

PRACE ORYGINALNE
położnictwo

Ocena związku polimorfizmów genów kodujących wybrane cytokiny z występowaniem porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich

Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of polish women

Kalinka Jarosław, Bitner Adam

Pracownia Medycznych i Środowiskowych Zagrożeń Ciąży,
Klinika Perinatologii I Katedry Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Cel pracy: Ostatnie doniesienia wskazują, że wystąpienie porodu przedwczesnego może mieć uwarunkowania genetyczne. Celem pracy była ocena zależności między nosicielstwem polimorficznych alleli następujących genów: interleukiny-1 β [IL1 β (+3953C>T)], promotora genu interleukiny-6 [IL6 (-174G>C)], promotora genu czynnika martwicy nowotworów- α [TNF α (-308G>A)] oraz antagonisty receptora interleukiny-1 (IL1RN) a ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego w populacji polskich kobiet.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 125 kobiet rasy kaukaskiej. Grupę badaną stanowiły 62 kobiety, które urodziły przed 36+6 tygodniem trwania ciąży w wyniku przedwczesnego pęknięcia błon płodowych przed terminem lub spontanicznej czynności skurczowej macicy. Grupę porównawczą stanowiły 63 kobiety, które urodziły w terminie. Na podstawie standaryzowanego kwestionariusza oraz dokumentacji medycznej zebrano szczegółowe dane demograficzne, medyczne i położnicze. DNA izolowano z krwi żyłnej pobranej od matek po porodzie. Polimorfizm genów oceniono stosując metodę analizy restrykcyjnej (PCR-RFLP – polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism). Ilorazy szans oraz ich 95% przedziały ufności obliczono przy użyciu modelu regresji logistycznej.

Wyniki: Nosicielki IL1RN*2 cechowały się zwiększonym ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego OR=2,75 (95%CI: 1,02-4,13). Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem polimorfizmu genów kodujących IL-1 β , IL-6 i TNF- α a ryzykiem urodzenia wcześniaka. Współwystępowanie polimorficznych alleli genu IL1RN (genotyp IL1RN*1/IL1RN*2, IL1RN*1/IL1RN*3, IL1RN*2/IL1RN*3) z polimorficznymi allelami promotora genu IL-6 (genotyp: GG, GC) zwiększało ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego OR=3,02(95%CI: 1,00-8,91).

Adres do korespondencji:

Jarosław Kalinka
Pracownia Medycznych i Środowiskowych Zagrożeń Ciąży
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
94-029 Łódź, ul. Wileńska 37
tel. 042 6804624
e-mail: j.kalinka@csk.am.lodz.pl

Otrzymano: 15.09.2008
Zaakceptowano do druku: 20.12.2008

Kalinka J, et al.

Wnioski: Nosicielstwo allele 2 intronu 2 genu antagonisty receptora interleukiny-1 (IL1RN*2) związane jest ze zwiększonym ryzykiem występowania porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich. Jednoczesne występowanie IL1RN*2 oraz co najmniej jednego allele G genu interleukiny-6 dodatkowo zwiększa ryzyko przedwczesnego zakończenia ciąży.

Słowa kluczowe: **poród przedwczesny / antagonistą receptora interleukiny-1 / Interleukina-1beta / czynnik martwicy nowotworów – alfa / Interleukina-6 / polimorfizm / cytokiny /**

Summary

Objective: Recent studies suggest that preterm delivery might be conditioned genetically. The main aim of this study was to examine the relationship between spontaneous preterm delivery (PTD) and the carriage of polymorphic genes that code the following cytokines: interleukin-1 β [IL1 β (+3953C>T)], interleukin-6 promoter [IL6 (-174G>C)], tumour necrosis factor- α promoter [TNF α (-308G>A)] and interleukin-1 receptor antagonist (IL1RN) in the population of Polish women.

Methods: A case-control study. 125 Caucasian women were examined, among them 62 cases and 63 controls. Case subjects were defined as those who had a delivery at less than 366 weeks of gestation due to either preterm premature rupture of membranes or preterm labour while control subjects gave birth at term. Detailed demographic, medical and obstetric data based on structured questionnaire and medical record were collected. Maternal venous blood samples were collected after the delivery and analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques for the presence of each of the allelic variants. Logistic regression model was used to compute odds ratio and its 95% confidence intervals.

Results: Women that carried IL1RN*2 were found to be at an increased risk of preterm delivery OR=2.75 (95%CI:1.02-4.13). No correlation between IL-1 β , IL-6 and TNF- α gene polymorphisms and the risk of PTD was found. Coincidence of IL1RN polymorphism (genotype IL1RN*1/ IL1RN*2, IL1RN*1/ IL1RN*3, IL1RN*2/ IL1RN*3) with IL-6 promoter polymorphism (genotype GG, GC) multiplied the risk of preterm delivery OR=3.02(95%CI: 1.00-8.91).

Conclusions: Maternal carriage of the IL1RN*2 allele appears to be associated with an elevated risk of preterm delivery in the population of Polish women. Coincidence of IL1RN*2 with at least one copy of IL-6 allele G might increase the risk of preterm delivery even further.

Key words: **obstetrics labor – premature / Interleukin 1 Receptor Antagonist Protein / Interleukin-1 beta / Interleukin-6 / Tumor Necrosis Factor – alpha / polymorphism – genetic / cytokines /**

Wstęp

Poród przedwczesny jest jedną z głównych przyczyn zachorowalności i umieralności noworodków na świecie [1]. Jego etiologia jest wieloczynnikowa. Wśród przyczyn występowania porodu przedwczesnego wymienia się czynniki socjalne, ekonomiczne, medyczne, a także uwarunkowania genetyczne.

W ostatnich latach w piśmiennictwie coraz więcej uwagi poświęca się wpływowi procesów zapalnych, także o subklinicznym przebiegu, na występowanie przedwczesnej czynności skurczowej macicy. Uważa się, że normalnie występujące w tkankach macicznych, płodowych i łożyskowych makrofagi, aktywowane przez produkty metabolizmu bakterii uwalniają cały szereg cytokin, takich jak: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, a także TNF [2, 3]. IL-1, IL-6 oraz TNF stymulują produkcję prostaglandyn przez owodnię, kosmówkę i doczesną prowadząc do wyzwolenia przedwczesnej czynności skurczowej macicy [2].

W regulacji odpowiedzi gospodarza na infekcję bardzo ważną rolę pełnią też cytokiny przeciwzapalne. Jedną z głównych cytokin o działaniu przeciwzapalnym jest antagonistą receptora IL-1 (IL-1ra), który konkuruje z IL-1 o wiązanie z receptorami na komórkach docelowych, jest jednak pozbawiony efektu agonistycznego [4].

W badaniach *in vitro* IL-1ra hamował stymulowaną przez IL-1 β produkcję prostaglandyn przez owodnię i kosmówkę [5].

Można przypuszczać, że różnice pomiędzy poszczególnymi kobietami dotyczące nasilenia reakcji zapalnej w odpowiedzi na infekcję w czasie ciąży mogą wpływać na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Różnice w nasileniu odpowiedzi na czynniki infekcyjne mogą wynikać między innymi z polimorfizmu genów kodujących cytokiny pro- i przeciwzapalne [6, 7, 8]. Geny kodujące IL-1 β , IL-1ra, IL-6, TNF- α są genami polimorficznymi. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP – *single nucleotide polymorphism*) w pozycji +3953 genu kodującego IL-1 β polegający na zastąpieniu cytozyny tyminą prowadzi do powstania rzadszego allele 2 (IL1 β +3953*2). Allel ten jest związany ze zwiększoną produkcją IL-1 β *in vitro* [6]. SNP w pozycji -174 regionu promotorowego genu IL-6 polegający na zastąpieniu guaniny cytozyną ma wpływ na produkcję IL-6. Homozygoty G/G oraz heterozygoty G/C wykazują normalną produkcję IL-6. Osobnicy homozygotyczni C/C charakteryzują się zmniejszoną produkcją IL-6 [9]. Zastąpienie guaniny adeniną w pozycji -308 regionu promotorowego genu TNF- α prowadzi do powstania rzadszego allele (TNF α -308*2). Nosicielstwo tego allele jest związane ze zwiększoną ekspresją genu TNF- α w stosunku do osób homozygotycznych G/G [10].

Ocena związku polimorfizmów genów kodujących wybrane cytokiny...

Gen kodujący IL-1ra (IL1RN) jest również genem polimorficznym. W intronie 2 tego genu występuje polimorfizm sekwencji tandemowych (VNTR – *variable number of tandem repeats*), polegający na różnej liczbie powtórzeń tandemowej sekwencji złożonej z 86 nukleotydów [11]. Liczba powtórzeń w poszczególnych allelach waha się od 2 do 6 [12]. W populacji ogólnej najczęściej występuje allel 1 (IL1RN*1), zawierający 4 powtórzenia sekwencji tandemowej. Rzadszy jest allel 2 (IL1RN*2), zawierający 2 powtórzenia. Pozostałe allele: IL1RN*3 (5 powtórzeń), IL1RN*4 (3 powtórzenia) oraz IL1RN*5 (6 powtórzeń) występują u mniej niż 1% populacji. Nosicielstwo IL1RN*2 wiąże się z wyższym stężeniem IL-1ra oraz IL-1β w osoczu [7].

Biorąc pod uwagę, że reakcja zapalna w odpowiedzi na infekcję może doprowadzić do występowania czynności skurczowej macicy oraz fakt, że nasilenie reakcji zapalnej może zależeć od występowania poszczególnych alleli cytokin pro- i przeciwzapalnych uzasadnione wydaje się pytanie, jaki jest wpływ występowania poszczególnych polimorfizmów tych genów na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego?

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie zależności pomiędzy polimorfizmem genów kodujących IL-1β (+3953C>T), IL-6 (-174G>C), TNF-α (-308G>A) oraz IL-1ra (allele 1-5) a ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego w populacji polskich kobiet.

Materiał i metody

Badania uzyskały pozytywną opinię Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Nr RNN/29/04/KE. Wszystkie kobiety biorące w nich udział wyraziły świadomą, pisemną zgodę.

Do badania zakwalifikowano 125 kobiet rasy kaukaskiej rodzących w Klinice Perinatologii, I Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2005-2007. Pacjentki zostały podzielone na dwie grupy. Grupę badaną stanowiły 62 kobiety, które urodziły przed 36+6 tygodniem ciąży. Grupę porównawczą stanowiły 63 kobiety rodzące po skończonym 37 tygodniu ciąży. W każdym przypadku czas trwania ciąży ustalony został na podstawie daty ostatniej miesiączki oraz zweryfikowany za pomocą badania USG wykonanego między 11 a 13+6 tygodniem trwania ciąży.

Z badania wykluczono kobiety z nieprawidłowościami anatomicznymi macicy, wadami płodu, niewydolnością szyjki macicy, infekcją ogólną oraz jatrogennym porodem przedwczesnym.

Na podstawie standaryzowanego kwestionariusza wywiadu oraz dokumentacji medycznej zebrano szczegółowe dane demograficzne, medyczne i położnicze.

Badanie polimorfizmu analizowanych genów przeprowadzono w Zakładzie Biologii Molekularnej, Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wszystkie startery były syntetyzowane w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. DNA izolowano metodą Higuchi'ego, z limfocytów żyłnej krwi obwodowej pobranej od matek po porodzie.

Namnażanie DNA przeprowadzono przy pomocy urządzenia GeneAmp PCR System 2007 i GeneAmp PCR System 2400 firmy Applied Biosystems (USA). Wykorzystane w badaniach primery zostały przedstawione w tabeli I.

Analizę genu IL-1β rozpoczynano od amplifikacji fragmentu o długości 249pz w następujących warunkach: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 5 minut, a następnie 30 cykli: 94°C przez 1 minutę, 58°C przez 1 minutę, 72°C przez 1 minutę. 8μl otrzymanego produktu PCR trawiono endonukleazą restrykcyjną TaqI – 1 (firmy Fermentas) w temperaturze 65°C przez 24 godz. Otrzymano produkty o długości 249pz dla IL1β*2 a także 135pz i 114pz dla IL1β*1.

W celu analizy SNP promotora genu IL-6 przeprowadzono amplifikację w następujących warunkach: denaturacja w temperaturze 95°C przez 40 sekund, przyklejanie starterów w temperaturze 63°C a następnie wydłużanie w temperaturze 72°C przez 40 sekund. Otrzymano produkty amplifikacji długości 94pz dla allele G oraz 103pz dla allele C.

Analizę polimorfizmu promotora genu TNF-α przeprowadzono w warunkach: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 4 minuty, a następnie 30 cykli: 94°C przez 40 sekund, 60°C przez 40 sekund, 72°C przez 40 sekund. 8μl otrzymanego produktu trawiono enzymem restrykcyjnym Nco I (firmy Fermentas) w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Uzyskano fragmenty długości 87pz i 20pz dla TNFα*1 oraz 107pz dla TNFα*2.

W celu analizy polimorfizmu w intronie 2 genu IL-1ra stosowano następujące warunki: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 5 minut a następnie 40 cykli: 94°C przez 1 minutę, 63°C przez 1 minutę, 72°C przez 1 minutę.

Tabela I. Startery wykorzystane do namnażania poszczególnych fragmentów genów.

IL-1β (+3953C>T)	5'-GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' 5'-TTCAGTTCATATGGACCAGA-3'
IL-6 (-174G>C)	5'-TCCCCCTAGTTGTGTCTGGCG-3' 5'-CTGCACTTTATCCCCTAGTTGTGTCATGCC-3' 5'-TGAGGGTGGGGCCAGAGA-3'
TNFα (-308G>A)	5'-AGGCAATAGTTTTGAGGGCCAT-3' 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'
IL1ra (allele 1-5)	5'-CTCAGCAAACTCCTAT-3' 5'-TCCTGGTTCGAGGTAA-3'

Kalinka J, et al.

Otrzymano produkty długości 410 pz (IL1RN*1), 240pz (IL1RN*2), 500pz (IL1RN*3).

Otrzymane produkty namnażania i trawienia, po wybarwieniu bromkiem etydyny i azotanem srebra analizowano w 10% żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem aparatów do elektroforezy Mini Protein II i Mini Protein III firmy Bio-Rad (USA). Sposób obrazowania przedstawia rycina 1.

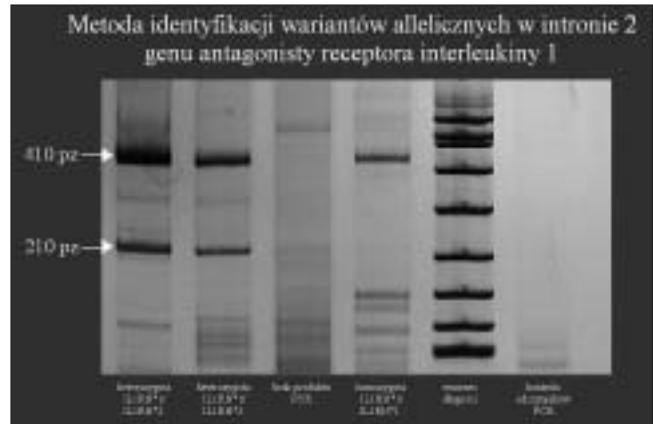
Wnioskowanie statystyczne przeprowadzono przy poziomie istotności 0,05 przy użyciu testów dwustronnych. Przy użyciu modelu regresji logistycznej obliczone zostały ilorazy szans oraz ich 95% przedziały ufności. Obliczono ryzyko porodu przedwczesnego dla każdego genu jak również dla liczby niekorzystnych polimorfizmów dla dwóch genów. W tym drugim przypadku zastosowano test trendu liniowego dla liczby polimorfizmów. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego R w wersji 2.7.2 (<http://www.r-project.org>).

Wyniki

Badane grupy były porównywalne pod względem średniego wieku matek, a także sposobu zakończenia ciąży. W grupie kobiet rodzących przedwcześnie znacznie częściej stwierdzono wystąpienie co najmniej jednego porodu przedwczesnego w przeszłości, nikotynizm oraz przedwczesne odpływanie płynu owodniowego (PROM - *preterm rupture of the membranes*). Średnia wieku ciążowego w grupie kobiet rodzących przedwcześnie wyniosła 31,1 tygodnia, a w grupie kobiet z porodem w terminie 39,2 tygodnia. Średnia masa dzieci w grupie badanej wyniosła 1742g, a w grupie porównawczej 3469g. Charakterystykę badanych grup przedstawia tabela II.

Oceniając wpływ polimorfizmu w intronie 2 genu IL1RN na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego stwierdzono, że w grupie kobiet rodzących w terminie najczęstszym genotypem był IL1RN*1/IL1RN*1, który występował u 56,6% kobiet, w porównaniu do 37,1% kobiet rodzących przedwcześnie. W grupie kobiet rodzących przedwcześnie najczęściej występował genotyp IL1RN*1/IL1RN*2, który stwierdzono u 45,2% kobiet, w porównaniu z 30% kobiet rodzących w terminie. Wykazano, że nosicielstwo jednego allela IL1RN*2 jest związane ze statystycznie istotnym wzrostem ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego OR=2,28(95%CI:1,01-5,26).

Ze względu na rzadkie występowanie u badanych kobiet genotypów IL1RN*2/IL1RN*2, IL1RN*1/IL1RN*3 oraz IL1RN*2/IL1RN*3, oceniono je łącznie.



Rycina 1. Sposób obrazowania.

Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu omawianych genotypów na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego OR=2,05 (95%CI:0,69-6,36). U włączonych do badania kobiet nie stwierdzono alleli IL1RN*4 oraz IL1RN*5. Związek między genotypem IL1RN a ryzykiem przedwczesnego zakończenia ciąży przedstawia rycina 2.

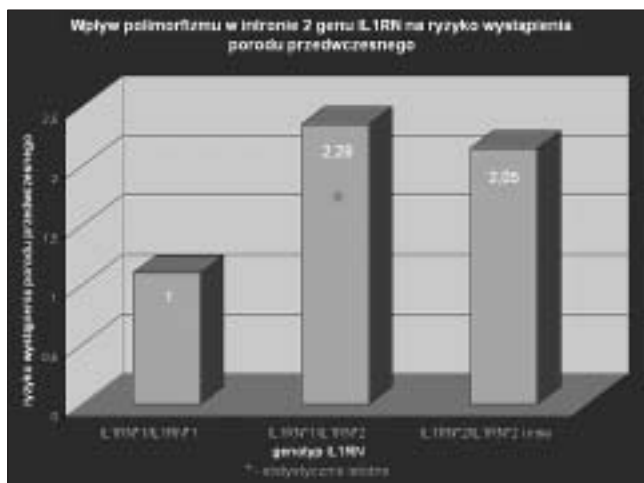
Analizując wpływ polimorfizmu genu IL-1 β na występowanie porodu przedwczesnego stwierdzono, że w obu grupach najczęściej występował genotyp IL1 β *1/ IL1 β *1. W grupie badanej oraz w grupie porównawczej stwierdzono go odpowiednio w 51,6% oraz w 51,9%. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy grupą kobiet rodzących przedwcześnie a grupą kobiet rodzących w terminie OR=1,01 (95%CI: 0,49-2,10).

Oceniając polimorfizm genu IL-6 stwierdzono, że w grupie badanej najczęstszym genotypem był GC, który występował u 42,6% kobiet. W grupie tej genotyp CC stwierdzono u 31,1%, a GG u 26,2% kobiet. W grupie porównawczej częstości występowania wyżej wymienionych genotypów wyniosły odpowiednio: 39,6%, 39,6% oraz 20,7%. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy grupą kobiet rodzących przedwcześnie a grupą kobiet rodzących o czasie. Iloraz szans wystąpienia porodu przedwczesnego dla genotypu GC wyniósł OR=1,37 (95%CI:0,59-3,21), a dla genotypu GG OR=1,61 (95%CI:0,60-4,39).

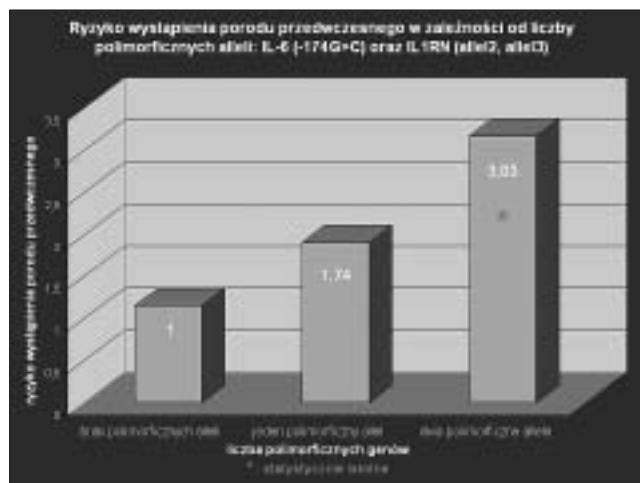
Tabela II. Charakterystyka badanych grup.

	Grupa badana	Grupa porównawcza	p
Średnia wieku matki (lata)	28,6	29,0	NS
Średnia masa matki (kg)	69,5	74	NS
Palenie papierosów (%)	26,0	17,5	P<0,05
Poród przedwczesny w wywiadzie (%)	20	4,6	P<0,05
PROM (%)	51,6	12,7	P<0,05
Cięcie cesarskie (%)	32,2	31,7	NS
Średnia wieku ciążowego (tygodnie)	31,1	39,2	P<0,05
Średnia masa urodzeniowa (g)	1742	3469	P<0,05

Ocena związku polimorfizmów genów kodujących wybrane cytokiny...



Rycina 2. Związek między genotypem IL1RN a ryzykiem przedwczesnego zakończenia ciąży.



Rycina 3. Zależność między liczbą polimorficznych alleli a ryzykiem przedwczesnego zakończenia ciąży.

Oceniając wpływ polimorfizmu promotora genu TNF- α na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego stwierdzono, że najczęstszym genotypem w obu grupach był TNF α *1/TNF α *1, który występował u 72,5% kobiet rodzących przedwcześnie i 68,5% kobiet rodzących o czasie. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów pomiędzy badanymi grupami. Iloraz szans wystąpienia porodu przedwczesnego dla kobiet z genotypami TNF α *1/TNF α *2 oraz TNF α *2/TNF α *2 wyniósł OR=0,82 (95%CI:0,37-1,84). Zależność pomiędzy polimorfizmem genów kodujących IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz IL-1ra, a ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego przedstawia tabela III.

Oceniono również ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego związane z łącznym nosicielstwem polimorficznych genów: interleukiny-6 (genotyp GG, GC vs CC) oraz antagonisty receptora interleukiny-1 (IL1RN*1/IL1RN*2, IL1RN*1/IL1RN*3, IL1RN*2/IL1RN*3 vs IL1RN*1/IL1RN*1).

Tabela III. Zależność pomiędzy polimorfizmem genów kodujących IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-1ra, a ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego.

Analizowany gen	Genotyp	OR	95%CI
IL1 β	IL1 β *1/ IL1 β *1	Ref.	
	IL1 β *1/ IL1 β *2, IL1 β *2/ IL1 β *2	1,01	0,49-2,10
IL6	IL6*2/IL6*2	Ref.	
	IL6*1/IL6*2	1,37	0,59-3,21
	IL6*1/IL6*1	1,61	0,60-4,39
TNF α	TNF α *1/TNF α *1	Ref.	
	TNF α *1/TNF α *2, TNF α *2/TNF α *2	0,82	0,37-1,84
IL1RN	IL1RN*1/IL1RN*1	Ref.	
	IL1RN*1/IL1RN*2	2,28	1,01-5,26
	IL1RN*2/IL1RN*2 i inne	2,05	0,69-6,36

Występowanie co najmniej jednego polimorficznego allela jednego z tych genów wiązało się z 1,74-krotnym wzrostem ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego OR=1,74 (95%CI:0,96-4,41), natomiast nosicielstwo przynajmniej jednego polimorficznego allela obu tych genów wiązało się z ponad trzykrotnym wzrostem ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego OR=3,02 (95%CI:1,00-8,91). Zależność między liczbą polimorficznych alleli a ryzykiem przedwczesnego zakończenia ciąży przedstawia rycina 3.

Dyskusja

Zgodnie z naszą wiedzą jest to pierwsza praca oceniająca w sposób kompleksowy wpływ występowania polimorfizmów genów kodujących cytokiny biorące udział w odpowiedzi na czynniki infekcyjne, na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego przeprowadzona w populacji kobiet polskich. W pracy wykazano istotne statystycznie zwiększenie ryzyka przedwczesnego zakończenia ciąży związane z matczynym nosicielstwem polimorficznego allela 2 intronu 2 genu kodującego antagonistę receptora interleukiny-1 (IL1RN*2). Nie stwierdzono statystycznie istotnych zależności pomiędzy nosicielstwem polimorficznych alleli pozostałych badanych genów a ryzykiem występowania porodu przedwczesnego.

Dane ze światowego piśmiennictwa na temat wpływu polimorfizmów genów kodujących cytokiny prozapalne na czas trwania ciąży są niejednorodne. Murtha i wsp. [13], badając populację białych i czarnych kobiet z Nowej Karoliny (USA) także stwierdzili zwiększone ryzyko występowania porodu przedwczesnego u matek, będących nosicielkami allela IL1RN*2. Ponadto badacze ci zaobserwowali wzrost ryzyka przedwczesnego zakończenia ciąży wraz ze wzrostem liczby polimorficznych alleli IL1RN*2. Wszystkie obserwowane przez nich pacjentki z genotypem IL1RN*2/IL1RN*2 urodziły przedwcześnie. W przeprowadzonej pracy uzyskaliśmy podobne wyniki. Ze względu na relatywnie małą liczbę kobiet z genotypem IL1RN*2, nie mogliśmy ocenić czy nosicielstwo dwóch polimorficznych alleli wiąże się z dalszym zwiększeniem ryzyka przedwczesnego zakończenia ciąży, w stosunku

do kobiet z tylko jednym polimorficznym allelem IL1RN*2. Istnieją również prace oceniające wpływ płodowego nosicielstwa polimorficznych alleli antagonisty receptora interleukiny-1 na czas trwania ciąży. Genc i wsp. ocenili ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego związane z polimorfizmem omawianego genu w populacji amerykańskiej [14]. Stwierdzili oni, że płodowe nosicielstwo IL1RN*2 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem przedwczesnego pęknięcia błon płodowych przed terminem (pPROM – *preterm premature rupture of membranes*) i następowym porodem przedwczesnym ale tylko w populacji płodów pochodzenia hiszpańskiego. Ciekawą pracę przedstawił Kalish i wsp. [15]. Badali oni występowanie polimorfizmu genu IL-1ra u płodów z ciąż wielopłodowych. Wykazali związek pomiędzy pPROM i w konsekwencji przedwczesnym zakończeniem ciąży a płodowym nosicielstwem IL1RN*2, przy czym ryzyko omawianych powikłań było większe, jeżeli oba płody były nosicielami polimorficznego allela 2.

W cytowanej pracy wykazano ponadto związek pomiędzy płodowym nosicielstwem IL1RN*2 a występowaniem u noworodków zespołu zaburzeń oddychania, krwawienia dokońcowego oraz martwiczego zapalenia jelit. Interesujące jest, że w ciążach bliźniaczych, w których jeden z płodów był nosicielem allela IL1RN*2, a drugi był homozygotą IL1RN*1, wymienione powikłania, mimo identycznego środowiska występowały częściej u nosiciela polimorficznego allela 2. Nosiciele IL1RN*2 cechują się wyższym osoczym stężeniem IL-1 β , wynikającym prawdopodobnie ze względnej niezdolności IL-1ra do zahamowania regulowanej przez IL-1 β reakcji zapalnej [13]. To właśnie zwiększone stężenie IL-1 β u nosicieli IL1RN*2 wydaje się być odpowiedzialne za zwiększone ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego [16].

W przeprowadzonych badaniach nie wykazaliśmy wpływu polimorfizmu IL1 β (+3953C>T) na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Podobne wyniki otrzymali Edwards i wsp. [17]. W przedstawionej pracy badacze sugerują, że obecność polimorficznego allela omawianego genu ani u matki, ani u płodu nie ma wpływu na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Odmienne wyniki przedstawiono w cytowanej już pracy Genc i wsp. przeprowadzonej w populacji nowojorskich płodów [14]. W pracy tej autorzy wykazali zwiększone ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego w przypadku płodowego nosicielstwa allela 1 genu IL-1 β . Ryzyko to dotyczyło jednak tylko płodów pochodzenia afroamerykańskiego.

W pracy nie wykazaliśmy wpływu polimorfizmu promotora genu IL-6 (-174G>C) na ryzyko występowania porodu przedwczesnego. Odmienne dane dostarczają badania przeprowadzone w Pensylwani (USA) przez Simhan i wsp. [18]. Badacze ci wykazali ochronny wpływ genotypu CC na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego w populacji białych kobiet. Sugerują oni, że kobiety z tym genotypem produkują mniejsze ilości IL-6 w odpowiedzi na czynniki zapalne i w ten sposób mają mniejszą tendencję do rozwoju kaskady zapalnej prowadzącej w konsekwencji do porodu przedwczesnego. W pracy tej autorzy zwracają również uwagę na różnice rasowe w rozkładzie genotypów. U żadnej afroamerykańskiej kobiety zakwalifikowanej do badania nie stwierdzili ochronnego genotypu CC. W piśmiennictwie można znaleźć również publikacje sugerujące wpływ polimorfizmu promotora

genu IL-6 na występowanie stanów zapalnych zarówno u matki, jak i u płodu. Według Reiman i wsp. genotyp GG wiąże się ze wzrostem częstości występowania zapalenia błon płodowych, natomiast przy genotypie CC stwierdzano większą częstość występowania posocznicy w przypadku noworodków urodzonych przedwcześnie [19].

Ciekawych informacji dostarcza piśmiennictwo dotyczące wpływu polimorfizmu promotora genu TNF- α (-308G>A) na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. W metaanalizie przeprowadzonej na ponad 1800 kobietach przez Menon i wsp. nie wykazano wpływu występowania polimorfizmu genu TNF- α w pozycji -308 na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego [20]. Nasze wyniki również sugerują brak takiego wpływu. Roberts i wsp. na podstawie badania przeprowadzonego w Pensylwani, mimo iż nie stwierdzili różnic w częstości występowania alleli TNF α pomiędzy kobietami rodzącymi przedwcześnie oraz w terminie, zaobserwowali istotne statystycznie częstsze występowanie polimorficznego allela TNF α *2 wśród afroamerykańskich kobiet z pPROM w stosunku do kobiet ze spontanicznym porodem przedwczesnym bez pPROM [21].

W najnowszych badaniach wykazano również wpływ matczyne nosicielstwa polimorficznych alleli genu IL-15 oraz płodowego nosicielstwa polimorficznych alleli genu receptora β IL-2 (IL2RB) na ryzyko przedwczesnego zakończenia ciąży [22].

Podsumowując powyższe dane wydaje się, że wpływ czynników genetycznych, w tym również polimorfizmów poszczególnych genów na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego jest niezaprzeczalny. Prawdopodobnie jednak w różnych populacjach inne warianty alleliczne poszczególnych genów mogą wiązać się ze zwiększonym ryzykiem przedwczesnego zakończenia ciąży. Wpływ czynników rasowych i populacyjnych na zależności pomiędzy polimorfizmem genetycznym a ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego podkreślali również inni autorzy [14, 18, 20, 23, 24]. Z tego powodu istotne jest określenie, które z polimorfizmów są związane ze zwiększonym ryzykiem przedwczesnego zakończenia ciąży w danej populacji.

Szacuje się, że istnieje około 200000 SNP w regionach kodujących 80000 ludzkich genów [14]. Oprócz genów regulujących odpowiedź zapalną na czynniki infekcyjne wykazano wpływ polimorfizmu genów odpowiedzialnych między innymi za procesy krzepnięcia, za metabolizm cholesterolu, a także za regulację ciśnienia tętniczego na wystąpienie porodu przedwczesnego [25, 26, 27, 28].

Trudno więc przewidywać ryzyko występowania porodu przedwczesnego na podstawie obecności lub braku pojedynczego polimorfizmu. Jest oczywiste, że wpływ poszczególnych polimorficznych alleli może się sumować lub wzajemnie wykluczać. Biorąc ten fakt pod uwagę zbadaliśmy wpływ łącznego występowania polimorfizmów genów IL-1ra oraz IL-6 na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Do analizy wybraliśmy te geny, ponieważ obecność allela 2 intronu 2 genu IL1RN wiązała się ze statystycznie istotnym ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego a obecność allela G genu IL-6, choć nie istotna statystycznie, również wydawała się zwiększać ryzyko urodzenia wcześniaka. W analizie tej wykazaliśmy, że obecność polimorficznego allela jednego z analizowanych

Ocena związku polimorfizmów genów kodujących wybrane cytokiny...

genów wiązała się średnio z 1,74 raza większym ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego, natomiast występowanie polimorficznych alleli obu analizowanych genów powodowało ponad 3-krotny wzrost ryzyka przedwczesnego zakończenia ciąży. Wzajemne relacje pomiędzy poszczególnymi polimorficznymi allelami są prawdopodobnie przyczyną różnic dotyczących wpływu określonych polimorfizmów na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego w poszczególnych grupach etnicznych.

Analizując rolę czynników genetycznych w przedwczesnym zakończeniu ciąży nie można zapominać o modyfikującym wpływie środowiska. Macones i wsp. przeanalizowali zależność pomiędzy polimorfizmem TNF- α (-308G>A), występowaniem BV (bakteryjnej waginosisy) oraz ryzykiem przedwczesnego zakończenia ciąży. Ryzyko urodzenia wcześniaka w przypadku nosicielstwa rzadszego allela TNF α *2 rosło 2,7-krotnie w stosunku do homozygot TNF α *1, natomiast w przypadku nosicielstwa allela TNF α *2 i jednoczesnego występowaniu BV ryzyko to rosło 6,1-krotnie [29].

Wydaje się więc, że analizując czynniki ryzyka porodu przedwczesnego należy uwzględniać również czynniki genetyczne. Ważne jest aby określić, które geny odgrywają najistotniejszą rolę w poszczególnych populacjach.

Być może w przyszłości uda się określić profil genów związanych z największym ryzykiem urodzenia wcześniaka w określonych grupach etnicznych. Stworzyłoby to szansę wyselekcjonowania i terapii pacjentek zagrożonych porodem przedwczesnym już na początku ciąży. W związku z powyższym celowe wydaje się prowadzenie dalszych badań oceniających wpływ polimorfizmu genów na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego.

Wnioski

1. Nosicielstwo allela 2 intronu 2 genu antagonisty receptora interleukiny-1 (IL1RN*2) związane jest ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich.
2. Nosicielstwo polimorficznych alleli IL-1 β (+3953C>T) oraz TNF- α (-308G>A) prawdopodobnie nie ma wpływu na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich
3. Jednoczesne występowanie IL1RN*2 oraz co najmniej jednego allela G genu interleukiny-6 dodatkowo zwiększa ryzyko przedwczesnego zakończenia ciąży.

Praca finansowana z grantu UM w Łodzi nr. 502-11-363

Piśmiennictwo

1. Martin J, Kochanek K, Strobino D, [et al.]. Annual Summary of vital statistics – 2003. *Pediatrics*. 2005, 115, 619-634.
2. Czajka R. Etiopatogeneza porodu przedwczesnego. W: Poród przedwczesny. Red. Bręborowicz G, Paszkowski T. Poznań: *Ośrodek Wydawnictw Naukowych*, 2006, 11-18.
3. Witczak M, Torbé A, Czajka R. Maternal serum and amniotic fluid IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6 and IL-8 levels in preterm and term labor complicated by PROM. *Ginekologia Pol.* 2003, 74, 1343-1347.
4. Arend W. Interleukin-1 receptor antagonist: a new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest.* 1991, 88, 1445-1451.
5. Romero R, Sepulveda W, Mazon M, [et al.]. The natural interleukin-1 receptor antagonist in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1992, 167, 863-872.
6. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, [et al.]. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992, 22, 396-402.
7. Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 beta genes. *Eur J Immunol.* 1998, 28, 2598-2602.
8. Santtila S, Savinainen K, Hurme M, [et al.]. Presence of IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1 beta production in vitro. *Scand J Immunol.* 1998, 47, 195-198.
9. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, [et al.]. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998, 102, 1369-1376.
10. Wilson A, Symons J, McDowell T, [et al.]. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997, 94, 3195-3199.
11. Tarlow J, Blakemore A, Lennard A, [et al.]. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet.* 1993, 91, 403-404.
12. Arend W, Malyak M, Guthridge C, [et al.]. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Ann Rev Immunol.* 1998, 16, 27-55.
13. Murtha A, Nieves A, Hauser E, [et al.]. Association of maternal IL-1 receptor antagonist intron 2 gene polymorphism and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 195, 1249-1253.
14. Gen M, Gerber S, Nesin M, [et al.]. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 187, 157-163.
15. Kalish R, Vardhana S, Gupta M, [et al.]. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and multifetal pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 189, 911-914.
16. Baggia S, Gravett M, Witkin S, [et al.]. Interleukin-1 beta intra-amniotic infusion induces tumor necrosis factor-alpha, prostaglandin production and preterm contraction in pregnant rhesus monkeys. *J Soc Gynecol Invest.* 1996, 3, 121-126.
17. Edwards R, Ferguson R, Duff P. The interleukin-1 beta +3953 single nucleotide polymorphism: cervical protein concentration and preterm delivery risk. *Am J Reprod Immunol.* 2006, 55, 259-264.
18. Simhan H, Krohn M, Roberts J, [et al.]. Interleukin-6 promoter -174 polymorphism and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 189, 915-918.
19. Reiman M, Kujari H, Ekholm E, [et al.]. Interleukin-6 polymorphism is associated with chorioamnionitis and neonatal infections in preterm infants. *J Pediatr.* 2008, 153, 19-24.
20. Menon R, Merilaidi M, Betrán A, [et al.]. Analysis of association between maternal tumor necrosis factor- α promoter polymorphism (-308), tumor necrosis factor concentration and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 195, 1240-1248.
21. Roberts A, Monzon-Bardonaba F, Van Deerlin P, [et al.]. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor- α gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1999, 180, 1297-1302.
22. Velez D, Fortunato S, Thorsen P, [et al.]. Spontaneous preterm birth in African Americans is associated with infection and inflammatory response gene variants. *Am J Obstet Gynecol.* 2008, Nov 17. [Epub ahead of print].
23. Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008, 87, 590-600.
24. Menon R, Velez D, Morgan N, [et al.]. Genetic regulation of amniotic fluid TNF-alpha and soluble TNF receptor concentrations affected by race and preterm birth. *Hum Genet.* 2008, 124, 243-253.
25. Velez D, Fortunato S, Thorsen P, [et al.]. Preterm birth in Caucasians is associated with coagulation and inflammation pathway gene variants. *PLoS ONE.* 2008, 3, e3283.
26. Chen B, Carmichael S, Shaw G, [i]i]i]i]. Association between 49 infant gene polymorphisms and preterm delivery. *Am J Med Genet A.* 2007, 143A:1990-6.
27. Steffen K, Cooper M, Shi M, [et al.]. Maternal and fetal variation in genes of cholesterol metabolism is associated with preterm delivery. *J Perinatol.* 2007, 27, 672-680.
28. Valdez-Velazquez L, Quintero-Ramos A, Perez S, [et al.]. Genetic polymorphism of renin-angiotensin system in preterm delivery and premature rupture of membranes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2007, 8, 160-168.
29. Macones G, Parry S, Elkousy M, [et al.]. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 190, 1504-1508.

Obrzezanie kobiet – nowy problem w praktyce lekarza ginekologa w krajach Unii Europejskiej?

Female circumcision – a new issue for gynecologists practicing in the EU countries?

Rogowska-Szadkowska Dorota¹, Niemiec Tomasz²

¹ Zakład Medycyny Rodzinnej i Pielęgniarstwa Środowiskowego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku,

² Zakład Zdrowia Prokreacyjnego, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa

Streszczenie

Rosnąca liczba imigrantów z krajów, w których wykonywane jest obrzezanie kobiet stanowi także europejski problem.

Celem tego przeglądu literatury jest dostarczenie aktualnych informacji dotyczących obrzezania u kobiet (female genital mutilation – FGM), które w dobie globalizacji, migracji ludności mogą stać się niezbędne dla lekarzy ginekologów pracujących w Polsce, ale także wyjeżdżających do pracy do innych krajów.

Słowa kluczowe: **okałeczenie narządów płciowych kobiet / obrzezanie kobiet / powikłania /**

Summary

An increasing number of immigrants from countries practicing female genital mutilation (FGM) has begun to concern Europe as well.

The aim of this article is to present recent medical data about FGM which, in the age of globalisation and migration of people, may become essential for gynaecologists working in Poland, but also those practising abroad.

Key words: **female genital mutilation / female circumcision / complications /**

Adres do korespondencji:

Dorota Rogowska-Szadkowska
Zakład Medycyny Rodzinnej i Pielęgniarstwa Środowiskowego UMB
15-054 Białystok, Mieszka I 4b,
e-mail: dszadkowska@umwb.edu.pl
tel. 604981789

Otrzymano: 20.12.2008

Zaakceptowano do druku: 30.01.2008