Mgr Agnieszka Boguska

„WPŁYW SILDENAFILU NA KOMÓRKI JEDNOJĄDRZASTE I GRANULOCYTY KRWI OBWODOWEJ MĘŻCZYZN”

STRESZCZENIE

Czas niezbędny do wyprodukowania i dokładnego przebadania nowej substancji leczniczej szacuje się na kilkanaście lat do momentu jej wejścia na rynek farmaceutyczny. W świetle tych danych zwraca się uwagę na poszukiwanie nowych zastosowań leków już dopuszczonych do obrotu (tzw. „drug repurposing”), których znana jest biodostępność, farmakokinetyka i toksyczność. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się preparaty, które mogą być potencjalnie stosowane w terapii schorzeń nowotworowych, autoimmunologicznych i zapalnych.

Sildenafil jest farmaceutykiem zatwierdzonm przez FDA (ang. Federal Drug Administration) w leczeniu zaburzeń erekcji oraz tętniczego nadciśnienia płucnego. Jest on silnym i selektywnym inhibitorem enzymu - fosfodiesterazy typu 5 (PDE5). PDE5 katalizuje reakcje hydrolizy cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) do nieczynnych 5’monofosforanów. Sildenafil przez zahamowanie katabolizmu cGMP zwieksza jego wewnątrzkomórkowe stężenie, co jak wykazują badania ostatnich lat ma znaczenie w regulacji aktywności wielu komórek, w tym komórek układu immunologicznego. Wykazano również, iż lek ten nasila produkcję tlenku azotu (NO). Dzieje się to za sprawą zwiększenia ekspresji enzymu odpowiedzialnego za jego syntezę - indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS). NO aktywuje cyklazę guanozynową będącą enzymem przekształcającym guanozyno-5’-trifosforan (GTP) w cGMP. Dostępne dane literaturowe wskazują, iż NO ma działanie immunomodulacyjne, a ekspresja iNOS zachodzi w komórkach układu odpornościowego, m.in. w makrofagach, komórkach dendrytycznych oraz neutrofilach. Ekspresja PDE5 również ma miejsce w komórkach immunokompetentnych (limfocytach T, komórkach NK, makrofagach, komórkach dendrytycznych). W limfocytach B z kolei nie wykazano obecności PDE5, ale wydaje się, że inhibitory PDE5 mogą modulować aktywność tych komórek przez wpływ na funkcjonowanie limfocytów T pomocniczych (Th1 i Th2).

Niektóre badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych sugerują, iż sildenafil może mieć działanie immunomodulacyjne. Niestety wpływ tego leku na komórki układu odpornościowego ludzi nie jest poznany, a nieliczne badania obserwacyjne przeprowadzone u osób leczonych sildenafilem z powodu zaburzeń erekcji dały niejednoznaczne rezultaty. W świetle tych danych celem niniejszej pracy było zbadanie nieopisanego dotychczas wpływu sildenafilu na aktywność komórek układu odpornościowego u zdrowych mężczyzn.

Badania przeprowadzono *in vitro* na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs, ang. peripheral blood mononuclear cells) oraz granulocytach krwi obwodowej, izolowanych metodą wirowania w gradiencie gęstości od zdrowych krwiodawców (16 mężczyzn) i hodowanych w medium uzupełnionym sildenafilem (w stężeniu 400 ng/ml, 4 µg/ml i 10 µg/ml). Kontrolę stanowiły hodowle zawierające równoważne ilości medium. Następnie badano wpływ sildenafilu na proliferację limfocytów T i B (stymulowanych mitogenami) oraz limfocytów stymulowanych alloantygenami w teście mieszanej hodowli limfocytów (MLR). Proliferacja oceniana była na podstawie pomiaru poziomu syntezy DNA z wykorzystaniem inkorporacji tymidyny znakowanej trytem. Kolejnym etapem prac było zbadanie wpływu sildenafilu na produkcję cytokin: TNF-α, IL-1β, IL-6 i osteopontyny (OPN) przez PBMCs (metodą immunoenzymatyczną, ELISA), a także na ekspresję genu osteopontyny (OPN) metodą real time PCR. W pracy oceniono również wpływu sildenafilu na aktywność komórek NK (natural killer) krwi obwodowej (metodą cytometrii przepływowej), a także na zdolność granulocytów do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego wykorzystując test redukcji cytochromu c.

W niniejszej pracy wykazano, iż sildenafil nie zaburza proliferacji limfocytów T i B oraz produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez granulocyty krwi obwodowej. Obserwowano natomiast, iż lek ten (w stężeniach 4 µg/ml i 10 µg/ml) istotnie zmniejsza aktywność komórek NK ($p < 0,05$). Ponadto udowodniono, iż sildenafil (w stężeniach 4 µg/ml i 10 µg/ml) istotnie obniża ekspresję genu *OPN* ($p < 0,05$) oraz produkcję jej białka ($p < 0,05$) przez PBMCs. Badania wykazały również, iż lek ten (w stężeniu 400 ng/ml) istotnie nasila produkcję TNF-α ($p < 0,05$), natomiast nie wpływa na syntezę IL-1β i IL-6.

Wyniki niniejszej pracy sugerują, iż sildenafil selektywnie wpływa na funkcje komórek układu odpornościowego u zdrowych mężczyzn. Tego typu analizy były prowadzone po raz pierwszy, zatem uzyskane wyniki należy traktować jako wstępne.

Celowe jest kontynuowanie badań, zrówno *in vitro* jak i *in vivo*, w większych grupach. Niezbędna wydaje się ponadto ocena molekularnych mechanizmów, które mogą warunkować działanie sildenafilu na określone populacje komórek układu odpornościowego.