

*Małgorzata Biernat-Sudolska, Sława Szostek, Danuta Rojek-Zakrzewska,
Jolanta Kopeć, Barbara Zawilińska*

CZY OBECNOŚĆ UREAPLAZM W DROGACH RODNYCH KOBIET ZAKAŻONYCH HPV WPŁYWA NA WYSTĘPOWANIE ZMIAN CYTOLOGICZNYCH W OBRĘBIE SZYJKI MACICY?

Zakład Wirusologii, Katedra Mikrobiologii CM UJ, Kraków
Kierownik Katedry Mikrobiologii: Piotr B. Heczko

Praca próbuje odpowiedzieć na pytanie, czy zakażenie dróg rodnych ureaplazmami wpływa na ryzyko wystąpienia zmian śród nabłonkowych (LSIL) u kobiet zakażonych wysoko onkogennymi typami HPV.

Słowa kluczowe: ureaplazma, HPV, LSIL-zmiany śród nabłonkowe małego stopnia
Key words: ureaplasma, HPV, LSIL-low grade squamous intraepithelial lesions

WSTĘP

Zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) jest ściśle związane z procesem onkogenezy w obrębie narządu rodno (1). Rola typów wysoko onkogennych HPV jako czynników inicjujących karcinogenezę szyjki macicy jest już udowodniona, jednakże patogenesa tego procesu nie jest w pełni wyjaśniona i nadal pozostawia wiele pytań. Wieloletnie obserwacje wskazują, że tylko u nieznacznego odsetka kobiet zakażonych typami HPV o wysokim potencjale onkogenym dochodzi do rozwoju nowotworu (2). Zastanawiające jest więc znaczenie dodatkowych czynników, które mogą mieć istotny, stymulujący wpływ na proces nowotworzenia. Do tej pory do grupy czynników sprzyjających temu procesowi zaliczono: wczesny okres rozpoczęcia kontaktów płciowych, wielu partnerów seksualnych, liczne porody, długi okres stosowania hormonalnych środków antykoncepcyjnych i palenie papierosów. Również współistniejące zakażenia przenoszone drogą płciową mogą być jednym z kofaktorów sprzyjających powstawaniu patologicznych zmian w obrębie nabłonka szyjki macicy (3).

Ureaplazmy zaliczane są wprawdzie do fizjologicznej flory żeńskich dróg moczowo-płciowych, ale w przypadku wzrostu ich liczebności ($>10^4$ /ml) mogą być przyczyną przewlekłych stanów zapalnych tego narządu. Uważa się, że ureaplazmy wykazują niską wirulencję. Poznano jednak szereg właściwości ureaplazm, które są odpowiedzialne za ich patogenność. Są to przede wszystkim silne zdolności adhezyjne w stosunku do wielu

komórek ludzkiego organizmu (eryocyty, neutrofile, plemniki czy komórki nabłonkowe dróg moczowych), zdolność penetracji do wnętrza komórek, zakłócanie prawidłowego metabolizmu komórkowego, włącznie z uszkodzeniami chromosomów i DNA, a także ich aktywność enzymatyczna (wytwarzają ureazę, fosfolipazę, proteazę). Zakażenie ureaplazmami jest czynnikiem stymulującym uwalnianie cytokin prozapalnych np. IL-1 β i IL-8 oraz TNF- α (4).

Obecnie znane są dwa gatunki ureaplazm występujące u człowieka: *Ureaplasma parvum* (*U.p.*) i *Ureaplasma urealyticum* (*U.u.*). Badania nad częstością ich występowania w drogach rodnych kobiet wskazują na przewagę zakażeń *U.p.* (5). Niewyjaśnione jest jak dotąd czy gatunki te różnią się patogennością.

Celem pracy była ocena częstości występowania obu gatunków ureaplazm u kobiet zakażonych i nie zakażonych wirusem brodawczaka w powiązaniu z rozwojem zmian cytologicznych (LSIL) w obrębie szyjki macicy.

MATERIAŁ I METODY

Grupę badaną stanowiło 168 kobiet w wieku 37 \pm 12 lat, z rozpoznaniem LSIL. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 82 kobiety w wieku 35 \pm 10 lat, u których nie wykazano badaniem cytologicznym obecności zmian patologicznych w nabłonku szyjki macicy. Materiałem do badań była wydzielina szyjki macicy pobierana szczoteczką typu cytobrush do zbuforowanej soli fizjologicznej i podłoży hodowlanych dla mykoplazm. Próbkę przeznaczoną do badań molekularnych przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia do czasu wykonania oznaczeń.

Izolację genomowego DNA przeprowadzano na mikrokolumnach (A&A Biotechnology) wg. procedury podanej przez producenta. Kontrolę prawidłowości izolacji DNA przeprowadzano amplifikując sekwencje kodujące β -globinę, wg. Saiki i wsp. (6).

W celu wykrycia zakażenia HPV stosowano metodę PCR z użyciem starterów uniwersalnych MY09/MY11 specyficznych dla sekwencji L1 wirusa (7). Obecność DNA HPV o wysokim potencjale onkogennym wykazywano przy użyciu starterów pU-1M/pU-2R charakterystycznych dla regionu E6/E7 wirusów HPV 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 (8). Warunki PCR i profil amplifikacji opisano wcześniej (9). Do każdej serii dołączano kontrolę dodatnią (komórki linii CaSki zakażone HPV 16) i ujemną (woda).

Obecność ureaplazm i ocenę ilościową zakażenia przeprowadzano testem firmy BioMerieux wg. procedury opisanej przez producenta oraz metodą hodowli na podłożach PPLO wg. Hayflicka (10). Analizą objęto te pacjentki, w materiale których miano ureaplazm, ocenione testem BioMerieux wynosiło $\geq 10^4$ CFU (jednostek koloniotwórczych), a na agarze PPLO stwierdzono obecność charakterystycznych kolonii tych drobnoustrojów.

Gatunek ureaplazm określano metodą PCR opisaną wcześniej (11) stosując 2 pary starterów swoistych dla *U.u.* i *U.p.* Kontrolę dodatnią stanowiło DNA izolowane ze szczepów wzorcowych *U.u.* i *U.p.* pozyskanych z amerykańskiej kolekcji szczepów wzorcowych.

Reakcje PCR przeprowadzano w aparacie f-my Biometra, produkty reakcji amplifikacji identyfikowano elektroforetycznie.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Różnice między grupami analizowano za pomocą testu Fishera (Fisher's exact test). Aby określić wpływ zakażenia ureaplazmowego

na rozwój zmian śródnabłonkowych szyjki macicy oraz podatność na infekcję wysokoonkogenicznymi typami HPV wykonano analizę regresji logistycznej standaryzowanej do wieku. Do analizy statystycznej użyto pakietu statystycznego STATA 8.0.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Częstość zakażeń występujących u kobiet w grupie badanej i kontrolnej zestawiono w tabeli I. Obserwowano znamienne częstsze zakażenia HPV u kobiet ze zmianami cytologicznymi w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (odpowiednio 42% i 6%; $p < 0,001$). Znamiennych różnic nie obserwowano natomiast w przypadku zakażeń ureaplazmami, jednak porównując częstość występowania *U.u* i *U.p.* w poszczególnych grupach stwierdzono, że *U.p.* występował znamienne częściej zarówno u kobiet z rozpoznaniem LSIL ($p < 0,001$) jak i wśród kobiet bez zmian cytologicznych w obrębie szyjki macicy ($p = 0,05$). Obserwowana w badaniach własnych wyższa częstość występowania *U.p.* w porównaniu do *U.u.* jest zgodna z danymi literaturowymi (5, 12).

Tabela I. Zakażenia wysokoonkogenicznymi typami HPV i ureaplazmami w grupie kobiet badanych z LSIL* i w grupie kontrolnej

Table I. High - risk HPV and ureaplasma infections in LSIL study and control group

| PATOGEN | LSIL (n=168) | | kontrola (n=82) | | istotność statystyczna |
|-------------------------|--------------|------|-----------------|------|------------------------|
| | N | % | N | % | |
| HPV + | 71 | 42,3 | 5 | 6,1 | $p < 0.001$ |
| Ogółem ureaplazmy | 38 | 22,6 | 12 | 14,6 | ns |
| <i>U. urealyticum</i> + | 6 | 3,6 | 1 | 1,2 | ns |
| <i>U. parvum</i> + | 32 | 19,0 | 11 | 13,4 | ns |

*LSIL – zmiany śródnabłonkowe małego stopnia

W grupie kontrolnej nie wykazano współzakażeń ureaplazm z HPV, natomiast obserwowano je u 31% kobiet z LSIL.

Występowanie poszczególnych gatunków ureaplazm u kobiet z grupy badanej, zakażonych i niezakażonych HPV przedstawia tabela II.

Tabela II. Porównanie występowania poszczególnych gatunków ureaplazm u 168 kobiet z rozpoznaniem LSIL zakażonych i nie zakażonych HPV

Table II. Comparison of prevalence of ureaplasma species in 168 women with LSIL infected and non-infected with HPV

| PATOGEN | HPV+ | HPV- | istotność statystyczna |
|-------------------------|----------|----------|------------------------|
| Ogółem ureaplazmy | 22 (31%) | 16 (16%) | $p = 0,039$ |
| <i>U. urealyticum</i> + | 5 (7%) | 1 (1%) | ns ($p = 0,084$) |
| <i>U. parvum</i> + | 17 (24%) | 15 (16%) | ns |

ns – różnice nie znamienne statystycznie

W grupie badanej, wśród kobiet zakażonych HPV znamiennej częściej stwierdzano obecność ureaplazm. Wprawdzie wykryto tylko pojedyncze przypadki zakażeń *U.u.*, ale u kobiet HPV pozytywnych obserwowano częstsze ich występowanie w porównaniu do kobiet nie zakażonych wirusem (wynik na granicy istotności).

Pytanie czy mykoplazmy, w tym także ureaplazmy, mogą uczestniczyć w procesach nowotworowych pozostaje nadal bez jednoznacznej odpowiedzi. W literaturze pojawiają się doniesienia o związku mykoplazm z różnymi nowotworami i stanami nowotworowymi np. żołądka, okrężnicy i szyjki macicy (13, 14). Niewiadomo jednak jaki mechanizm wzajemnego oddziaływania między makroorganizmem i komórką mykoplazmową mógłby odgrywać rolę w tego typu procesach. Być może jest to związane z patogennością poszczególnych gatunków ureaplazm. W związku z tym przeprowadzono analizę ryzyka podatności na wystąpienie zakażenia HPV w zależności od obecności ureaplazm, biorąc pod uwagę wiek pacjentek (przedziały wiekowe co 10 lat). Wykazano, że w obecności ureaplazm zakażenie wysokoonkogennymi typami HPV występuje prawie dwukrotnie częściej (OR=1,79; 95% PU 0,90-3,53; p=0,093) co ilustruje tabela III. Może to sugerować protekcyjne działanie ureaplazm na infekcję HPV. Być może odgrywa tu rolę aktywność enzymatyczna ureaplazm. Wnikanie różnych patogenów, w tym także wirusa brodawczaka ludzkiego, ułatwiać mogą lokalne uszkodzenia błon śluzowych powstałe na skutek drażniącego działania amoniaku uwalnianego z mocznika rozkładanego przez ureazę ureaplazm. Także sprzyjać temu może degradacja błon fosfolipidowych komórek nabłonkowych pod wpływem fosfolipazy A tych drobnoustrojów. Z drugiej strony rozkład wydzielniczej IgA przez proteazy ureaplazm osłabia barierę ochronną błon śluzowych narządu rodowego.

Tabela III. Standaryzowane do wieku (przedziały wiekowe co 10 lat) ryzyko występowania zakażenia HPV w zależności od obecności ureaplazm

Table III. Risk of HPV infection depending on the presence of ureaplasma standardized to age (for every 10-year interval)

| | iloraz szans (OR) | 95% przedział ufności | istotność statystyczna |
|-----------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|
| Ureaplasma | 1,79 | 0,90 - 3,53 | p = 0,093 |
| wiek (10 lat) | 0,69 | 0,53 - 0,92 | p = 0,012 |
| <i>U. urealitycum</i> | 6,54 | 1,22 - 35,09 | p = 0,028 |
| <i>U. parvum</i> | 1,41 | 0,67 - 2,96 | ns |
| wiek (10 lat) | 0,69 | 0,52 - 0,92 | p = 0,012 |

W badaniach własnych szczególnie wyraźny związek między obecnością zakażenia HPV a ureaplazmami dotyczył gatunku *U.u.* Przy zakażeniu tym gatunkiem ryzyko wystąpienia infekcji HPV wzrastało 6,5 krotnie (OR=6,54; 95% PU 1,22-35,09; p=0,028). Tak istotnej zależności nie potwierdzono dla gatunku *U.p.* Wyższą patogenność tego gatunku potwierdzają również prace dotyczące zakażeń dróg oddechowych noworodków (15, 16).

Nie stwierdzono bezpośredniego związku między ureaplazmami a wystąpieniem zmian śródnabłonkowych małego stopnia (tabela IV). Ryzyko wystąpienia takich zmian było związane głównie z obecnością wysokoonkogennych typów HPV (OR=11,82; 95% PU 4,43-31,54; p < 0,001) i rosło wraz z wiekiem kobiet co 10 lat o 36% (OR=1,36; 95% PU 1,03-1,79; p=0,027).

Stwierdzone w naszych badaniach współwystępowanie ureaplazm z wysokoonkogennymi typami HPV u kobiet ze zmianami cytologicznymi może sugerować ich rolę wspomagającą w procesie wnikania i przetrwania wirusa w komórkach nabłonkowych narządu płciowego, a w dalszej konsekwencji w inicjacji procesu przednowotworowego.

Tabela IV. Standaryzowane do wieku (przedziały wiekowe co 10 lat) ryzyko występowania LSIL w zależności od zakażenia HPV i ureaplazmami

Table IV. Risk of LSIL depending on HPV and ureaplasma infection standardized to age (for every 10-year interval)

| | iloraz szans (OR) | 95% przedział ufności | istotność statystyczna |
|-----------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|
| HPV | 11,82 | 4,43 - 31,54 | p < 0,001 |
| Ureaplazmy | 1,58 | 0,70 - 3,53 | ns |
| wiek (10lat) | 1,36 | 1,03 - 1,79 | p = 0,027 |
| | | | |
| HPV | 11,82 | 4,41 - 31,63 | p < 0,001 |
| <i>U. urealyticum</i> | 1,61 | 0,15 - 17,27 | ns |
| <i>U. parvum</i> | 1,58 | 0,68 - 3,66 | ns |
| wiek (10lat) | 1,36 | 1,03 - 1,79 | p = 0,027 |

Rolę ureaplazm jako ewentualnego kofaktora infekcji HPV podkreślali także w swoich pracach Lukic i wsp. (14) oraz Friedek i wsp. (17). Nie ulega wątpliwości, iż ureaplazmy mogą być jednym z wielu czynników współdziałających z HPV w procesie nowotworzenia, dlatego badania dotyczące tej tematyki powinny być kontynuowane.

WNIOSEK:

Zakażenia ureaplazmowe, szczególnie gatunkiem *U.u.* należy brać pod uwagę jako czynnik zwiększający ryzyko infekcji HPV w komórkach nabłonkowych szyjki macicy.

M Biernat-Sudolska, S Szostek, D Rojek-Zakrzewska, J Kopeć, B Zawilińska

MAY UREAPLASMAS IN GENITAL TRACT OF HPV-POSITIVE WOMEN INFLUENCE ABNORMAL CYTOLOGY OF CERVIX?

SUMMARY

The aim of the study was to estimate the incidence of *Ureaplasma urealyticum* (*U.u.*) and *Ureaplasma parvum* (*U.p.*) in 168 women diagnosed with LSIL infected and not infected with HPV vs. 82 women with no cytological abnormalities in the cervix (control group). The material used in the study were cervical secretions samples. PCR was used to confirm the presence of HPV and to identify the species of ureaplasmas. *U.p.* was significantly more frequent in both groups of women. In the study group, ureaplasmas were more frequently isolated in the HPV infected (31%) vs. HPV negative (16%) women. No direct relationship was found between ureaplasmas and LSIL. Statistical analysis showed, that infection with HPV occurred more frequently in the presence of ureaplasmas (OR=1,79; 95% PU 0,90-3,53; p=0,093). The above relationship was most evident for *U.u.* The risk for HPV infection in that case was 6.5 fold higher. Infections with ureaplasmas, especially *U.u.* should be considered as a factor increasing the risk of HPV infection of the cervical epithelial cells.

PIŚMIENNICTWO

1. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.
2. Bosch F X, Lorincz A, Munoz N, i in. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.
3. McNicol P, Paraskevas M, Guijon F. Variability of polymerase chain reaction-based detection of human papillomavirus DNA is associated with the composition of vaginal microbial flora. *J Med Virol.* 1994; 43:194-200.
4. Weites K B, Katz B, Schelonka R L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 757-89.
5. Kim M, Kim G, Romero R, i in. Biovar diversity of *Ureaplasma urealyticum* in amniotic fluid: distribution, intrauterine inflammatory response and pregnancy outcomes. *J Perinat Med*, 2003; 31: 146-52.
6. Saiki R K, Scharf S, Faloona F, i in. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230; 1350-54.
7. Manos M M, Ting Y, Wright D K. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.
8. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, i in. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991;72: 1039-44.
9. Szostek S, Klimek M, Zawilińska B, i in. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta Biochem Pol* 2006; 53: 603-607.
10. Hayflick L. *The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria.* New York: Meredith Corporation., 1965.
11. Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Lauterbach R. Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. *Acta Biochem Pol* 2006; 53: 609-12.
12. Luki N, Lebel P, Boucher M, i in. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 255-63.
13. Huang S, You Li J, Wu J, i in. Mycoplasmas infections and different human carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 266-69.
14. Lukic A, Canzio C, Patella A, i in. Determination of cervicovaginal microorganisms in women with abnormal cervical cytology: the role of *Ureaplasma urealyticum*. *Anticancer Res* 2006; 26: 4843-49.
15. Abele-Horn M C, Wolff P, Dressel F, i in. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1199-1202.
16. Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Rzepecka-Węglarz B, i in. Wpływ zakażenia ureaplazmami na stan kliniczny noworodków. *Przegląd Epidemiol* 2006; 60: 53-8.
17. Friedek D, Ekiel A, Chełmicki Z, i in. HPV, Chlamydia trachomatis and genital mycoplasmas infections in women with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL). *Ginekol Pol* 2004; 75:457-63.

Adres autora:

Małgorzata Biernat-Sudolska
Zakład Wirusologii Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum UJ
ul. Czysta 18, 31-121 Kraków,
tel. 012/634-54-00; e-mail: msudolsk@cm-uj.krakow.pl