

mgr Monika Ohams

**Wpływ sildenafilu na aktywność komórek NK krwi obwodowej u kobiet z
poronieniami nawykowymi.**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w zakresie biologii medycznej**

**Promotor: dr hab. med. Małgorzata Jerzak,
prof. nadzw. WIM w Warszawie**

Zakład Immunologii Klinicznej

Istytutu Transplantologii WUM

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Andrzej Górski



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą I Wydziału Lekarskiego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Warszawa 2013

STRESZCZENIE

Nawracające poronienia (poronienia nawykowe - PN) definiuje się jako trzy lub więcej kolejnych ciąż, które kończą się poronieniami. Przyczyny poronień mogą być genetyczne (np. nieprawidłowe kariotypy partnerów, inwersje, translokacje, mozaicyzm), anatomiczne (np. deformacje macicy), mikrobiologiczne (np. zakażenie toksoplazmozą czy chłamydią), hormonalne (np. niedoczynność tarczycy, zespół policystycznych jajników, niedomoga lutealna), psychologiczne (np. stany lękowe, depresja), i immunologiczne (np. przeciwciała antyfosfolipidowe (APA), przeciwciała przeciwjądrowe (ANA), przeciwciała przeciwplemnikowe (ASA), zgodność w układzie HLA (szczególnie pod względem locus DQ2), podwyższona aktywność komórek NK, obniżenie ilości limfocytów T regulatorowych, dominacja odpowiedzi Th1).

Wcześniejsze badania wskazują, że wzrost aktywności komórek NK krwi obwodowej wiąże się z mniejszą możliwością implantacji zarodka i z istotnie większym odsetkiem poronień. Chociaż immunofenotyp większości komórek NK krwi obwodowej jest inny niż doczesnowych komórek NK (dNK), to właśnie komórki NK krwi obwodowej wydają się być blisko powiązane z dNK a ich aktywność może odzwierciedlać funkcjonowanie populacji dNK. Ustalono, że przynajmniej część komórek dNK pochodzi z krwi obwodowej. Dodatkowo niektóre badania sugerują, że kobiety z PN mają podwyższoną aktywność komórek NK krwi obwodowej.

Cytrynian sildenafilu wzmacnia działania tlenku azotu (NO), w tym zwiększanie przepuszczalności naczyń krwionośnych. Podawanie cytrynianu sildenafilu dopochwowo poprawia przepływ krwi w tętnicach macicznych i zwiększa grubość endometrium. W czasie fazy proliferacyjnej NO może również wykazywać efekt toksyczny na poziomie endometrium w czasie implantacji zarodka. NO wydaje się być odpowiedzialny za uwalnianie cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , z aktywowanych komórek NK, co może być przyczyną defektu implantacji.

Innym potencjalnym lekiem, który mógłby być użyty w terapii PN o podłożu immunologicznym jest etanercept. Etanercept jest używany w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych i został zaaprobowany przez FDA do stosowania w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, młodzieńczego zapalenia stawów, łuszczycowego zapalenia stawów, łuszczycy oraz zeszytniającego zapalenia stawów kręgosłupa. Etanercept jest rekombinowanym białkiem receptora p75 Fc (receptora 2 dla TNF- α) powiązanego z

częścią Fc ludzkiej IgG1. Lek przyłącza się do TNF- α i blokuje jego działanie. Jest on antagonistą TNF- α o działaniu przeciwzapalnym. Blokery TNF- α mogą stanowić bezpieczną i skuteczną metodę leczenia pacjentek z niepłodnością zależną od zaburzenia odpowiedzi Th1 i nawracającymi poronieniami. Antagoniści TNF- α należą do grupy leków B do stosowania w czasie ciąży. Chociaż dane dotyczące bezpiecznego stosowania tych leków w czasie ciąży są ograniczone, do tej pory nie uzyskano wystarczających dowodów, że stosowanie antagonistów TNF- α jest embriotoksyczne, wywiera efekt teratogeny czy też zwiększa ryzyko utraty ciąży.

Celem badania było zbadanie wpływu sildenafilu i etanerceptu na aktywność komórek NK krwi obwodowej u kobiet z poronieniami nawykowymi (po naturalnym zapłodnieniu jak i po zapłodnieniu *in vitro*-IVF), oznaczenie poziomu TNF- α w surowicy pacjentek przed i po leczeniu oraz zbadanie wpływu leków na przebieg ciąży.

Materiał i Metody: Badanie wpływu sildenafilu na aktywność komórek NK przeprowadzono na 28 nieciążarnych pacjentkach z poronieniami nawykowymi w wywiadzie, zarówno po naturalnym zapłodnieniu jak i po IVF. Z badania wyłączono pacjentki z poronieniami o przyczynach innych niż immunologiczne. Wszystkie pacjentki włączone do badania miały podwyższoną aktywność komórek NK krwi obwodowej. Sildenafil podawano dopochwowo w czopkach po 25mg, 4 razy dziennie w czasie fazy proliferacyjnej cyklu u kobiet z PN. Ocenę aktywności komórek NK krwi obwodowej przed i po leczeniu przeprowadzono wykorzystując metodę cytometrii przepływowej. Dodatkowo badano wpływ sildenafilu w stężeniu 10 μ g oraz 400ng (stężenie fizjologiczne leku po podaniu doustnym) na aktywność komórek NK w hodowli komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (MNC) pacjentek. Ekspresję markerów powierzchniowych komórek NK (CD16 i CD56) na MNC oznaczano przy użyciu cytometrii przepływowej. Dla grupy kontrolnej badanie wpływu sildenafilu na aktywność komórek NK zostało wykonane tylko *in vitro* ze względu na brak zgody Komisji Bioetycznej na badanie *in vivo*.

Zbadano również wynik ciąży u 28 kobiet leczonych etanerceptem z podwyższoną aktywnością lub ilością komórek NK. Kobiety otrzymywały 4 dawki leku po 25mg, 2 razy w tygodniu. Aktywność komórek NK i ekspresja markerów powierzchniowych CD16, CD56, CD25, i CD4 na komórkach krwi obwodowej przed i po leczeniu były oceniane przy użyciu cytometrii przepływowej.

Wyniki: Kobiety z nawracającymi poronieniami miały istotnie zwiększoną ekspresję antygenu CD56 na komórkach CD3⁺ i wyższą aktywność komórek NK w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej (odpowiednio 4,46 \pm 2,96% vs 9,05 \pm 6,63% i 11,75 \pm 5,52% vs

13,4 +/-6,2%, $p<0,05$). Po leczeniu sildenafilem aktywność komórek NK i poziom komórek CD16⁺ u pacjentek z poronieniami nawykowymi uległy istotnemu obniżeniu (15,67 +/- 11,86% vs. 8,29 +/- 5,00% i 13,4 +/-6,2% vs 11,75 +/- 5,52%, $p<0,05$). Podobne wyniki uzyskano w hodowli *in vitro* MNC izolowanych od pacjentek z PN i kobiet z grupy kontrolnej z 10 µg lub 400 ng sildenafilu ($p<0,05$). Nie zaobserwowano natomiast zmiany aktywności komórek NK w hodowli *in vitro* MNC izolowanych od pacjentek i kobiet z grupy kontrolnej z 10 µg lub 400 ng sildenafilu przed leczeniem sildenafilem ($p>0,05$).

Pacjentki z grupy leczonej etanerceptem miały istotnie podwyższony poziom TNF- α przed terapią w porównaniu do grupy kontrolnej (16,6 +/-7,2 pg/ml vs 41,4 +/- 28,4 pg/ml). W grupie pacjentek leczonych sildenafilem stwierdzono tendencję do wzrostu stężenia TNF- α w surowicy po terapii. Leczenie etanerceptem skutkowało istotnym obniżeniem poziomu TNF- α w surowicy (41,4 +/- 28,4 vs 25,4 +/-13,2 pg/ml). Etanercept obniżał aktywność komórek NK krwi obwodowej. Inne parametry immunologiczne (poziom komórek CD16⁺, CD56⁺ i CD25⁺CD4⁺) nie były istotnie zmienione.

Po leczeniu cytrynianem sildenafilu uzyskaliśmy 24 zdrowe donoszone ciążę – 16 u 24 pacjentek z PN (67%) i 8 u 14 pacjentek po IVF (57%). U 4 z 14 pacjentek po IVF (43%) i 2 pacjentek z PN (8%) wystąpiło poronienie.

16 z 28 pacjentek z PN (57,2%) leczonych etanerceptem urodziło zdrowe dzieci (8 pacjentek po naturalnym zapłodnieniu oraz 8 pacjentek po IVF), a u 6 pacjentek (21,4%) doszło do ponownej utraty ciąży. 6 pacjentek (21,4%) nie zaszło w ciążę przed zakończeniem badań.

Wnioski: Przeprowadzone badania wskazują, że cytrynian sildenafilu podawany dopochwowo ma wpływ na aktywność komórek NK u kobiet z PN. Zgodnie z naszą wiedzą, jest to pierwsze badanie pokazujące, że terapia sildenafilem może być skuteczna w leczeniu kobiet z PN. Badania przeprowadzone *in vitro* pokazują, że sildenafil nie ma szkodliwego wpływu na komórki. Nie zwiększa śmiertelności MNC, ale obniża aktywność komórek NK. Mechanizm działania sildenafilu na komórki NK nie został dotąd wyjaśniony. Nie można wykluczyć zależności poprawy krążenia krwi w tętnicach macicznych, który może zmniejszać ilość dNK i dzięki temu obniżać ich aktywność.

Według ostatnich badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych zablokowanie aktywności TNF- α przy użyciu etanerceptu zapobiegało wystąpieniu nawracających poronień. Istnieją doniesienia o związku pomiędzy zastosowaniem blokerów TNF- α (etanerceptu i adalimumabu) a pozytywnym wynikiem ciąży.

Terapia anty-TNF- α wydaje się być obiecująca w leczeniu niepłodności o podłożu immunologicznym. Niektóre dane sugerują, że etanercept sprzyja zagnieżdżeniu się zarodka przez blokowanie nadprodukcji TNF- α przez komórki NK w macicy. Skuteczność takiej terapii może wynikać z regulacji mechanizmów immunologicznych, zapalnych i/lub prokoagulacyjnych, których zaburzenia mogą brać udział w patogenezie PN. Według ostatnich prac, etanercept znacznie obniża ekspresję markera aktywacji CD69 na komórkach NK CD56⁺. Wydaje się, że etanercept może być stosowany w celu hamowania działania TNF- α i produkcji działających embriotoksycznie cytokin Th1 przez aktywowane komórki NK. Podobnie sildenafil podawany dopochwowo może być nową terapią, która poprawia mikrośrodowisko immunologiczne i jakość endometrium u pacjentek cierpiących na nawracające poronienia.

dr hab. med. Mirosława Jęszak
specjalista ginekolog-położnik
tel. 011 661 565
61 6785

Medicus