząsteczkowej 72 kDa. Z uwagi na specyficzność substratową należy do podrodziny żelatynaz. Nazwa pochodzi od powinowactwa do zdenaturowanego kolagenu - żelatyny. Charakterystycznym elementem jej domeny katalitycznej są trzy fragmenty podobne do fibronektyny. Fragmenty te odpowiedzialne są za tworzenie połączenia z substratami MMP-2.



Rycina 2. Schemat budowy strukturalnej MMP 2. Opracowanie własne.

PS – peptyd sygnałowy, PP – propeptyd, DK– domena katalityczna, Hpx – domena hemopeksynowa, Fn II – domena zawierające powtórzenia podobne do fibronektyny

Podstawowym substratem dla MMP-2 jest kolagen typu IV będący składnikiem błony podstawnej. Uszkodzenia struktury błony podstawnej stanowią jeden z elementów warunkujących migrację komórek. Dlatego też żelatynaza A pełni istotną rolę w takich procesach jak procesy zapalne (migracja komórek odpornościowych) oraz nowotworowe (tworzenie przerzutów). Do pozostałych substratów MMP-2 zaliczamy kolagen typu I, II, III, IV, VII, IX, X, XI oraz żelatyna, agrekan, elastyna, entaktyna, fibronektyna,

laminina, tenascyna, witronektyna, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-9, pro-MMP-13, plazminogen, pro-TNF α .

MMP-2 ulega ekspresji zarówno w fibroblastach, makrofagach, komórkach śródbłónka jak i komórkach nowotworowych [87]. MMP-2 wydaje się być kluczowa do rozwoju naczyń nowotworu, a tym samym odgrywa rolę w procesie naciekania guza nowotworowego oraz tworzeniu przerzutów. Dowodem na zaangażowanie MMP-2 w proces angiogenezy jest fakt, że czynniki angiogenne takie jak VEGF powodują na wzrost wydzielania żelatynazy A z komórek śródbłónka [88].

1.8.6 Metaloproteinaza-8 (MMP-8)

Metaloproteinaza macierzowa 8 (MMP-8) opisywana jest zamiennie także jako kolagenaza neutrofilowa lub kolagenaza-2 o numerze EC 3.4.24.34. Przynależy do podrodziny kolagenaz [70]. Gen kodujący MMP-8 o locus 11q22 mieści się w zbiorze genów MMPs [153]. Początkowo badania wskazywały, że MMP-8 jest syntetyzowana przez neutrofile w trakcie ich dojrzewania i aktywacji. Dalsze prace ujawniły, że w przebiegu procesu zapalnego białko może być wydzielane przez szeroką gamę komórek układu odpornościowego między innymi makrofagi, mastocyty, limfocyty T, a także komórki epitalialne, endotelialne czy nawet mięśniowe [173-176]. MMP-8 występuje w kilku formach rozpuszczalnych glikozylowanych o masie 75 kDa oraz mniejszych nieglikozylowanych o masie wahającej się w zakresie 40-50 kDa [172, 177, 178]. Poza formami rozpuszczalnymi, zidentyfikowano postać połączoną z błoną komórkową obecną na aktywowanych neutrofilach. Wydaje się ona być główną postacią białka znajdowaną w stanie zapalnym [179]. Struktura chemiczna MMP-8 jest tożsama z innymi przedstawicielami rodziny [138, 180].

1.8.7 Metaloproteinaza-9 (MMP-9)

Metaloproteinaza macierzowa 9 nazywana jest również żelatynazą B lub kolagenazą 92kDa. Swoją budową przypomina MMP-2, gdyż także zawiera trzy fragmenty podobne do fibronektyny zlokalizowane w obrębie domeny katalitycznej. Jej cechą unikatową jest obecność domeny kolagenu typu V usytuowanej w rejonie regionu zawiasowego. Ponadto posiada w swojej budowie komponentę węglowodanową, dlatego kwalifikuje się ją także do rodziny glikoprotein [89, 90].

Dzięki podobieństwu budowy czwartorzędowej do MMP-2 aktywność proteolityczna żelatynazy B powoduje podobne skutki. Podstawowym substratem MMP-9 jest również kolagen typu IV. Ponadto żelatynaza B rozkłada m.in.: kolagen typu, V, XI, XIV, żelatynę, agrekan, dekorynę, elastynę, lamininę, vitronektynę, α 2-makroglobulinę, endotelinę, kazeinę, fibrynę, fibrynogen, IL1 β , plazminogen oraz pro-TNF α . MMP-9 wydzielają komórki śródbłonna, fibroblasty oraz makrofagi [89, 90].

1.8.8 Prolidaza

Prolidaza (peptydaza D, imidopeptydaza) jest cytozolową egzopeptydazą o numerze klasyfikacyjnym EC.3.4.13.9, która odpowiada za prawidłowy metabolizm kolagenu, równoważąc jego rozkład i syntezę. Jest metaloproteinazą, bowiem do pełnej aktywności enzymatycznej wymaga obecności jonów manganu. Opisywany enzym pełni ważną rolę w odzyskiwaniu proliny z imidodipeptydów (pochodzących głównie z wewnątrzkomórkowej degradacji białek endogennych, zwłaszcza kolagenu) do ponownej biosyntezy kolagenu i innych białek zawierających prolinę.

Gen prolidazy (PEPD) znajduje się na chromosomie 19 i koduje polipeptyd złożony z 493 aminokwasów o masie cząsteczkowej 54 kDa. Dojrzała postać enzymu jest dimerem złożonym z dwóch identycznych podjednostek. Gen zawiera polimorficzne allele bez wpływu na aktywność. Rzadkie mutacje występujące w eksonach 7, 8, 12 i 14 mogą być odpowiedzialne za niedobór prolidazy. Niedobór prolidazy charakteryzuje się masywną imidodipeptydurią, zmianami skórnymi, nawracającymi infekcjami, upośledzeniem umysłowym i podwyższonym stężeniem dipeptydów zawierających prolinę w osoczu.

Wszystkie badania sugerują, że wzrost aktywność prolidazy jest skorelowana ze zwiększonymi wskaźnikami obrotu kolagenu i rozregulowaniu jego metabolizmu.

Wzrost aktywności prolidazy zaobserwowano w chorobach związanych z destrukcją tkanek takich jak nowotwory, gruźlica, przewlekłą chorobę wątroby [197-199].

1.8.9 Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i prolidaza w medycynie perinatalnej

- **Rola MMPs w procesach związanych z porodem**

Poród jest wynikiem wieloetapowych procesów, które obejmują skurcz mięśnia macicy, dojrzewanie szyjki macicy, pęknięcie błon płodowych, wydalenie płodu oraz oddzielenie się łożyska w IV okresie porodu. Rozległa przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) ma kluczowe znaczenie w przebiegu tych etapów.

Metaloproteinazy macierzowe są głównym czynnikiem odpowiedzialnym za degradację macierzy pozakomórkowej (ECM) błon płodowych oraz łożyska podczas porodu. Wiele badań wykazało, że podwyższony poziom MMPs w ludzkim łożysku, błonach płodowych i płynie owodniowym jest obserwowany w porodzie terminowym lub przedwczesnym, wskazując tym samym na rolę MMPs podczas porodu [121-127].

Mechanizmy zaangażowane w regulację produkcji MMPs podczas porodu pozostają dotychczas słabo poznane. Wiadomym jest, że aktywność enzymatyczna MMP podlega wielokierunkowej regulacji, m.in. na etapie transkrypcji genów przy udziale różnych czynników biologicznych. Kontrola aktywności MMP zachodzi także na etapie aktywacji formy proenzymu. Wydzielanie metaloproteinaz jest pobudzane przez śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor-VEGF*), czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor alpha, TNF- α*), interleukinę 1 (IL-1), prostanglandyny E2, D2, F2- α oraz procesy fagocytozy. Ponadto aktywność proteolityczna metaloproteinaz regulowana jest poprzez stosunek poziomu ich ekspresji do poziomu czynników hamujących. Znane są cztery klasy inhibitorów metaloproteinaz, występujące w przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz płynach ustrojowych (TIMPs-1, 2, 3 i 4). W tkankach najczęściej występuje TIMP-1 oraz TIMP-2. Hamowanie proteolitycznej aktywności MMP zachodzi poprzez tworzenie kompleksów między aktywnymi formami metaloproteinaz lub proenzymów a ich tkankowymi inhibitorami [133-137].

W wielu dostępnych pracach udowodnione jest istnienie wzorca ekspresji MMPs sugerujący udział poszczególnych metaloproteinaz macierzowych w fizjologicznym i patologicznym pęknięciu błon płodowych [158-169]. W głównej mierze badacze skoncentrowali się na żelatynazach MMP-2 i MMP-9 czyli enzymach, które degradują kolagen typu V oraz kolageny błony podstawnej (typ IV). Wiele autorów stwierdziło, że zwiększona ekspresja tych enzymów, ale w głównej mierze MMP-9, jest związana

z pęknięciem błon płodowych w ciąży donoszonej jak i przed ukończonym 37. tygodniem ciąży. W pracy dwóch autorów Vadillo-Ortega z 1995 roku oraz McLaren'a z 2000 roku zostało dowiedzione, że poziom MMP-9 wzrasta w błonach płodowych w przypadku porodu o czasie. W kolejnych latach w pracy m.in. Xu i wsp. z 2002 roku wykazano, że poziom MMP-9 jest znacząco wyższy w błonach płodowych zarówno w trakcie porodów o czasie jak i tych przedwczesnych. To był ważny krok w wysunięciu przypuszczenia, że być może procesy doprowadzające do pęknięcia błon płodowych, zarówno w przypadku porodów o czasie jak i tych przedterminowych, są podobne. Yonemoto H. i wsp. w 2006 roku potwierdzili wzorec ekspresji MMP-9 w błonach płodowych w przypadku porodów o czasie jak i przedwczesnych, ale wyniki dotyczące MMP-2 nie były spójne w porównaniu do wyników prac innych autorów. Yonemoto i wsp. nie wykazali wzrostu poziomu MMP-2 w błonach płodowych w porodach o czasie i przedterminowych w porównaniu do poziomów obserwowanych w trakcie ciąży (porównanie do wyników m.in. pracy Xu i wsp. z 2002) [166], co więcej stwierdzili spadek poziomu MMP-2 w płynie owodniowym w porodach terminowych i przedwczesnych (niespójność m.in. z pracą Goldmana z 2003 roku) [170]. Być może różnice te wynikały z odmienności buforu ekstrakcyjnego użytego w projekcie lub nieuwzględnienia faktu, że owodnia i kosmówka mają inne wzorce uwalniania MMP (co wykazał Yonemoto), które nie zostały wzięte pod uwagę w metodologii innych badań w tym zakresie. Procesy zachodzące w doczesnej regulują mechanizmy doprowadzające do przerwania błon płodowych poprzez zwiększenie ekspresji i aktywacji MMP-9.

W wielu badaniach udowodniono, że enzymy zaangażowane w mechanizm pęknięcia błon obejmują także MMP-1, MMP-8. Metaloproteinazy macierzy (MMPs) rozkładają w macierzy zewnątrzkomórkowej określone typy kolagenu (preferencyjnie działają na kolagen typu I). Maymon i wsp. wykazali, że w przedwczesnym pęknięciu błon płodowych w ciąży niedonoszonej (zarówno w przypadkach obecności i braku infekcji) obserwuje się wzrost stężenia MMP-1 w płynie owodniowym [204], natomiast podwyższone stężenie MMP-8 w płynie owodniowym było obserwowane tylko w sytuacji kiedy błony płodowe pękały w ciąży niedonoszonej. W ciążach donoszonych tej zależności nie wykazano [205].

Procesy z kompartmentu macicznego jak i płodowego, zaangażowane w przebudowę ECM podczas porodu krzyżują się. Fakt istnienia hierarchii w modulacji aktywności MMPs podczas porodu, gwarantują bezpieczny przebieg tego procesu, umożliwiając tym

samym pęknięcie błon płodowych przy jednoczesnym uniknięciu przedwczesnego oddzielenia się łożyska.

- **Rola MMPs w prawidłowym rozwoju ciąży**

W ostatnich latach duże zainteresowanie w perinatologii zwraca uwagę udział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w kontekście prawidłowego rozwoju ciąży, który to uwarunkowany jest wieloma czynnikami. Jednym z nich jest prawidłowa implantacja oraz rozwój łożyska. Właściwa aktywność enzymów MMPs rozkładających elementy ECM i błony podstawnej jest gwarantem dla optymalnego przebiegu tego procesu. Warunkiem koniecznym do zapoczątkowania procesu przebudowy naczyń wysokooporowych w naczynia niskooporowe w obrębie łożyska jest degradacja składników błony podstawnej oraz macierzy zewnątrzkomórkowej, co umożliwi proliferację i migrację komórek śródbłonna naczyńniowego. Najważniejszą rolę odgrywają tutaj żelatynazy: MMP-2 i MMP-9, których substratem jest kolagen typu IV ECM (zasadniczy składnik błon podstawnych) [54-57].

Udowodniono, iż konsekwencją zaburzenia właściwych relacji pomiędzy składowymi układu proteolitycznego, utworzonego przez metaloproteinazy wraz z ich inhibitorami, jest rozwój nadciśnienia tętniczego indukowanego ciążą (PIH) czy wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu (IUGR) (często obie te patologie współwystępują ze sobą), gdzie niedostateczne nasilenie proteolizy prowadzi do zaburzenia implantacji trofoblastu oraz nieprawidłowej angiogenezy łożyskowej [51-53]. Dowiedziono, że to właśnie nieprawidłowy przepływ krwi w obrębie łożyska spowodowany zaburzeniem przebudowy naczyń krwionośnych leży u podstaw powstania wspomnianych patologii.

Jednym z elementów regulacji aktywności metaloproteinaz są swoiste tkankowe inhibitory metaloproteinaz macierzowych. Udowodniono, iż w zależności od stężenia TIMP-2 ekspresja MMP-2 może być wzmagana (przy niskich stężeniach TIMP-2) bądź blokowana (przy wysokich stężeniach TIMP-2) [141, 142]. Być może dlatego analizując dostępną literaturę należy zauważyć pewne rozbieżne informacje dotyczące różnic w łożyskowej ekspresji tkankowego inhibitora metaloproteinazy-2 (TIMP-2) u ciężarnych w przebiegu nadciśnienia tętniczego i wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostu. Część dostępnych prac wskazuje na słabszą aktywność TIMP-2 w kosmkach trofoblastu w ciążach przebiegających prawidłowo, a podwyższoną w przebiegu

nadciśnienia tętniczego i IUGR [144-147]. Inni badacze nie znaleźli różnic w łożyskowej ekspresji TIMP-2 w ciążach powikłanych PIH lub hipotrofią płodu w porównaniu do ciąż fizjologicznych [139-140]. Świerczewski A i wsp. badając ekspresję MMP-9 i tkankowego inhibitora TIMP-2 w łożyskach ciężarnych z IUGR wykazali, że wysoka aktywność metaloproteinazy 9 stwierdzona w kosmkach łożyskowych koreluje z prawidłową jego budową i funkcjonowaniem. W odniesieniu do terapii IUGR wysnuli konkluzję - zastosowane leczenie wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu zmniejsza łożyskową ekspresję TIMP-2 [143].

Vural i wsp. w swojej pracy z 2010 wykazali niski poziom prolidazy w surowicach ciężarnych z wczesną utratą ciąży z równoczesnym wzrostem aktywności tego enzymu w tkance łożyskowej (odwrotna zależność poziomów aktywności prolidazy w surowicy oraz łożysku). To odkrycie sugeruje, że wysokie zużycie tego enzymu przez tkankę łożyska (zwiększony obrót kolagenu w łożysku) ma przełożenie na konieczność odzyskiwania tego enzymu z surowicy matki. W konsekwencji obniżony poziom aktywności prolidazy we krwi matki może być przydatny do wykrywania patologii związanych z łożyskiem w sytuacjach wczesnej utraty ciąży. W zwiększonym wskaźniku obrotu kolagenu autorzy upatrują prawdopodobną etiopatogenezę tej patologii położniczej [200].

2. CEL PRACY

Cel ogólny:

Celem pracy było poznanie czynników degradujących macierz zewnątrzkomórkową błon płodowych odgrywających najistotniejszą rolę w patomechanizmie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych oraz sprawdzenie czy produkty wytypowanych genów mogą stanowić markery predykcyjne przedwczesnego pęknięcia błon płodowych .

Cele szczegółowe:

- a. ocena ekspresji metaloproteinaz (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9) w błonach płodowych pochodzących od ciężarnych kobiet z grupy badanej i grup kontrolnych
- b. ocena ekspresji genu kodującego prolidazę w błonach płodowych pochodzących od ciężarnych kobiet z grupy badanej i grup kontrolnych
- c. ocena stężenia wybranych MMPs w matczyńskich osoczach. Ocenie podlegały produkty dwóch genów: MMP-8 i prolidazy, które to zostały wytypowane w pierwszym etapie realizacji projektu.

3. MATERIAŁY I METODY

Na przeprowadzenie badania została udzielona zgoda Komisji Etyki Badań Naukowych działającej przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi nr 55/2014.

3.1 Charakterystyka pacjentek włączonych do badania oraz kryteria podziału badanych pacjentek z uzasadnieniem

Analizie poddano grupę 98 ciężarnych kobiet należących do rasy białej. Pacjentki do badań kwalifikowano w Klinice Położnictwa i Ginekologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi w okresie od lipca 2014 do grudnia 2015 roku. Wszystkie ciężarne zostały poinformowane o celu i zakresie przeprowadzanych badań oraz udzieliły świadomej, pisemnej zgody na udział w badaniu.

Stan ogólny zdrowia pacjentek zakwalifikowanych do projektu był dobry bez towarzyszących chorób przewlekłych. Wszystkie pacjentki negowały uzależnienie od papierosów, alkoholu czy narkotyków. U wszystkich ciężarnych zostały wykluczone aktualne choroby infekcyjne (na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego). Wyniki pomiaru ciśnienia tętniczego krwi u wszystkich ciężarnych były w normie. Częstość matczynej pracy serca u żadnej z pacjentek nie przekraczała 100 uderzeń/min. Wszystkie pacjentki z projektu badawczego prezentowały prawidłową temperaturę ciała. Ogólna charakterystyka wszystkich pacjentek włączonych do badania została przedstawiona w tabeli 3.

Średni wiek pacjentek w grupie badanej PROM/PPROM (Grupa 0) wynosił 31 lat ($\pm 5,2$), w grupie kontrolnej (Grupa 1, 2, 3) wynosił 29 lat ($\pm 5,03$).

Średni wiek ciążowy w momencie kwalifikacji do badania w grupie badanej PROM/PPROM (Grupa 0) wynosił 35,7 tygodni ($\pm 3,2$), w grupie kontrolnej (Grupa 1, 2, 3) wynosił 38,9 tygodni ($\pm 0,9$).

W grupie badanej PROM/PPROM (Grupa 0) spośród 56 pacjentek 29 (51,8%) było pierworódkami, a 27 (48,2%) wieloródkami. W grupie kontrolnej (Grupa 1, 2, 3) spośród 42 pacjentek 29 (45,2%) było pierworódkami 23 (54,8%) wieloródkami.

Z wywiadu położniczego zebrano dane mówiące o tym, że u dwóch spośród 27 wieloródek z grupy badanej w wywiadzie wystąpił PROM w poprzedniej ciąży. Jedna pacjentka spośród 23 wieloródek z grupy kontrolnej w wywiadzie podała wystąpienie PROM w poprzedniej ciąży.

Średnia wartość BMI [kg/m^2] w grupie badanej PROM/PPROM (Grupa 0) wynosił ($27,4 \pm 3,0$) w grupie kontrolnej (Grupa 1, 2, 3) wynosił $28,5 (\pm 3,7)$.

Maksymalne stężenie leukocytów w surowicy krwi było równe lub mniejsze niż 14,2 G/l.

Wartość czynności serca płodu była w zakresie dla normokardii, zapis KTG oceniono jako reaktywny, bez cech patologii.

Ogólna charakterystyka badanych pacjentek z podziałem na grupy została przedstawiona w tabeli 4.

Tabela 3

Ogólna charakterystyka pacjentek włączonych do badania, N=98

Analizowane zmienne	Pacjentki włączone do badania, ogółem N=98
➤ Rasa	biała
➤ Stan zdrowia ogólny	dobry
➤ Choroby przewlekłe	nieobecne
➤ Choroby infekcyjne (aktualne)	nieobecne
➤ Uzależnienia (papierosy, narkotyki, alkohol)	nieobecne
➤ Temperatura ciała przy kwalifikacji do badania (°C) <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>średnia (\pm SD)</i> ○ <i>mediana</i> ○ <i>minimum/maksimum</i> 	<p>36,7 \pm 0,3</p> <p>36,7</p> <p>36,2/36,9</p>
➤ Częstość pracy serca ciężarnej < 100 (ud/min.)	u wszystkich
➤ Stężenie leukocytów w surowicy krwi przy przyjęciu (G/l) <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>średnia (\pm SD)</i> ○ <i>mediana</i> ○ <i>minimum/maksimum</i> 	<p>10,84 \pm 2,23</p> <p>10,72</p> <p>4,0/14,20</p>
➤ FHR płodu podczas kwalifikacji (uderzeń/min.) <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>średnia (\pm SD)</i> ○ <i>mediana</i> ○ <i>minimum/maksimum</i> 	<p>140 \pm 10</p> <p>140</p> <p>125/155</p>

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 4

Charakterystyka badanych pacjentek z podziałem na grupy

Analizowane zmienne	Grupa badana PROM/PPROM Grupa 0 (n=56)	Grupa kontrolna zdrowe ciężarne Grupa 1, 2, 3 (n=42)
Wiek (lata) <i>średnia (\pm SD)</i> <i>mediana (IQR)</i> <i>minimum/maksimum</i>	31,02 \pm 5,2 31(8) 21/43	29 \pm 5,03 29 (7) 20/40
Wiek ciążowy w tyg. w czasie kwalifikacji do badania <i>średnia (\pm SD)</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	35,71 \pm 3,27 36 27,2/39	38,93 \pm 0,92 39 37/40
Rodność Pierworódki Wieloródki	29 (51,8%) 27 (48,2%)	29 (45,2%) 23 (54,8%)
BMI (kg/m²) <i>średnia (\pm SD)</i>	27,4 \pm 3,0	28,5 \pm 3,7
PROM/PPROM w wywiadzie	2 (3,57%)	1 (2,38%)

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Kryteria podziału badanych pacjentek

Pacjentki włączone do badania podzielono na cztery grupy. **Grupe badana (Grupa 0, n=56)** stanowiły pacjentki, których ciąża przebiegała bez patologii z wyjątkiem rozpoznania PROM lub PPRM, **grupe kontrolną pierwszą (Grupa 1, n=8)** stanowiły

zdrowe ciężarne z terminowym porodem naturalnym, do **grupy kontrolnej drugiej (Grupa 2, n=16)** zakwalifikowano zdrowe ciężarne w ciąży donoszonej z wykonanym elektywnym cięciem cesarskim przed rozpoczęciem czynności skurczowej, do **grupy kontrolnej trzeciej (Grupa 3, n=18)** zakwalifikowano ciężarne zdrowe z terminowym porodem drogami i siłami natury, u których nie nastąpiło samoistne przerwanie ciągłości błon płodowych (istniała konieczność przebicia pęcherza płodowego ze wskazań położniczych).

Uzasadnienie utworzenia grup pacjentek według opisanych wyżej kryteriów

Projekt pracy badawczej zakładał, że układ porównujący uzyskane wyniki w grupie badanej (Grupa 0) do wyników pacjentek w grupie kontrolnej 1 (Grupa 1) pozwoli ocenić czy istnieje różnica w wydzielaniu poszczególnych typów MMPs pomiędzy w/w grupami oraz ustalić które typy MMPs są zaangażowane w patomechanizm PROM/PPROM, a które w mechanizm porodu fizjologicznego.

Analiza wyników uzyskanych w grupie badanej (Grupa 0) w odniesieniu do grupy kontrolnej 2 (Grupa 2) pozwoli na ocenę wydzielania określonych typów MMPs w błonach płodowych w trakcie trwania ciąży.

Wnioski dotyczące zagadnienia, które MMPs są najistotniejsze w patologii przedwczesnego pęknięcia błon płodowych, będą oparte na analizie porównującej wyniki z grupy badanej (Grupa 0) do grupy kontrolnej 3 (Grupa 3).

3.2 Kryteria włączenia do grupy badanej

Pacjentki w ciąży pojedynczej, po wykluczeniu ogólnoustrojowych chorób przewlekłych, aktualnie trwających chorób infekcyjnych¹ oraz infekcji wewnątrzowodniowej², kwalifikowano do grupy badanej z rozpoznaniem przedwczesnego pęknięcia błon płodowych po spełnieniu wszystkich z poniższych kryteriów:

- udowodniona we wcześniejszych badaniach ultrasonograficznych prawidłowa ilość płynu owodniowego do momentu wystąpienia PROM/PPROM
- okres latencji odpływania płynu owodniowego do chwili wystąpienia skurczowej czynności porodowej co najmniej 2 godziny
- okres trwania PROM/PPROM do chwili kwalifikacji < 4 godzin

- uwidocznienie przy użyciu sterylnego wziernika podczas badania ginekologicznego obecności płynu owodniowego wypływającego z ujścia zewnętrznego szyjki macicy
- dodatni wynik testu nitrazynowego tj. zaobserwowana zmiany zabarwienia papierka nasączonego nitrazyną z żółtego na niebieski i/lub dodatni wynik testu immunochromatycznego AmniSure

¹ *Warunki wykluczenia aktualnie toczących się chorób infekcyjnych u ciężarnych:*

- prawidłowy wynik badania podmiotowego
- prawidłowy wynik podstawowego badania internistycznego

² *Warunki wykluczenia obecności klinicznych oraz laboratoryjnych wykładników infekcji wewnątrzowodniowej w chwili kwalifikacji do badania:*

- temperatura ogólna ciała $\leq 37,0^{\circ}\text{C}$
- leukocytoza $\leq 15 \text{ G/l}$, CRP $\leq 10 \text{ mg/L}$
- częstość matczynej pracy serca < 100 uderzeń serca/min.
- częstość płodowej pracy serca – FHR ≤ 160 uderzeń serca/min.
- prawidłowy zapach płynu owodniowego

3.3 Kryteria wyłączenia z badania

Pacjentki, które spełniły którykolwiek z poniższych kryteriów, zostały zdyskwalifikowane z udziału w projekcie badawczym.

Kryteria wykluczenia z badania:

- ciąża wielopłodowa
- stwierdzanie w badaniu ultrasonograficznym w chwili kwalifikacji do badania lub podczas wcześniejszych badań ultrasonograficznych wielowodzia
- stwierdzanie w badaniu ultrasonograficznym w chwili kwalifikacji do badania lub podczas wcześniejszych badań ultrasonograficznych wad wrodzonych płodu
- okres latencji odpływania płynu owodniowego do chwili wystąpienia skurczowej czynności porodowej poniżej 2 godziny (w kontekście grupy badanej)
- okres trwania PROM do chwili kwalifikacji > 4 godzin (w kontekście grupy badanej)

- stwierdzenie podwyższenia wykładników stanu zapalnego sugerujących toczące się zakażenie wewnątrzowodniowe (temperatura ogólna ciała $>37,0^{\circ}\text{C}$, leukocytoza $\geq 15\text{G/l}$, częstość matczynej pracy serca ≥ 100 uderzeń serca/min., FHR >160 uderzeń serca/min, nieprawidłowy zapach płynu owodniowego (w kontekście grupy badanej)
- stwierdzenie aktualnie toczących się innych chorób infekcyjnych u ciężarnej
- stwierdzenie współistniejących przewlekłych chorób ogólnoustrojowych

Wiek ciążowy ciężarnych ustalano na podstawie daty ostatniej miesiączki oraz na podstawie badania ultrasonograficznego pierwszego trymestru. Temperaturę ogólną ciała pacjentek zmierzono przy użyciu bezdotykowego termometru elektronicznego.

U wszystkich pacjentek, które zostały włączone do badania przeprowadzono badanie podmiotowe oraz wstępne badanie ginekologiczne. Ponadto każda pacjentka miała wykonane KTG oraz położnicze badanie ultrasonograficzne.

Następnie przeprowadzono podstawowe badanie internistyczne wykluczając aktualnie toczące się choroby infekcyjne.

Po spełnieniu wszystkich opisanych powyżej kryteriów włączenia do projektu badawczego, pacjentkom z potwierdzonym PROM/PPROM pobrano w przeciągu 4 godzin od pęknięcia błon płodowych krew z żyły odłokciowej celem późniejszego oznaczenia stężenia w osoczu wybranych metaloproteinaz i prolidazy (dla pacjentek z grup kontrolnych przedział czasowy nie miał żadnego znaczenia).

Każdej ciężarnej wykonano ponadto podstawowe badania laboratoryjne (morfologia).

Wszystkim pacjentkom udzielono informacji, że do projektu potrzebne będzie jeszcze nieinwazyjne pozyskanie po porodzie błon płodowych. Na wszystkie procedury pacjentki wyraziły pisemną zgodę.

Następnie ciężarne z PROM/PPROM obserwowano w Klinice Położnictwa i Ginekologii lub Bloku Porodowym ICZMP w Łodzi.

W sytuacji PROM/PPROM trwającego dłużej niż 6 godzin wdrożono profilaktyczną antybiotykoterapię (Ampicylina $2 \times 1,0$ g i.v. lub Biofuroksym $3 \times 1,5$ g i.v.), którą kontynuowano do momentu porodu lub przez co najmniej 7 dni.

W przypadku 10 pacjentek, u których doszło do przedwczesnego pęknięcia błon płodowych przed ukończonym 34. tygodniem ciąży podano kurs steroidoterapii celem

stymulacji dojrzałości płuc płodu oraz profilaktyki krwawień dokomorowych (Betametazon 2 x 12 mg i.m.). Przedwczesna czynność skurczowa macicy stwierdzana przed 34. tygodniem ciąży była wskazaniem do leczenia tokolitycznego.

3.4 Metodyka

Przeprowadzone w pracy analizy wykonano w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Na potrzeby projektu badawczego od wszystkich zakwalifikowanych ciężarnych kobiet pobrano:

- krew pełną na EDTAK3 celem uzyskania osocza – próbkę wirowano z ustawieniem 3 000 obrotów na minutę przez 5 minut. Uzyskane osocze rozdzielano po 100-200 μ l do probówek typu Eppendorf, a następnie mrożono w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz
- błony płodowe – pobrane bezpośrednio po porodzie. Po odpłukaniu błon w roztworze PBS pH 7.2-7.4 umieszczano je w roztworze RNA later (Ambion, Stany Zjednoczone) celem zabezpieczenia RNA przed degradacją. Eliminowało to potrzebę natychmiastowego przetwarzania próbek z tkankami lub zamrażania ich w ciekłym azocie do późniejszego przetwarzania.

3.4.1 Izolacja RNA z błon płodowych

Pozyskane wcześniej błony płodowe (20-50 mg) zostały roztarte w moździerzu z ciekłym azotem. Następnie sproszkowane tkanki zostały przeniesione do probówki 1,5 ml typu Eppendorf. Wyizolowano RNA całkowite z błon płodowych z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do izolacji RNA Mini o numerze katalogowym 031-100 (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z przedstawionym poniżej protokołem. Stężenie i czystość wyizolowanego RNA była oceniana metodą spektrofotometryczną (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Polska). Czystość RNA została oceniona na podstawie stosunków 280nm/260nm i 260nm/230nm. Uzyskane wyniki w zakresie 1.8-2.0 pozwoliły na zakwalifikowanie RNA do dalszych analiz. Odwrotną transkrypcję 2000 ng czystego RNA do cDNA przeprowadzono za pomocą zestawu Maxima First Strand cDNA (Thermo Fisher Scientific, Polska) według instrukcji producenta. Otrzymany cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do dalszej analizy

Protokół izolacji RNA

1. Do przygotowanej próbki dodano po 800 µl fenozolu (inaktywuje endogenne RNAzy) i mieszano przez pipetowanie, aż do całkowitej lizy komórek.
2. Próbkę inkubowano przez 5 min w temp. 50 °C.
3. Do lizatu dodano 200 µl chloroformu i delikatnie mieszano próbkę przez kilkakrotne odwracanie probówki.
4. Próbkę pozostawiono na 3 min w temp. pokojowej, a następnie wirowano przez 10 min przy 10 000-12 000 obrotach na minutę.
5. Pobrano górne frakcje (ok. 450 µl supernatantu) do nowej probówki 1,5 ml i dodano po 250 µl izopropanolu.
6. Dokładnie wymieszano i naniesiono na minikolumnę.
7. Wirowano przez 1 min przy 10 000-12 000 RPM.
8. Przeniesiono minikolumnę do nowej probówki 2 ml i dodano po 700 µl roztworu płuczącego A1.
9. Ponownie wirowano przez 1 min przy 10 000-12 000 obrotach na minutę.
10. Wyjęto minikolumnę z probówki, wylano przesącz i ponownie umieszczono w niej minikolumnę. Dodano ponownie 700 µl roztworu płuczącego A1.
11. Wirowano przez 1 min przy 10 000-12 000 obrotach na minutę.
12. Wyjęto minikolumnę z probówki, wylano przesącz i ponownie umieszczono w niej minikolumnę. Dodano po 200 µl roztworu płuczącego A1.
13. Wirowano przez 2 min przy 10 000-12 000 obrotach na minutę.
14. Przeniesiono minikolumnę do nowej probówki 1,5 ml. Do złoza, znajdującego się na dnie minikolumny, dodano po 100 µl wody ultraczystej.
15. Próbkę pozostawiono na 3 min w temp. pokojowej i następnie wirowano przez 1 min przy 10 000-12 000 obrotach na minutę.
16. Minikolumnę usunięto, a oczyszczone RNA znajdujące się w próbówce przechowywano w temp. -20 °C, -80 °C do czasu dalszych analiz.

3.4.2 Ocena ekspresji genów metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym

W celu określenia zmian w poziomie ekspresji genów dla metaloproteinazy 1, 2, 8 i 9 (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9) oraz genu prolidazy przeprowadzono reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (metoda RT-PCR, ang. *Real Time PCR*).

Reakcje RT-PCR prowadzono w 20 μ l mieszaniny reakcyjnej przez 40 cykli: 95°C /15sek; 58°C /15sek; 72°C/15sek.

Poprawności doboru starterów do badanego genu przewidywano z wykorzystaniem programu Primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Sekwencje starterów użytych w analizie RT-PCR przedstawiono w tabeli 5. Zaprojektowane primery obejmowały fragmenty dwóch niezależnych od siebie eksonów w obrębie badanego transkryptu.

Tabela 5

Sekwencje starterów wykorzystanych w analizie Real-time PCR

Gen	Sekwencje starterów Forward (F)	Sekwencje starterów Reverse (R)	Długość produktu PCR
MMP-1	CCACAAAGTTGATGCAGTTT	GCAGTTGAACCAGCTATTAG	130bp
MMP-2	GGTTCATTTGGCGGACTG	ACACAGCCTTCTCCTCCT	129bp
MMP-8	TTCATGGAGCCAGGTTATC	CCACTGAAGACATGGAAGA	107bp
MMP-9	GCAGACATCGTCATCCAGTT	ATGGGCGTCTCCCTGAATG	120bp
Prolidaza	CTTCATCGACCACCTCCT	CTCTATGCCGCTGTCAGT	142bp

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Wyniki poziomu ekspresji badanych genów były analizowane metodą Pfaffla, z uwzględnieniem genu referencyjnego RFLPO (housekeeping gene) oraz z wykorzystaniem próby referencyjnej uzyskanej na drodze zmieszania ze sobą cDNA pochodzących z 8 próbek należących do każdej z badanych grup (8 próbek z grupy badanej, 8 z grupy kontrolnej 1, 8 z grupy kontrolnej 2 i 8 z grupy kontrolnej 3).

3.4.3 Ocena stężenia MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu

Ocena stężenia oparte było o metodę ELISA z wykorzystaniem komercyjnych kitów (ABCAM, Wielka Brytania). Test służący do oznaczenia stężenia MMP-8 i prolidazy w osoczu krwi opierał się na ilościowej metodzie kanapkowej. W pierwszej kolejności przygotowano, zgodnie z instrukcją producenta, wszystkie niezbędne odczynniki oraz badane próbki. Następnie do wszystkich dołków na mikropłytkę zawierającej przeciwciała monoklonalne wiążące się z MMP-8 bądź prolidazą, umieszczano za pomocą pipety zarówno próbki kontrolne oraz próbki badane. W dalszej kolejności do studzienek na mikropłytkę dodawano 50 μ L koktajlu przeciwciał (Antibody Coctail) specyficznych dla MMP-8 bądź prolidazy, a następnie pozostawiano płytkę w temperaturze pokojowej na 1 godzinę. Po tym czasie przepłukiwano trzykrotnie mikropłytkę buforem (Wash Buffer PT) w celu usunięcia wszystkich umieszczonych na niej substancji niezwiązanych z przeciwciałami. Po każdym przepłukaniu płytki usuwano z niej płynną zawartość studzienek. Po ostatnim płukaniu dokładnie usuwano pozostałość bufora. W następnym kroku w każdej ze studzienek umieszczano 100 μ L roztworu barwnika (Substrate Solution) na 30 minut, a następnie dodawano 100 μ L roztworu hamującego (Stop Solution). W zależności od ilości MMP-8 bądź prolidazy w poszczególniej studziencie uzyskiwano różne natężenie koloru, które mierzono metodą spektrofotometryczną przy długości fali 620 nm.

3.5 Analiza statystyczna

Baza danych ciężarnych pacjentek, które wzięły udział w badaniu, została utworzona w arkuszu kalkulacyjnym Microsoft Excel 2016. Statystyczna analiza wyników otrzymanych w prezentowanej pracy została przeprowadzona przy użyciu pakietu IBM SPSS Statistics w wersji 26.

Do zbadania podobieństwa rozkładu zmiennych do rozkładu normalnego posłużył test Shapiro-Wilka. W zależności od normalności rozkładu stosowano: parametryczny test t-Studenta, kiedy rozkład wyników był normalny oraz nieparametryczny test U-Manna-Whitney'a w przypadku, kiedy rozkład wyników odbiegał od normalnego. Dla rozkładu normalnego dane w badaniu zostały wyrażone za pomocą średnich i odchylenia

standardowego. W przeciwnym wypadku zmienne opisywano za pomocą mediany i rozkładu kwartylowego.

Analizę krzywych ROC przedstawiono jako ocenę wielkości pola pod krzywą (AUC; 95% CI) oraz czułość i specyficzność testu dla wyznaczonego punktu odcięcia. Wielkość parametru AUC, zawierająca się w przedziale 1,0–0,5, gdzie 0,5 oznacza rozkład losowy została naniesiona na skalę, Poszczególnym zakresom wartości AUC przydzielono następującą klasyfikację: 0.9-1.0 = bardzo dobry, 0.8-0.9 = dobry, 0.7-0.8 = satysfakcjonujący, 0.6-0.7 = średni, 0.5-0.6 = niedostateczny.

Poziomy korelacji badanych zmiennych oceniono na podstawie testu korelacji Spearmana. Dla zastosowanych metod oceny statystycznej przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1 Charakterystyka grup

Do badania włączono 98 pacjentek. Zebrane dane analizowano w oparciu o podział ciężarnych na grupę badaną z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) oraz grupę kontrolną (Grupa 1, 2, 3). Ogólną charakterystykę grup przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6

Charakterystyka grupy badanej (Grupa 0), n=56 i grup kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42

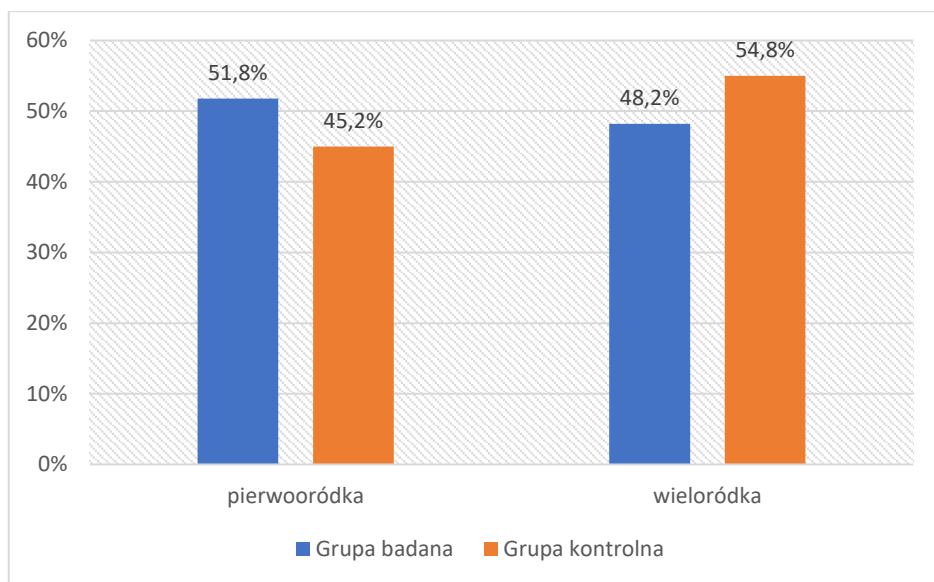
	Grupa badana (Grupa 0) <i>n</i> = 56	Grupy kontrolne (Grupa 1, 2, 3) <i>n</i> = 42	<i>p</i>
Wiek			
<i>M (SD)</i>	31,02 (5,20)	29,00 (5,03)	0,059
<i>Mdn (IQR)</i>	31,00 (8)	29,00 (7)	
Wiek ciążowy			
<i>M (SD)</i>	35,71 (3,27)	38,93 (0,92)	<0,001
<i>Mdn (IQR)</i>	36 (4,2)	39 (2)	
Rodność			
pierwiastka	29 (51,8%)	19 (45,2%)	0,512
wieloródka	27 (48,2%)	23 (54,8%)	
Masa ciała noworodków			
<i>M (SD)</i>	2695,27 (725,72)	3434,27 (474,16)	<0,001
<i>Mdn (IQR)</i>	2785,00 (1078)	3450,00 (670)	
Płeć dziecka			
syn	37 (66,1%)	25 (59,5%)	0,606
córka	19 (33,9%)	17 (40,5%)	
Apgar w 1 minucie			
<i>M (SD)</i>	8,63 (1,72)	9,85 (0,42)	<0,001
<i>Mdn (IQR)</i>	9,00 (2)	10,00 (2)	

Kolor czerwony-wynik istotny statystycznie

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Grupę badaną (Grupa 0) stanowiło 56 pacjentek u których rozpoznano przedwczesne pęknięcie błon płodowych, w tym 29 (51,8%) pierworódek oraz 27 (48,2%) wieloródek. Do grup kontrolnych (Grupa 1, 2, 3) włączono sumarycznie 42 pacjentek, w tym 19 (45,2%) pierworódek i 23 (54,8%) wieloródek. Nie wykazano istotnej statystycznie

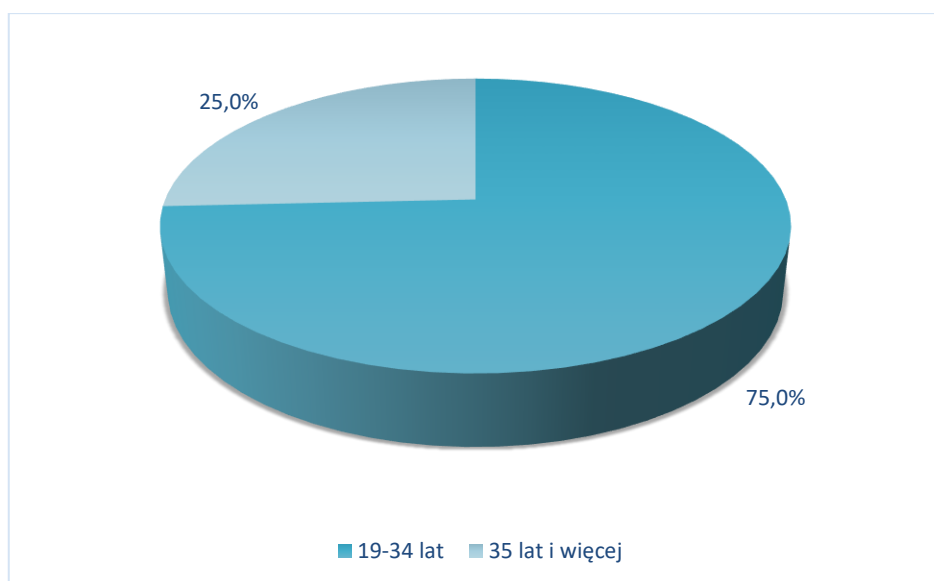
różnicy dla rodności pomiędzy grupą badaną a grupami kontrolnymi ($p=0,512$). Strukturę rodności w obu grupach pacjentek badanej i kontrolnych ilustruje rycina 5.



Rycina 5. Rodność w grupie badanej (Grupa 0), $n=56$ i grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), $n=42$

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Mediana wieku ciężarnych grupy badanej (Grupa 0) wynosiła 31 lat (IQR 8). Najwięcej pacjentek (75%) było w wieku między 19 a 34 lata (rycina 6). Najmłodsza pacjentka miała 21 lat, najstarsza 43 lata. Analiza nie wykazała istotnej statystycznie różnicy dla wieku pomiędzy grupą badaną a grupami kontrolnymi ($p=0,059$). Strukturę wieku pacjentek z grupy badanej przedstawiono na rycinie 6. Średnia wieku pacjentek i jego zróżnicowanie w grupie badanej przedstawiono w tabeli 7.



Rycina 6. Struktura wieku pacjentek w grupie badanej (Grupa 0), n=56

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

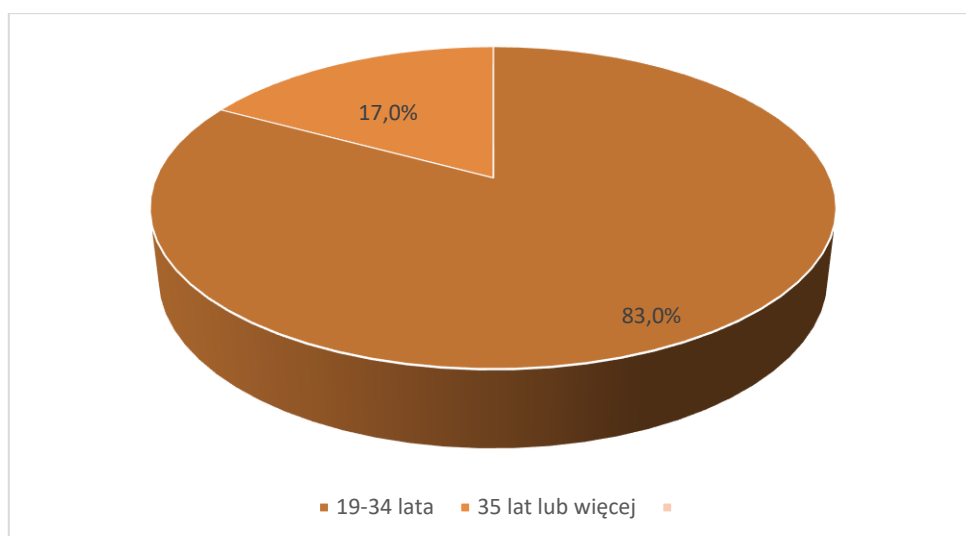
Tabela 7

Wiek pacjentek z grupy badanej (Grupa 0), n=56

Wyszczególnienie	Wartość (lata)
Średnia	31,02
Mediana	31
IQR	8
Minimum	21
Maksimum	43

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Mediana wieku ciężarnych w grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3) wynosiła 29 lat. Najwięcej pacjentek (83%) było w wieku między 19 a 34 lata (rycina 7). Strukturę wieku pacjentek z grupy badanej przedstawiono na rycinie 7. Średnia wieku pacjentek i jego różnicowanie w grupie kontrolnej przedstawiono w tabeli 8.



Rycina 7. Struktura wieku pacjentek w grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

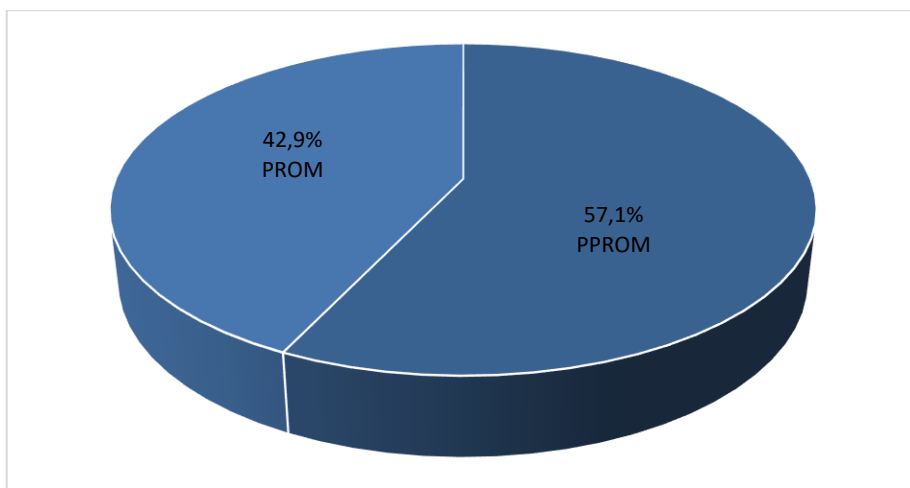
Tabela 8

Wiek pacjentek w grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42

Wyszczególnienie	Wartość (lata)
Średnia	29
Mediana	29
IQR	7
Minimum	20
Maksimum	40

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Mediana wieku ciążowego w czasie kwalifikacji do badania w grupie badanej (Grupa 0) wynosiła 36 tygodni. Najwięcej pacjentek tj. 32 (57,1%) było w wieku ciążowym poniżej 37 tygodnia (rycina 8). Spośród 56 pacjentek 24 pacjentki (42,9%) były w wieku ciążowym powyżej 37 tygodnia (rycina 8). Strukturę wieku ciążowego pacjentek z grupy badanej przedstawiono na rycinie 8. Średnia wieku ciążowego i jego zróżnicowanie w grupie badanej przedstawiono w tabeli 9.



Rycina 8. Struktura wieku ciążowego pacjentek z grupy badanej (Grupa 0). Punkt odcięcia – 37. tydzień ciąży. PROM (>37.tygodnia ciąży), n=24 vs PPRM (<37.tygodnia ciąży), n=32

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 9

Wiek ciążowy pacjentek z grupy badanej (Grupa 0), n=56

Wyszczególnienie	Wartość (tygodnie)
Średnia	35,71
Mediana	36
IQR	4,2
Minimum	27,2
Maksimum	39

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Mediana wieku ciążowego w czasie kwalifikacji do badania w grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3) wynosiła 39 tygodni. Analiza wykazała istotną statystycznie różnicę dla wieku ciążowego pomiędzy grupą badaną a grupami kontrolnymi ($p < 0,001$). Średnia

wieku ciążowego i jego zróżnicowanie w grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3) przedstawiono w tabeli 10.

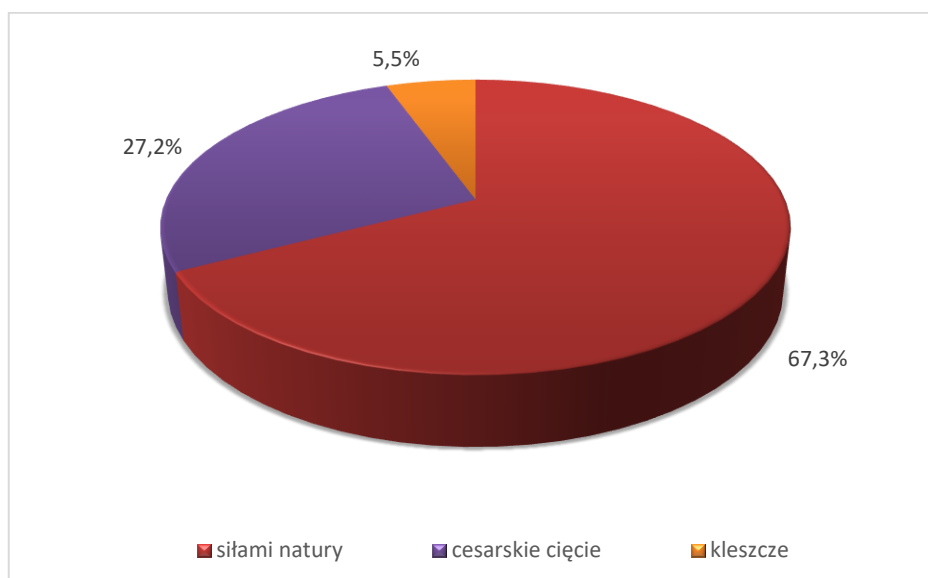
Tabela 10

Wiek ciążowy pacjentek z grup kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42

Wyszczególnienie	Wartość (tygodnie)
Średnia	38,93
Mediana	39
IQR	2
Minimum	37
Maksimum	40

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Najczęściej pacjentki w grupie badanej (Grupa 0) rodziły drogami i siłami natury (67,3%), cięcie cesarskie wykonano u 27,2 % pacjentek, natomiast poród kleszczowy odbył się u 5,5 % ciężarnych kobiet. Dane dotyczące sposobu porodu w grupie badanej (Grupa 0) przedstawiono na rycinie 9.

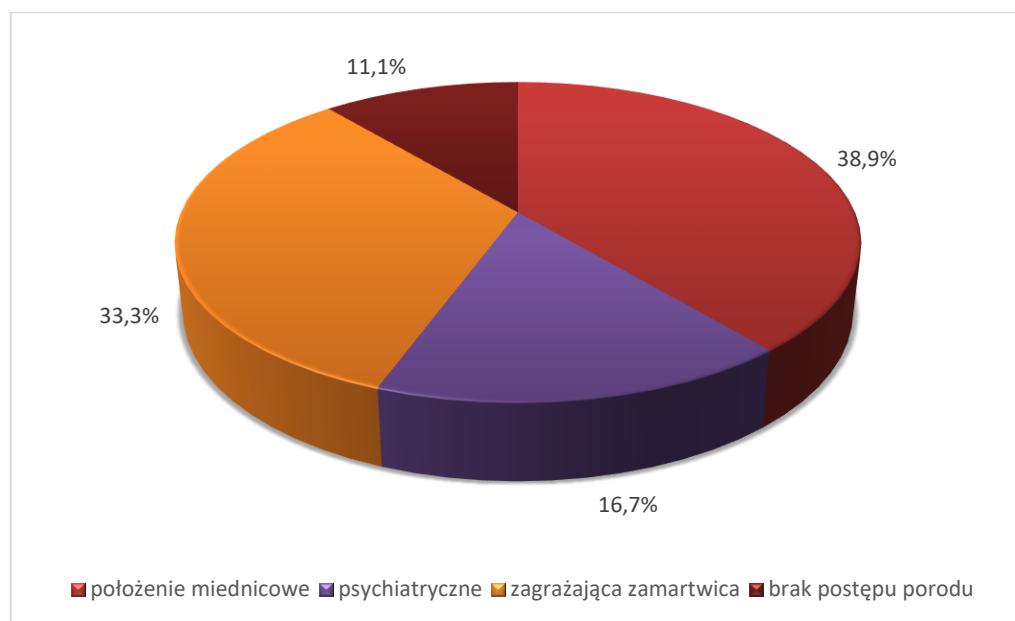


Rycina 9. Struktura sposobu porodu w grupie badanej (Grupa 0), n=56

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

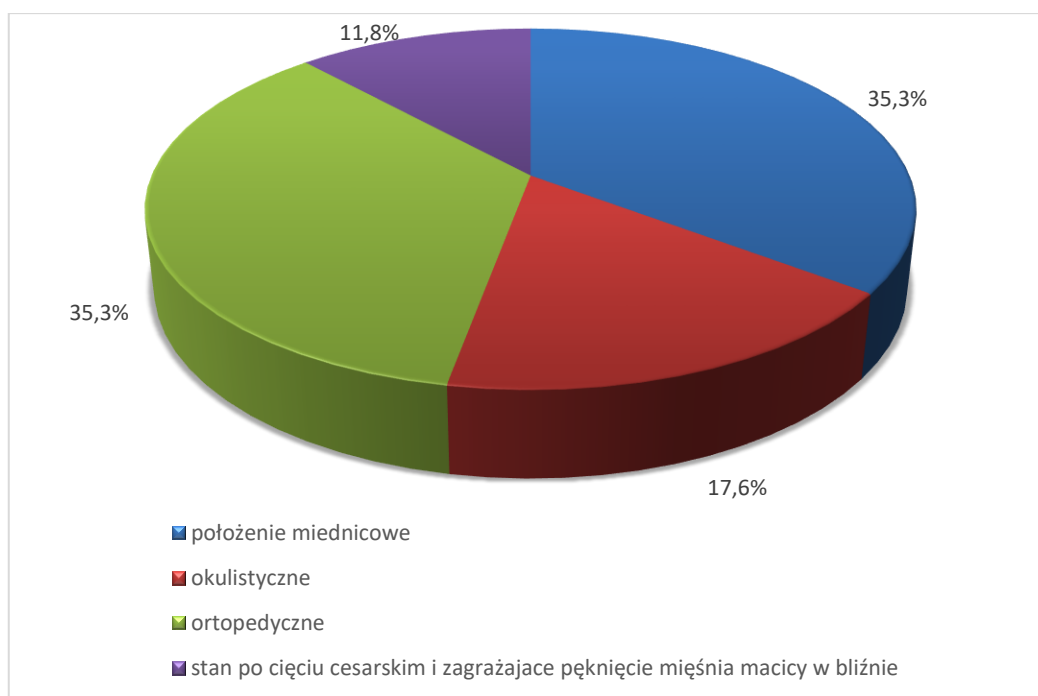
Najczęstszym wskazaniem do wykonania cięcia cesarskiego w grupie badanej (Grupa 0) po wystąpieniu PROM/PPROM było położenie miednicowe płodu (38,9%). Odsetek cięć cesarskich wykonanych z powodu objawów zagrażającej zmartwicy wewnątrzmacicznej płodu wyniósł 33,3%, wskazania psychiatryczne i brak postępu porodu stanowiły kolejno 16,7% oraz 11,1%. W przypadku porodów kleszczowych wskazaniem do założenia kleszczy były objawy zagrażającej zmartwicy wewnątrzmacicznej płodu. Dane dotyczące wskazań do wykonania cięcia cesarskiego w grupie badanej (Grupa 0) przedstawiono na rycinie 10.

U wszystkich pacjentek w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2) wykonano elektywne cięcie cesarskie przed wystąpieniem regularnej czynności skurczowej macicy. Pacjentki z grupy kontrolnej 1 (Grupa 1) oraz z grupy kontrolnej 3 (Grupa 3) odbyły poród drogami i siłami natury. Dane dotyczące wskazań do wykonania cięcia cesarskiego w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2) przedstawiono na rycinie 11.



Rycina 10. Struktura wskazań do cięcia cesarskiego w grupie badanej (Grupa 0), n=56

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

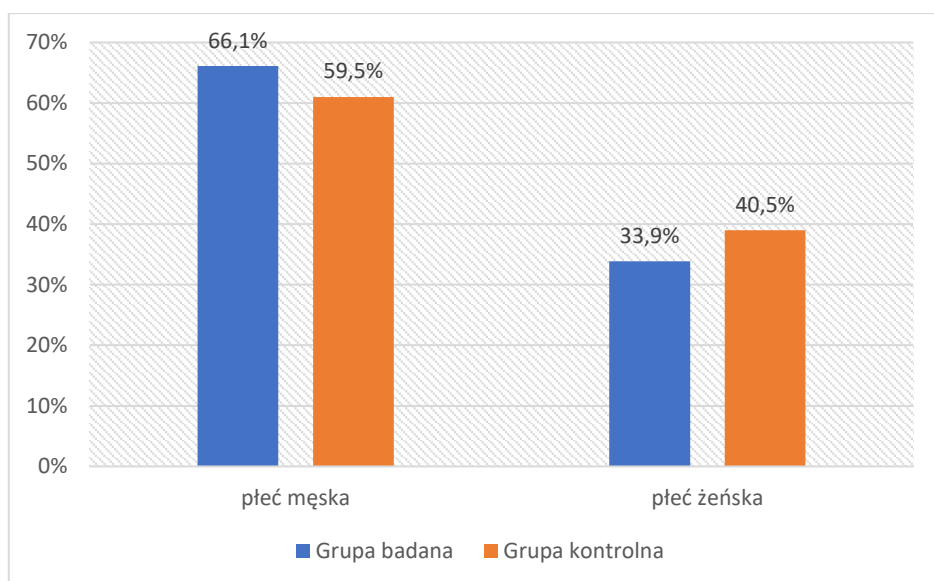


Rycina 11. Struktura wskazań do cięcia cesarskiego w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2), n=16

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Masy urodzeniowe noworodków matek z grupy badanej (Grupa 0) były istotnie mniejsze w porównaniu do noworodków matek z grup kontrolnych *Mdn*: 2785,00g (*IQR* 1078 g) vs *Mdn*: 3450,00 g (*IQR* 670 g). Siła odnotowanego efektu była duża.

W grupie badanej (Grupa 0) 37 (66,1%) noworodków było płci męskiej, a 19 (33,9%) noworodków płci żeńskiej. W grupie kontrolnej urodziło się odpowiednio 25 (59,5%) noworodków płci męskiej i 17 (40,5%) noworodków. W przypadku płci noworodków nie odnotowano zależności między badanymi grupami ($p=0,606$). Strukturę płci noworodków w obu grupach prezentuje rycina 12.



Rycina 12. Struktura płci noworodków w grupie badanej (Grupa 0), n=56 i grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Różnicę istotną statystycznie zauważono dla punktacji w skali Apgar w 1-szej minucie ($p < 0,001$). Siła odnotowanego efektu jest duża. Mediana oceny w skali Apgar w 1-szej minucie była wyższa u noworodków matek z grup kontrolnych (Grupa 1, 2, 3) w porównaniu do noworodków matek grupy badanej (Grupa 0) *Mdn* 10 punktów (*IQR* 2 punkty) vs *Mdn* 9 punktów (*IQR* 2 punkty).

4.2 Wyniki analizy ekspresji genów MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 i prolidazy. I etap realizacji projektu.

Analiza wyników relatywnego poziomu ekspresji genów MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, prolidazy testem Shapiro-Wilka wykazała, iż wyniki dla każdego z genów mają rozkład nieparametryczny ($p < 0.05$). Z tego też względu dalsza analiza wyników oparta była o wyliczenie: mediany, rozkładów kwartylowych oraz o analizę testem U-Manna-Withney'a. Mediany i rozkłady kwartylowe zostały wyliczone dla relatywnych poziomów ekspresji badanych genów wyliczonych metodą Pfaffla z uwzględnieniem genu referencyjnego RFLP0 (housekeeping gene) oraz z wykorzystaniem próby

referencyjnej. Próba referencyjna wymagana do analizy danych metodą Pfaffla i normalizująca uzyskane w poszczególnych „runach” wyniki została przygotowana poprzez zmieszanie ze sobą 8 przypadkowo wytypowanych cDNA z każdej grupy (8 prób z grupy badanej z patologią PROM/PPROM (Grupa 0), 8 prób z grupy kontrolnej 1 (Grupa 1), 8 prób z grupy kontrolnej 2 (Grupa 2), 8 prób z grupy kontrolnej 3 (Grupa 3). Wyniki poziomu ekspresji badanych genów przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11

Mediany i rozkłady kwartyłowe wyliczone dla uzyskanych wyników ekspresji poszczególnych genów w analizie Real-Time PCR

Gen	Grupa 0 n= 56	Grupa 1 n= 8	Grupa 2 n= 16	Grupa 3 n= 18	Grupa0/ Grupa2+3 n= 56/34	Grupa0+1/ Grupa 2+3 n=64/34
MMP-1	1,15 (0.21-4.79)	6,55 (3.03-7.59)	1,29 (0.49-6.06)	1,27 (0.40-2.77)	1,27 (0.41-3.95)	1.37 (0.45-6.17)/ 1.13 (0.40-3.80)
MMP-2	0,65 (0.21-1.33)	1,61 (0.47-3.42)	0,26 (0.09-0.60)	0,63 (0.27-1.74)	0,50 (0.16-1.38)	0.71 (0.21-1.37)/ 0.49 (0.16-0.99)
MMP-8	4,29 (0.66-9.88)	5,31 (3.14-8.97)	1,41 (0.28-3.06)	0,96 (0.21-4.87)	1,23 (0.25-3.27)	5.09 (0.72-23.14)/ 1.07 (0.25-2.80)
MMP-9	1,53 (0.15-6.03)	2,17 (0.47-4.47)	0,99 (0.26-2.82)	0,77 (0.43-1.76)	0,77 (0.28-2.10)	1.53 (0.20-5.26)/ 0.72 (0.27-1.79)
Prolidaza	1,06 (0.42-1.92)	1,29 (0.50-1.92)	0,68 (0.24-1.87)	0,57 (0.36-0.70)	0,58 (0.29-1.82)	1.09 (0.42-1.92)/ 0.58 (0.29-1.04)

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

W oparciu o wyniki median uzyskanych w analizie Real-Time PCR dla poszczególnych genów przeprowadzono analizę stopnia zmian. Fold change został wyliczony dla poszczególnych grup w oparciu o wyniki median uzyskanych w analizie Real-Time PCR dla poszczególnych genów. Dane przedstawiono w tabeli 12 i 13.

Tabela 12

Analiza stopnia zmiany wyników ekspresji badanych genów w grupie badanej (Grupa 0) względem pozostałych grup kontrolnych

Gen	FC Grupa0/Grupa1 (p)	FC Grupa0/Grupa2 (p)	FC Grupa0/Grupa3 (p)	FC Grupa0/Grupa2+3 (p)	FC Grupa0+1/Grupa2+3 (p)
MMP-1	0.17 (0.044)	0.89 (0.907)	0.90 (0.474)	0.90 (0.698)	1.21 (0.323)
MMP-2	0.40 (0.171)	2.48 (0.10)*	1.03 (0.636)	1.29 (0.492)	1.45 (0.239)
MMP-8	0.81 (0.687)	3.04 (0.87)	4.45 (0.049)	3.47 (0.019)	4.76 (0.006)
MMP-9	0.71 (0.692)	1.53 (0.477)	1.99 (0.192)	1.99 (0.193)	2.13 (0.114)
Prolidaza	0.82 (0.780)	1.56 (0.513)	1.86 (0.236)	1.83 (0.235)	1.88 (0.143)

FC - Fold change, (p) - próg istotności statystycznej wyliczony w oparciu o test

U-Manna-Withney'a. Kolor czerwony - wynik istotny statystycznie. * - wynik na

poziome tendencji statystycznej ($0,05 < p < 0,1$). Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 13

Analiza stopnia zmiany wyników ekspresji badanych genów w obrębie grup kontrolnych

Gen	FC Grupa 1/Grupa 2 (p)	FC Grupa 1/Grupa 3 (p)	FC Grupa 2/Grupa 3 (p)
MMP-1	5.09 (0.101)*	5.15 (0.011)	1.01 (0.339)
MMP-2	6.16 (0.070)*	2.54 (0.211)	0,41 (0.75)
MMP-8	3.77 (0.194)	5.51 (0.070)*	1.46 (0.769)
MMP-9	2.17 (0.283)	2.82 (0.232)	1.46 (0.769)
Prolidaza	1.89 (0.481)	2.26 (0.359)	1.19 (0.717)

FC - Fold change. (p) - próg istotności statystycznej wyliczony w oparciu o test

U-Manna-Withney'a. Kolor czerwony - wynik istotny statystycznie. * - wynik na

poziome tendencji statystycznej ($0,05 < p < 0,1$). Źródło: Badanie i opracowanie własne.

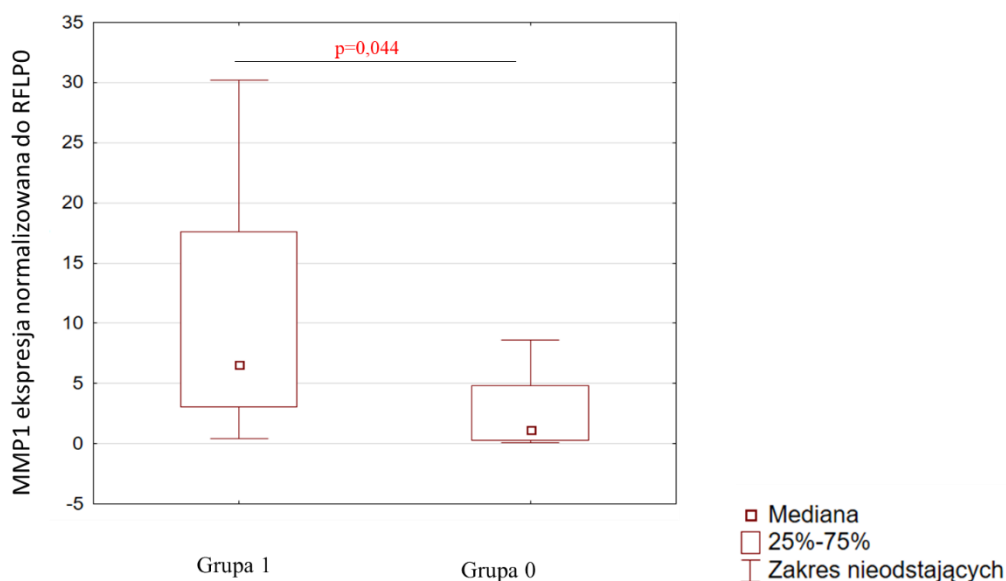
4.2.1 Ekspresja mRNA MMP-1 w błonach płodowych

Wyniki ekspresji genu MMP-1 przedstawiono w tabeli 11.

Najwyższe wartości ekspresji mRNA MMP-1 znormalizowane względem genu referencyjnego RFLP0 uzyskano dla grupy kontrolnej 1 (Grupa 1) *Mdn*: 6,55 (rozkład kwartyłowy 3,03-17,59). Dla pozostałych dwóch grup kontrolnych uzyskano zbliżone wartości tj. dla grupy kontrolnej 2 (Grupa 2) *Mdn*: 1,29 (rozkład kwartyłowy 0,49-6,06), dla grupy kontrolnej 3 (Grupa 3) *Mdn*: 1,27 (rozkład kwartyłowy 0,40-2,77). W grupie badanej (Grupa 0) mediana ekspresji genu MMP-1 była najniższa *Mdn*: 1,15 (rozkład kwartyłowy 0,21-4,79).

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników ekspresji genu MMP-1 pomiędzy grupą badaną (Grupa 0) a poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 12):

- istotną statystycznie różnicę między ekspresją MMP-1 w błonach płodowych grupy badanej (Grupa 0) i grupy kontrolnej 1 (Grupa 1); $p=0,044$. Oznacza to 5,7-krotny wzrost ekspresji enzymu w grupie ciężarnych ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych podczas regularnej czynności skurczowej w trakcie porodu drogami i siłami natury (Grupa 1) w porównaniu do grupy z patologią przedwczesnego pęknięcia błon płodowych przed wystąpieniem czynności skurczowej (Grupa 0). Na rycinie 13 przedstawiono porównanie ekspresji MMP-1 pomiędzy Grupą 1 a Grupą 0.



Rycina 13. Porównanie ekspresji MMP-1 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 1 a Grupą 0

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

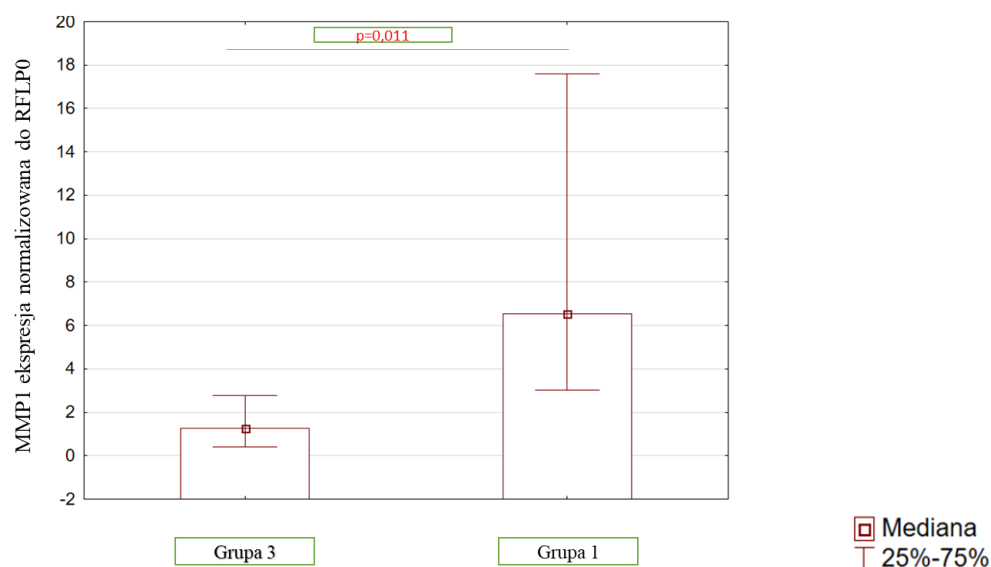
- brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy ekspresją MMP-1 w błonach płodowych z grupy badanej (Grupa 0) i grupy kontrolnej 2 (Grupa 2); $p=0,907$

-brak istotnej statystycznie różnicę pomiędzy ekspresją MMP-1 w błonach płodowych uzyskanych po porodzie ciężarnych z grupy badanej (Grupa 0) i grupy kontrolnej 3 (Grupa 3); $p=0,474$

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników ekspresji genu MMP-1 pomiędzy poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 13):

- istotną statystycznie różnicę tylko pomiędzy ekspresją MMP-1 w błonach płodowych ciężarnych z grupy kontrolnej 1 (Grupa 1) i grupy kontrolnej 3 (Grupa 3); $p=0,011$. Oznacza to 5,15-krotny wzrost ekspresji enzymu błonach płodowych ciężarnych ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych podczas porodu drogami i siłami natury (Grupa 1) w porównaniu do grupy ciężarnych, u których regularna czynność skurczowa podczas porodu drogami i siłami natury nie powoduje pęknięcia błon płodowych (Grupa

3). Na rycinie 14 przedstawiono porównanie ekspresji MMP-1 pomiędzy Grupą 3 a Grupą 1.



Rycina 14. Porównanie ekspresji MMP-1 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 3 a Grupą 1

Źródło: Badanie i opracowanie własne

- brak różnicy pomiędzy pozostałymi wynikami ekspresji genów MMP-1 pomiędzy grupami kontrolnymi

4.2.2 Ekspresja mRNA MMP-2 w błonach płodowych

Wyniki ekspresji genu MMP-2 przedstawiono w tabeli 11.

Najwyższe wartości ekspresji mRNA MMP-2 znormalizowane względem genu referencyjnego RFLP0 uzyskano dla grupy kontrolnej 1 (Grupa 1) *Mdn*: 1,61 (rozkład kwartyłowy 0,47-3,42). Dla grupy badanej (Grupa 0) oraz grupy kontrolnej 3 (Grupa 3) uzyskano zbliżone wartości tj. *Mdn*: 0,65 (rozkład kwartyłowy 0,21-1,33) vs *Mdn*: 0,63

(rozkład kwartylowy 0,27-1,74). W grupie kontrolnej 2 (Grupa 2) otrzymano najniższe wartości ekspresji MMP-2 *Mdn*: 0,26 (rozkład kwartylowy 0,09-0,6).

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników ekspresji genu MMP-2 pomiędzy grupą badaną a poszczególnymi grupami kontrolnymi (tabela 12):

- nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic

Analiza stopnia zmiany median dla wyników ekspresji genu MMP-2 pomiędzy poszczególnymi grupami kontrolnymi (tabela 13):

- nie wykazała żadnych istotnych statystycznie różnic

4.2.3 Ekspresja mRNA MMP-8 w błonach płodowych

Wyniki ekspresji genu MMP-8 przedstawiono w tabeli 11.

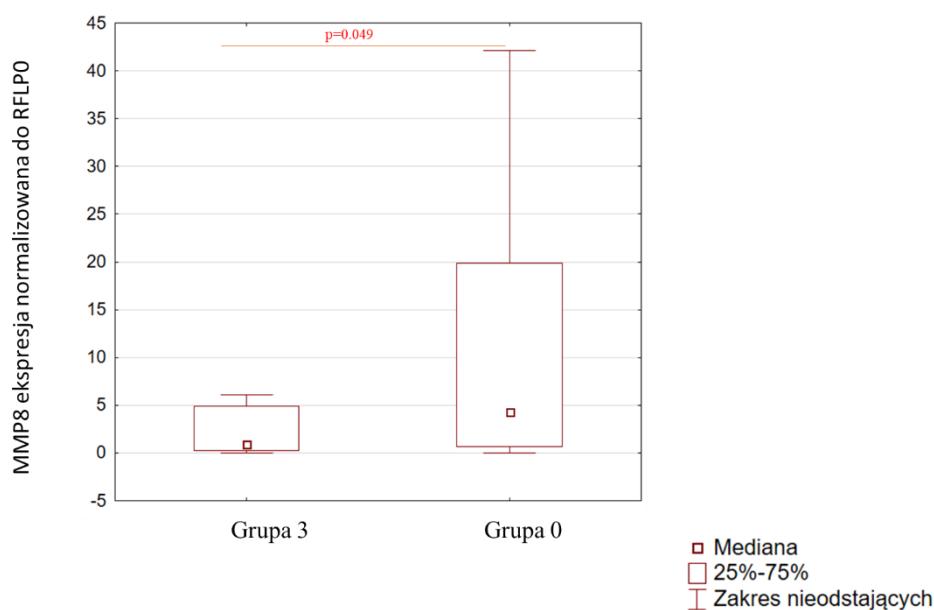
Najwyższe wartości ekspresji mRNA MMP-8 znormalizowane względem genu referencyjnego RFLP0 uzyskano dla grupy kontrolnej 1 (Grupa 1) *Mdn*: 5,31 (rozkład kwartylowy 3,14-28,97). Mediana ekspresji genu MMP-8 w grupie badanej 0 (Grupa 0) wyniosła 4,29 (rozkład kwartylowy 0,66-19,88). Dla pozostałych dwóch grup kontrolnych uzyskano niższe wartości tj. dla grupy kontrolnej 2 (Grupa 2) *Mdn*: 1,41 (rozkład kwartylowy 0,28-3,06), dla grupy kontrolnej 3 (Grupa 3) *Mdn*: 0,96 (rozkład kwartylowy 0,21-4,87).

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników ekspresji genu MMP-8 pomiędzy grupą badaną a poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 12):

- brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy ekspresją MMP-8 w błonach płodowych uzyskanych po porodzie ciężarnych z grupy badanej (Grupa 0) w porównaniu do grupy kontrolnej 1 (Grupa 1); $p=0,687$

- brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy ekspresją MMP-8 w błonach płodowych uzyskanych po porodzie ciężarnych z grupy badanej (Grupa 0) w porównaniu do grupy kontrolnej 2 (Grupa 2); $p=0,87$

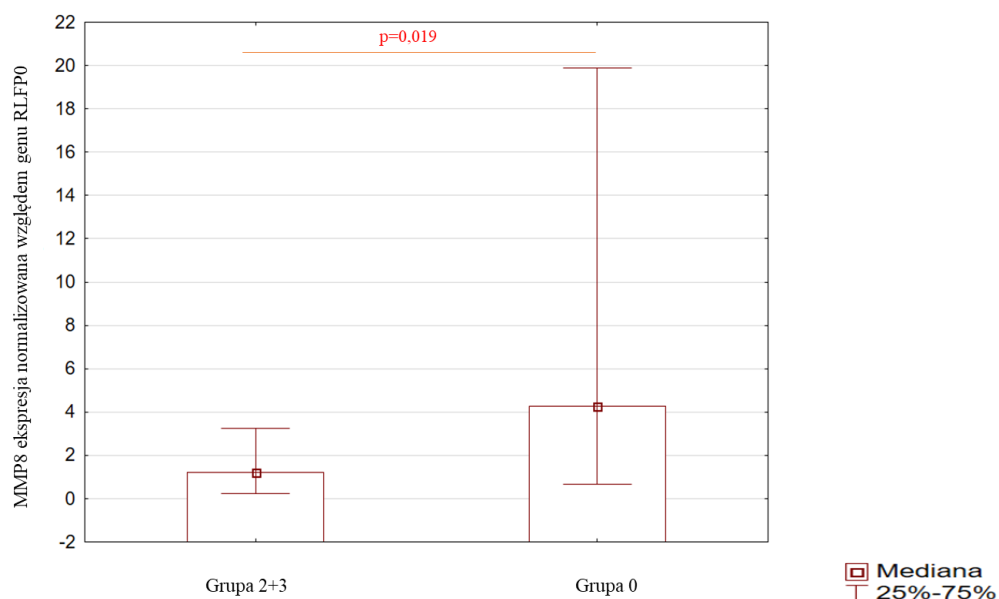
- istotną statystycznie różnicę między ekspresją MMP-8 w błonach płodowych grupy badanej (Grupa 0) i grupy kontrolnej 3 (Grupa 3); $p=0,049$. Widoczny był 4,45-krotny wzrost ekspresji genu MMP-8 w grupie ciężarnych z patologicznym przedwczesnym pęknięciem błon płodowych (Grupa 0) w porównaniu do grupy ciężarnych, gdzie błony płodowe nie ulegają przerwaniu nawet będąc pod wpływem regularnej czynności skurczowej podczas porodu drogami i siłami natury (Grupa 3). Na rycinie 15 przedstawiono porównanie ekspresji MMP-8 pomiędzy Grupą 3 a Grupą 0.



Rycina 15. Porównanie ekspresji MMP-8 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 3 a Grupą 0

Źródło: Badanie i opracowanie własne

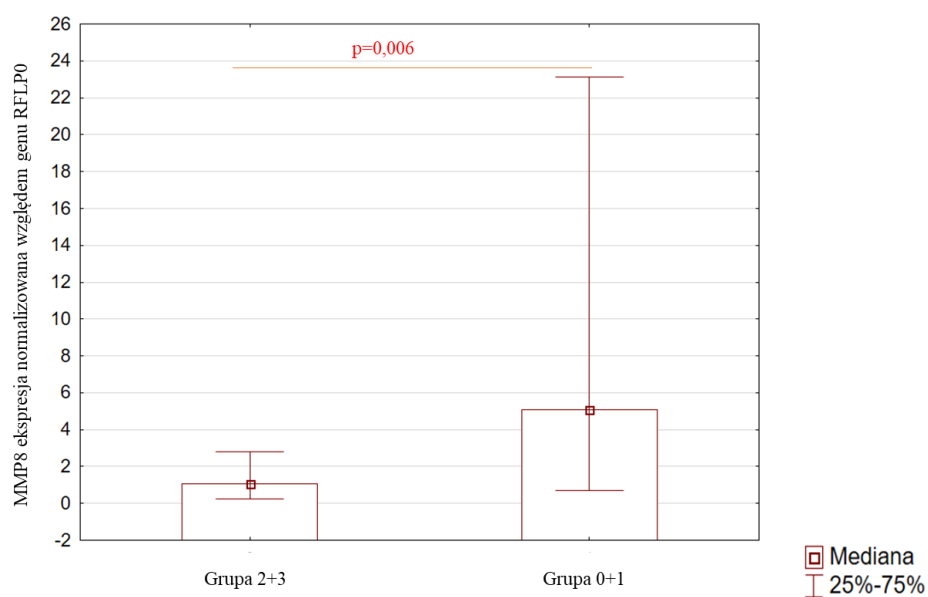
- istotną statystycznie różnicę między ekspresją MMP-8 w błonach płodowych grupy badanej (Grupa 0) w zestawieniu z grupą kontrolną 2 i 3 (Grupa 2+3), w których błony płodowe nie pękały spontanicznie (Grupa 2+3); $p=0,019$. Zaobserwowano 3,47- krotny wzrost ekspresji genu MMP-8 w grupie z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) w porównaniu do ciężarnych, będących w ciąży donoszonej zarówno podczas porodu (Grupa 3) jak i ciężarnych nierodzących (Grupa 2), gdzie błony płodowe pozostawały nienaruszone. Na rycinie 16 przedstawiono porównanie ekspresji MMP-8 pomiędzy Grupą 0 a Grupą 2+3.



Rycina 16. Porównanie ekspresji MMP-8 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 0 a Grupą 2+3.

Źródło: Badanie i opracowanie własne

- istotną statystycznie różnicę pomiędzy ekspresją MMP-8 w błonach płodowych pacjentek, u których dochodziło przerwania ciągłości błon płodowych tj. Grupa 0+1 w porównaniu z grupami ciężarnych, których błony płodowe pozostawały zachowane tj. Grupa 2+3 ($p=0,006$). Fold change wyniósł w tym przypadku 4,76. Na rycinie 17 przedstawiono porównanie ekspresji genu MMP-8 pomiędzy Grupą 0+1 a Grupą 2+3.



Rycina 17. Porównanie ekspresji MMP-8 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 0+1 a Grupą 2+3. Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników ekspresji genu MMP-8 pomiędzy poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 13):

- brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy wynikami ekspresji genów MMP-8 pomiędzy grupami kontrolnymi

4.2.4 Ekspresja mRNA MMP-9 w błonach płodowych

Wyniki ekspresji genu MMP-9 przedstawiono w tabeli 11.

Najwyższe wartości ekspresji mRNA MMP-9 znormalizowane względem genu referencyjnego RFLP0 uzyskano dla grupy kontrolnej 1 (Grupa 1) *Mdn*: 2,17 (rozkład kwartylowy 0,47-4,47). Mediana ekspresji genu MMP-9 w grupie badanej 0 (Grupa 0) wyniosła 1,53 (rozkład kwartylowy 0,15-6,03). Dla pozostałych dwóch grup kontrolnych uzyskano niższe, porównywalne wartości tj. dla grupy kontrolnej 2 (Grupa 2) *Mdn*: 0,99 (rozkład kwartylowy 0,26-2,82), dla grupy kontrolnej 3 (Grupa 3) *Mdn*: 0,77 (rozkład kwartylowy 0,43-1,76).

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników ekspresji genu MMP-9 pomiędzy grupą badaną a poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 12):

- brak istotnych statystycznie różnic. Oznacza to, że ekspresja genu MMP-9 nie różni się pomiędzy grupą badaną (Grupą 0) a poszczególnymi grupami kontrolnymi.

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników ekspresji genu MMP-9 pomiędzy poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 13):

- brak istotnych statystycznie różnic. Ekspresja genu MMP-9 nie różni się pomiędzy poszczególnymi grupami kontrolnymi.

4.2.5 Ekspresja mRNA prolidazy w błonach płodowych

Wyniki ekspresji genu prolidazy przedstawiono w tabeli 11.

Najwyższe wartości ekspresji mRNA dla prolidazy znormalizowane względem genu referencyjnego RFLP0 uzyskano dla grupy kontrolnej 1 (Grupa 1) *Mdn*: 1,29 (rozkład kwartylowy 0,50-1,92). Mediana ekspresji genu prolidazy w grupie badanej 0 (Grupa 0) wyniosła 1,06 (rozkład kwartylowy 0,42-1,92). Dla pozostałych dwóch grup kontrolnych uzyskano niższe, porównywalne wartości tj. dla grupy kontrolnej 2 (Grupa 2) *Mdn*: 0,68 (rozkład kwartylowy 0,24-1,87), dla grupy kontrolnej 3 (Grupa 3) *Mdn*: 0,57 (rozkład kwartylowy 0,36-0,70).

Oceniając stopień zmian median wyników ekspresji genu prolidazy pomiędzy grupą badaną a poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 12):

- brak istotnych statystycznie różnic. Oznacza to, że ekspresja genu prolidazy nie różni się pomiędzy grupą badaną (Grupa 0) a poszczególnymi grupami kontrolnymi

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników ekspresji genu prolidazy pomiędzy poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 13):

- brak istotnych statystycznie różnic. Ekspresja genu prolidazy nie różni się pomiędzy poszczególnymi grupami kontrolnymi.

4.3 Wyniki stężenia MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu. II etap realizacji projektu.

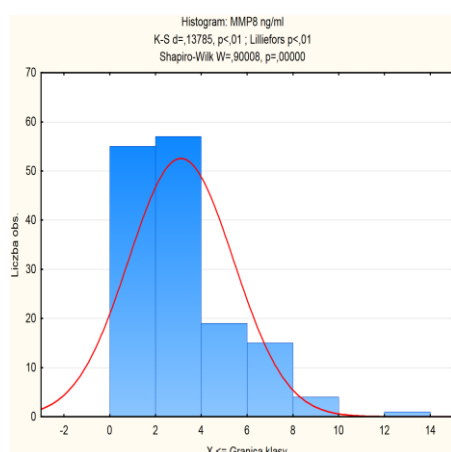
Z uwagi na ograniczenia finansowe niniejszego projektu założono, że do drugiego etapu badania mającego na celu ocenę wybranych enzymów w matczynym osoczu zostanie wytypowana jedna metaloproteinaza spośród innych zaangażowanych w degradację macierzy zewnątrzkomórkowej w błonach płodowych oraz dodatkowo enzym będący czynnikiem równoważącym rozkład i syntezę kolagenu w ECM błon płodowych, a na temat którego jest wciąż mało publikacji w kontekście jego roli w patologii PROM/PPROM (prolidaza).

Przy próbie wytypowanie metaloproteinazy wzięto pod uwagę analizę stopnia zmian ekspresji poszczególnych genów metaloproteinaz w błonach płodowych pomiędzy grupą badaną z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) a grupami kontrolnymi w których błony płodowe były zachowane (Grupa 2, Grupa 3).

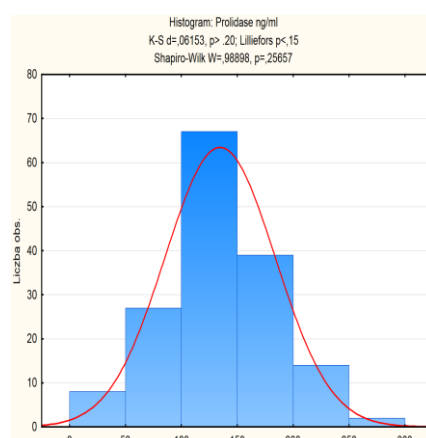
Wytypowano metaloproteinazę 8, której poziom ekspresji wykazywał największą tendencję wzrostową w przypadku ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem wód płodowych (Grupa 0) w stosunku do ciąż w których nie występowało pęknięcia błon płodowych (Grupa 2 i Grupa 3). Dla genu MMP-8 (spośród innych zaangażowanych w degradację macierzy zewnątrzkomórkowej w błonach płodowych) fold change dla grup 0/2 i 0/3 wynosił odpowiednio 3,04 i 4,45.

Dla drugiego wytypowanego enzymu tj. prolidazy (czynnika równoważającego rozkład i syntezę kolagenu w macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych) fold change dla grup 0/2 i 0/3 wynosił odpowiednio 1,56 i 1,86.

Produkty wytypowanych genów były określane w osoczu kobiet ciężarnych z grupy badanej z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) oraz w trzech grupach kontrolnych (Grupa 1, Grupa 2, Grupa 3) celem sprawdzenia czy MMP-8 lub prolidaza mogą stanowić markery predykcyjne przedwczesnego pęknięcia wód płodowych. Analiza uzyskanych wyników testem Shapiro-Wilka wykazała, iż rozkład wyników uzyskanych dla stężenia MMP-8 odbiegał od rozkładu normalnego $p < 0,05$ (rycina 3) podczas gdy wyniki uzyskane dla prolidazy miały rozkład normalny $p > 0,05$ (rycina 4).



Rycina 3. Rozkład wyników uzyskanych dla MMP-8.



Rycina 4. Rozkład wyników uzyskanych dla prolidazy.

Z tego powodu mediany i rozkłady kwartylowe uzyskane dla wyników stężeń MMP-8 we krwi kobiet zakwalifikowanych do badania analizowano testem U Manna-Withney'a, natomiast wyniki uzyskane dla stężeń prolidazy analizowano testem t-Studenta. Uzyskane wyniki przedstawiono w ng/ml w tabeli 14, 15 i 16.

4.3.1 Stężenie MMP-8 w osoczu ciężarnych

Wyniki stężenia MMP-8 w matczynym osoczu przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14

Wyniki stężeń MMP-8 w osoczu ciężarnych kobiet zakwalifikowanych do badania

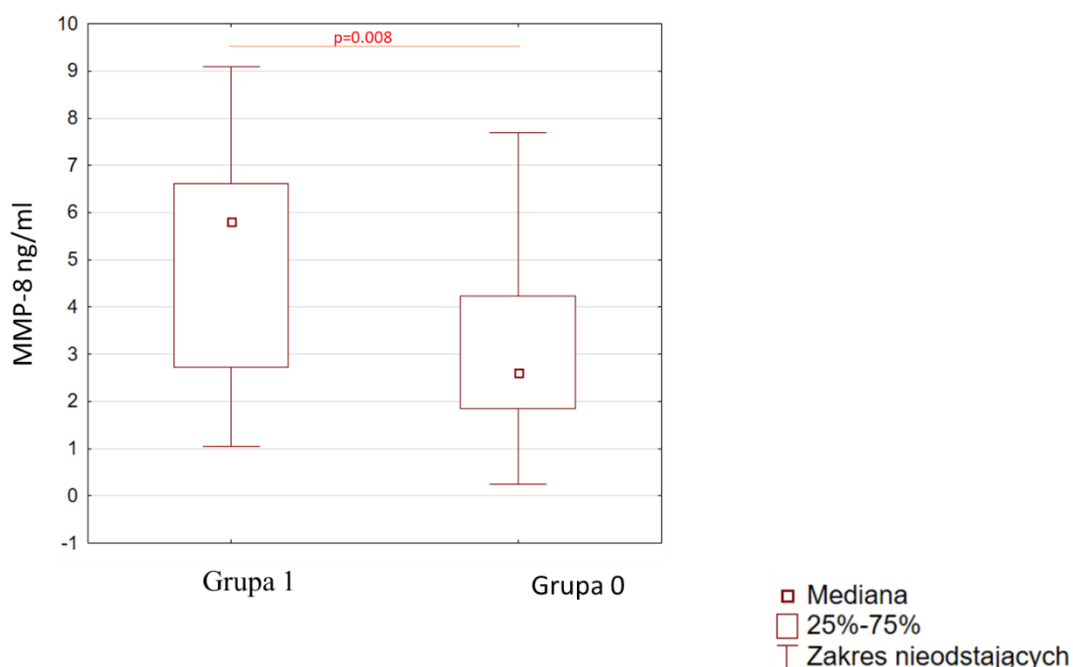
	Grupa 0	Grupa 1	Fold change p
MMP8 ng/ml Mediana (rozkład kwartylowy)	2.62 (1.85-4.24)	5.85 (2.99-6.61)	0,44 (0.008)
	Grupa 0	Grupa 2	Fold change p
MMP8 ng/ml Mediana (rozkład kwartylowy)	2.62 (1.85-4.24)	1.62 (1.08-2.86)	1,61 (0.014)
	Grupa 0	Grupa 3	Fold change p
MMP8 ng/ml Mediana (rozkład kwartylowy)	2.62 (1.85-4.24)	2.26 (1.11-3.55)	1,15 (0.092)*
	Grupa 0	Grupa 2+3	Fold change p
MMP8 ng/ml Mediana (rozkład kwartylowy)	2.62 (1.85-4.24)	2.02 (1.05-3.40)	1,29 (0.014)
	Grupa 0+1	Grupa 2+3	Fold change p
MMP8 ng/ml Mediana (rozkład kwartylowy)	2.87 (1.96-5.12)	2.03 (1.11-3.39)	1,41 (0.001)

p–próg istotności statystycznej wyliczony w oparciu o test U-Manna-Withney'a. Kolor czerwony - wyniki istotne statystycznie; $p < 0,05$. * - wynik na poziomie tendencji statystycznej ($0,05 < p < 0,1$). Źródło: Badanie i opracowanie własne

Mediana stężenia MMP-8 we krwi kobiet ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych z grupy badanej (Grupa 0) wynosiła 2,62 ng/ml, w grupie kontrolnej 1 (Grupa 1) uzyskano najwyższą wartość 5,85 ng/ml, natomiast kolejno w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2) średnia mediana stężenia wyniosła 1,62 ng/ml, zaś w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3) – 2,26 ng/ml.

Oceniając uzyskane wartości stężenia MMP-8 w matczynym osoczu stwierdzono:

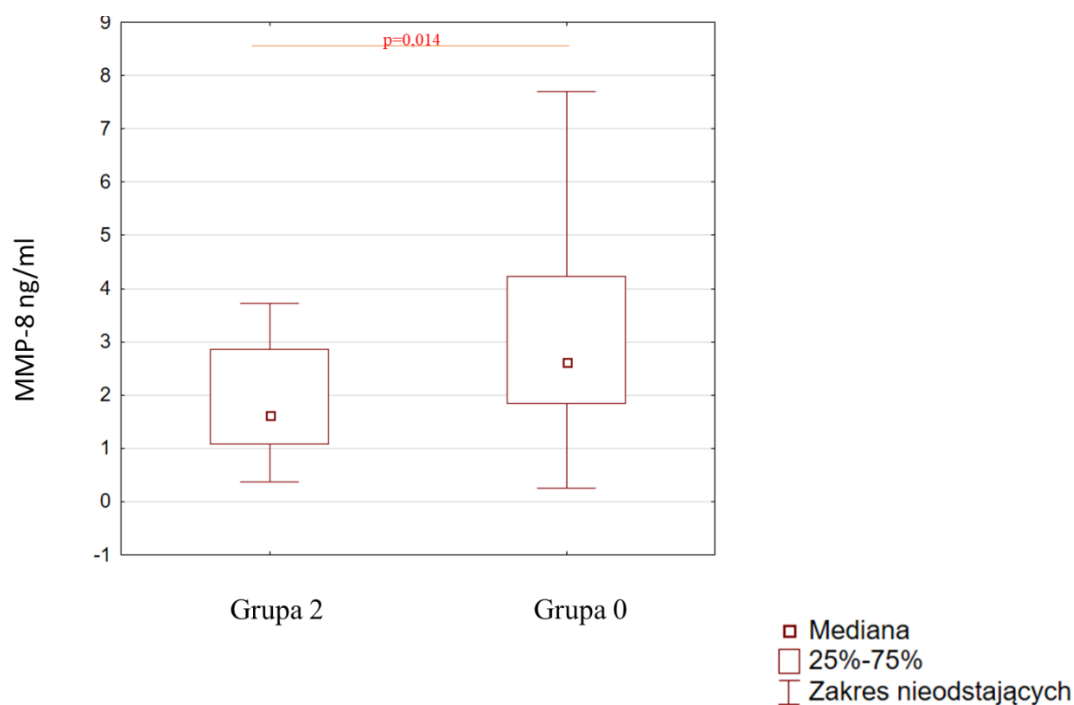
- istotną statystycznie różnicę pomiędzy osoczym stężeniem MMP-8 u ciężarnych w grupie badanej (Grupa 0) w porównaniu do ciężarnych z grupy kontrolnej 1 (Grupa 1); $p=0,008$. Oznacza to 2,23-krotny wzrost ekspresji tego enzymu w grupie ciężarnych ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych podczas porodu naturalnego (Grupa 1) w porównaniu do ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych (Grupa 0). Na rycinie 18 przedstawiono porównanie stężenia MMP-8 w oparciu o wykres skrzynkowy.



Rycina 18. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 1 a Grupą 0.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

- istotną statystycznie różnicę między stężeniem MMP-8 w próbkach krwi ciężarnych z grupy badanej (Grupa 0) w porównaniu do grupy kontrolnej 2 (Grupa 2); $p=0,014$. Oznacza to 1,61-krotny wzrost ekspresji tego enzymu w grupie badanej z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) w porównaniu do ciężarnych w ciąży donoszonej, bez czynności skurczowej z zachowanymi błonami płodowymi (Grupa 2). Na rycinie 19 przedstawiono porównanie stężenia MMP-8 w oparciu o wykres skrzynkowy.



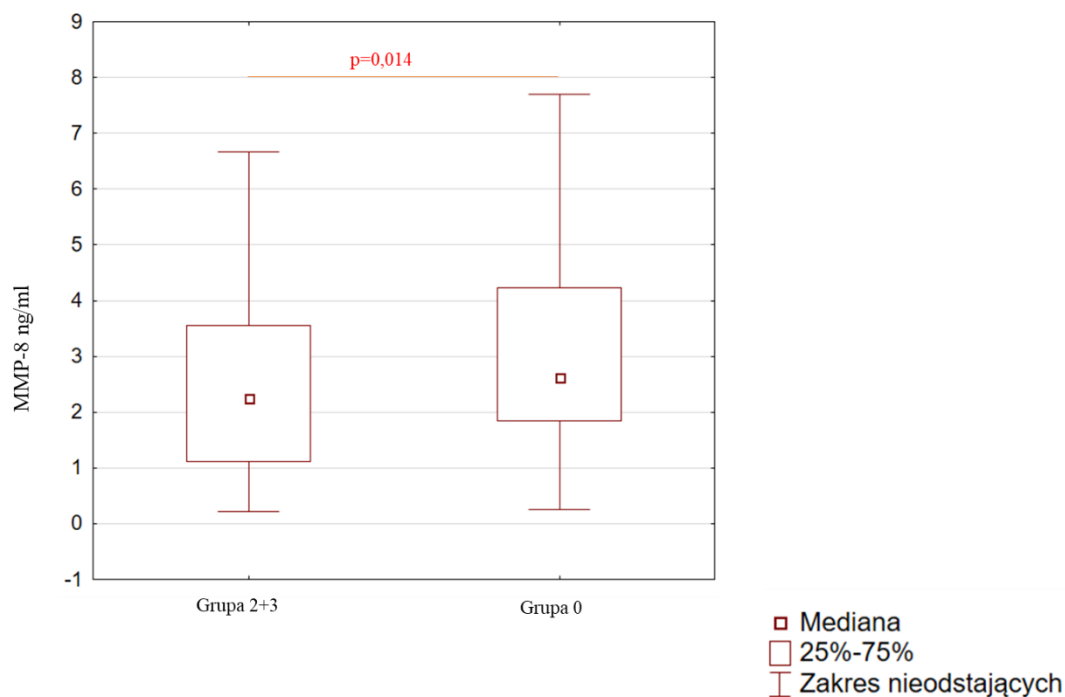
Rycina 19. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 2 a Grupą 0.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

- brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniem MMP-8 we krwi ciężarnych z grupy badanej (Grupa 0) w porównaniu do grupy kontrolnej 3 (Grupa 3); $p=0,092$

- istotną statystycznie różnicę pomiędzy stężeniem MMP-8 we krwi kobiet ciężarnych z grupy badanej (Grupa 0), a kobietami ciężarnymi u których nie dochodziło do samoistnego pęknięcia pęcherza płodowego tj. razem dla grupy kontrolnej 2 (Grupa 2)

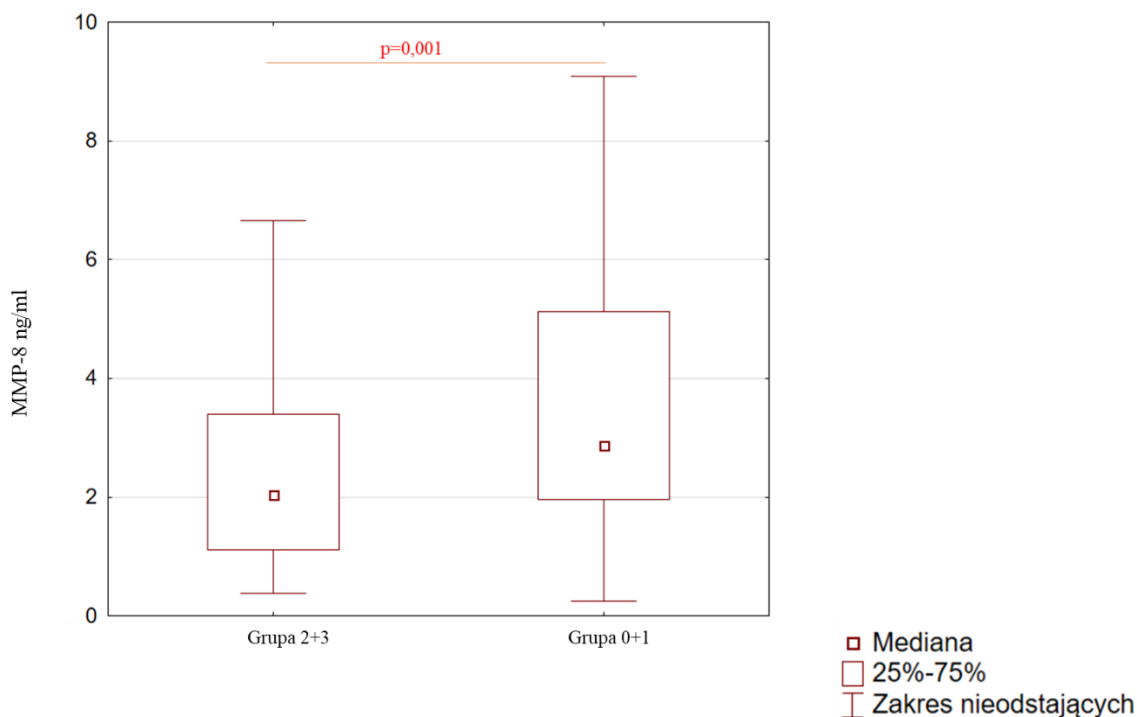
i 3 (Grupa 3); $p=0,014$. Na rycinie 20 przedstawiono porównanie stężenia MMP-8 pomiędzy Grupą 0 a Grupą 2+3.



Rycina 20. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 0 a Grupą 2+3.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

- istotną statystycznie różnicę pomiędzy stężeniem MMP-8 we krwi ciężarnych z dwóch grup badanej i kontrolnej 1 (Grupa 0 + Grupa 1), gdzie dochodziło do samoistnego pęknięcia pęcherza płodowego (przedwcześnie i w trakcie porodu czasie), a kobietami z połączonych dwóch grup kontrolnych 2 i 3 (Grupa 2 + Grupa 3), gdzie nie dokonywało się samoistne pęknięcie pęcherza płodowego; $p=0,001$. Na rycinie 21 przedstawiono porównanie stężenia MMP-8 pomiędzy Grupą 0+1 a Grupą 2+3.



Rycina 21. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 0+1 a Grupą 2+3.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

W następnym kroku porównano między sobą stężenia MMP-8 w osoczu pomiędzy ciężarnymi z kontrolnych grup. Dane przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15

Analiza stopnia zmiany wyników stężenia MMP-8 w obrębie grup kontrolnych

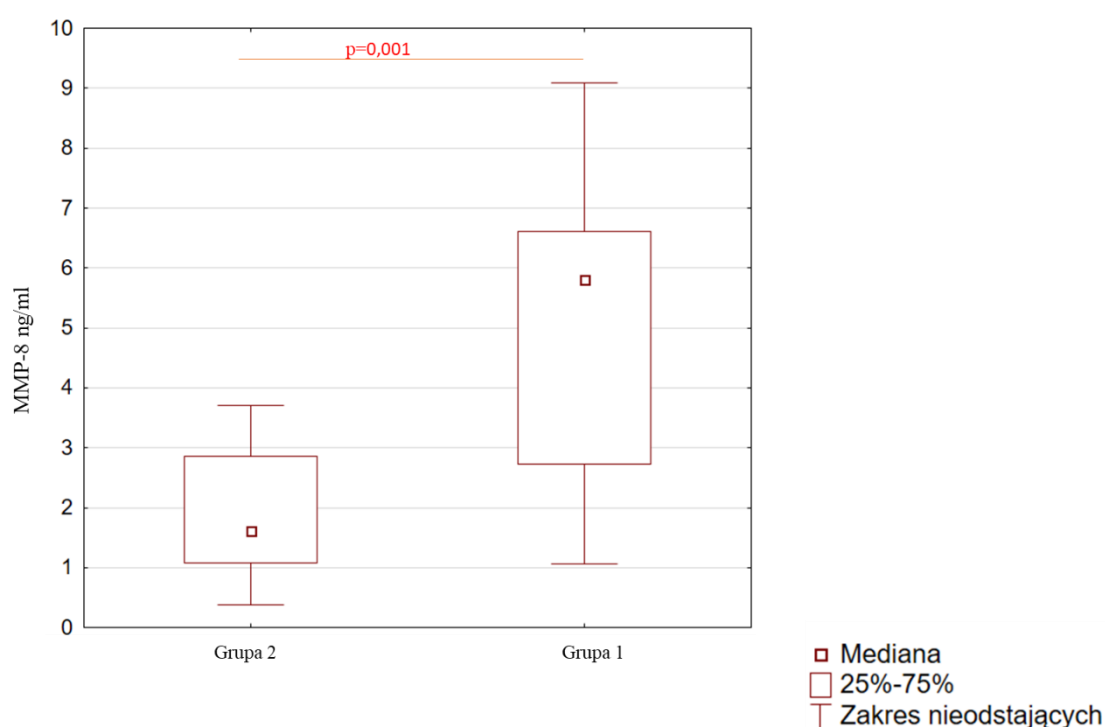
	FC Gr1/Gr2 (p)	FC Gr1/Gr3 (p)	FC Gr2/Gr3 (p)
MMP-8	3.99 (0.001)	2.58 (<0.001)	0.72 (0.381)

FC - Fold change. (p) – próg istotności statystycznej wyliczony w oparciu o test U-Manna-Withneya. Na czerwono zaznaczono wyniki istotne statystycznie; $p < 0,05$.

Źródło: Badanie i opracowanie własne

Dokonując analizy stopnia zmian median dla wyników stężeń MMP-8 pomiędzy poszczególnymi grupami kontrolnymi stwierdzono (tabela 15):

- istotną statystycznie różnicę pomiędzy stężeniem MMP-8 w grupie kontrolnej 1 (Grupa 1) w porównaniu do grupy kontrolnej 2 (Grupa 2); $p=0,001$. Oznacza to 3,99-krotnie wyższe stężenie tej kolagenazy w matczynym osoczu w grupie kobiet ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych podczas porodu (Grupa 1) w porównaniu do grupy kobiet także w ciąży donoszonej, ale bez porodowej czynności skurczowej z zachowanymi błonami (Grupa 2). Na rycinie 22 przedstawiono porównanie stężenia MMP-8 pomiędzy Grupą 1 a Grupą 2.

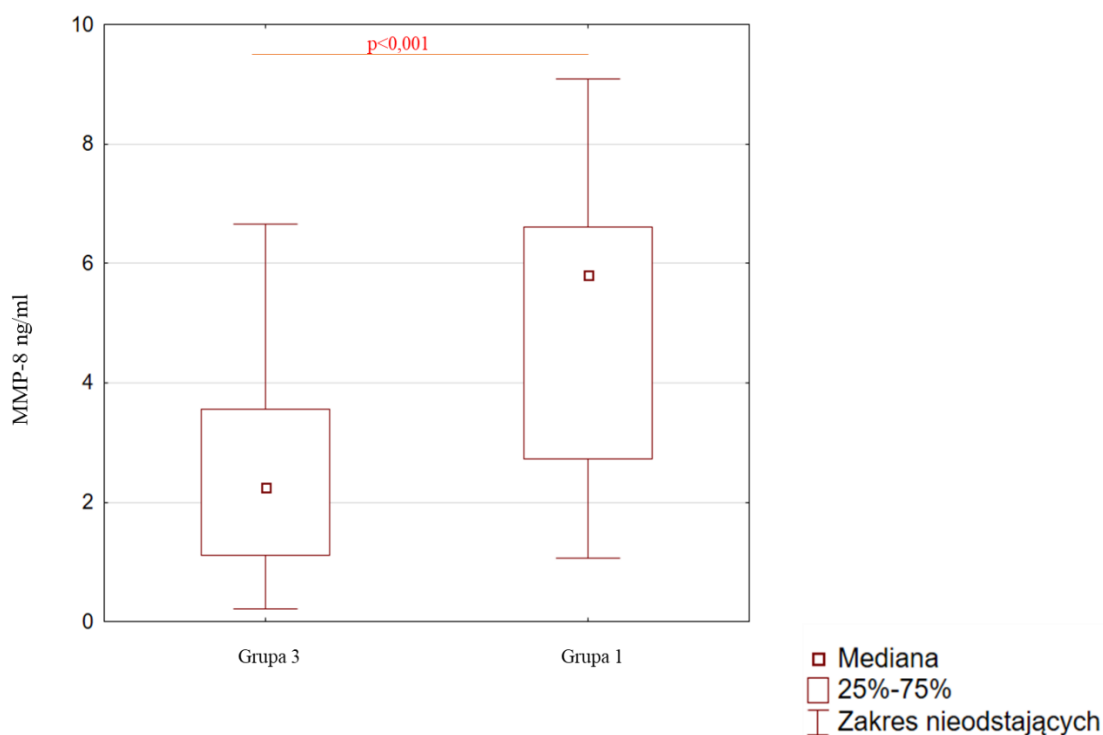


Rycina 22. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 1 a Grupą 2.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

- istotną statystycznie różnicę pomiędzy stężeniem MMP-8 w grupie kontrolnej 1 (Grupa 1) i grupie kontrolnej 3 (Grupa 3); $p<0,001$. Oznacza to 2,58-krotnie wyższe stężenie tej kolagenazy w matczynym osoczu u ciężarnych ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych podczas porodu (Grupa 1) w porównaniu do grupy kobiet ciężarnych,

u których błony płodowe są na tyle wytrzymałe, że nawet porodowa, regularna czynność skurczowa nie jest w stanie przyczynić się do przerwania ciągłości błon płodowych (Grupa 3). Na rycinie 23 przedstawiono porównanie stężenia MMP-8 pomiędzy Grupą 1 a Grupą 3.



Rycina 23. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 1 a Grupą 3.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

- brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniem MMP-8 we krwi ciężarnych z grupy kontrolnej 2 (Grupa 2) i grupy kontrolnej 3 (Grupa 3); $p=0,381$

4.3.2 Stężenie prolidazy w osoczu ciężarnych

Następnie ocenie poddano stężenie prolidazy w osoczu kobiet ciężarnych biorących udział w projekcie badawczym. Uzyskane w ng/ml wyniki przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16

Wyniki stężenia prolidazy w osoczu ciężarnych kobiet w poszczególnych grupach

Zmienna	Grupa 0	Grupa 1	Fold change (p)
Prolidaza ng/ml Średnia ±SD	135.11±49	128.78±41	1,049 (0.641)
	Grupa 0	Grupa 2	
Prolidaza ng/ml Średnia ±SD	135.11±49	138.08±56	0,978 (0.778)
	Grupa 0	Grupa 3	
Prolidaza ng/ml Średnia ±SD	135.11±49	132.21±47	1,021 (0.785)
	Grupa 0	Grupa 2+ Grupa 3	
Prolidaza ng/ml Średnia ±SD	135.11±49	135.36±53	0,998 (0.978)

Średnie i odchylenia standardowe wyliczone w oparciu o wyniki stężeń prolidazy w osoczu ciężarnych kobiet zakwalifikowanych do poszczególnych grup; p wyliczone testem t-Studenta; $p < 0,05$

Źródło: Badanie i opracowanie własne

Średnie stężenie prolidazy we krwi kobiet ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych w grupie badanej (Grupa 0) wynosiło 135,11 ng/ml, natomiast kolejno w grupie kontrolnej 1 (Grupa 1) 128,78 ng/ml, grupie kontrolnej 2 (Grupa 2) 138,08 ng/ml, grupie kontrolnej 3 (Grupa 3) 132,21 ng/ml.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu prolidazy między grupą badaną a grupami kontrolnymi (Grupa 1, 2, 3).

W następnym kroku porównano między sobą stężenia prolidazy w osoczu pomiędzy ciężarnymi z grup kontrolnych. Dane przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17

Analiza stopnia zmiany wyników stężenia prolidazy w obrębie grup kontrolnych

	FC Gr1/Gr2 (p)	FC Gr1/Gr3 (p)	FC Gr2/Gr3 (p)
Prolidaza	0,94 (0.687)	0,9 (0,970)	0.97 (0.690)

FC - Fold change. (p) – próg istotności statystycznej wyliczony w oparciu o test U-Manna-Withney’a; $p < 0,05$

Źródło: Badanie i opracowanie własne

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy wynikami osocznego stężenia prolidazy we krwi ciężarnych w obrębie grup kontrolnych.

4.4 Wyniki ekspresji mRNA badanych enzymów obrębie grupy badanej (grupy PPRM n=32 i grupy PROM n=24)

Na potrzeby tej analizy dokonano podziału wewnątrz grupy z przedwczesnym pękaniem błon płodowych (Grupa 0) $n=56$ na dwie podgrupy PROM $n=24$ i PPRM $n=32$ z punktem odcięcia 37. tygodnia ciąży.

W tej części analiz sprawdzono czy istnieją różnice w ekspresji genów MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 i prolidazy w błonach płodowych pomiędzy grupą PROM $n=24$ (przedwczesne pęknięcie błon płodowych > 37 . tygodnia ciąży) a grupą PPRM $n=32$ (przedterminowe przedwczesne pęknięcie błon płodowych < 37 . tygodnia ciąży) oraz czy istnieje różnica w osoczym stężeniu MMP-8 i prolidazy pomiędzy badanymi grupami. Do obliczeń zastosowano nieparametryczny test U Manna-Withney’a. Wyniki przedstawiono w tabeli 18 oraz w tabeli 19.

Tabela 18

Mediany i rozkłady kwartylowe wyliczone dla uzyskanych wyników dla poszczególnych genów w analizie Real-Time PCR oraz dla stężenia MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu w obrębie grupy PPROM n=32 oraz grupy PROM n=24

	Ekspresja genów w błonach płodowych					Stężenie w osoczu [ng/ml]	
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	Prolidaza	MMP-8	Prolidaza
PPROM	1,03	0,83	7,30	1,87	1,01	3,05	124,34
n=32	(0,20-5,35)	(0,21-1,58)	(1,4-40,36)	(0,47-7,34)	(0,41-1,88)	(2,00-5,41)	(95,61-42,05)
PROM	1,43	0,46	2,98	0,48	1,10	2,81	146,19
n=24	(0,51-4,33)	(0,18-0,96)	(0,38-5,68)	(0,13-3,12)	(0,42-1,91)	(1,90-3,86)	(103,1-184,9)

Źródło: Badanie i opracowanie własne

Tabela 19

Analiza stopnia zmiany (Fold change) wyników ekspresji genów w błonach płodowych oraz wyników stężeń MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu uzyskanych w grupie PPROM n=32 względem wyników w grupie PROM n=24

	Fold change dla wyników ekspresji genów w błonach płodowych (p)					Fold change dla wyników stężenia w osoczu (p)	
	MMP-1	MMP-2	MMP-8	MMP-9	Prolidaza	MMP-8	Prolidaza
PPROM /PROM	0,73	1,78	2,45	3,90	0,92	1,09	0,85
	(0,47)	(0,211)	(0,049)	(0,086)*	(0,772)	(0,199)	(0,099)*

(p) – próg istotności statystycznej wyliczony w oparciu o test U-Manna-Withney’a. Na czerwono zaznaczono wyniki istotne statystycznie. *-wynik na poziomie tendencji statystycznej; (0,05<p<0,1). Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Oceniając uzyskane wyniki analizy ekspresji genów w błonach płodowych stwierdzono:

- istotną statystycznie różnicę w ekspresji MMP-8 w błonach płodowych pomiędzy badanymi grupami. W grupie PPRM n=32 mediana stężeń wynosiła 7,30; w grupie PPRM n=34 odpowiednio 2,98. Oznacza to, że ekspresja MMP-8 jest 2,45-krotnie większa w grupie, gdzie wody płodowe odpływają patologicznie przed ukończonym 37 tygodniem ciąży.
- brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji genów MMP-1, MMP-2, MMP-9 i prolidazy w błonach płodowych pomiędzy wyżej wymienionymi grupami
- brak istotnych statystycznie różnic w osoczym stężeniu MMP-8 i prolidazy pomiędzy analizowanymi grupami

4.5 Korelacje

4.5.1 Korelacje między ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, prolidazy w błonach płodowych oraz stężeniem MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu w poszczególnych grupach

Wykonano analizę korelacji rho Spearmana badanych parametrów. W każdej grupie skorelowano ze sobą następujące: ekspresja mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, prolidazy w błonach płodowych oraz stężenie [ng/ml] prolidazy i MMP-8 w matczynym osoczu. Wyniki przedstawiono w tabelach 20, 21, 22, 23.

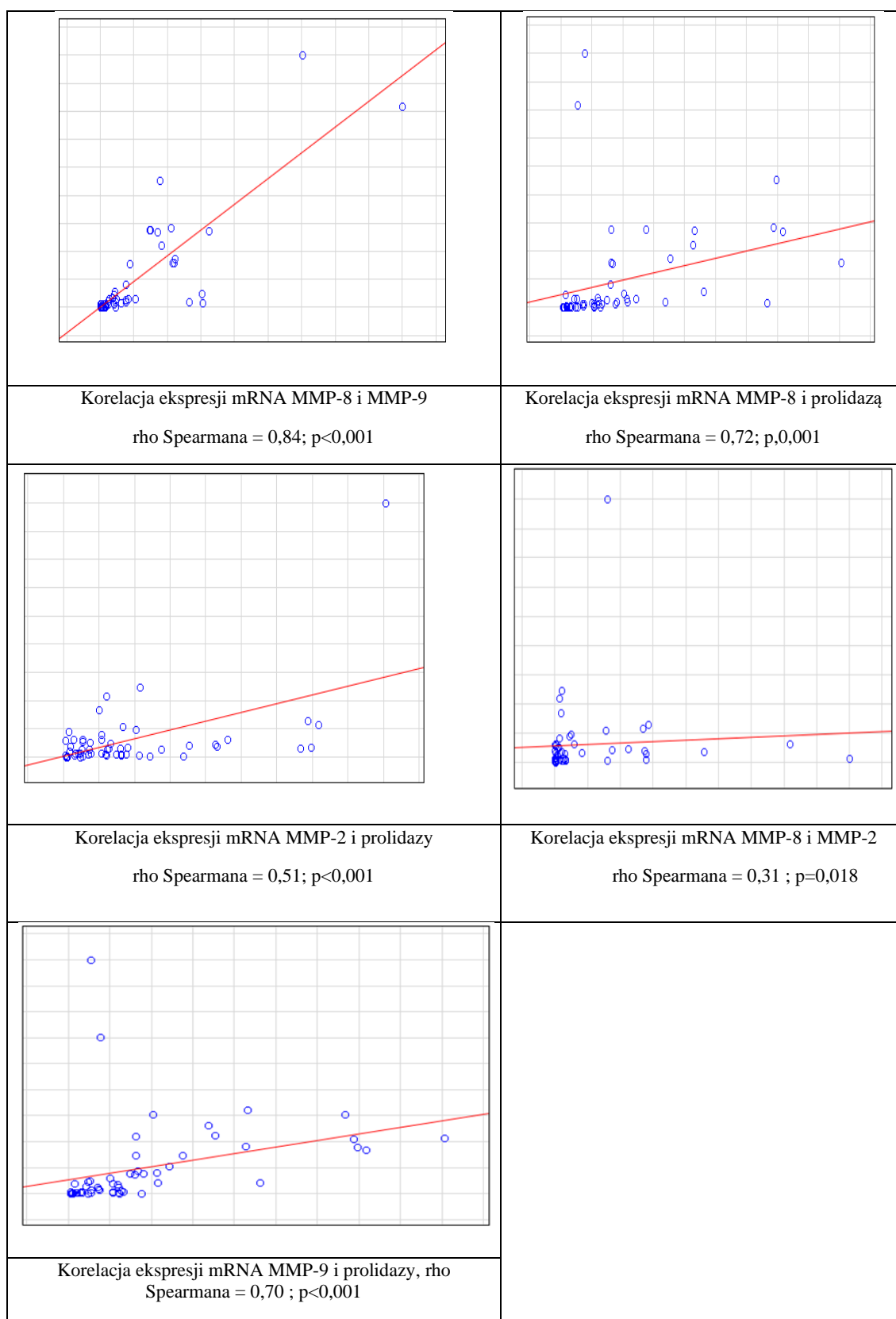
Tabela 20

Analiza korelacji badanych zmiennych w grupie badanej (Grupa 0)

	MMP-1 ekspresja	MMP-2 ekspresja	MMP-8 ekspresja	MMP-9 ekspresja	Prolidaza ekspresja	Prolidaza stężenie	MMP-8 stężenie
MMP-1 ekspresja		rho=0,15 p=0,256	rho=-0,26 p=0,051	rho=-0,2 p=0,135	rho=-0,23 p=0,896	rho=-0,03 p=0,981	rho=-0,17 p=0,207
MMP-2 ekspresja	rho=0,15 p=0,256		rho=0,31 p=0,018	rho=0,25 p=0,057	rho=0,51 p<0,001	rho=-0,09 p=0,945	rho=0,19 p=0,172
MMP-8 ekspresja	rho=-0,26 p=0,051	rho=0,31 p=0,018		rho=0,84 p<0,001	rho=0,72 p<0,001	rho=-0,01 p=0,936	rho=0,19 p=0,155
MMP-9 ekspresja	rho=-0,2 p=0,135	rho=0,25 p=0,057	rho=0,84 p<0,001		rho=0,7 p<0,001	rho=-0,09 p=0,467	rho=0,21 p=0,133
Prolidaza ekspresja	rho=-0,23 p=0,089	rho=0,51 p<0,001	rho=0,31 p=0,0213	rho=0,7 p<0,001		rho=-0,03 p=0,780	rho=0,16 p=0,235
Prolidaza stężenie	rho=0,03 p=0,981	rho=-0,09 p=0,945	rho=-0,01 p=0,936	rho=-0,09 p=0,467	rho=-0,03 p=0,780		rho=-0,09 p=0,430
MMP-8 stężenie	rho=-0,17 p=0,207	rho=0,19 p=0,172	rho=0,19 p=0,155	rho=0,21 p=0,133	rho=0,16 p=0,235	rho=-0,09 p=0,430	

Przedstawiono współczynniki korelacji rho Spearmana między zmiennymi; ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, prolidazy w błonach płodowych oraz stężeniem [ng/ml] prolidazy i MMP-8 w matczynym osoczu. Na czerwono zaznaczono korelacje istotne statystycznie, $p < 0,05$. Źródło: Badanie i opracowanie własne

W grupie badanej (Grupa 0) zaobserwowano cztery istotnie statystycznie dodatnie korelacje wysokiego stopnia: (1). między ekspresją mRNA MMP-8 a ekspresją mRNA MMP-9 ($\rho=0,84$), (2). między ekspresją mRNA MMP-8 a ekspresją mRNA prolidazy ($\rho=0,72$), (3). między ekspresją mRNA MMP-2 a ekspresją mRNA prolidazy ($\rho=0,51$), (4). między ekspresją mRNA MMP-9 a ekspresją mRNA prolidazy ($\rho=0,7$), a także istotną statystycznie korelację umiarkowanego stopnia między ekspresją mRNA MMP-8 a ekspresją mRNA MMP-2 ($\rho=0,31$). Korelacje istotne statystycznie dla grupy badanej przedstawiono na rycinie 24.



Rycina 24. Istotne statystycznie korelacje zmiennych w grupie badanej (Grupa 0).

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 21

Analiza korelacji badanych zmiennych w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3)

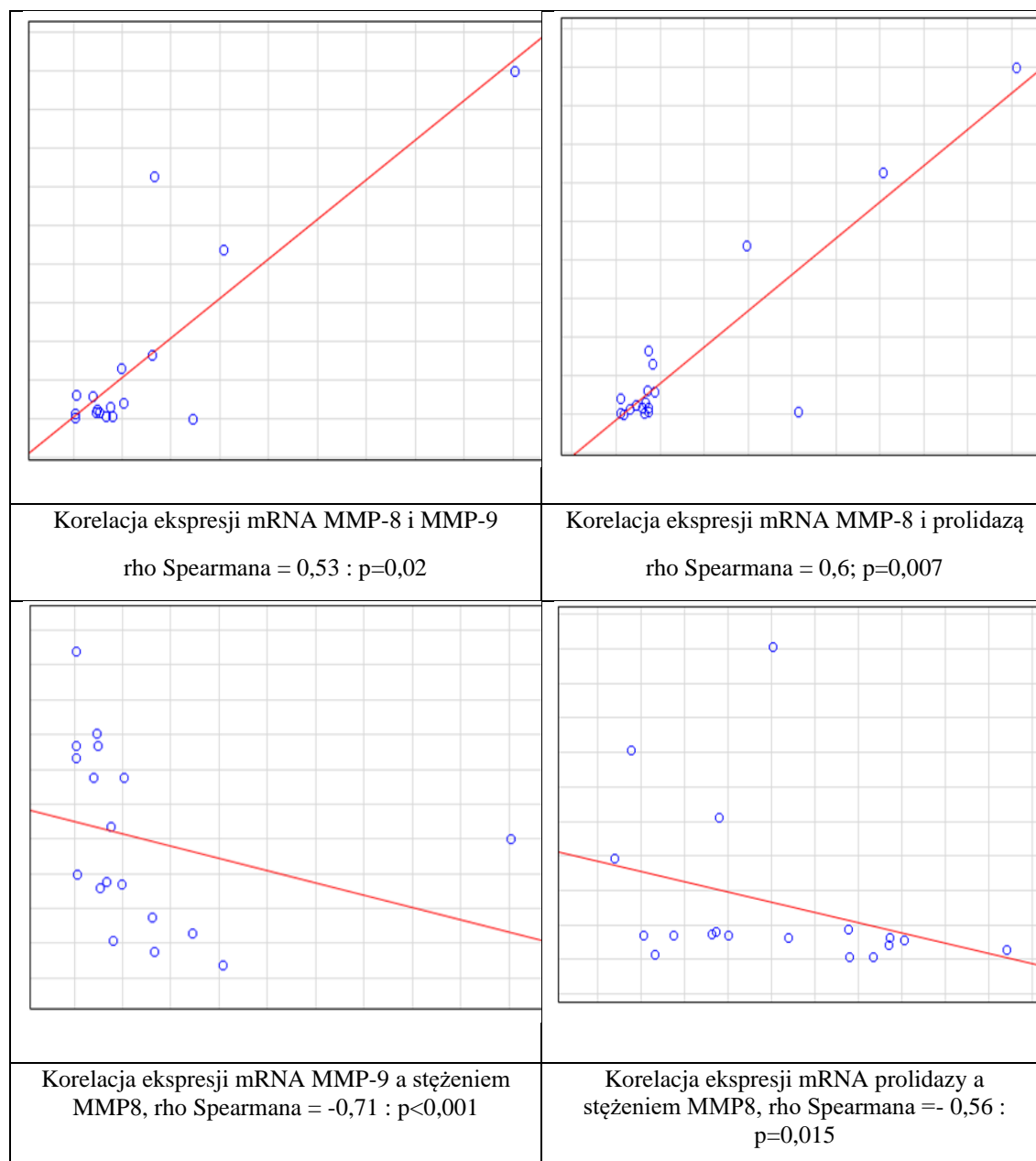
	MMP-1 ekspresja	MMP-2 ekspresja	MMP-8 ekspresja	MMP-9 ekspresja	Prolidaza ekspresja	Prolidaza stężenie	MMP-8 stężenie
MMP-1 ekspresja		rho=0,02 p=0,918	rho=-0,2 p=0,422	rho=0,3 p=0,235	rho=-0,09 p=0,729	rho=0,32 p=0,201	rho=-0,05 p=0,844
MMP-2 ekspresja	rho=0,02 p=0,918		rho=0,25 p=0,299	rho=0,21 p=0,390	rho=0,46 p=0,052	rho=0,33 p=0,173	rho=-0,08 p=0,729
MMP-8 ekspresja	rho=-0,2 p=0,422	rho=0,25 p=0,299		rho=0,53 p=0,020	rho=0,6 p=0,007	rho=-0,04 p=0,867	rho=-0,35 p=0,147
MMP-9 ekspresja	rho=0,3 p=0,235	rho=0,21 p=0,390	rho=0,53 p=0,020		rho=0,45 p=0,060	rho=0,24 p=0,332	rho=-0,71 p<0,001
Prolidaza ekspresja	rho=-0,09 p=0,729	rho=0,46 p=0,052	rho=0,6 p=0,007	rho=0,45 p=0,060		rho=0,27 p=0,275	rho=-0,56 p=0,015
Prolidaza stężenie	rho=0,32 p=0,201	rho=0,33 p=0,173	rho=-0,04 p=0,867	rho=0,24 p=0,332	rho=0,27 p=0,275		rho=-0,19 p=0,321
MMP-8 stężenie	rho=-0,05 p=0,844	rho=-0,08 p=0,729	rho=-0,35 p=0,147	rho=-0,71 p<0,001	rho=-0,56 p=0,015	rho=-0,19 p=0,321	

Przedstawiono współczynniki korelacji rho Spearmana między zmiennymi ; ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, prolidazy w błonach płodowych oraz stężeniem [ng/ml] prolidazy i MMP-8 w matczynym osoczu. Na czerwono zaznaczono korelacje istotne statystycznie.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

W grupie kontrolnej 3 (Grupa 3) zaobserwowano dwie istotne statystycznie dodatnie korelacje wysokiego stopnia: 1. między ekspresją mRNA MMP-8 a ekspresją mRNA

MMP-9 ($\rho=0,53$), 2. między ekspresją mRNA MMP-8 a ekspresją mRNA prolidazy ($\rho=0,6$). Ponadto stwierdzono dwie istotne statystycznie ujemne korelacje wysokiego stopnia: 1. między ekspresją mRNA MMP-9 a stężeniem MMP-8 ($\rho=-0,71$), 2. między ekspresją mRNA prolidazy a stężeniem MMP-8 ($\rho=-0,56$). Korelacje istotne statystycznie dla grupy kontrolnej 3 (Grupa 3) przedstawiono na rycinie 25.



Rycina 25. Istotne statystycznie korelacje zmiennych w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3).

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 22

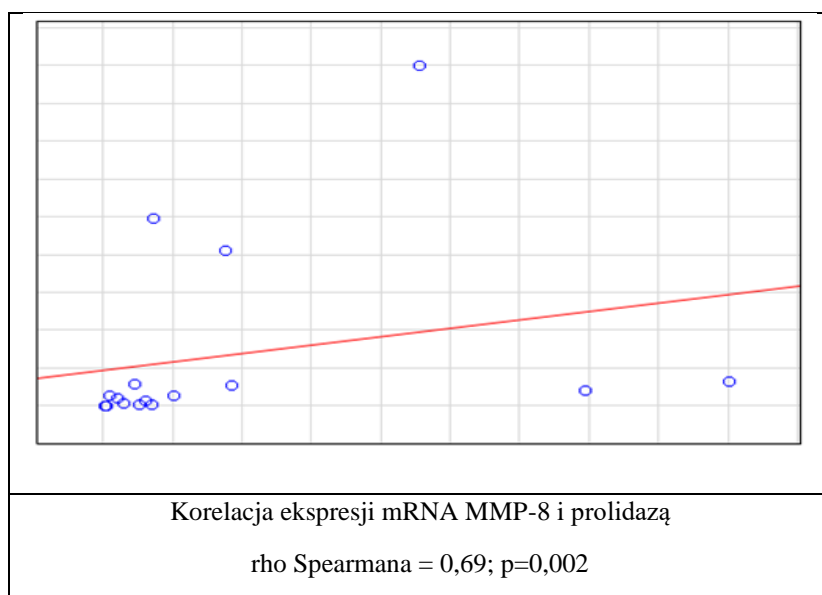
Analiza korelacji badanych zmiennych w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2)

	MMP-1 ekspresja	MMP-2 ekspresja	MMP-8 ekspresja	MMP-9 ekspresja	Prolidaza ekspresja	Prolidaza stężenie	MMP-8 stężenie
MMP-1 ekspresja		rho=0,43 p=0,089	rho=-0,13 p=0,609	rho=0,02 p=0,991	rho=0,05 p=0,837	rho=0,07 p=0,770	rho=-0,31 p=0,248
MMP-2 ekspresja	rho=0,43 p=0,089		rho=0,15 p=0,556	rho=0,02 p=0,913	rho=0,2 p=0,444	rho=-0,17 p=0,520	rho=0,09 p=0,742
MMP-8 ekspresja	rho=-0,13 p=0,609	rho=0,15 p=0,556		rho=0,34 p=0,187	rho=0,69 p=0,002	rho=0,15 p=0,579	rho=0,41 p=0,124
MMP-9 ekspresja	rho=0,02 p=0,991	rho=0,02 p=0,913	rho=0,34 p=0,187		rho=0,47 p=0,065	rho=0,4 p=0,115	rho=-0,21 p=0,443
Prolidaza ekspresja	rho=0,05 p=0,837	rho=0,2 p=0,444	rho=0,69 p=0,002	rho=0,47 p=0,065		rho=0,15 p=0,579	rho=0,38 p=0,159
Prolidaza stężenie	rho=0,07 p=0,770	rho=-0,17 p=0,520	rho=0,15 p=0,579	rho=0,4 p=0,115	rho=0,15 p=0,579		rho=-0,06 p=0,721
MMP-8 stężenie	rho=-0,31 p=0,248	rho=0,09 p=0,742	rho=0,41 p=0,124	rho=-0,21 p=0,443	rho=0,38 p=0,159	rho=-0,06 p=0,721	

Przedstawiono współczynniki korelacji rho Spearmana między zmiennymi; ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, prolidazy w błonach płodowych oraz stężeniem [ng/ml] prolidazy i MMP-8 w matczynym osoczu. Na czerwono zaznaczono korelacje istotne statystycznie.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

W grupie kontrolnej 2 (Grupa 2) zaobserwowano istotną statystycznie dodatnią korelację wysokiego stopnia między ekspresją mRNA MMP-8 a ekspresją mRNA prolidazy ($r=0,69$). Opisywaną korelację przedstawiono na rycinie 26.



Rycina 26. Istotne statystycznie korelacje zmiennych w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2).
Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 23

Analiza korelacji badanych zmiennych w grupie kontrolnej 1 (Grupa 1)

	MMP-1 ekspresja	MMP-2 ekspresja	MMP-8 ekspresja	MMP-9 ekspresja	Prolidaza ekspresja	Prolidaza stężenie	MMP-8 stężenie
MMP-1 ekspresja		rho=0,26 p=0,530	rho=0,09 p=0,822	rho=-0,19 p=0,651	rho=-0,26 p=0,530	rho=0,08 p=1,00	rho=-0,11 p=0,778
MMP-2 ekspresja	rho=0,26 p=0,530		rho=0,19 p=0,651	rho=0,07 p=0,866	rho=0,38 p=0,351	rho=0,28 p=0,492	rho=-0,28 p=0,492
MMP-8 ekspresja	rho=0,09 p=0,822	rho=0,19 p=0,651		rho=0,61 p=0,101	rho=0,57 p=0,138	rho=0,02 p=0,955	rho=-0,52 p=0,182
MMP-9 ekspresja	rho=-0,19 p=0,651	rho=0,07 p=0,866	rho=0,61 p=0,101		rho=0,42 p=0,289	rho=-0,59 p=0,119	rho=-0,09 p=0,822
Prolidaza ekspresja	rho=-0,26 p=0,530	rho=0,38 p=0,351	rho=0,57 p=0,138	rho=0,42 p=0,289		rho=-0,16 p=0,693	rho=-0,23 p=0,570
Prolidaza stężenie	rho=0,08 p=1,00	rho=0,28 p=0,492	rho=0,02 p=0,955	rho=-0,59 p=0,119	rho=-0,16 p=0,693		rho=-0,18 p=0,507
MMP-8 stężenie	rho=-0,11 p=0,778	rho=-0,28 p=0,492	rho=-0,52 p=0,182	rho=-0,09 p=0,822	rho=-0,23 p=0,570	rho=-0,18 p=0,507	

Przedstawiono współczynniki korelacji rho Spearmana między zmiennymi; ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, prolidazy w błonach płodowych oraz stężeniem [ng/ml] prolidazy i MMP-8 w matczynym osoczu.

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

W grupie kontrolnej 1 (Grupa 1) nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie korelacji między badanymi zmiennymi.

4.5.2 Korelacje pomiędzy osoczym stężeniem MMP-8 a wiekiem ciążowym, wiekiem ciążarnych kobiet i masą urodzeniową noworodka

W następnym kroku przetestowano zależność pomiędzy stężeniem MMP-8 we krwi wśród badanych kobiet a następującymi zmiennymi: wiekiem ciążowym, wiekiem ciążarnych kobiet oraz masą urodzeniową noworodka. Wykonano w tym celu analizy korelacji *rho* Spearmana. Wyniki analiz wykonano osobno w czterech grupach: grupy 0, 1, 2 i 3. W tabeli 24 przedstawiono wyniki tej analizy.

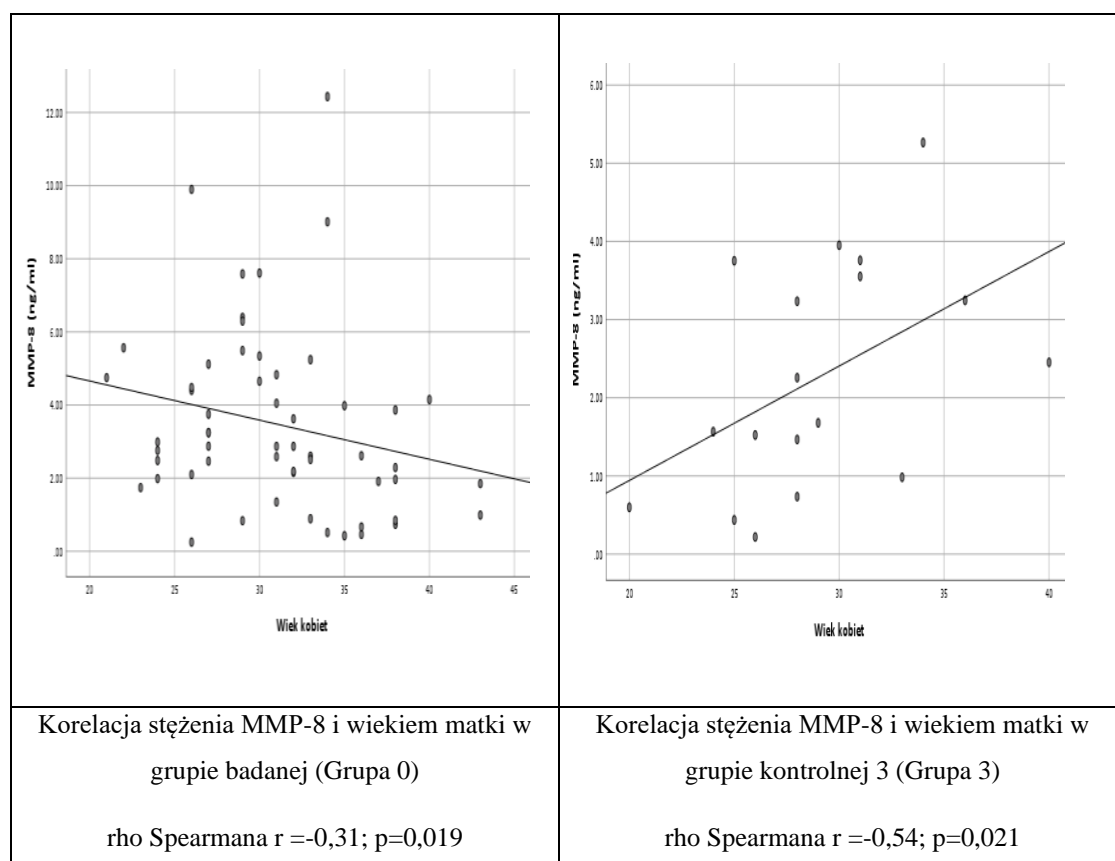
Tabela 24

Korelacje stężenia MMP-8 we krwi z wiekiem ciążowym, wiekiem kobiet oraz masą urodzeniową noworodka

Zmienna	MMP-8 (ng/ml)	
	<i>rho</i> Spearmana	<i>p</i>
Grupa 0 (<i>n</i> = 56)		
Wiek ciążowy	-0,14	0,303
Wiek kobiet	-0,31	0,019
Masa urodzeniowa noworodka	-0,08	0,575
Grupa 1 (<i>n</i> = 8)		
Wiek ciążowy	0,13	0,788
Wiek kobiet	0,07	0,878
Masa urodzeniowa noworodka	0,44	0,272
Grupa 2 (<i>n</i> = 16)		
Wiek ciążowy	0,00	1,000
Wiek kobiet	0,10	0,710
Masa urodzeniowa noworodka	0,14	0,621
Grupa 3 (<i>n</i> = 18)		
Wiek ciążowy	0,09	0,724
Wiek kobiet	0,54	0,021
Masa urodzeniowa noworodka	0,30	0,223

Przedstawiono współczynniki korelacji *rho* Spearmana między zmiennymi; Na czerwono zaznaczono korelacje istotne statystycznie. Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Analiza wykazała istotne statystycznie korelacje jedynie w grupie 0 i w grupie 3 pomiędzy wiekiem kobiet a stężeniem MMP-8 we krwi. W grupie 0 ta korelacja jest umiarkowana i ujemna, co wskazuje na następującą zależność: im młodsze są kobiety, tym wyższy jest u nich poziom MMP-8 we krwi. Z kolei w grupie 3 odnotowano związek dodatni i silny. Wynika z tego, że wraz z wiekiem kobiet w tej grupie, wzrasta u nich stężenie MMP-8. Pozostałe korelacje okazały się nieistotne statystycznie. Korelacje istotne statystycznie przedstawiono na rycinie 27.



Rycina 27. Istotne statystycznie korelacje między stężeniem MMP8 w matczynym osoczu a wiekiem ciężarnej w grupie badanej (Grupa 0) oraz w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3).

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Kolejno sprawdzono, czy rodność różnicuje stężenie MMP-8 we krwi w zależności od grupy (badawczej vs kontrolnych). Liczebności poszczególnych grup zostały przedstawione w tabeli 25.

Tabela 25

Liczebności pierwiastek i wieloródek dla stężenia MMP-8 we krwi przy podziale na grupy badawczą i kontrolne

Grupa	Rodność	
	Pierworódka	Wieloródka
Grupa 0	29	27
Grupa 1	4	4
Grupa 2	8	8
Grupa 3	7	11

Źródło: Badanie i opracowanie własne

Wykonano testy *U* Manna Whitney’a, aby porównać pierworódki i wieloródki pod względem stężenia MMP-8 w grupach: 0, 1, 2 i 3. W tabeli 26 zawarto wyniki tej analizy. Wyniki okazały się nieistotne statystycznie dla każdego porównania. Wynika z tego, że pierworódki nie różnią od wieloródek pod kątem stężenia MMP-8 w każdej analizowanej grupie.

Tabela 26

Porównanie stężenia MMP-8 w zależności od rodności kobiet

MMP-8 (ng/ml) przy podziale na grupy	pierworódka			wieloródka			<i>Z</i>	<i>p</i>	η^2
	średnia ranga	<i>Mdn</i>	<i>IQR</i>	średnia ranga	<i>Mdn</i>	<i>IQR</i>			
Grupa 0	28,74	2,87	2,78	28,24	2,87	2,90	-0,11	0,909	<0,01
Grupa 1	4,75	6,51	5,52	4,25	6,21	5,18	-0,29	0,773	0,01
Grupa 2	6,29	0,71	2,94	8,71	2,46	3,25	-1,09	0,277	0,09
Grupa 3	8,57	1,57	2,51	10,09	2,45	2,78	-0,59	0,556	0,02

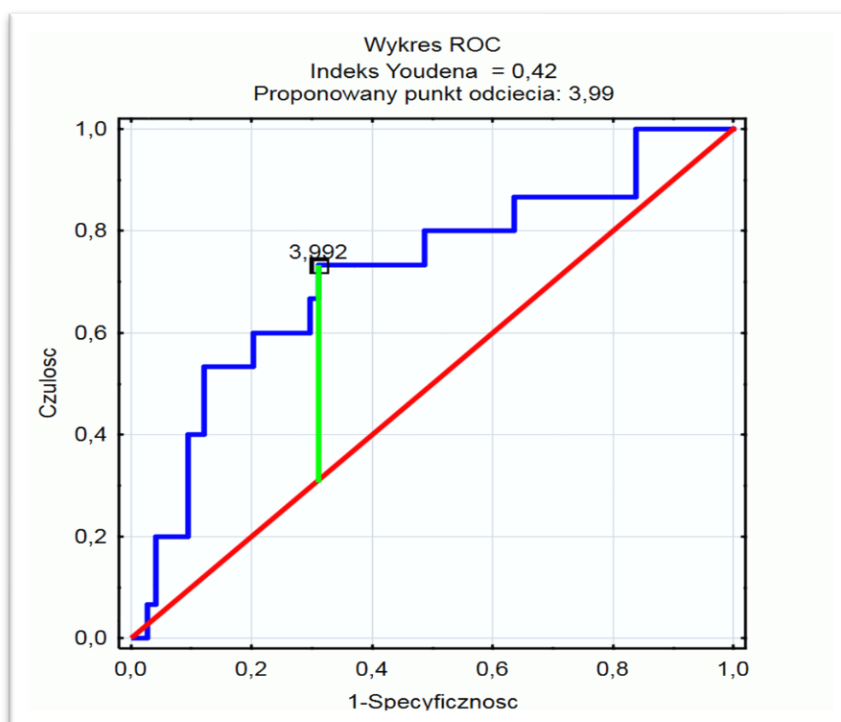
Źródło: Badanie i opracowanie własne

4.6 Krzywe ROC

Wyznaczono krzywe ROC (Receiver Operating Characteristic) celem wyjaśnienia wartości rokowniczej osocznego stężenia MMP-8 w przewidywaniu wystąpienia pęknięcia błon płodowych oraz poszukiwania optymalnego punktu odcięcia.

4.6.1 Analiza krzywych ROC w oparciu o podział na grupę badaną z PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 1 ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych w trakcie terminowego porodu (Grupa 1)

Na podstawie uzyskanych wyników stężenia MMP-8 analizowano wartość predykcyjną ww. parametru w przewidywaniu momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 1. Za progową wartość (cut-off) stężenia MMP-8, różnicującą moment w którym wystąpi pęknięcie błon płodowych w grupie badanej z PROM/PPROM (Grupa 0) oraz w grupie kontrolnej 1 ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych podczas terminowego porodu (Grupa 1), uznano po obliczeniach wartość 3,99 ng/ml. Wartość predykcyjna stężenia MMP-8 w osoczu krwi matki mieściła się w zakresie wartości wyników satysfakcjonujących dla wystąpienia porodowej czynności skurczowej związanej z równoczesnym pęknięciem błon płodowych. Wykazano, że tak skonstruowany test (cut-off 3.99 ng/ml dla stężenia MMP-8 w osoczu) charakteryzuje się 70 % czułością oraz 73 % swoistością i polem pod krzywą ROC (ang. area under curve AUC) rzędu 0,717 %. Dodatnia wartość predykcyjna testu (ang. positive predictive value PPV) wyniosła 72 % a ujemna (ang. negative predictive value NPV) 71% (rycina 28, tabela 27).



Rycina 28. Osoczowe stężenie MMP-8 w predykcji momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 1 (krzywa ROC, AUC=0,717).
Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 27

Charakterystyka testu w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 1 (Grupa 1)

	<u>Grupa badana 0</u> Przedwczesne pęknięcie błon płodowych	<u>Grupa kontrolna 1</u> Spontaniczne pęknięcie błon płodowych w trakcie regularnej czynności skurczowej podczas porodu w terminie
Dodatni <3.99	70%	27%
Ujemny >3.99	30%	73%

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

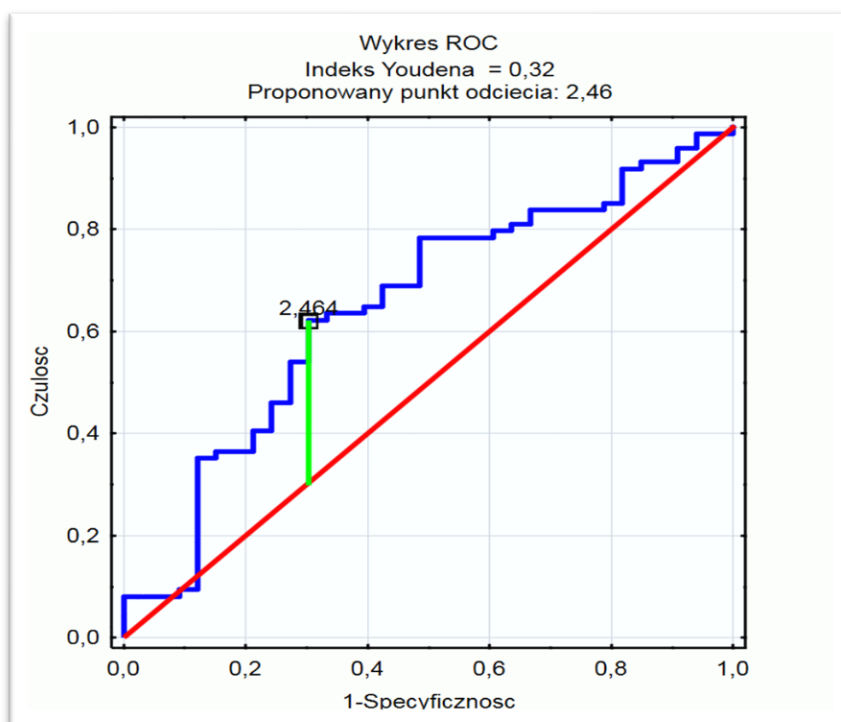
Czułość = 70%, swoistość = 73%, $p=0.004$,

PPV= 72%; NPV=71%; dokładność (wiarygodność testu) = 72%

Wnioski: Oznaczanie stężenia MMP8 w osoczu matki może stanowić marker diagnostyczny przy wartości odcięcia (cut-off) 3.99 ng/ml wskazujący na wystąpienie skurczowej czynności porodowej związanej z równoczesnym pęknięciem błon płodowych. Czułość i swoistość testu wynosi 70% i 73% odpowiednio ($p=0,004$).

4.6.2 Analiza krzywych ROC w oparciu o podział na grupę badaną z PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 2 z ciążarnymi w ciąży donoszonej bez czynności skurczowej (Grupa 2)

Na podstawie uzyskanych wyników stężenia MMP-8 analizowano wartość predykcyjną ww. parametru w przewidywaniu momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupę badaną z PROM/PPR (Grupa 0) oraz grupę kontrolną 2 reprezentowaną przez ciężarne w ciąży donoszonej bez czynności skurczowej (Grupa 2). Za progową wartość (cut-off) stężenia MMP8, różnicującą moment w którym wystąpi pęknięcie błon płodowych w grupie badanej z PROM/PPROM (Grupa 0) oraz grupie kontrolnej 2 (Grupa 2), uznano po obliczeniach wartość 2,46 ng/ml. Wartość predykcyjna stężenia MMP-8 w osoczu krwi matki mieściła się w zakresie wartości wyników średnich dla wystąpienia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych w ciąży donoszonej. Wykazano, że tak skonstruowany test (cut-off 2,46 ng/ml dla stężenia MMP-8 w osoczu) charakteryzuje się 62 % czułością oraz 64 % swoistością. Pole pod krzywą ROC dla testu oceniającego predykcję wystąpienia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych na podstawie stężenia MMP-8 w osoczu ciężarnych osiągnęło wartość 0,649. Dodatnia wartość predykcyjna testu (ang. positive predictive value PPV) wyniosła 63 % a ujemna (ang. negative predictive value NPV) 63% (rycina 29, tabela 28).



Rycina 29. Osoczowe stężenie MMP-8 w predykcji momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 2 (krzywa ROC, AUC=0,649).
Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 28

Charakterystyka testu w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 2 (Grupa 2)

	<u>Grupa badana 0</u> Przedwczesne pęknięcie błon płodowych	<u>Grupa kontrolna 2</u> Cięża donoszona bez znak porodu, ciągłość błon płodowych zachowana
Dodatni >2,46	62%	36%
Ujemny <2,46	38%	64%

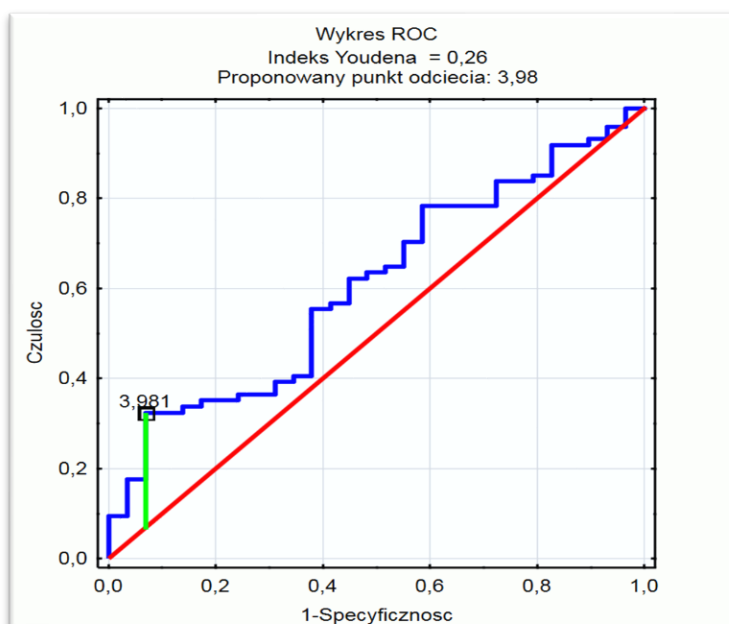
Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Czułość = 62%; Swistość = 64%; $p=0,013$

PPV = 63%; NPV = 63%; dokładność (wiarygodność testu) = 63%

4.6.3 Analiza krzywych ROC w oparciu o podział grupę badaną z PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 3 z ciężarnymi z zachowaną ciągłością błon płodowych mimo regularnej, porodowej czynności porodowej (Grupa 3)

Na podstawie uzyskanych wyników stężenia MMP-8 analizowano wartość predykcyjną ww. parametru w przewidywaniu momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupę badaną z PROM/PPROM (Grupa 0) oraz grupę kontrolną 3 z ciężarnymi, u których mimo regularnej, porodowej czynności skurczowej nie dochodziło do spontanicznego pęknięcia błon płodowych (Grupa 3). Za progową wartość (cut-off) stężenia MMP-8, różnicującą moment w którym wystąpi pęknięcie błon płodowych w grupie badanej z PROM/PPROM (Grupa 0) oraz w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3), uznano po obliczeniach wartość 3,98 ng/ml. Wartość predykcyjna stężenia MMP-8 w osoczu krwi matki mieściła się w zakresie wartości wyników średnich dla pęknięcia błon płodowych dla wystąpienia porodowej czynności skurczowej związanej z równoczesnym pęknięciem błon płodowych. Wykazano, że tak skonstruowany test (cut-off 3,98 ng/ml dla stężenia MMP-8 w osoczu) charakteryzuje się tylko 30 % czułością oraz aż 93 % swoistością. Pole pod krzywą ROC dla testu oceniającego predykcję wystąpienia pęknięcia błon płodowych na podstawie stężenie MMP-8 w osoczu ciężarnych osiągnęło wartość 0,607. Dodatnia wartość predykcyjna testu (ang. positive predictive value PPV) wyniosła 81 % a ujemna (ang. negative predictive value NPV) 57% (rycina 30, tabela 29).



Rycina 30. Osoczowe stężenie MMP-8 w predykcji momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 3 (krzywa ROC, AUC=0,607).

Źródło: Badanie i opracowanie własne

Tabela 29

Charakterystyka testu w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 3 (Grupa 3)

	<u>Grupa badana 0</u> Przedwczesne pęknięcie błon płodowych	<u>Grupa kontrolna 3</u> Brak samoistnego pęknięcia pęcherza płodowego podczas porodu, mimo regularnej czynności skurczowej
Dodatni >3.98	30%	7%
Ujemny <3.98	70%	93%

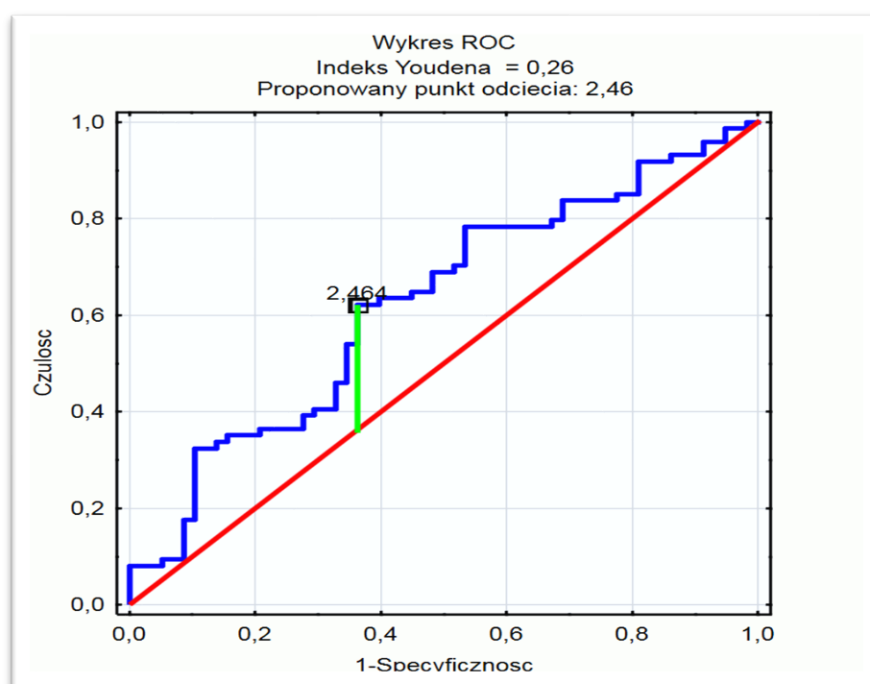
Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Czułość = 30%; Swistość = 93%; $p=0,027$

PPV=81%; NPV=57%; dokładność (wiarygodność testu) = 61%

4.6.4 Analiza krzywych ROC w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 2+3 z ciężarnymi z zachowaną ciągłością błon płodowych (zarówno podczas porodu jak i bez) (Grupa 2+3)

Na podstawie uzyskanych wyników stężenia MMP-8 analizowano wartość predykcyjną ww. parametru w przewidywaniu momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 2+3. Za progową wartość (cut-off) stężenia MMP-8, różnicującą moment w którym wystąpi pęknięcie błon płodowych w Grupie 0 oraz Grupie 2+3, uznano po obliczeniach wartość 2,46 ng/ml. Wartość predykcyjna stężenia MMP-8 w osoczu krwi matki mieściła się w zakresie wartości wyników średnich dla wystąpienia pęknięcia błon płodowych. Wykazano, że tak skonstruowany test (cut-off 2,46 ng/ml dla stężenia MMP-8 w osoczu) charakteryzuje się 62% czułością oraz 60 % swoistością. Pole pod krzywą ROC dla testu oceniającego predykcję wystąpienia pęknięcia błon płodowych na podstawie stężenie MMP-8 w osoczu ciężarnych z Grupy 0 i Grupa 2+3 miało wartość 0,625. Dodatnia oraz ujemna wartość predykcyjna testu (PPV i NPV) wyniosła 61 % (rycina 31, tabela 30).



Rycina 31. Stężenie MMP-8 w predykcji momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 2+3 (krzywa ROC, AUC=0,607).

Źródło: Badanie i opracowanie własne.

Tabela 30

Charakterystyka testu w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 2+3 (Grupa 2+3)

	<u>Grupa badana 0</u> Przedwczesne pęknięcie błon płodowych	<u>Grupa kontrolna 2+3</u> Zachowana ciągłość błon płodowych (zarówno podczas porodu jak i bez)
Dodatni >2.46	62%	40%
Ujemny < 2.46	38%	60%

Czułość = 62%; swoistość 60%; $p=0.0099$

PPV = 61%; NPV = 61%; dokładność (wiarygodność testu) = 61%

5. DYSKUSJA

Rozwijający się płód otoczony jest owodnią i kosmówką, zwanych wspólnie błoną płodową. W czasie trwania ciąży błony płodowe przechodzą przez proces zaprogramowanej przebudowy kolagenolitycznej celem dostosowania się błon do rosnącego ciśnienia i objętości macicy w miarę postępu ciąży [201, 213]. Udowodniono, że homeostaza macierzy pozakomórkowej jest kluczowym procesem w utrzymaniu wytrzymałości na rozciąganie błon płodowych [15]. W prawidłowo przebiegającej ciąży błony płodowe pozostają nienaruszone aż do chwili terminowego porodu, kiedy to pęknięcie błon płodowych (ang. *Rupture Of Membranes, ROM*) występuje naturalnie i spontanicznie podczas skurczowej czynności porodowej lub jest wywoływane przez lekarza ze wskazań położniczych.

Powszechnie uważa się, że spontaniczne pęknięcie błon płodowych podczas porodu jest konsekwencją sił mechanicznych generowanych przez mięśniówkę macicy oraz obecności postępujących zmian zachodzących w szyjce macicy. Jest to jednak wyraźnie uproszczone pojęcie, ponieważ błony płodowe ulegają także biochemicznym zmianom w okresie okołoporodowym, co dowodzi tezie, że czysto mechaniczny aspekt rozerwania błon płodowych nie może dostatecznie wyjaśnić etiologii spontanicznego przerwania ciągłości błon płodowych podczas porodu w terminie.

W latach 90. oceniano łożyska uzyskane po porodzie odbytym po ukończonym 37. tygodniu ciąży, aby lepiej zrozumieć histologię miejsc pęknięcia błon. Zostało udowodnione, iż we wszystkich przypadkach ROM błony płodowe pękają w obszarach, które wykazują osłabienie [206]. Quintero i in. potwierdzili endoskopowo, że ten osłabiony region błon jest zwykle zlokalizowany bezpośrednio nad wewnętrznym ujściem szyjki macicy [206]. Dodatkowo McLaren i in. wykazali, że region ten miał grubszą warstwę tkanki łącznej i cieńsze warstwy cytotrofoblastu niż regiony błon w pobliżu łożyska lub w połowie drogi między łożyskiem a szyjką macicy [214].

Zaproponowano, aby miejsce zmienionej struktury błon nazwać „strefą zmienionej morfologii”. Zmiany, które zauważono były konsekwencją dezorganizacji i rozerwania włókien kolagenowych. Kolagen zawarty w macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych jest podatny na degradację przez MMPs [210, 214].

Dowód na to, że aktywność MMPs jest ważna dla pęknięcia błony płodowej obejmuje obserwację, że ekspresja mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-11 w błonach płodowych wzrasta w czasie porodu terminowego jak i przedwczesnego [121, 122]. Wykazano także wzrost stężenia w płynie owodniowym MMP-1, MMP-2, MMP-3 w trakcie porodu [23, 123, 136, 137, 238, 239]. Ponadto w pracy Athayde i wsp. oraz Fortunato i wsp. wykazano zwiększoną koncentrację MMP-8 w płynie owodniowym podczas porodu, jednak ci sami badacze nie udowodnili z kolei ekspresji mRNA MMP-7 i MMP-8 w błonach płodowych [232, 239, 240].

Zwiększona kolagenoliza i spadek zawartości kolagenu w błonach związany z aktywacją MMPs zostały udokumentowane zarówno podczas porodu, jak i w patologii przedwczesnego pęknięcia błon płodowych [162, 215]. Piśmiennictwo podaje, że w 10% ciąż donoszonych błony płodowe pękają przed rozpoczęciem się porodu, co definiuje się jako pęknięcie błon przed porodem (PROM) [65]. W 40% porodów przedwczesnych błony płodowe pękają przed rozpoczęciem porodowej czynności skurczowej (przedwczesne pęknięciem błon płodowych przed terminem-PPROM) [65].

Ostatnie badania identyfikują aktywację cytokin i metaloproteinaz macierzowych, stres oksydacyjny i apoptozę jako główne szlaki prowadzące do przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. Tak więc zarówno PPRM jak i PROM reprezentuje wspólny punkt końcowy dla kilku unikalnych patologicznych zdarzeń, które prawdopodobnie działają synergicznie, aby osłabić membrany i sprawić, że będą one predysponowały do pęknięcia [237].

W obliczu obecnego stanu wiedzy nie brakuje sprzecznych wyników, które niestety nie pozwalają wyciągnąć klarownych wniosków co do znaczenia określonych MMPs w rozwoju wspomnianych położniczych patologii. Dzieje się tak z uwagi fakt, iż pomimo upływu lat, mechanizmy doprowadzające do przedwczesnego pęknięcia błon są nadal słabo poznane [60].

W prezentowanej rozprawie doktorskiej swoją uwagę skupiałam na ocenie udziału określonych metaloproteinaz i prolidazy jako czynników degradujących macierz zewnątrzkomórkową błon płodowych i odgrywających istotną rolę w kaskadzie prowadzącej do PROM/PPROM, ale też udokumentowałam znaczenie określonych metaloproteinaz w mechanizmie spontanicznego pęknięcia błon podczas terminowego porodu.

W pracy Maymona i wsp. w przypadku oceny MMP-8 w płynie owodniowym udowodniono wzrost stężenia MMP-8 podczas porodu w ciąży terminowej [205]. Średnie stężenie MMP-8 w płynie owodniowym w ciąży donoszonej bez czynności skurczowej wynosiło 3,3 ng/mL; *PMK* 0,06-38,6 ng/mL, natomiast podczas porodu terminowego średnia wartość znacząco wzrosła i wynosiła 16,6 ng/mL; *PMK* 0,33-1650 ng/mL; $p < 0,05$. Oceniając stężenie MMP-8 w matczynym osoczu uzyskałam podobną zależność w wynikach stężenia MMP-8 w matczynym osoczu przy porównaniu grupy pacjentek w ciąży donoszonej bez porodu (Grupa 2) z grupą pacjentek rodzących w terminie ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1). Stężenie w osoczu MMP-8 było wyższe podczas terminowego porodu ze spontanicznym przzerwaniem błon płodowych (Grupa 1); *Mdn*: 5,85 ng/ml; *PMK*: 2,99-6,61 ng/ml) w porównaniu z ciążą donoszoną z zachowanymi błonami płodowymi przed porodem (Grupa 2); *Mdn*: 1,62 ng/ml; *PMK*: 1,08-2,89 ng/ml; $p = 0,001$; (tabela 14, 15). Również ekspresja genu MMP-8 w błonach płodowych była prawie 4-krotnie wyższa podczas porodu o czasie ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1); *Mdn*: 5,31; *PMK*: 3,14-8,97) w porównaniu z ciążą terminową bez czynności skurczowej (Grupa 2); *Mdn*: 1,41; *PMK*: 0,28-3,06, jednak wynik ten nie osiągnął istotności statystycznej, $p = 0,194$ (tabela 11, 12).

Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej sugerują, iż występowanie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych jest związane ze wzrostem ekspresji mRNA MMP-8 w błonach płodowych oraz wzrostem stężenia metaloproteinazy-8 w osoczu kobiet ciężarnych w sytuacji nieobecności ogólnego stanu zapalnego.

W zaprezentowanym badaniu, dokonując analizy ekspresji mRNA MMP-8 w błonach płodowych, wykazano istotną statystycznie nadekspresję mRNA MMP-8 wśród pacjentek z patologią przedwczesnego pęknięcia błon płodowych (Grupa 0); *Mdn*: 4,29; *PMK*: 0,66-9,88 w porównaniu do pacjentek rodzących drogami i siłami natury o czasie z jatrogennym pęknięciem błon płodowych wykonanym ze wskazań położniczych (Grupa 3); *Mdn*: 0,96; *PMK*: 0,21-4,87; $p = 0,04$ (tabela 11, 12). Trzy razy większą ekspresję genu MMP-8 wykazano również u pacjentek z PROMM/PROM (Grupa 0) przy porównaniu z pacjentkami nierodzącymi w ciąży donoszonej (Grupa 2), jednak wynik ten nie osiągnął statystycznej istotności, odpowiednio *Mdn*: 4,29; *PMK*: 0,66-9,88 vs *Mdn*: 1,41; *PMK*: 0,28-3,06; $p = 0,87$. Być może z uwagi na stosunkowo małą liczebność badanych grup oraz dodatkowo dysproporcję w liczbie ciężarnych uczestniczek badania w omawianych grupach, odpowiednio $n = 56$ dla grupy 0 i $n = 16$ dla grupy 2, zależność ta

nie uzyskala istotności statystycznej. Ponadto okazało się, że przedwczesne pęknięcie błon płodowych (Grupa 0) jest związane ze wzrostem ekspresji mRNA MMP-8; *Mdn*: 4,29; *PMK*: 0,66-9,88 przy porównaniu z ciążą donoszoną z zachowanymi błonami płodowymi, zarówno w trakcie zaawansowanego porodu jak i bez porodowej czynności skurczowej (Grupa 2+3); *Mdn*: 1,23; *PMK*: 0,25-3,27; $p=0,019$ (tabela 11, 12).

Z kolei produkt genu MMP-8 oznaczony w osoczu tych ciężarnych kobiet i oceniony w tym samym układzie grup także wykazywał już istotnie statystycznie wyższe stężenie w przypadku przedwczesnego pęknięcia błon płodowych (Grupa 0) zarówno przy porównaniu z ciążą donoszoną bez porodu (Grupa 2) oraz przy porównaniu z grupami z zachowanymi błonami płodowymi po ukończonym 37. tygodniu ciąży (Grupa 2+3), odpowiednio *Mdn*: 2,62ng/ml; *PMK*:1,85-4,24 ng/ml dla grupy 0 vs *Mdn*: 1,62 ng/ml; *PMK*: 1,08-2,86ng/ml; $p=0,014$ dla grupy 2, *Mdn*: 2,62 ng/ml; *PMK*:1,85-4,24 ng/ml dla grupy 0 vs *Mdn*: 2,02 ng/ml; *PMK*: 1,05-3,40 ng/ml; $p=0,014$ dla grupy 2+3. Również przy porównaniu stężenia MMP-8w osoczu ciężarnych kobiet z grupy badanej (Grupa 0) ze stężeniem badanego enzymu we krwi ciężarnych z grupy kontrolnej 3, gdzie mimo regularnej, porodowej czynności skurczowej błony płodowe nie ulegały spontanicznemu przerwaniu i zachodziła konieczność jatrogennego przerwania owych błon ze wskazań położniczych (Grupa 3), zaobserwowano wyższe stężenie MMP-8 w osoczu ciężarnych z grupy PROM/PPROM (Grupa 0), odpowiednio *Mdn*: 2,62 ng/ml; *PMK*:1,85-4,24 ng/ml dla grupy 0 vs *Mdn*: 2,26 ng/ml; *PMK*: 1,11-3,55 ng/ml. Rezultat ten okazał się istotny na poziomie tendencji statystycznej; $p=0,092$). Oznaczanie stężenia MMP-8 w osoczu matki przy wartości odcięcia (cut-off) 2,46 ng/ml wskazuje na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych przed wystąpieniem czynności skurczowej w ciąży donoszonej. Czulość i swoistość testu wynosi 62% i 64%, $p=0,013$ (rycina 29, tabela 28).

W prezentowanej pracy doktorskiej nie została wykazana natomiast istotna różnica w ekspresji mRNA omawianego enzymu pomiędzy grupą badaną z patologia PROM/PPROM (Grupa 0) a grupą kontrolną ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych w ciąży donoszonej podczas porodu drogami i siłami natury (Grupa 1). Co więcej, w tych dwóch grupach mediany ekspresji mRNA MMP-8 były na podobnym poziomie, odpowiednio *Mdn* 4,29 vs *Mdn* 5,31; $p=0,687$. Wiadomym jest, że metaloproteinaza macierzy 8 czyli kolagenaza neutrofilowa degraduje kolageny śródmiażdżowe działając preferencyjnie na kolagen typu I, który zapewnia główną

wytrzymałość na rozciąganie błon płodowych. Dlatego być może uzyskanie zbliżonych wartości ekspresji genu MMP-8 stanowi pośredni dowód na to, że metaloproteinaza macierzowa 8 jest zaangażowana zarówno w proces spontanicznego pęknięcia błon płodowych podczas terminowego porodu w trakcie występowania regularnej czynności skurczowej, jak i w proces patologicznego przedwczesnego przerwania ciągłości błon płodowych.

Z kolei poród terminowy ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1) jest związany ze wzrostem osoczowego stężenia MMP-8; *Mdn*: 5,85 ng/ml; *PMK*: 2,99-6,61 ng/ml przy porównaniu z patologicznym przedwczesnym pęknięciem błon płodowych (Grupa 0); *Mdn*: 2,62 ng/ml; *PMK*: 1,85-4,24 ng/ml); $p=0,008$ (tabela 14). Dodatkowo oznaczenie stężenia MMP-8 w osoczu matki może stanowić przy wartości odcięcia (cut-off) 3.99 ng/ml marker wskazujący na wystąpienie skurczowej czynności porodowej związanej z równoczesnym pęknięciem błon płodowych. Czulość i swoistość testu wynosi odpowiednio 70% i 73%; $p=0.004$ (rycina 28, tabela 27).

Kontynuując, w niniejszej rozprawie wykazano, iż przerwanie błon płodowych, zarówno przedwczesne jak i spontaniczne podczas terminowego porodu (Grupa 0+1), jest związane ze wzrostem ekspresji mRNA MMP-8; *Mdn*: 5,09; *PMK*: 0,72-23,14 przy porównaniu z ciążą donoszoną z zachowanymi błonami płodowymi, zarówno w trakcie porodu jak i przed porodem (Grupa 2+3); *Mdn*: 1,07; *PMK*: 0,25-2,8); $p=0,006$ (tabela 11, 12). Także osoczowe stężenie MMP-8 było wyższe u pacjentek w przypadku przerwania ciągłości błon płodowych, zarówno w sytuacji PROM/PPROM jak i spontanicznego pęknięcia błon płodowych podczas terminowego porodu (Grupa 0+1); *Mdn*: 2,87 ng/ml; *PMK*: 1,96-5,12 ng/ml przy porównaniu z pacjentkami w ciąży donoszonej z zachowanymi błonami płodowymi, zarówno tymi nierodzącymi jak i tymi w trakcie porodu płodowych (Grupa 2+3); *Mdn*: 2,03 ng/ml; *PMK*: 1,11-3,39); $p=0,001$.

Interesującym badaniem okazało się badanie Biggio JR Jr i wsp. z 2005 [216]. W swoim badaniu autor podjął próbę ustalenia, czy poziomy stężenie MMP-8 w płynie owodniowym w drugim trymestrze ciąży są związane z wystąpieniem w późniejszym okresie patologii PROM. Badanie obejmowało 57 bezobjawowych ciężarnych, które przeszły amniopunkcję genetyczną pomiędzy 14. a 21. tygodniem ciąży, a następnie doświadczyły przedwczesnego pęknięcia błon. Grupę kontrolną stanowiło 58 kobiet z późniejszym terminowym porodem, bez patologii PROM. Okazało się, że ogólny

rozkład stężeń metaloproteinazy macierzy-8 w płynie owodniowym był podobny u kobiet, u których wystąpiło przedwczesne pęknięcie błon oraz kobiet z grupy kontrolnej (mediana 2,39 ng / ml, 25 do 75 percentyla 1; 1-10,1 vs 2,37 ng/ml,; 25 do 75 percentyla 1,5-4,7; $p = 94,26$). Jednak u 26 % kobiet z grupy kontrolnej z późniejszym PROM średni poziom stężenia MMP-8 w płynie owodniowym w trakcie drugiego trymestru ciąży były powyżej 90. percentyla (8,7 ng/mL). Taki wynik odnotowano tylko u 10% kobiet z grupy kontrolnej, bez wystąpienia patologii PROM w trzecim trymestrze ciąży. Podwyższony poziom stężenia MMP-8, po adjustacji do zmiennych takich jak wiek matki, rasa, rodność i wiek ciążowy, jest związany z wystąpieniem PROM w późniejszym czasie trwania ciąży. Autorzy wysnuli istotne wnioski, iż mimo brak wystąpienia istotnych różnic w poziomach stężenia MMP-8 w płynie owodniowym pobranym w drugim trymestrze, stwierdzenie podwyższonych poziomów stężenia MMP-8 w płynie owodniowym w drugim trymestrze silnie koreluje z wystąpieniem PROM w trzecim trymestrze ciąży. Ważną konkluzją płynącą z przytoczonego badania jest to, iż procesy patofizjologiczne, które przyczyniają się do przedwczesnego pęknięcia błon, mogą rozpocząć się już na wczesnym etapie ciąży [216].

Przyjmuje się, że pęknięcie błon płodowych wynika z działania sił fizycznych w obszarach błon osłabionych degradacją kolagenów zawartych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Już Skinner i wsp. w 1981 roku w swojej pracy oceniającej zawartość kolagenu w ludzkich błonach owodniowych dowiódł, że zawartość kolagenu w błonach owodniowych istotnie zmniejszyła się między 32 a 40. tygodniem ciąży z 446 do 362 mikrogramów/mg ($r=0,588$; $p<0,001$) u pacjentów bez PROM i od 393 do 332 mikrogramów/mg ($r=-,362$; $p<0,05$) u pacjentów z PROM (okres utajony między pęknięciem błony a porodem nie wiązał się ze spadkiem zawartości kolagenu) [202].

Zaobserwowane zmiany w zawartości kolagenu w błonach płodowych w czasie ciąży oraz różnice obserwowane w przypadku PROM sugerują, że osłabienie owodni w przygotowaniu do pęknięcia może być częściowo zdeterminowane czynnikami kontrolującymi syntezę i degradację kolagenu [213]. Teza o miejscowej aktywności enzymatycznej powodującej degradację kolagenu zawartego w macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych i tym samym sprzyjającej procesowi pęknięcia błon płodowych została zaproponowana także przez badaczy Halaburt'a i wsp. w pracy z 1989 roku oraz Vadillo-Ortega z wsp. w publikacji z 1990 roku [214, 215].

W prezentowanej przeze mnie rozprawie, oceniającej udział wybranych metaloproteinaz w występowaniu zjawiska przedwczesnego pęknięcia błon płodowych zaobserwowano, iż ekspresja MMP-1 w błonach płodowych w grupie kobiet z patologią przedwczesnego pęknięcia błon płodowych (Grupa 0) jest znacząco niższa od ekspresji tej metaloproteinazy w błonach płodowych kobiet rodzących drogami i siłami natury za spontanicznym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1), odpowiednio *Mdn* 1,15; *PMK*: 0,21-4,79 dla grupy 0 oraz *Mdn* 6,55 *PMK*: 3,03-7,59 dla grupy 1; $p=0,044$. Przy porównaniu wyników ekspresji mRNA MMP-1 między grupą z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) a grupą ciężarnych w ciąży donoszonej nierodzących (Grupa 2) uzyskano podobne wartości median ekspresji wspomnianej metaloproteinazy, odpowiedni *Mdn* 1,15; *PMK*: 0,21-4,79 vs *Mdn* 1,29; *PMK*: 0,49-6,06 $p=0,907$ (tabela 11, 12). Dane te są tylko częściowo spójne z wynikami Maymon'a i wsp. z 2000 roku [12]. Porównując wówczas wyniki stężeń MMP-1 w płynie owodniowym pacjentek z PROM do wyników pacjentek rodzących o czasie Maymon i wsp. także udowodnili niższe statystycznie stężenie MMP-1 w grupie z patologią PROM. Jednakże Maymon i wsp. odnotowali niższe statystycznie stężenia MMP-1 w grupie z patologią PROM w porównaniu z grupą pacjentek nierodzących będących w ciąży donoszonej bez porodu [12], co jest wynikiem odmiennym do tego, który uzyskano w prezentowanej pracy.

Dodatkowo Maymon i wsp. w swojej pracy wykazali wyższe stężenie MMP-1 w płynie owodniowym w przypadku przedwczesnego pęknięcia błon płodowych przed terminem (PPROM) zarówno w sytuacji braku jak i obecności objawów infekcji wewnątrzmacicznej [12]. W niniejszej pracy takiej zależności nie badano.

Być może różnic w uzyskanych wynikach należy upatrywać w nieco odmiennym składzie grupy z patologią przedwczesnego pęknięcia błon płodowych oraz innym medium użytym w badaniu MMP-1. W prezentowanej rozprawie do grupy badanej zakwalifikowano razem pacjentki, które doświadczyły jakiegokolwiek patologii pęknięcia błon płodowych przed wystąpieniem porodu (zarówno PROM jak i PPRM). W pracy Maymon'a analiza dotyczyła porównania stężenia MMP-1 w płynie owodniowym osobno dla grupy pacjentek z patologią PROM oraz PPRM.

Porównując z kolei wyniki ekspresji MMP-1 w błonach płodowych w grupach kontrolnych, czyli wśród pacjentek w ciążach donoszonych do danych z piśmiennictwa zauważyłam częściowo podobne korelacje. W pracy z 2000 roku

Maymon i wsp. [12] oceniając stężenie MMP-1 w płynie owodniowym nie wykazał istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniem wspomnianej metaloproteiny w grupie kobiet w ciąży donoszonej bez towarzyszącego porodu w porównaniu do grupy ciężarnych kobiet w ciąży donoszonej w trakcie porodu. Skoordynowanego z terminowym porodem wzrostu aktywności MMP-1 w surowicy krwi nie udowodnił również Morrison i wsp. [236]. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach nie została wykazana istotna statystyczna różnica pomiędzy wynikami ekspresji genu MMP-1 w błonach płodowych w grupie pacjentek rodzących o czasie z wywołanym przez lekarza przerwaniem ciągłości błon płodowych (Grupa 3) w porównaniu do grupy ciężarnych w ciąży donoszonej bez towarzyszącego porodu (Grupa 2), $p=0,339$. Jednak różnica odnotowana w wynikach ekspresji mRNA MMP-1 pomiędzy grupą pacjentek rodzących o czasie ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1), a ciężarnymi w ciąży donoszonej nierodzących (Grupa 2) wskazywała już na trend statystyczny; $p=0,1$; odpowiednio *Mdn* 6,55; *PMK* 3,03-7,59 vs *Mdn* 1,29; *PMK* 0,49-6,06.

Interesujący wydaje się fakt, iż w grupie kobiet rodzących drogami i siłami natury, gdzie rozerwanie pęcherza płodowego następowało spontanicznie na znacznie wcześniejszym etapie porodu - Grupa 1 - (przy rozwarciu szyjki macicy do ok. 4 cm), ekspresja genu MMP-1 w błonach płodowych była istotnie statystycznie większa niż ekspresja MMP-1 w błonach płodowych uzyskanych po porodzie odbytym drogami i siłami natury, gdzie błony pozostawały nienaruszone do momentu rozwarcia szyjki macicy do ok. 8 cm (Grupa 3), odpowiednio *Mdn* 6,55; *PMK* 3,03-7,59 dla grupy 1 oraz *Mdn* 1,27; *PMK* 0,4-2,77 dla grupy 3; $p=0,011$. Z kolei ekspresja mRNA MMP-8 w błonach płodowych była wyższa dla grupy 1 w porównaniu z grupą 3, odpowiednio *Mdn* 5,31; *PMK* 3,14-8,97 vs *Mdn* 0,96; *PMK* 0,21-4,87. Uzyskany wynik okazał się na poziomie tendencji statystycznej, $p=0,07$. Osoczowe stężenie MMP-8 dla grupy 1 ze spontanicznym pęknięciem pęcherza było również wyższe przy porównaniu ze stężeniem w osoczu w grupie 3, gdzie błony płodowe były odporne na skurcze macicy i nie pękały samoistnie, odpowiednio *Mdn*: 5,85; *PMK* 2,99-6,61 vs *Mdn*: 2,26; *PMK* 1,11-3,55; $p<0,001$. Otrzymane wyniki sugerują, że niższa ekspresja MMP-1 i MMP-8, a tym samym niższe stężenie MMP-8 w osoczu (stężenie MMP-1 we krwi nie było oceniane) jest być może jednym z czynników zapewniającym przedłużoną trwałość błon płodowych przy porodzie. Tak przeprowadzonego porównania, oceniającego prawdopodobny

mechanizm trwałości błon płodowych podczas naturalnego porodu drogami i siłami natury, nie znalazłam w dotychczas dostępnych publikacjach.

Na związek żelatynaz (MMP-2 i MMP-9) z patogenezą pęknięcia błon płodowych wskazują wyniki wielu przeprowadzonych dotychczas badań.

Próby zrozumienia różnic w procesie spontanicznego i przedwczesnego pęknięcia błon płodowych pod kątem aktywności żelatynaz pojawiły się w latach '90 ubiegłego wieku. Pierwszą pracą, która dostarczyła szczegółowe informacje na temat aktywności MMP-9 w błonach płodowych, była praca Vadillo-Ortega z 1995 roku [121]. Został wówczas udowodniony wzrost aktywności metaloproteinazy macierzy 9 podczas porodu. Dodatkowe wykrycie żelatynazy o masie cząsteczkowej MMP-2 w próbkach pobranych przed, w trakcie i po porodzie sprawiło, że przedstawiono wniosek potwierdzający koncepcję Fernandez'a z 1992 roku [217], iż aktywność MMP-2 nie zmienia się w trakcie trwania ciąży. Dlatego badacze wysnuli stwierdzenie, że pojawienie się niektórych MMPs w błonach płodowych nie jest czasowo związane z przygotowaniem do zbliżającego się porodu w porównaniu do skoordynowanego z porodem wzrostu poziomu MMP-9 [218].

Xu i wsp. w swojej pracy wykazali, że poziom MMP-9 jest istotnie statystycznie wyższy w błonach płodowych zarówno w trakcie porodów o czasie jak i tych przedwczesnych [125]. To był ważny krok w wysunięciu przypuszczenia, że być może procesy doprowadzające do pęknięcia błon płodowych, zarówno w przypadku porodów o czasie jak i tych przedterminowych, są podobne. Yonemoto H. i wsp. w 2006 roku potwierdzili wzorzec ekspresji MMP-9 w błonach płodowych w przypadku porodów o czasie jak i przedwczesnych, ale wyniki dotyczące MMP-2 nie były spójne w porównaniu do wyników prac innych autorów. Yonemoto i wsp. nie wykazali wzrostu poziomu MMP-2 w błonach płodowych w porodach o czasie i przedterminowych w porównaniu do poziomów obserwowanych w trakcie ciąży [166], co więcej stwierdzili spadek poziomu MMP-2 w płynie owodniowym w porodach terminowych i przedwczesnych (niespójność m.in. z pracą Goldmana z 2003 roku) [170]. Być może różnice te wynikały z odmienności buforu ekstrakcyjnego użytego w projekcie lub nieuwzględnienia faktu, że owodnia i kosmówka mają inne wzorce uwalniania MMP (co wykazał Yonemoto), które nie zostały wzięte pod uwagę w metodologii innych badań

w tym zakresie. Procesy zachodzące w doczesnej regulują mechanizmy doprowadzające do przerwania błon płodowych poprzez zwiększenie ekspresji i aktywacji MMP-9.

Jeśli chodzi o ekspresję genu MMP-2, w opozycji do wyników uzyskanych pracy Vadillo-Ortegi, Fernandez i Yonemoto, w prezentowanej przeze mnie rozprawie doktorskiej wykazano, że w grupie pacjentek w ciąży donoszonej ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych podczas porodu (Grupa 1) ekspresja mRNA MMP-2 była wyższa w porównaniu do wyników ekspresji tej metaloproteiny w grupie ciężarnych pacjentek w ciąży donoszonej bez oznak porodu (Grupa 2), odpowiednio *Mdn* 1,61; *PMK* 0,47-3,42 dla grupy 1 vs *Mdn* 0,26; *PMK* 0,09-0,06 dla grupy 2. Wynik ten był bliski istotności statystycznej; $p=0,070$. Uzyskane przeze mnie wyniki są spójne m.in. z wynikami Goldmana i wsp. z 2003 roku [127]. Wspomniani badacze ocenili zmianę aktywności MMP-2 i MMP-9 w trakcie porodu o czasie w poszczególnych warstwach błon płodowych (w moim badaniu analizie poddano całościowo błony płodowe, bez separacji poszczególnych warstw) oraz w płynie owodniowym. Materiał do badań został uzyskany od zdrowych kobiet ciężarnych między 38-39. tygodniem ciąży. Grupę badaną stanowiło 12 ciężarnych, których ciążę zostały ukończone na drodze cięcia cesarskiego, po trwającej co najmniej 1 godzinę regularnej czynności skurczowej. Do grupy kontrolnej należało 12 kobiet poddane elektywnemu cięciu cesarskiemu przed wystąpieniem regularnych skurczów macicy. W dwóch kompartmentach owodni i doczesnej w trakcie porodu z regularną czynnością skurczową macicy zaobserwowano wyraźnie wyższą aktywność zarówno MMP-2 jak i MMP-9 [127].

W prezentowanej przeze mnie rozprawie w zakresie ekspresji genu MMP-9 w błonach płodowych analizowanych całościowo (bez selekcji poszczególnych warstw) także odnotowano wyższą wartość mediany ekspresji genu MMP-9 w błonach płodowych po odbytym porodzie ze spontanicznym pęknięciem pęcherza płodowego (Grupa 1) w porównaniu do wyników u kobiet w ciąży donoszonej bez porodowej czynności skurczowej (Grupa 2); odpowiednio *Mdn* 2,17; *PMK* 0,47-4,47 dla grupy 1 vs *Mdn* 0,99; *PMK* 0,26-2,82 dla grupy 2, jednak wyniki te nie uzyskały istotności statystycznej; $p=0,283$.

Co ciekawe, w prezentowanej rozprawie doktorskiej analizując ekspresję genu MMP-2 i MMP-9 w błonach płodowych podczas porodu bez samoistnego pęknięcia błon płodowych (Grupa 3) uzyskano nieco odmienne wyniki. Zestawiając grupę ciężarnych

rodzących u których lekarz na etapie ok. 8 cm rozwarcia szyjki macicy dokonywał ze wskazań medycznych przerwania ciągłości błon płodowych (Grupa 3) z grupą kobiet w ciąży donoszonej bez porodu (Grupa 2), zaobserwowano wprawdzie wzrost ekspresji genu MMP-2 w grupie rodzących, ale był on ok. 2,5 razy mniejszy ($p=0.75$) niż przy porównaniu rodzących ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1) do ciężarnych nierodzących (Grupa 2), odpowiednio analiza stopnia zmiany dla Grupy 1/Grupy 2=6,19; $p=0,07$, a dla Grupy 3/Grupy 2=2,42; $p=0,7$. Z kolei poziom ekspresji MMP-9 (w tym układzie porównania) był niższy dla kobiet rodzących bez spontanicznego pęknięcia pęcherz płodowego (Grupa 3) w porównaniu do grupy ciężarnych nierodzących (Grupa 2); $p=0,769$.

Podsumowując tematykę skoordynowanego z porodem wzrostu ekspresji enzymu z rodziny metaloproteinaz w błonach płodowych w niniejszej rozprawie odnotowano wzrost ekspresji mRNA w błonach płodowych każdej badanej metaloproteiny w sytuacji wystąpienia porodu (porównanie grupy 1 do grupy 2), jednak tylko w przypadku MMP-1 i MMP-2 uzyskany wynik był bliski istotności statystycznej, odpowiednio $p=0,1$ oraz $p=0,07$ (tabela 11, tabela 13). Być może zwiększenie liczby badanych ciężarnych oraz wybiórcze oznaczenie wybranych metaloproteinaz w poszczególnych warstwach błon płodowych skutkowałoby uzyskaniem istotnych statystycznie wyników.

Fortunato i wsp. w swojej publikacji z 1999 roku stwierdził, iż pacjentki z PROM mają wyższe stężenie zarówno MMP-2 jak i MMP-9 w płynie owodniowym w porównaniu z ciężarnymi w ciąży donoszonej bez oznak porodu [232]. W niniejszej rozprawie doktorskiej analiza wyników ekspresji mRNA MMP-2 i MMP-9 w błonach płodowych wykazała, iż ciężarne z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych (Grupa 0) prezentowały wyższe wartości mediany ekspresji genu MMP-2 i MMP-9 w porównaniu do wyników w grupie ciężarnych w ciąży donoszonej bez oznak porodu (Grupa 2), odpowiednio Mdn MMP-2=0,65; Mdn MMP-9=1,53 dla grupy 0 oraz Mdn MMP-2=0,26; Mdn MMP-9=0,99 dla grupy 2. Tylko wynik ekspresji mRNA MMP-2 był na poziomie tendencji statystycznej; $0,05 < p < 0,1$. W przypadku MMP-9 wynik nie uzyskał istotności statystycznej; $p=0,47$.

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych przed ukończeniem 37. tygodnia ciąży (PPROM) występuje około 2,5–3 razy niż PROM [234, 235]. Z uwagi na częstość

występowania oraz na ciężkość powikłań generowanych przez PPRM istotne wydają się ustalenie, które metaloproteinazy zaangażowane są w PROM, a które w PPRM.

Doświadczenia opublikowane przez Maymon'a i wsp. w 2000 roku sugerują występowanie wyższych stężeń MMP-8 w płynie owodniowym u ciężarnych z patologią PPRM w porównaniu do ciężarnych z PROM [205]. W niniejszym badaniu w analizie wewnątrzgrupowej przeprowadzonej w grupie badanej (Grupa 0) zaobserwowano podobne zjawisko, ale tylko w zakresie nadekspresji mRNA MMP-8 w błonach płodowych w grupie pacjentek z PPRM w porównaniu do pacjentek z patologią PROM (Fold change=2,45; $p=0,049$). W prezentowanej przeze mnie pracy, dokonując ponadto oceny stężenia MMP-8 w osoczu krwi ciężarnych (w pracy Maymon'a analiza dotyczyła płynu owodniowego), nie wykryto znamiennych różnic w zakresie stężenia MMP-8 pomiędzy grupą pacjentek z PPRM a PROM. Być może nie bez znaczenia jest rodzaj materiału biologicznego, w którym zostały wykonane oznaczenia badanych markerów biochemicznym.

W przypadku stężenia prolidazy w osoczu ciężarnych zaobserwowano bliski istotności statystycznej odwrotny trend, a mianowicie okazało się, że to w osoczu krwi ciężarnych z PROM stężenie prolidazy jest wyższe w porównaniu do ciężarnych z PPRM, odpowiednio *Mdn* 142,05 vs *Mdn* 124,34; $p=0,09$. Innych publikacji w tym zakresie na dzień pisania pracy nie znalazłam.

Ponadto w prezentowanej rozprawie, pomiędzy grupą ciężarnych pacjentek z PPRM a grupą z patologią PROM, wykazano bliską istotności statystycznej różnicę w zakresie ekspresji w błonach płodowych mRNA innej metaloproteinazy macierzowej, a mianowicie MMP-9. Prawie 4-krotnie wyższa ekspresja genu MMP-9 w błonach płodowych była w przypadku pacjentek z patologią PPRM (Fold change=3,9; $p=0,08$). Nie wykazano znamiennych różnic w ekspresji mRNA pozostałych analizowanych metaloproteinaz w błonach płodowych pomiędzy grupą PPRM i PROM.

Porównując wyniki analizy ekspresji genu MMP-1 w błonach płodowych pomiędzy grupą z patologią PROM a grupą z patologią PPRM nie wykazałam istotnych statystycznie różnic. W pracy Maymon'a i wsp. [12], analizując stężenie MMP-1 w płynie owodniowym pomiędzy grupą pacjentek PROM vs PPRM, udowodniono wyższe stężenie MMP-1 w grupie pacjentek PPRM i niższe w PROM.

W wewnątrzgrupowych analizach korelacji zaobserwowano wysokiego stopnia dodatni związek między ekspresją mRNA MMP-8 i prolidazy w błonach płodowych zarówno w grupie badanej (Grupa 0) i grupie kontrolnej 3 (Grupa 3) oraz w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2). Opisywana relacja nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej w przypadku pacjentek z grup kontrolnych 1 (Grupa 1). Ponadto dodatnią korelację zaobserwowano pomiędzy MMP-8 i MMP-9 zarówno z grupie badanej z PROM/PPROM (Grupa 0) jak i w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3). Opisywana relacja nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej w grupie 1 (Grupa 1) jak i w grupie badanej (Grupa 0). Wydaje się, że opisany związek może być wynikiem wspólnej ekspresji wyżej wymienionych genów obu metaloproteinaz w błonach płodowych w obrębie jednej grupy [138, 153]. Wyniki te wskazują na możliwość wzajemnej regulacji MMP-8 i prolidazy oraz MMP-8 i MMP-9 zarówno w przypadku patologii PROM/PPROM, podczas porodu o czasie jak i w sytuacji ciąży donoszonej bez rozpoczętego jeszcze aktu porodu. Analizując dostępne piśmiennictwo w kontekście opisywanych wzajemnych korelacji, nie znalazłam podobnie przeprowadzonych porównań.

Przy kwalifikacji pacjentek do badania klinicznego starano się uzyskać jednorodną grupę ciężarnych. Wszystkie ciężarne były ogólnie zdrowe, a pacjentki z grupy badanej dodatkowo ze współistniejącą patologią pod postacią PROM/PPROM. Takie kryteria przy kwalifikacji miały służyć wyeliminowaniu dodatkowych zaburzeń, które mogłyby wpływać na ekspresję genów metaloproteinaz w błonach płodowych oraz na stężenia MMPs w osoczu matki. Dlatego do projektu były kwalifikowane między innymi tylko te ciężarne, które nie prezentowały objawów infekcji zarówno w badaniu podmiotowym jak i przedmiotowym. Jednakże należy zaznaczyć, że zdawano sobie sprawę z ograniczeń płynących z zastosowanej metodologii. Bazując bowiem na danych z piśmiennictwa, przedwczesne pęknięcie błon płodowych jest często związane z infekcjami, które w większości niestety mają przebieg subkliniczny [218-221].

Każde zakażenie może bowiem przyczyniać się do osłabienia membran w co najmniej trzech mechanizmach. Po pierwsze niektóre bakterie wydzielają kolagenazę, która może degradować kolagen zawarty w macierzy zewnątrzkomórkowej w błonach płodowych [222, 223]. Po drugie w przebiegu infekcji następuje inwazja neutrofilowych leukocytów polimorfojądrzastych, które wytwarzają z kolei elastazę mającą zdolność degradacji kolagenu w błonach płodowych. Po trzecie Bennett i wsp. wykazali, że pewne bakterie chorobotwórcze indukują przesunięcie metabolizmu owodniowego kwasu

arachidonowego ze ścieżki lipooksygenazy na ścieżkę cyklooksygenazy i w efekcie uzyskanie produktów takich jak prostaglandyna E. Ponieważ pochodne kwasu arachidonowego są ważnymi regulatorami wydzielania kolagenazy w wielu tkankach zdolnych do syntezy kolagenazy, bakterie te mogą modyfikować obrót kolagenu także w ludzkich błonach płodowych [224].

Ograniczenia mojej pracy mogą wynikać także z faktu braku wyników badania histopatologicznego łożyska po odbytym porodzie pod kątem dowodów istnienia zapalenia wewnątrzowodniowego.

Inwazja drobnoustrojów do jamy owodniowej towarzyszy od 30 do 40 % patologii przedwczesnego pęknięcia błon płodowych, a im niższy wiek ciążowy tym większy związek PPRM z infekcją wewnątrzmaciczną [205]. Athayde i wsp. w swojej pracy z 1998 roku odnotowali wzrost stężenia metaloproteinazy macierzowej 9 w płynie owodniowym uzyskanym od kobiet z zakażeniem wewnątrzowodniowym [161]. Podobnie Fortunato i wsp. opisali nadekspresję informacyjnego kwasu rybonukleinowego MMP-9 w ludzkich błonach płodowych w odpowiedzi na toksyny bakteryjne.

W medycynie perinatalnej zaproponowano wystąpienie zaburzenia metabolizmu kolagenu jako istotny czynnik etiopatogenetyczny przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. Prolidaza odgrywa ważną rolę w produkcji kolagenu i innych białek z zawartością proliny, a także jest wskaźnikiem zwiększonego obrotu kolagenu [225, 226]. Stwierdzono, że aktywność prolidazy wzrasta w chorobach związanych z zaburzeniami metabolizmu kolagenu [227-229]. W piśmiennictwie są nieliczne prace prezentujące wyniki badań w obszarze tego zagadnienia [15, 63]. Dlatego mając na uwadze fakt, że upośledzony metabolizm kolagenu obok innych patologii takich jak zwiększonego stresu oksydacyjnego czy zapalenia błon płodowych odgrywa istotną rolę w kaskadzie zdarzeń prowadzącej do przedwczesnego pęknięcia błon płodowych [15, 63] oraz niewielką ilość opublikowanych badań w tej tematyce, w niniejszym badaniu podjęto się próby analizy ekspresji prolidazy w błonach płodowych oraz poziomu stężenia prolidazy w próbkach osocza ciężarnych kobiet z patologią PROM/PPROM.

Tworząc projekt badawczy wzięto pod uwagę wyniki uzyskane przez tureckich badaczy w pracach z 2012 i 2013 roku w zakresie udziału prolidazy w występowaniu patologii

PPROM [230, 231]. Soydinc i wsp. oznaczając prolidazę w osoczu i wydzielinie pochwowej kobiet z PPRM (26-34 hbd) stwierdzili, że stężenie prolidazy w matczynym osoczu i wydzielinie pochwowej było znacznie wyższe w grupie ciężarnych z PPRM w porównaniu do wyników stężenia tego enzymu w grupie kontrolnej bez PPRM; $p < 0,001$ [230, 231].

Wyniki prezentowanej pracy nie wykazały istotnej statystycznie różnicy zarówno w ekspresji mRNA prolidazy w błonach płodowych jak i w osoczym stężeniu tego enzymu w grupie kobiet z patologią przedwczesnego pęknięcia błon płodowych (Grupa 0) w porównaniu do grupy kobiet bez patologii PROM (zarówno Grupa 1, Grupa 2 i Grupa 3). Analizując wyniki kobiet z grupy z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) oraz wyniki pacjentek z grupy ciężarnych rodzących o czasie ze spontanicznym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1) stwierdzono, że zarówno mediany jak i przedziały kwartylowe uzyskane dla ekspresji mRNA prolidazy prezentowały przybliżone wartości, odpowiednio *Mdn*: 1,06 i *PMK*: 0,42-1,92 dla grupy 0 oraz *Mdn*: 1,29 i *PMK* 0,5-1,92 dla grupy 1. Porównując wyniki ekspresji mRNA prolidazy uzyskane dla grupy kobiet rodzących o czasie ze spontanicznym przerwaniem błon płodowych (Grupa 1) do wyników u kobiet nierodzących w ciąży terminowej (Grupa 2) stwierdzono prawie dwukrotnie większą ekspresję prolidazy w grupie rodzących (Grupa 1), wynik ten jednak nie uzyskał istotności statystycznej; $p = 0,481$. Bliskie istotności statystycznej wyższe stężenie prolidazy w osoczu odnotowano w grupie kobiet z PROM w porównaniu do grupy kobiet z PPRM; odpowiednio *Mdn*: 146,19 ng/ml; *PMK*: 103,11-184,91 ng/ml vs *Mdn* 124,34 ng/ml ; *PMK* 95,61-142,05 ng/ml; $p = 0,09$.

Istnieje konieczność dalszych badań w tym zakresie, z liczniejszą grupą pacjentek by móc ustalić rolę prolidazy w kaskadzie zdarzeń prowadzących zarówno do patologicznego jak i fizjologicznego przerwania ciągłości błon płodowych oraz stwierdzić, że obserwuje się bądź nie skoordynowany z porodem wzrost ekspresji mRNA prolidazy w błonach płodowych.

Należy wspomnieć, iż w pracy Soydinc'a i wsp. próbki osocza i wydzieliny pochwowej dla grupy badanej i kontrolnej badaniu były pobrane od kobiet będących w tym samym przedziale wieku ciążowego (26-34 hbd). Być może wykazanie istotnej statystycznie różnicy w wieku ciążowym pomiędzy grupą badaną a grupami kontrolnymi w moim

badaniu tłumaczy fakt uzyskania odmiennych wyników w porównaniu do pracy Soydnic i wsp..

We wspomnianej wyżej pracy autorzy ocenili także stężenie MMP-1 i MMP-13 w osoczu i wydzielinie pochwowej ciężarnych [230, 231]. Dowiedli, iż stężenia MMP-1 w osoczu nie różniły się znacząco między grupami z PPRom i bez, ale już w przypadku oznaczeń w wydzielinie pochwowej odnotowano znaczący wzrost stężenia MMP-1 w grupie badanej z PPRom ($p < 0,001$). Stężenie MMP-13 zarówno w osoczu jak i w wydzielinie pochwowej kobiet z grupy PPRom były znacząco wyższe. Ponadto doświadczenia autorów tej pracy wskazują na wyższe poziomy proilidazy, MMP-1, MMP-13 w wydzielinie pochwowej pacjentek z grupy PPRom z zapaleniem błon płodowych w porównaniu do pacjentek z grupy PPRom bez zapalenia błon. Wyżej wymienione parametry ocenione w wydzielinie pochwowej ciężarnych mogą być predyktorami wystąpienia PPRom, a w grupie PPRom proilidaza i MMP-13 ocenione w wydzielinie pochwowej mogą być predyktorami wystąpienia zapalenia błon płodowych [230, 231].

W przedstawionej przeze mnie pracy oprócz oceny stężenia MMP-8 w matczynym osoczu, również analizie poddano takie czynniki jak wiek i rodność pacjentek, wiek ciążowy w czasie kwalifikacji do badania, masę urodzeniową noworodka oraz ich wpływ na stężenie badanej metaloproteinazy w osoczu pacjentek z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) jak i pacjentek z grup kontrolnych. Analiza wykazała istotne statystycznie korelacje jedynie w grupie badanej z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) i w grupie kontrolnej 3 (zdrowe ciężarne rodzące drogami i siłami natury o czasie z pęknięciem błon płodowych wywołanym przez lekarza) pomiędzy wiekiem kobiet a stężeniem MMP-8 w osoczu matczynym. W grupie z patologią PROM/PPROM ta korelacja jest umiarkowana i ujemna, co wskazuje na zależność, że im starsze są kobiety, tym niższy jest u nich poziom MMP-8 we krwi. Z kolei w grupie kontrolnej 3 odnotowano związek dodatni i silny. Wynika z tego, że wraz z wiekiem kobiet w tej grupie, wzrasta u nich stężenie MMP-8. Pozostałe korelacje okazały się nieistotne statystycznie.

Mając na uwadze metodologię prezentowanej rozprawy jasnym jest, że do analizy nie włączono oceny wyników badań laboratoryjnych, wykonanych w dniu kwalifikacji do badania, takich jak stężenie białka C-reaktywnego czy wartość leukocytozy (pacjentki włączone do badania prezentowały wyniki w zakresie normy, a tym samym stwierdzono brak cech infekcji w badaniach laboratoryjnych).

Rozważając etiopatogenezę przedwczesnego pęknięcia błon płodowych nie sposób pominąć uwarunkowań genetycznych. Od dawna istnieją doniesienia, które pośrednio dowodzą związek genetyki z patologią PROM/PPROM. Wystąpienie tej patologii w wywiadzie zwiększa od 4 do 8 razy prawdopodobieństwo powtórzenia się tej patologii w kolejnej ciąży (ryzyko nawrotu PROM w kolejnej ciąży wynosi od 16 do 32 % w porównaniu z około 4 % ryzykiem wystąpienia tej patologii u kobiet, które wcześniej rodziły bez komplikacji [58]. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że jednak większość przypadków PROM/PPROM występuje u zdrowych kobiet bez możliwych do zidentyfikowania czynników ryzyka.

W analizowanej przeze mnie populacji ciężarnych kobiet z patologią PROM/PPROM jedynie u dwóch pacjentek wystąpiło przedwczesne przerwanie błon płodowych w poprzedniej ciąży.

Dostępność markerów umożliwiającą prawidłowe identyfikowanie pacjentek narażonych na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych byłaby nieoceniona w doborze najbardziej optymalnego sposobu postępowania oraz poprawy wyników położniczych. Koniecznym wydaje się przeprowadzenie dalszych badań klinicznych na większej populacji ciężarnych kobiet w celu ustalenia czy metaloproteiny jako enzymy degradujące elementy macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych mogą stanowić co-marker pomocny w predykcji wystąpienia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych u kobiet ciężarnych we wszystkich populacjach.

W kontekście udziału niektórych metaloproteinaz w kaskadzie zdarzeń prowadzącej do przedwczesnego pęknięcia błon płodowych i po stwierdzeniu zwiększonego stężenia MMPs we krwi matki, pacjentki z grupy narażonych na wystąpienie PROM/PPROM (po wykluczeniu zakażenia wewnątrzrodniowego) mogłyby być kwalifikowane do podania specjalnie opracowanego preparatu, którego podanie np. dopochwowe mogłoby zahamować nasiloną degradację macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych

Jednakże, zdając sobie sprawę ze złożonej etiologii przedwczesnego pęknięcia błon płodowych oraz udziału czynników genetycznych, hormonalnych i środowiskowych, mało prawdopodobne jest, aby pojedynczy biomarker mógł stać się predyktorem wystąpienia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych u kobiet ciężarnych we wszystkich populacjach.

Istnieje potrzeba poszukiwania wiarygodnych i kompleksowych narzędzi diagnostycznych, a tym samym stworzenia możliwości opracowania odpowiednich

standardów postępowania w celu przewidywania wystąpienia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych.

6. WNIOSKI

1. Wzrost ekspresji mRNA metaloproteinazy 8 w błonach płodowych ciężarnych z patologią przedwczesnego pęknięcia błon płodowych w sytuacji wykluczenia ogólnego stanu zapalnego sugeruje możliwy udział tej MMP w powstaniu tej patologii.
2. Występowanie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych jest związane ze wzrostem stężenia metaloproteinazy 8 w osoczu kobiety ciężarnej w sytuacji nieobecności ogólnego stanu zapalnego.
3. Wiek matki jest czynnikiem wpływającym na stężenie MMP-8 w osoczu kobiet ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych.
4. Funkcje mediowane przez metaloproteinazę 8 odpowiadają kaskadzie zdarzeń obserwowanej w przebiegu przerwania ciągłości osłabionych błon płodowych. Wzrost ekspresji genu metaloproteinazy-8 jak i stężenia MMP-8 w matczynym osoczu może występować zarówno w sytuacji spontanicznego pęknięcia błon płodowych podczas terminowego porodu, ale także stanowić jeden z kluczowych czynników patogenetycznych w rozwoju PROM/PPROM.
5. Odmienna ekspresja mRNA MMP-8 w błonach płodowych w przypadku PROM i PPRM sugeruje odmienny patomechanizm degradacji ECM w błonach płodowych w powyższych patologiach.
6. Odmienny wskaźnik zwiększonego obrotu kolagenu reprezentowany przez stężenie proladazy różnicuje PROM od PPRM.
7. Dla spontanicznego pęknięcia błon płodowych podczas terminowego porodu ważna jest aktywność MMP-1.
8. Wzrost stężenia MMP-8 w osoczu ciężarnych kobiet jest skoordynowany z wystąpieniem terminowego porodu.
9. W sytuacji zwiększonej, przedłużonej odporności błon płodowych na skurcze macicy skutkujące jatrogennym przebicciem błon płodowych ze wskazań położniczych w przypadkach terminowego porodu obserwuje się mniejszą ekspresję mRNA MMP-1.

7. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wstęp

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych (PROM, ang. *Premature Rupture of Membranes*) występujące z częstością 3–10% oraz przedwczesne pęknięcie błon płodowych przed terminem (PPROM, ang. *Preterm Premature Rupture of Membranes*) dotyczące ok. 1–3% wszystkich ciąż i będące przyczyną 30–40% przypadków porodu przedwczesnego nadal pozostają istotnym problemem medycyny perinatalnej.

Przedwczesne pęknięcie błon płodowych bezsprzecznie wiąże się z powikłaniami dotyczącymi, zarówno matki jak i dziecka oraz dodatkowo w przypadku przedwczesnego pęknięcia błon płodowych przed terminem (PPROM) ze wszystkimi konsekwencjami wcześniactwa.

Pomimo złożonej etiologii badacze są zgodni co do faktu, iż nasilona degradacja kolagenu, stanowiącego główną składową macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych, jest ostatnim najistotniejszym czynnikiem prowadzącym do PROM i PPROM. Dostępność markerów umożliwiających wczesne rozpoznanie nasilonej degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych, a tym samym prawidłowe identyfikowanie pacjentek narażonych na wystąpienie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych byłaby nieoceniona w doborze najbardziej optymalnego sposobu postępowania, redukcji liczby przypadków PROM i PPROM oraz w konsekwencji poprawy wyników położniczych.

Cel pracy

Celem pracy było poznanie czynników degradujących macierz zewnątrzkomórkową błon płodowych odgrywających najistotniejszą rolę w patomechanizmie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych oraz sprawdzenie czy produkty wytypowanych genów mogą stanowić markery predykcyjne przedwczesnego pęknięcia błon płodowych .

Material i metody

Na przeprowadzenie badania została udzielona zgoda komisji etyki. Wszystkie pacjentki udzieliły świadomej zgody na udział w badaniu.

Analizie poddano łącznie grupę 98 kobiet ciężarnych. Pacjentki podzielono na cztery grupy. Grupę badaną (Grupa 0, n=56) stanowiły pacjentki, których ciąża przebiegała bez patologii z wyjątkiem rozpoznania PROM lub PPRM, grupę kontrolną pierwszą (Grupa 1, n=8) stanowiły zdrowe ciężarne z terminowym porodem naturalnym, do grupy kontrolnej drugiej (Grupa 2, n=16) zakwalifikowano zdrowe ciężarne w ciąży donoszonej z wykonanym elektywnym cięciem cesarskim przed rozpoczęciem czynności skurczowej, do grupy kontrolnej trzeciej (Grupa 3, n=18) zakwalifikowano ciężarne zdrowe z terminowym porodem drogami i siłami natury, u których nie nastąpiło samoistne przerwanie ciągłości błon płodowych (konieczność przebicia pęcherza płodowego ze wskazań położniczych).

Od każdej włączonej do badania ciężarnej kobiety pobrano krew oraz błony płodowe. Pozyskane błony płodowe posłużyły do oceny ekspresji genów MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 oraz genu prolidazy w oparciu o metodę RT-PCR w czasie rzeczywistym. Osocze matki posłużyło do oceny stężenia MMP-8 i prolidazy, Poziomy ekspresji genów i stężeń wyżej wspomnianych enzymów zostały porównane pomiędzy grupą badaną z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) i grupami kontrolnymi (Grupa 1, 2, 3).

Wyniki

Oceniając ekspresję genów MMPs i prolidazy badanie wykazało:

1. Istotny statystycznie mniejszą ekspresję mRNA MMP-1 w błonach płodowych w grupie ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych (Grupa 0) w porównaniu z grupą ze spontanicznym terminowym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1); *Mdn* 1,15 vs *Mdn* 6,55; $p=0,044$). Oznacza to 5,7-krotny wzrost ekspresji enzymu w grupie kontrolnej 1 (Grupa 1) w porównaniu do grupy PROM/PPROM (Grupa 0).
2. Istotny statystycznie wzrost ekspresji mRNA MMP-8 w błonach płodowych w przypadku ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem wód płodowych (Grupa 0) w stosunku do ciąż donoszonych, gdzie podczas naturalnego porodu nie dochodziło do spontanicznego pęknięcia błon płodowych (Grupa 3); *Mdn* 4,29 vs *Mdn* 0,96; $p=0,049$. Oznacza to 4,45-krotny wzrost ekspresji enzymu w grupie badanej z PROM/PPROM w porównaniu do grupy kontrolnej 3.

3. Istotny statystycznie wzrost ekspresji mRNA MMP-8 w błonach płodowych w przypadku ciąż powikłanych przedwczesnym odpływaniem wód płodowych (Grupa 0) w stosunku do ciąż donoszonych w których nie doszło do samoistnego pęknięcia błon płodowych (Grupa 2 i 3); *Mdn* 4,29 vs *Mdn* 1,23; $p=0,019$). Oznacza to 3,47-krotny wzrost ekspresji enzymu w grupie badanej z PROM/PPROM w porównaniu do grupy kontrolnej 2 i 3.
4. Istotny statystycznie wzrost ekspresji mRNA MMP-8 w błonach płodowych w przypadku ciąż, u których doszło do przerwania ciągłości błon płodowych, zarówno przedwczesnego jak i spontanicznego w trakcie porodu terminowego (Grupa 0 i 1) w porównaniu do pacjentek w ciążach donoszonych u których nie nastąpiło samoistne pęknięcie błon płodowych (Grupa 2 i 3); *Mdn* 5,09 vs *Mdn* 1,07; $p=0,006$. Oznacza to 4,76-krotny wzrost ekspresji enzymu w grupie, gdzie pękają błony płodowe (Grupa 0 i 1) w porównaniu do grup, gdzie nie dochodzi do pęknięcia błon płodowych (Grupa 2 i 3).
5. Brak istotnych statystycznie różnic w ekspresji mRNA MMP-2, MMP-9, prolidazy między grupą badaną a grupami kontrolnymi.

Oceniając stężenie MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu badanie wykazało:

1. Istotnie statystycznie niższe stężenie MMP-8 w osoczu pacjentek z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych (Grupa 0) w porównaniu do ciężarnych ze spontanicznym terminowym pęknięciem błon płodowych (Grupa 1); *Mdn* 2,62 ng/ml vs *Mdn* 5,85 ng/ml; $p=0,008$.
2. Istotny statystycznie wzrost stężenia MMP-8 w osoczu pobranym od ciężarnych z grupy badanej z patologią PROM/PPROM (Grupa 0) w porównaniu do ciężarnych w ciąży donoszonej z wykonanym elektywnym cięciem cesarskim przed wystąpieniem czynności skurczowej z zachowanymi błonami płodowymi (Grupa 2); *Mdn* 2,62 ng/ml vs *Mdn* 1,62 ng/ml; $p=0,014$.
3. Istotnie statystycznie wyższe stężenie MMP-8 w osoczu pacjentek z PROM/PPROM (Grupa 0) w porównaniu do pacjentek u których nie doszło do spontanicznego pęknięcia błon w ciąży terminowej (Grupa 2 i 3); *Mdn* 2,62 ng/ml vs *Mdn* 2,02 ng/ml; $p=0,014$.
4. Istotnie statystycznie wyższe stężenie MMP-8 w osoczu pacjentek u których dochodziło do przerwania błon płodowych, zarówno przedwczesnego jak i spontanicznego w trakcie porodu terminowego (Grupa 0 i 1) w porównaniu do

ciężarnych bez spontanicznego pęknięcia błon płodowych w terminie porodu (Grupa 2 i 3); *Mdn* 2,87 ng/ml vs *Mdn* 2,03 ng/ml; $p=0,001$.

5. Brak różnicy różnicy w stężeniu prolidazy w matczynym osoczu pomiędzy grupą badaną z PROM/PPROM (Grupa 0) a żadną z grup kontrolnych (Grupa 1, 2, 3).

6. Proponowany punkt odcięcia dla stężenia MMP-8 wskazujący na wystąpienie skurczowej czynności porodowej związanej z równoczesnym pęknięciem błon płodowych wyniósł 3,99 ng/ml. Czułość i swoistość testu wynosi odpowiednio 70% i 73%; $p=0,004$.

Wnioski

1. Występowanie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych jest związane zarówno ze wzrostem ekspresji mRNA metaloproteinazy 8 w błonach płodowych jak i ze wzrostem stężenia metaloproteinazy 8 w osoczu kobiety ciężarnej w sytuacji nieobecności stanu zapalnego.

2. Wiek matki jest czynnikiem wpływającym na stężenie MMP-8 zarówno w osoczu kobiet ciężarnych z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych jak i rodzących terminowo kobiet, u których zwiększona odporność błon płodowych na pękanie wymagała przeprowadzenia amniocentezy ze wskazań położniczych.

3. Funkcje mediowane przez metaloproteinazę 8 odpowiadają kaskadzie zdarzeń obserwowanej w przebiegu przerwania ciągłości osłabionych błon płodowych. Wzrost ekspresji metaloproteinazy-8 może występować zarówno w sytuacji spontanicznego pękania błon płodowych podczas terminowego porodu, ale także stanowić jeden z kluczowych czynników patogenetycznych w rozwoju PROM/PPROM.

4. Zarówno odmienna ekspresja mRNA MMP-8 w błonach płodowych oraz różny wskaźnik obrotu kolagenem reprezentowanym przez stężenie prolidazy w matczynym osoczu różnicują patomechanizm degradacji ECM w błonach płodowych w przypadku PROM i PPROM.

5. MMP-1 degrдуje komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej błon płodowych prowadząc do przerwania ciągłości błon płodowych w trakcie skurczów macicy podczas terminowego porodu.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Introduction

Preterm rupture of membranes (PROM) at a frequency of 3-10% and preterm premature rupture of membranes (PPROM) occurring in approximately 1-3% of all pregnancies and 30-40% of preterm births are still a significant problem in perinatal medicine.

PROM/PPROM is strongly associated with complications for both mother and child and in the case of preterm premature rupture of membranes (PPROM) with all the consequences of prematurity.

Although several etiological factors have been implicated in the pathogenesis of PROM/PPROM, increased collagen degradation of the extracellular matrix of the amniotic membranes is suggested to be the final common pathway that causes the rupture of membranes.

The availability of markers enabling early recognition of increased degradation of the extracellular matrix of the amniotic membranes, and thus the correct identification of patients at risk of premature rupture of membranes, would be invaluable in the selection of the most optimal procedure, reduction of the number of cases of PROM and PPRM and consequently, improvement of obstetric outcomes.

Objectives

This study aimed to identify the factors predisposing to degradation of the extracellular matrix of fetal membranes that play the most important role in the pathomechanism of premature rupture of membranes and to investigate the role of products of selected genes in prediction of premature rupture of membranes.

Material and methods

The study protocol was reviewed and approved by the ethics committee. Informed consent was obtained from all patients prior to enrollment.

A total of 98 pregnant women were analyzed. The patients were divided into four groups. The study group (Group 0, n=56) consisted of patients whose pregnancy proceeded without any pathology except for the diagnosis of PROM or PPRM, the first control group (Group 1, n=8) consisted of healthy pregnant women with term natural delivery and spontaneous rupture of fetal membranes, the second control group (Group 2, n=16)

healthy pregnant women with intact fetal membranes in full-term pregnancy that underwent elective caesarean section before the onset of regular uterus contractions, the third control group (Group 3, n=18) included healthy pregnant women with term labor with no spontaneous rupture of fetal membranes (amniocentesis due to obstetric indications).

The blood samples and fetal membranes were taken from each pregnant woman enrolled in the study. The obtained fetal membranes were used to evaluate the expression of the MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 and prolidase genes based on the RT-PCR method. Maternal plasma was used to assess the concentration of MMP-8 and prolidase. Gene expression levels and concentrations of the above-mentioned enzymes were compared between the study group with PROM/PPROM pathology (Group 0) and the control groups (Group 1, 2, 3).

Results

Gene expression levels of MMPs and prolidase showed:

1. Statistically significant lower mRNA expression of MMP-1 in the group PROM/PPROM group (Group 0) compared to the group with spontaneous term rupture of membranes during natural labor (Group 1); *Mdn* 1,15 vs *Mdn* 6,55; $p=0,044$). This translates into a 5,7-fold increase in enzyme expression in the control group 1 (Group 1) compared to the PROM/PPROM study group (Group 0).
2. Statistically significant increase in MMP-8 mRNA expression in pregnancies complicated by premature rupture of membranes (Group 0) in relation to full-term pregnancies, where spontaneous rupture of membranes did not occur during natural labor-intact membranes (Group 3); *Mdn* 4,29 vs *Mdn* 0,96; $p=0,049$. This means a 4,45-fold increase expression of mRNA MMP-8 in the PROM/PPROM study group (Group 0) compared to the control group 3 (Group 3).
3. Statistically significant increase of mRNA expression of MMP-8 in pregnancies complicated by premature rupture of membranes (Group 0) in relation to full-term labor and non labor with intact fetal membranes (Group 2 and 3); *Mdn* 4,29 vs *Mdn* 1,23; $p=0,019$). This means a 3,47-fold increase in enzyme expression in the study group with PROM/PPROM compared to the control group 2 and 3 (Group 2 and 3)
4. Statistically significant increase mRNA expression of MMP-8 in pregnancies with membrane disruption, both premature and spontaneous, during term delivery (Groups 0 and 1) compared to the patient in full-term pregnancies with no spontaneous rupture of

membranes (Groups 2 and 3), accordingly *Mdn* 5,09 vs *Mdn* 1,07, respectively; $p=0,006$. This represents a 4,76-fold increase in enzyme expression in the ruptured membranes group (Groups 0 and 1) compared to the non-ruptured membranes groups (Groups 2 and 3).

5. No statistically significant differences in MMP-2, MMP-9, prolidase mRNA expression between the PROM/PPROM group (Group 1) and the control groups (Group 1, 2, 3).

Maternal plasma levels of MMP-8 and prolidase revealed:

1. In the PROM/PPROM group (Group 0), the MMP-8 plasma level was significantly lower compared with corresponding levels in pregnant women with spontaneous term rupture of the membranes during natural labor (Group 1); *Mdn* 2,62 ng/mL vs *Mdn* 5,85 ng/mL; $p=0,008$.

2. As compared with the control group 2 (Group 2) where pregnant women underwent elective caesarean section before the onset of regular contractions, the MMP-8 plasma level was found significantly higher in the PROM/PPROM group (Group 0); *Mdn* 1,62 ng/mL vs *Mdn* 2,62 ng/mL; $p=0,014$).

3. The level of MMP-8 in maternal plasma was significantly increased in the PROM/PPROM group (Group 0) as compared with the control group 2 and 3 (Group 2 and 3) consisted of healthy pregnant women with intact fetal membranes during term labor; *Mdn* 2,62 ng/mL vs *Mdn* 2,02 ng/mL; $p=0,014$.

4. Statistically significantly higher level of MMP-8 in maternal plasma in the group of pregnant women with fetal membranes rupture, both premature and spontaneous during term delivery (Groups 0 and 1) as compared with the control group 2 and 3 (Group 2 and 3) consisted of healthy pregnant women with intact fetal membranes during term labor; *Mdn* 2,87 ng/mL vs *Mdn* 2,03 ng/mL; $p=0,001$.

5. The prolidase maternal plasma levels did not differ significantly between the PROM/PPROM group (Group 0) and control groups (Group 1, 2, 3).

6. In the study, the proposed cut-off point for MMP-8 in the case of spontaneous membrane rupture during labour was 3,99 ng/ml (sensitivity-70%; specificity-73%).

Conclusion

1. The occurrence of premature rupture of membranes is associated with both an increase in mRNA expression of metalloproteinase-8 in the membranes and an increase in the concentration of metalloproteinase-8 in the plasma of a pregnant woman in the absence of inflammation.
2. Maternal age is a factor affecting the concentration of MMP-8 in the plasma of both pregnant women with premature rupture of membranes and women giving birth at term, in whom increased resistance of membranes to rupture required amniocentesis due to obstetric indications.
3. Functions mediated by metalloproteinase-8 correspond to the cascade of events observed in the course of the disruption of weakened fetal membranes. The increase in the expression of metalloproteinase-8 may occur both in the situation of spontaneous rupture of membranes at term delivery, but also can be one of the pathogenetic factor in the development of PROM/PPROM.
4. Both the different mRNA expression of MMP-8 in the fetal membranes and the different index of collagen turnover represented by the prolidase concentration in the maternal plasma differentiate the pathomechanism of ECM degradation in the fetal membranes in the case of PROM and PPRM.
5. MMP-1 degrades the components of the extracellular matrix of the fetal membranes, leading to the disruption of the continuity of the membranes during uterine contractions at the term delivery.

9. SPIS TABEL, RYCIN I RYSUNKÓW

Tabela 1. Czynniki ryzyka przedwczesnego pęknięcia błon płodowych.

Tabela 2. Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej i ich enzymy degradujące.

Tabela 3. Ogólna charakterystyka pacjentek włączonych do badania, N=98.

Tabela 4. Charakterystyka badanych pacjentek z podziałem na grupy.

Tabela 5. Sekwencje starterów wykorzystanych w analizie Real-time PCR.

Tabela 6. Charakterystyka grupy badanej (Grupa 0), n=56 i grup kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42.

Tabela 7. Wiek pacjentek z grupy badanej (Grupa 0), n=56.

Tabela 8. Wiek pacjentek w grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42.

Tabela 9. Wiek ciążowy pacjentek z grupy badanej (Grupa 0), n=56

Tabela 10. Wiek ciążowy pacjentek z grup kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42.

Tabela 11. Mediany i rozkłady kwartylowe wyliczone dla uzyskanych wyników ekspresji poszczególnych genów w analizie Real-Time PCR.

Tabela 12. Analiza stopnia zmiany wyników ekspresji badanych genów w grupie badanej (Grupa 0) względem grup kontrolnych.

Tabela 13. Analiza stopnia zmiany wyników ekspresji badanych genów w obrębie grup kontrolnych.

Tabela 14. Wyniki stężeń MMP-8 w osoczu ciężarnych kobiet zakwalifikowanych do badania.

Tabela 15. Analiza stopnia zmiany wyników stężenia MMP-8 w obrębie grup kontrolnych.

Tabela 16. Wyniki stężenia prolidazy w osoczu ciężarnych kobiet w poszczególnych grupach.

Tabela 17. Analiza stopnia zmiany wyników stężenia prolidazy w obrębie grup kontrolnych.

Tabela 18. Mediany i rozkłady kwartylowe wyliczone dla uzyskanych wyników dla poszczególnych genów w analizie Real Time PCR oraz dla stężenia MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu w obrębie grupy PPRM n=32 oraz grupy PROM n=24.

Tabela 19. Analiza stopnia zmiany (Fold change) wyników ekspresji genów w błonach płodowych oraz wyników stężeń MMP-8 i prolidazy w matczynym osoczu uzyskanych w grupie PPRM n=32 względem wyników w grupie PROM n=24

Tabela 20. Analiza korelacji badanych zmiennych w grupie badanej (Grupa 0).

Tabela 21. Analiza korelacji badanych zmiennych w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3).

Tabela 22. Analiza korelacji badanych zmiennych w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2).

Tabela 23. Analiza korelacji badanych zmiennych w grupie kontrolnej 1 (Grupa 1).

Tabela 24. Korelacje stężenia MMP-8 we krwi z wiekiem ciążowym, wiekiem kobiet oraz masą urodzeniową noworodka.

Tabela 25. Liczebności pierwiastek i wieloródek dla stężenia MMP-8 we krwi przy podziale na grupy badawczą i kontrolne.

Tabela 26. Porównanie stężenia MMP-8 w zależności od rodności kobiet.

Tabela 27. Charakterystyka testu w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 1 (Grupa 1).

Tabela 28. Charakterystyka testu w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 2 (Grupa 2).

Tabela 29. Charakterystyka testu w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 3 (Grupa 3).

Tabela 30. Charakterystyka testu w oparciu o podział na grupę badaną PROM/PPROM (Grupa 0) i grupę kontrolną 2+3 (Grupa 2+3).

Rysunek 1. Budowa błon płodowych z wyszczególnieniem ich głównych składników macierzy zewnątrzkomórkowej i enzymów degradujących macierz zewnątrzkomórkową.

Rycina 1. Schemat budowy strukturalnej MMP 1. Opracowanie własne.

Rycina 2. Schemat budowy strukturalnej MMP 2. Opracowanie własne.

Rycina 3. Rozkład wyników uzyskanych dla MMP-8.

Rycina 4. Rozkład wyników uzyskanych dla prolidazy.

Rycina 5. Rodność w grupie badanej (Grupa 0) n=56 i grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3) n=42.

Rycina 6. Struktura wieku pacjentek w grupie badanej n=56.

Rycina 7. Struktura wieku pacjentek w grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42.

Rycina 8. Struktura wieku ciążowego pacjentek z grupy badanej (Grupa 0). Punkt odcięcia 37 tygodni ciąży. PROM (>37. tygodnia ciąży), n=24 vs PPRM (<37. tygodnia ciąży), n=32.

Rycina 9. Struktura sposobu porodu w grupie badanej (Grupa 0), n=56.

Rycina 10. Struktura wskazań do cięcia cesarskiego w grupie badanej (Grupa 0), n=56.

Rycina 11. Struktura wskazań do cięcia cesarskiego w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2), n=16.

Rycina 12. Struktura płci noworodków w grupie badanej (Grupa 0), n=56 i grupach kontrolnych (Grupa 1, 2, 3), n=42.

Rycina 13. Porównanie ekspresji MMP1 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 1 a Grupą 0.

Rycina 14. Porównanie ekspresji MMP-1 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 3 a Grupą 1.

Rycina 15. Porównanie ekspresji MMP-8 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 3 a Grupą 0.

Rycina 16. Porównanie ekspresji MMP-8 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 0 a Grupą 2+3.

Rycina 17. Porównanie ekspresji MMP-8 w błonach płodowych pomiędzy Grupą 0+1 a Grupą 2+3.

Rycina 18. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 1 a Grupą 0.

Rycina 19. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 2 a Grupą 0.

Rycina 20. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 0 a Grupą 2+3.

Rycina 21. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 0+1 a Grupą 2+3.

Rycina 22. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 1 a Grupą 2.

Rycina 23. Porównanie stężenia MMP-8 w matczynym osoczu pomiędzy Grupą 1 a Grupą 3.

Rycina 24. Istotne statystycznie korelacje zmiennych w grupie badanej (Grupa 0).

Rycina 25. Istotne statystycznie korelacje zmiennych w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3).

Rycina 26. Istotne statystycznie korelacje zmiennych w grupie kontrolnej 2 (Grupa 2).

Rycina 27. Istotne statystycznie korelacje między stężeniem MMP8 w matczynym osoczu a wiekiem ciężarnej w grupie badanej (Grupa 0) oraz w grupie kontrolnej 3 (Grupa 3).

Rycina 28. Osoczowe stężenie MMP-8 w predykcji momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 1 (krzywa ROC, AUC=0,717).

Rycina 29. Osoczowe stężenie MMP-8 w predykcji momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 2 (krzywa ROC, AUC=0,649).

Rycina 30. Osoczowe stężenie MMP-8 w predykcji momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 3 (krzywa ROC, AUC=0,607).

Rycina 31. Osoczowe stężenie MMP-8 w predykcji momentu pęknięcia błon płodowych w oparciu o podział na grupy 0 i 2+3 (krzywa ROC, AUC=0,607)

10. PIŚMIENNICTWO

1. Simhan HN, Canavan TP. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis, evaluation and management strategies. BJOG. 2005; 112, Suppl 1, 32-37.
2. Medina TM H DA. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis and management. Am Fam Physician. 2006;73(4):659–664
3. American College of Obstetricians and Gynecologists. Practice Bulletin no. 188. ACOG practice bulletin No. 188: prelabor rupture of membranes. Obstet Gynecol. 2018;131:e1–e14.
4. Ocviyanti D, Wahono WT. Risk factors for neonatal sepsis in pregnant women with premature rupture of the membrane. J Pregnancy. 2018;2018:1–6
5. Thomson AJ. Care of women presenting with suspected preterm prelabour rupture of membranes from 24+0 weeks of gestation. BJOG. 2019;126(9):e152–e166
6. M. H. Yudin, J. van Schalkwyk, and N. Van Eyk, “No. 233-Antibiotic Terapy in Preterm Premature Rupture of the Membranes,” Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada, vol. 39, no. 9, pp. e207–e212, 2017
7. Modena AB, Kaihura C, Fieni S. Prelabour rupture of the membranes: recent evidence. Acta Biomed. 2004;75(Suppl 1):5–10
8. Bond DM, Middleton P, Levett KM, van der Ham DP, Crowther CA, Buchanan SL, et al. Planned early birth versus expectant management for women with preterm prelabour rupture of membranes prior to 37 weeks’ gestation for improving pregnancy outcome. Cochrane Database Syst Rev. 2017;2017(3)
9. Helmer H. Continuing challenges in treating preterm labour: preterm prelabour rupture of the membranes. BJOG. 2006;113(Suppl. 3):111–112
10. Major CA, de Veciana M, Lewis DF, Morgan MA. Preterm premature rupture of membranes and abruptio placentae: is there an association between these pregnancy complications? Am J Obstet Gynecol. 1995;172(2):672–676
11. Ananth CV, Oyelese Y, Srinivas N, Yeo L, Vintzileos AM. Preterm premature rupture of membranes, intrauterine infection, and oligohydramnios: risk factors for

placental abruption. *Obstet Gynecol.* 2004;104(1):71–77

12. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi M-T, Bianco K, Ghezzi F, Yoon BH. Evidence for the participation of interstitial collagenase(matrix metalloproteinase-1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:914-920

13. Tu FF, Goldenberg RL, Tamura T, et al. Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 levels to predict spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol.* 1998; 92: 446–449

14. Vadillo-Ortega, F. & Estrada-Gutiérrez, G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 112, 19–22 (2005)

15. Parry S, Strauss JF III. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998;338(10):663–670

16. Gunn GC, Mishell DR, Morton DG. Premature rupture of the fetal membranes. A review. *Am J Obstet Gynecol* 1970;106:469–83

17. Simhan HN, Canavan TP. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis, evaluation and management strategies. *BJOG.* 2005, 112, Suppl 1, 32-37

18. Schucker JL, Mercer BM. Midtrimester premature rupture of the membranes. *Semin Perinatol.* 1996, 20:389–400

19. Czajka R.: Poród przedwczesny. *Klin. Perinat. Ginekol.* 1994; 10: 59-66

20. Czekanowski R.: Czynność skurczowa macicy w perinatologii. Białystok. 1992; 123-140

21. Moutquin, J.-M., Milot-Roy, V., & Irion, O. (1996). Preterm Birth Prevention: Effectiveness of Current Strategies. *Journal SOGC*, 18(6), 571–588

22. Czajka R. Etiopatogeneza porodu przedwczesnego. W: Poród przedwczesny. Red. Bręborowicz G, Paszkowski T. Poznań: Ośrodek Wydawnictw Naukowych. 2006, 11-19

23. Genc M, Ford C. The clinical use of inflammatory markers during pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010, 22, 116-121

24. Goldberg R, Hauth J, Andrews W, [et al.]. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000, 342, 1500-1507

25. Svigos J.M. i wsp. Threatened and actual preterm labour including mode of delivery. High risk pregnancy. 2000; 999-1013
26. Obi SN, Ozumba BC. Pre-term premature rupture of fetal membranes: the dilemma of management in a developing nation. J Obstet Gynaecol. 2007, 27, 37-40
27. Smith G, Rafuse C, Anand N, [et al.]. Prevalence, management, and outcomes of preterm prelabour rupture of the membranes of women in Canada. J Obstet Gynaecol Can. 2005, 27, 547-553
28. Simhan HN, Canavan TP. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis, evaluation and management strategies. BJOG. 2005, 112, Suppl 1, 32-37
29. Caughey A, Robinson J, Norwitz E. Contemporary Diagnosis and Management of Preterm Premature Rupture of Membranes. Rev Obstet Gynecol. 2008, 1, 11-22
30. Baramova E, Foidart JM. Matrix metalloproteinase family. Cell biology international. 1995;19(3) 239-42
31. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biological chemistry. 1997;378(3-4) 151-60
32. Loffek S, Schilling O, Franzke C-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. Eur Respir J 2011; 38: 191-208
33. Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otin C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. Biochim Biophys Acta. 2010 Jan;1803(1):3-19
34. Bode W., Maskos K.: Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. Biol. Chem. 2003, 358, 863–872
35. Lipka D., Boratyński J.: Metaloproteiny MMP. Struktura i funkcja. Postępy Hig. Med. Dośw. 2008, 62, 328–336
36. Łukaszewicz M., Mroczko B., Szmitkowski M.: Rola metaloproteiny i ich inhibitorów w raku trzustki. Postępy Hig. Med. Dośw. 2008, 62, 141–147

37. Bogaczewicz J., Chodorowska G., Krasowska D.: Rola metaloproteinaz macierzy i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w układzie odpornościowym skóry. *Przegl. Dermatol.*, 2005; 92: 139–149
38. Bogaczewicz J., Jasielski P., Mosiewicz A., Trojanowski T., Suchożębska-JesioneckD., Stryjecka-Zimmer M., Rola metaloproteaz macierzy i tkankowych inhibitorów metaloproteaz w inwazji nowotworów pochodzenia neuroepitelialnego, „*Neurologia i Neurochirurgia Polska*” 2006, nr 5, s. 404–412
39. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherosclerosis: the good, the bad, the ugly. *Circ Res.* 2002, 90, 251–262
40. Wojtowicz-Praga S.M., Dickson R.B., Hawkins M.J.: Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest. New Drugs* 1997, 15, 61–75
41. Haq M., Shaeii A.E., Zervos E.E., Rosemurgy A.S.: In vitro and in vivo matrix metalloproteinase production by pancreatic cancer cells and by distant organs. *Int. J. Surg. Invest.* 2000, 1, 459–465
42. Arianna Aricò, Mery Giantin, Mariaelena Gelain, Fulvio Riondato, Michele Mortarino, Stefano Comazzi, Mauro Dacasto, Massimo Castagnaro, Luca Aresu: Matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor expression in canine leukaemias. *Vet. J.* 2013, 196, 260–262
43. Kowalski M., Walczak A., Majsterek I. Metaloproteinazy macierzowe (MMPs) – nowoczesne markery molekularne do prognozowania i terapii jaskry otwartego kąta. *Postepy Hig Med Dosw* 2008, 62, 582–592
44. Łapińska J., Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej w inwazji nowotworów, „*Współczesna Onkologia*” 1999, nr 3, s. 120–122
45. Piccard H, Van den Steen PE, Opdenakker G (2007) Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J Leukoc Biol* 81: 870-892
46. Clark IM, Swingle TE, Sampieri CL, Edwards DR (2008) The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Internat J Bio-chem Cell Biol* 40: 1362-1378

47. Łapka A, Goździalska A, Jaśkiewicz J. Rola metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w nowotworach piersi, ze szczególnym uwzględnieniem roli Żelatynazy A oraz Żelatynazy B. *Post Biol Komórki*. Tom 33 2006 Nr 4 (683-695)
48. Poola I, DeWitty RL, Marshall JJ, Bhatnagar R, Abraham J, Leffall LD. Identification of MMP-1 as a putative Breast cancer predictive marker by global gene expression analysis. *Nat Med*. 2005 May;11(5):481-3. Epub 2005 May 1
49. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002; 52: 255-64
50. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463-516
51. Karowicz-Bilińska A. Ocena wybranych parametrów biochemicznych w hipotrofii wewnątrzmacicznej płodu. Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet Medyczny w Łodzi. 2003, 9-18
52. Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)- 2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochem*. 2004, 106, 353-362
53. Xu P, Wang Y, Zhu S, [et al.]. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biol Reprod*. 2000, 62, 988-994
54. Hu Z, Fang M, Shen Z, [et al.]. Relationship between expression of vimentin, type IV collagen and fibronectin in human placenta and pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2004, 39, 609-611
55. Zhan Y, Chen W, Ye Y, Lou Y. Expression of matrix metalloproteinase-9 and tumor necrosis factor-alpha in the placenta of patients with pregnancy-induced hypertension. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2005, 25, 1070-1074
56. Shokry M, Orman O, Hassan H, [et al.]. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human trophoblasts of normal and preeclamptic placentas: preliminary findings. *Exp Mol Pathol*. 2009, 87, 219-225

57. Zhang H, Lin Q, Qiao C. Expression of trophoblast invasion related genes mRNA and protein in human placenta in preeclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2006, 41, 509-513
58. Caughey AB, Robinson JN, Norwitz ER. Contemporary Diagnosis and Management of Preterm Premature Rupture of Membranes. *Rev Obstet Gynecol*. 2008 1(1): 11–22
59. El Khwad M, Stetzer B, epsteine RM, [et al.]. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod* 2005, 72:720–6
60. Moore RM, Mansour JM, Redline RW, [et al.]. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta*. 2006, 27: 1037–51
61. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased incidence of apoptosis in non-labour-affected cytotrophoblast cells in term fetal membranes overlying the cervix. *Hum Reprod*. 1999, 14: 2895–900
62. Lavery JP, Miller CE, Knight RD. The effect of labor on the rheologic response of chorioamniotic membranes. *Obstet Gynecol*. 1982, 60:87–92
63. Mercer BM. Preterm premature ruptures of the membranes. *Obstet Gynecol*. 2003, 101:178–93
64. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol*. 2003, 101(1): 178–193
65. Mercer BM, Goldenberg RL, Moawad AH, [et al.]. The preterm prediction study: Effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 1999, 181: 1216–21
66. Pardo A, Selman M. MMP-1 the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(2) 283-8
67. Iyer S, Visse R, Nagase H, Acharya KR. Crystal structure of an active form of human MMP-1. *Journal of molecular biology*. 2006;362(1) 78-88
68. Arakaki PA, Marques MR, Santos MC. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *Journal of biosciences*. 2009;34(2) 313-20

69. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(5) 534-40
70. Baramova E, Foidart JM. Matrix metalloproteinase family. *Cell biology international.* 1995;19(3) 239-42
71. Mishra G, Ranganathan K. Matrix metalloproteinase-1 expression in oral submucous fibrosis an immunohistochemical study. *Indian journal of dental research official publication of Indian Society for Dental Research.* 2010;21(3) 320-5.
72. Eto H, Suga H, Aoi N, Kato H, Doi K, Kuno S, et al. Therapeutic potential of fibroblast growth factor-2 for hypertrophic scars upregulation of MMP-1 and HGF expression. *Lab Invest.* 2012;92(2) 214-23
73. Herrera I, Cisneros J, Maldonado M, Ramirez R, Ortiz-Quintero B, Anso E, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-1 induces lung alveolar epithelial cell migration and proliferation, protects from apoptosis, and represses mitochondrial oxygen consumption. *J Biol Chem.* 2013;288(36) 25964-75.
74. Wang W, Pan H, Murray K, Jefferson BS, Li Y. Matrix metalloproteinase-1 promotes muscle cell migration and differentiation. *The American journal of pathology.* 2009;174(2) 541-9
75. Shi ZD, Ji XY, Berardi DE, Qazi H, Tarbell JM. Interstitial flow induces MMP-1 expression and vascular SMC migration in collagen I gels via an ERK1/2-dependent and c-Junmediated mechanism. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2010;298(1) H127-35
76. Sri Manjari K, Nallari P, Vidyasagar A, Jyothy A, Venkateshwari A. Plasma TGF-beta1, MMP-1 and MMP-3 Levels in Chronic Pancreatitis. *Indian journal of clinical biochemistry IJCB.* 2012;27(2) 152-6
77. Hadziabdic N, Kurtovic-Kozaric A, Pojskic N, Sulejmanagic N, Todorovic L. Gene expression analysis of matrix metalloproteinases 1 and 2 and their tissue inhibitors in chronic 96 periapical inflammatory lesions. *Journal of oral pathology & medicine official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2016;45(3) 224-30

78. Evrosimovska B, Dimova C, Kovacevska I, Panov S. Concentration of collagenases (MMP-1, -8, -13) in patients with chronically inflamed dental pulp tissue. *Prilozi*. 2012;33(2) 191-204
79. Ahmed Z, Dent RG, Leadbeater WE, Smith C, Berry M, Logan A. Matrix metalloproteases degradation of the inhibitory environment of the transected optic nerve and the scar by regenerating axons. *Molecular and cellular neurosciences*. 2005;28(1) 64-78
80. Homma T, Kato A, Sakashita M, Takabayashi T, Norton JE, Suh LA, et al. Potential Involvement of the Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Epiregulin and Matrix Metalloproteinase-1 in Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017
81. Basaran R, Senol M, Ozkanli S, Efendioglu M, Kaner T. Correlation of matrix metalloproteinase (MMP)-1, -2, -3, and -9 expressions with demographic and radiological features in primary lumbar intervertebral disc disease. *Journal of clinical neuroscience official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2017
82. Guiot J, Moermans C, Henket M, Corhay JL, Louis R. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung*. 2017
83. Robert S, Gicquel T, Victoni T, Valenca S, Barreto E, Bailly-Maitre B, et al. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. *Bioscience reports*. 2016;36(4)
84. Tokito A, Jougasaki M. Matrix Metalloproteinases in Non-Neoplastic Disorders. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7)
85. Mishra G, Ranganathan K. Matrix metalloproteinase-1 expression in oral submucous fibrosis an immunohistochemical study. *Indian journal of dental research official publication of Indian Society for Dental Research*. 2010;21(3) 320-5
86. Li H.C., Cao D.C., Liu Y., Hou Y.F., Wu J., Lu J.S., Di G.H., Liu G., Li F.M., Ou Z.L., Jie C., Shen Z.Z., Shao Z.M.: Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treatm*. 2004, 88, 75–85

87. Łapka A, Goździalska A, Jaśkiewicz J. Rola metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w nowotworach piersi, ze szczególnym uwzględnieniem roli Żelatynazy A oraz Żelatynazy B. *Post Biol Komórki*. Tom 33 2006 Nr 4 (683-695)
88. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*. 2002 Feb;160(2):673-80
89. Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):2276-81
90. Trojanek J. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowe inhibitory. *Post Bioch* 58 (3) 2012:353-362
91. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). Guideline No. 44, November 2006. Preterm Prelabour Rupture of Membranes
92. Bręborowicz GH, Drews K, Połczyńska-Kaniak E. Ciąża Wysokiego Ryzyka. Przedwczesne pęknięcie błon płodowych. OWN Poznań, 2010, Wydanie III, 177-192
93. Belady PH, Farkouh LJ, Gibbs RS. Intra-amniotic infection and premature rupture of the membranes. *Clin Perinatol*. 1997, 24(1):43-57
94. Brown CL, Ludwiczak MH, Blanco JD, [et al.]. Cervical dilation: accuracy of visual and digital examinations. *Obstet Gynecol*. 1993, 81:215–6
95. Munson LA, Graham A, Koos BJ, [et al.]. Is there a need for digital examination in patients with spontaneous rupture of the membranes? *Am J Obstet Gynecol*. 1985, 153: 562–3
96. Lewis DF, Major CA, Towers CV, [et al.]. Effects of digital vaginal examinations on latency period in preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol*. 1992, 80:630–4, 630-634
97. Asrat T, Garite TJ. Management of preterm premature rupture of membranes. *Clin Obstet Gynecol*. 1991, 34(4): 730-41
98. Słomko Z, Pisarski T. Zakażenie wewnątrzrodniowe i jego następstwa. *Medycyna Perinatalna* 1986, Tom II, PZWL, Warszawa

99. Bennett SL, Cullen JB, Sherer DM, [et al.]. The ferning and nitrazine tests of amniotic fluid between 12 and 41 weeks gestation. *Am J Perinatol.* 1993, 10, 101–104
100. Piazzze J, Anceschi MM, Cerekja A, [et al.]. Validity of amniotic fluid index in preterm rupture of membranes. *J Perinat Med.* 2007, 35, 394-398
101. Poniedziałek-Czajkowska E, Leszczyńska-Gorzelak B, Oleszczuk J. The relationship between the levels of proinflammatory cytokines, and AFI value in pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Ginekol Pol.* 2001, 72, 1163-1169
102. ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2007, 109, 1007-1019
103. Bręborowicz G. Położnictwo i ginekologia. Warszawa: PZWL; 2005, tom I, str.125-129, 178- 182, 439-444
103. Prelabor rupture of membranes: ACOG Practice Bulletin, Number 217. *Obstet Gynecol.* 2020;135(3):e80–e97
104. Shazly SA, Ahmed IA, Radwan AA, Abd-Elkariem AY, El-Dien NB, Ragab EY, et al. Middle-East OBGYN graduate education (MOGGE) foundation practice guidelines: prelabor rupture of membranes; practice guideline (01)-O-19. *J Glob Health.* 2020;10(1)
105. Hannah ME, Ohlsson A, Farine D, Hewson SA, Hodnett ED, Myhr TL, et al. Induction of labor compared with expectant management for prelabor rupture of the membranes at term. *N Engl J Med.* 1996;334(16):1005–1010
106. Keirse MJ, Ottervanger HPSW. Controversies: prelabor rupture of the membranes at term: the case for expectant management. *J Perinat Med.* 1996;24(6):563–572
107. Seaward PG, Hannah ME, Myhr TL, Farine D, Ohlsson A, Wang EE, et al. International multicentre term prelabor rupture of membranes study: evaluation of predictors of clinical chorioamnionitis and postpartum fever in patients with prelabor rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177(5):1024–1029
108. Zanella P, Bogana G, Ciullo R, Zambon A, Serena A, Albertin MA. Corionamnionite in Sala Parto. TT-[chorioamnionitis in the delivery room] *Minerva Pediatr.* 2010;62(3 Suppl 1):151–153

109. Thomson AJ. Care of women presenting with suspected preterm prelabour rupture of membranes from 24+0 weeks of gestation. *BJOG*. 2019;126(9):e152–e166
110. Fahey JO. Clinical management of intra-amniotic infection and chorioamnionitis: a review of the literature. *J Midwifery Women's Heal*. 2008;53(3):227–235
111. Mercer BM, Miodovnik M, Thurnau GR, Goldenberg RL, Das AF, Ramsey RD, et al. Antibiotic therapy for reduction of infant morbidity after preterm premature rupture of the membranes: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc*. 1997;278(12):989–995
112. Garite TJ, Freeman RK. Chorioamnionitis in the preterm gestation. *Obstet Gynecol*. 1982;59(5):539–545
113. Beydoun SN, Yasin SY. Premature rupture of the membranes before 28 weeks: conservative management. *Am J Obstet Gynecol*. 1986;155(3):471–479. doi: 10.1016/0002-9378(86)90257-7
114. Seaward PG, Hannah ME, Myhr TL, Farine D, Ohlsson A, Wang EE, et al. International multicentre term prelabor rupture of membranes study: evaluation of predictors of clinical chorioamnionitis and postpartum fever in patients with prelabor rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;177(5):1024–1029
115. Tita ATN, Andrews WW. Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis. *Clin Perinatol*. 2010;37(2):339–354
116. Johnson CT, Farzin A, Burd I. Current management and long-term outcomes following chorioamnionitis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2014;41
117. Dale PO, Tanbo T, Bendvold E, [et al.]. Duration of the latency period in preterm premature rupture of the membranes. Maternal and neonatal consequences of expectant management. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1989, 30: 257-262
118. Bengtson JM, Van Marter L, Barss VA, [et al.]. Pregnancy outcome after premature rupture of membranes at or before 26 weeks' gestation. *Obstet Gynecol*. 1989, 73:921-927
119. Mercer BM. Management of premature rupture of the membranes before 26 weeks' gestation. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1992,19: 339-351

120. Lee T, Carpenter M, Heber WW, [et al.]. Preterm pre- mature rupture of membranes:risks of recurrent complications in the next pregnancy among a population based sample of gravid women. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 188: 209–13
121. Vadillo-Ortega F, Gonzalea-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, StetlerStevenson G, Strauss III JF 1995 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 146:148–156
122. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC 2000 Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 182:409–416
123. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R Edwin SS, Yoon BH 2000 Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 183:887–894
124. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Bianco K, Ghezzi F, Yoon BH 2000 Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 183:914–920
125. Xu P, Alfaidy N, Challis JRG 2002 Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1353–1361
126. Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, Espinoza J, Yoshimatsu J, Edwin S, Gomez R, Yoon BH, Romero R 2003 Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *J Perinat Med* 31:12–22
127. Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E 2003 Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and deciduas, associated with labour. *Mol Hum Reprod* 9:367–373
128. Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan QW, Miyauche T, Toyama Y, Kuno N, Yuasa S, Takahashi M, Senda T, Taguchi O, Yamamura K, Arimura K,

Muramatsu T 1998 A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol* 194:152–165

129. Kuno N, Kadomatsu K, Fan Q, Hagihara M, Senda T, Mizutani S, Muramatsu T 1998 Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett* 425:191–194

130. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasing HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Jackson A 2000 A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is up regulated in heart failure. *Circulation* 102:1944–1949

131. Kanekura T, Chen X, Kanzaki T 2002 Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 99:520–528

132. Yang JM, Xu Z, Wu H, Zhu HG, Wu XH, Hait WN 2003 Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer Res* 1:420–427

133. Riley SC, Leask R, Denison FC, Wisely K, Calder AA, Howe DC 1999 Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human fetal membranes, deciduas and placenta at parturition. *J Endocrinol* 162:351–359

134. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ, LaFleur B 2001 Interleukin-10 inhibition of gelatinases in fetal membranes: therapeutic implications in preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 98:284–288

135. So T, Ito A, Sato T, Mori Y, Hirakawa S 1992 Tumor necrosis factor- stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biol Reprod* 46:772–778

136. Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD 1997 An autocrine/ paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod* 56:812–820

137. Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD 1997 An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod* 56:800–811
138. Li, Wei; Alfaidy, Nadia; Challis, John R. G. (2004). Expression of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer in Human Placenta and Fetal Membranes at Term Labor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2897–2904
139. Zhang H, Lin Q, Qiao C. Expression of trophoblast invasion related genes mRNA and protein in human placenta in preeclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2006, 41, 509-513
140. von Steinburg S, Kruger A, Fischer T, [et al.]. Placental expression of proteases and their inhibitors in patients with HELLP syndrome. *Biol Chem*. 2009, 390, 1199-1204
141. Stettner R, Bogusiewicz M, Rechberger T. Rola metaloproteaz macierzowych i ich inhibitorów w progresji raka jajnika – implikacje diagnostyczne i terapeutyczne. *Ginekolog Pol*. 2009, 80, 47-53
142. Wlaźlak E, Surkont G, Kobos J, Tyliński W, [i wsp.]. Ekspresja metaloproteinaz MMP-1, MMP-9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinazy TIMP-1 w przypadkach raka endometrium oraz rozrostów błony śluzowej jamy macicy. *Przegląd Menopauzalny*. 2006, 6, 363-366
143. Arkadiusz Świerczewski, Józef Kobos, Jacek Pasiński, Urszula Kowalska-Koprek, Agata Karowicz-Bilińska. Ekspresja metaloproteinazy MMP-9 i tkankowego inhibitora metaloproteinazy TIMP-2 w łożysku kobiet w ciąży z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrostu. *Ginekolog Pol* 2012;83(6)
144. Xu P, Wang Y, Piao Y, [et al.]. Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod*. 2001, 65, 240-246
145. Huppertz B, Kertschanska S, Demir A, [et al.]. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res*. 1998, 291, 133-148

146. Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)- 2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochem.* 2004, 106, 353-362
147. Merchant S, Crocker I, Baker P, [et al.]. Matrix metalloproteinase release from placental explants of pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *J Soc Gynecol Investig.* 2004, 11, 97-103
148. Arikat S, Novince RW, Mercer BM, Kumar D, Fox JM, Mansour JM, Moore JJ
Separation of amnion from choriodecidua is an integral event to the rupture of normal term fetal membranes and constitutes a significant component of the work required. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Jan;194(1):211-7
149. Oyen ML, Calvin SE, Landers DV Premature rupture of the fetal membranes: is the amnion the major determinant? *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Aug;195(2):510-5
150. Parry S, Strauss JF III. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998;338(10):663–670
151. Joyce EM, Moore JJ, Sacks MS. Biomechanics of the fetal membrane prior to mechanical failure: review and implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;144(suppl 1):S121–S127
152. Helmig R, Oxlund H, Petersen LK, Uldbjerg N. Different biomechanical properties of human fetal membranes obtained before and after delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1993;48(3):183–189
153. Jabareen M, Mallik AS, Bilic G, Zisch AH, Mazza E. Relation between mechanical properties and microstructure of human fetal membranes: an attempt towards a quantitative analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;144(suppl 1):S134–S141
154. Pressman EK, Cavanaugh JL, Woods JR. Physical properties of the chorioamnion throughout gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(3):672–675
155. Moore RM, Mansour JM, Redline RW, Mercer BM, Moore JJ. The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta.* 2006;27(11-12):1037–1051

156. Hampson V, Liu D, Billett E, Kirk S. Amniotic membrane collagen content and type distribution in women with preterm premature rupture of the membranes in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104(9):1087–1091
157. Meirowitz NB, Smulian JC, Hahn RA. et al. Collagen messenger RNA expression in the human amniochorion in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(6):1679–1685
158. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(2):409–416
159. Arechavaleta-Velasco F, Mayon-Gonzalez J, Gonzalez-Jimenez M, Hernandez-Guerrero C, Vadillo-Ortega F. Association of type II apoptosis and 92-kDa type IV collagenase expression in human amniochorion in prematurely ruptured membranes with tumor necrosis factor receptor-1 expression. *J Soc Gynecol Investig.* 2002;9(2):60–67
160. Fortunato SJ, Menon R, Bryant C, Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(6):1468–1476
161. Athayde N, Edwin SS, Romero R. et al. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(5):1248–1253
162. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol.* 1995;146(1):148–156
163. Nishihara S, Someya A, Yonemoto H, et al. Evaluation of the expression and enzyme activity of matrix metalloproteinase-7 in fetal membranes during premature rupture of membranes at term in humans. *Reprod Sci.* 2008;15(2):156–165
164. Yonemoto H, Young CB, Ross JT, Guilbert LL, Fairclough RJ, Olson DM. Changes in matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the fetal amnion and chorion during gestation and at term and preterm labor. *Placenta.* 2006;27(6-7):669–677

165. Ota A, Yonemoto H, Someya A, Itoh S, Kinoshita K, Nagaoka I. Changes in matrix metalloproteinase 2 activities in amniochorions during premature rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig.* 2006;13(8):592–597
166. Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1353–1361
167. Tromp G, Kuivaniemi H, Romero R, et al. Genome-wide expression profiling of fetal membranes reveals a deficient expression of proteinase inhibitor 3 in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(4):1331–1338
168. Fortunato SJ, Menon R. Screening of novel matrix metalloproteinases (MMPs) in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet.* 2002;19(10):483–486
169. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3 and -4) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol.* 1998;40(6):395–400
170. Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod* 2003
171. Carroll SG, Papiaioannou S, Nicolaides KH. Assessment of fetal activity and amniotic fluid volume in the prediction of intrauterine infection in preterm prelabor amniorrhexis. *Am J Obstet Gynecol.* 1995, 172, 1427–1435
172. Ismail MA, Zinaman MJ, Lowensohn RI, [e al.]. The significance of C-reactive protein levels in women with premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1985
173. Watts DH, Krohn MA, Hillier SL, [et al.]. Characteristics of women in preterm labour associated with elevated C-reactive protein levels. *Obstet Gynecol.* 1993, 82: 509–14
174. Carroll SG, Papaioannou S, Ntumazah IL, [et al.]. Lower genital tract swabs in the prediction of intrauterine infection in preterm prelabour rupture of the membranes. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996;103:54–9

175. RCOG. Preterm Prelabour Rupture of Membranes. Green-top Guideline No. 44, 2010
176. van de Laar R, van der Ham DP, Oei SG, [et al.]. Accuracy of C-reactive protein determination in predicting chorioamnionitis and neonatal infection in pregnant women with premature rupture of membranes: A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009, 147, 124-129
177. Bręborowicz GH, Drews K, Połczyńska-Kaniak E. Ciąża Wysokiego Ryzyka. Przedwczesne pęknięcie błon płodowych. OWN Poznań, 2010, Wydanie III, 177-192
178. Harding JE, Pang J, Knight DB, [et al.]. Do antenatal corticosteroids help in the setting of preterm rupture of membranes ? *Am J Obstet Gynecol.* 2001, 184: 131–9
179. Crowley P. Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000; 2
180. ACOG Committee on Practice Bulletins-Obstetrics. ACOG Practice Bulletin No. 80: premature rupture of membranes. Clinical management guidelines for obstetrician & gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2007, 109: 1007-1019
181. Mercer BM, Miodovnik M, Thurnau GR, [et al.]. Antibiotic therapy for reduction of infant morbidity after preterm premature rupture of the membranes. A randomized controlled trial. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *JAMA.* 1997, 278, 989– 995
182. Kenyon S, Boulvain M, Neilson J. Antibiotics for preterm rupture of membranes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003, 2, CD001058
183. Combs CA, McCune M, Clark R, [et al.]. Aggressive tocolysis does not prolong pregnancy or reduce neonatal morbidity after preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 190: 1723–8
184. Weiner CP, Renk K, Klugman M. The therapeutic efficacy and costeffectiveness of aggressive tocolysis for premature labor associated with premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159: 216–22
185. Wolfensberger A, Zimmermann R, von Mandach U. Neonatal mortality and morbidity after aggressive longterm tocolysis for preterm premature rupture of the membranes. *Fetal Diagn Ther.* 2006, 21: 366-373

186. Mercer BM. Is there a role for tocolytic therapy during conservative management of preterm premature rupture of the membranes ? Clin Obstet Gynecol. 2007, 50: 487-496
187. Wielgoś M. Poród przedwczesny. Biblioteka ginekologa praktyka. Gdańsk . VIA MEDICA. 2014. Wydanie drugie.25-39
- 188.Wielgoś M, Bomba-Opoń DA. Tocolysis in preterm labour-current recommendations. Ginekol Pol. 2014, 85, 332-334
189. Informacja Prezesa Urzędu z dnia 30.10.2013 r. dotycząca stanowiska CMDh w sprawie ograniczenia w stosowaniu krótkodziałających beta-agonistów w położnictwie. <http://www.urpl.gov.pl/aktualności>.
190. Restrictions on use of short –acting beta-agonists in obstetrics indications – CMDh endorses PRAC recommendations.<http://www.ema.europa.eu>.
- 191.Lyndon A. Preterm labor and birth:where are we now?J.Perinat. Neonatal Nurs. 2006, 20, 82-84
192. Spinnato JA 2nd. Maturity testing with preterm premature rupture of the membranes. Clin Perinatol. 2001, 28, 819-836
193. Dare MR, Middleton P, Crowther CA, [et al.]. Planned early birth versus expectant management (waiting) for prelabour rupture of membranes at term (37 weeks or more) (Review). The Cochrane Database Syst Rev. 2009
194. Neerhof MG, Cravello C, Haney EI, [et al.]. Timing of labor induction after premature rrupture of membranes between 32 and 36 weeks' gestation. Am J Obstet Gynecol. 1999, 180, 349–352
195. Waters TP, Mercer BM. The management of preterm premature rupture of the membranes near the limit of fetal viability. Am J Obstet Gynecol. 2009, 201(3): 230-40
196. Mercer BM, Arheart KL. Antimicrobial therapy in expectant management of preterm premature rupture of membranes. Lancet. 1995, 346: 1271-1279
197. Myara I, Myara A, Mangeot M, Fabre M, Charpentier C, Lemonnier A. Plasma prolidase activity: A possible index of collagen catabolism in chronic liver disease. Clin Chem 1984; 30: 211-15.

198. Cechowska-Pasko M, Pałka J, Wojtukiewicz MZ. Enhanced prolidase activity and decreased collagen content in breast cancer tissue. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 289-96
199. Gumus S, Yaman H, Ozcan O, Deniz O, Karaman B, Cakir E, Tozkoparan E, Ozkan M, Bilgic H. Serum prolidase activity in patients with pulmonary tuberculosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2011; 71: 467-72
200. Vural M, Toy H, Camuzcuoglu H, Aksoy N. Comparison of prolidase enzyme activities of maternal serum and placental tissue in patients with early pregnancy failure. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283: 953-8
201. Kanayama N, Terao T, Kawashima Y, Horiuchi K, Fujimoto D. Collagen types in normal and prematurely ruptured amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153:899 -903
202. Skinner SJ, Campos GA, Liggins GC. Collagen content of human amniotic membranes: Effect of gestation length and premature rupture. *Obstet Gynecol* 1981;57:487-9
203. Skinner SJ, Liggins GC. Glycosaminoglycans and collagen in human amnion from pregnancies with and without premature rupture of the membranes. *J Dev Physiol* 1981;3:111-21
204. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Bianco K, Ghezzi F, 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
205. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Athayde N, Edwin S, et al. Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:94–9
206. Quintero RA, Morales WJ, Kalter CS, Allen M, Mendoza G, Angel JL, et al. Transabdominal intra-amniotic endoscopic assessment of previable premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:71–6
207. Beckmann MW, Wiegratz I, Dereser MM, Baier P, Born HJ. Diagnostik des Blasensprungs: Vergleich des vaginalen Nachweises von fetalem Fibronectin und der intraamnialen Injektion von Indigo Carmine. *Geburtshilfe Frauenheilk.* 1993;53:86–91

208. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and metaanalysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45:16–26
209. Souza ASR, Patriota AF, Guerra GVDQL, Melo BCPD. Evaluation of perinatal outcomes in pregnant women with preterm premature rupture of membranes. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2016;62:269–75
210. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994;101:375–86.
211. Drews K, Pieńkowski W, Bręborowicz GH, Paszkowski T. Infekcja wstępująca i wertykalna a poród przedwczesny. *Poród Przedwczesny. OWN Poznań* 2006; 79-94
212. Sadowski K, Bręborowicz GH, Paszkowski T. Przedwczesne pęknięcia pęcherza płodowego – PROM. *Poród Przedwczesny. OWN Poznań* 2006; 159-176
213. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Meraz N, Ayala A, Selman M: Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990, 75:84-88
214. McLaren J, Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: Identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod* (1999) 14(1):237–41
215. Drapper D, Mc Gregor J, Hall J et al. Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1506–1512
216. Joseph R. Biggio Jr.; Patrick S. Ramsey; Suzanne P. Cliver; Martha D. Lyon; Robert L. Goldenberg; Katharine D. Wenstrom (2005). Midtrimester amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) levels above the 90th percentile are a marker for subsequent preterm premature rupture of membranes. , 192(1), 109–113
217. Fernandez P, Merino M, Nogales F, Charonis A, Stetler-Stevenson W, Liotta L: Immunohistochemical profile of basement membrane proteins and 72 kilodalton type IV collagenase in the implantation placental site. *Lab Invest* 1992, 66:572-579

218. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Meraz N, Ayala A, Selman M: Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990, 75:84-88
218. Easterling TR, Garite T. *Fusobacterium*: anaerobic occult amnionitis and premature labor. *Obstet Gynecol* 1985;66:825-828
219. Gibbs RS, Blanco JD. Premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 1982;60:671-679
- 220 Feinstein SJ, Vintzileos AM, Lodeiro JG, Campbell WA, Weinbaum PJ, Nochimson DJ. Amniocentesis with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1986;68:147-152
221. Evaldson G, Lagrelius A, Winiarski J. Premature rupture of the membranes. *Acta Obstet Gynecol Stand* 1980;59:385-393
222. McGregor J, Lawellin D, France-Buff A, Todd JK, Makowski EL. Protease production by microorganisms associated with reproductive tract infection. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:109-114
223. McGregor JA, French JL, Lawellin D, France-Buff A, Smith C, Todd JK. Bacterial protease-induced metabolism in human amnion cells by bacterial products. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:649-655
224. Bennett PR, Rose MP, Myatt L, Elder MG. Preterm labor: stimulation of arachidonic acid metabolism in human amnion cells by bacterial products. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156
225. Muszynska A, Pałka J, Gorodkiewicz E. The mechanism of daunorubicin induced inhibition of prolidase activity in human skin fibroblasts and its implication to impaired collagen biosynthesis. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52: 149-55
226. Emmerson KS, Phang JM. Hydrolysis of proline dipeptides completely fulfills the proline requirement in a proline—auxotrophic Chinese hamster ovary cell line. *J Nutr* 1993
227. Brosset B, Myara I, Fabre M, Lemonnier A. Plasma prolidase and prolinase activity in alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta* 1988; 175: 291-5

228. Ipcioglu OM, Ozcan O, Gultepe M, Deniz O, Akgul EO. Prolidase activity in serum and pleural fluids in patients with tuberculous pleural effusion [correction of effussion]. Clin Biochem 2008; 41: 670-5
229. Toy H, Camuzcuoglu H, Ario DT, Kurt S, Celik H, Aksoy N. Serum prolidase activity and oxidative stress markers in pregnancies with intrauterine growth restricted infants. J Obstet Gynaecol Res 2009; 35: 1047-53
230. Soydinc, H. E., Sak, M. E., Evliyaoglu, O., Evsen, M. S., Turgut, A., Özler, A., Gul, T. (2013). Prolidase, Matrix Metalloproteinases 1 and 13 Activity, Oxidative-Antioxidative Status as a Marker of Preterm Premature Rupture of Membranes and Chorioamnionitis in Maternal Vaginal Washing Fluids. International Journal of Medical Sciences, 10(10), 1344–1351
231. Ender Soydinc, H., Sak, M. E., Evliyaoglu, O., Evsen, M. S., Turgut, A., Ozler, A., Gul, T. (2012). Maternal plasma prolidase, matrix metalloproteinases 1 and 13, and oxidative stress levels in pregnancies complicated by preterm premature rupture of the membranes and chorioamnionitis. Journal of the Turkish German Gynecological Association, 13(3), 172–177
232. Fortunato, Stephen J.; Menon, Ramkumar; Lombardi, Salvatore J. (1999). MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. Journal of Perinatal Medicine, 27(5)
233. Epstein, Franklin H.; Parry, Samuel; Strauss, Jerome F. (1998). Premature Rupture of the Fetal Membranes. New England Journal of Medicine, 338(10), 663–670
234. Naeye RL, Peters EC: Causes and consequences of premature rupture of fetal membranes. Lancet 1980;1:192–194
235. Alexander MJ, Cox MS: Clinical course of premature rupture of the membranes. Semin Perinatol 1996;20:369–374
236. John J. Morrison; Ian M. Clark; Elizabeth K. Powell; Timothy E. Cawston; Gerald A. Hackett; Stephen K. Smith (1994). Tissue collagenase: serum levels during pregnancy and parturition. , 54(1), 71–75

237. Lannon, S. M. R.; Vanderhoeven, J. P.; Eschenbach, D. A.; Gravett, M. G.; Waldorf, K. M. A. (2014). Synergy and Interactions Among Biological Pathways Leading to Preterm Premature Rupture of Membranes. *Reproductive Sciences*, 21(10), 1215–1227
238. Menon R, Fortunato SJ. The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig*. 2004;11(7):427-437
239. Athayde N, Romero R, Gomez R, et al. Matrix metalloproteinases-9 in preterm and term human parturition. *J Matern Fetal Med*. 1999;8(5):213-219
240. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol*. 1999;94(3):435-440