Prof. Włodzimierz Maśliński
Zakład Patofizjologii i Immunologii
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji
Spartańska 1
02-637 Warszawa

Ocena
Rozprawy Doktorskiej mgr Agnieszki Boguskiej zatytułowanej:
„ Wpływ sildenafilu na komórki jednojądrzaste i granulocyty krwi obwodowej mężczyzn"

Rejestracja nowych leków wymaga bardzo dokładnych badań związanych z poznaniem mechanizmów ich działania, toksyczności, biodostępności, farmakokinetyki, bezpieczeństwa, a przede wszystkim skuteczności leczenia. Z tych powodów, tylko substancje spełniające te bardzo szczegółowe i restrykcyjne wymagania mogą zostać dopuszczone do leczenia. Pomimo wiedzy dotyczącej mechanizmów działania zarejestrowanych leków, istnieje możliwość, że niektóre z nich mogą wykazywać dodatkowe korzystne właściwości, które mogłyby zostać wykorzystane w leczeniu innych chorób. Jednym z takich leków jest sildenafil stosowany w leczeniu zaburzeń erekcji i tętniczego nadciśnienia płucnego. Lek ten jest selektywnym inhibitorem fosfodiesterazy typu 5 (PDE5), który prowadzi do zwiększenia produkcji tlenku azotu oraz podniesienia wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego guanomonofosforanu.

Poszukiwania innych możliwych efektów działania tego leku prowadzone na zwierzętach sugerowały, że sildenafil może także wykazywać działanie immunomodulujące. Jednakże, badania prowadzone u ludzi były nieliczne, a ich wyniki nie były jednoznaczne. W celu wyjaśnienia tych rozbieżności, Autorka postawiła hipotezę, że sildenafil może wpływać na komórki układu odpornościowego u zdrowych mężczyzn. Weryfikacja tej hipotezy stanowi przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej.

Praca zawiera 71 strony w typowym układzie: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Założenia i Cel Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo, Spis Tabel, Spis Rycin oraz dwa Załączniki Zgody Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym na przeprowadzenie zaplanowanych badań.

We wstępie, Autorka omówiła podział, strukturę, oraz mechanizm działania 11 rodzin fosfodiesteraz, które w zależności od powinowactwa mogą selektywnie hydrolizować cykliczny 3'monofosforan adenozyny (cAMP), 3'monofosforan guanozyny cGMP) lub nieselektywnie oba te związki.

Następnie w przystępny sposób omówiła zastosowanie, farmakokinetykę i mechanizm działania sildenafilu jako selektywnego inhibitora PDE5, który prowadzi do podwyższenia wewnątrzkomórkowego stężenia cGMP, co z kolei podnosi poziom tlenku azotu NO.

W kolejnej części przedstawiła komórki jednojądrzaste w tym główne subpopulacje limfocytów T cytotoksycznych (Tc), pomocniczych Th wraz z ich subpopulacjami (Th0, Th1, Th2, Th9, Th17, Th22). Omówiła także komórki regulatorowe Treg, odpowiedzialne za wygaszanie odpowiedzi immunologicznej.

Przedstawiła także limfocyty pamięci wraz z ich dwoma grupami: centralnymi komórkami pamięci (Tcm) oraz efektorowymi komórkami pamięci (Tem).

Następnie przedstawiła limfocyty B, wraz z ich subpopulacjami B2, B1, oraz limfocytami B pamięci. Kolejno omówiła komórki NK (natural killers) oraz monocyty.

W ostatniej części dosyć szczegółowo omówiła granulocyty krwi obwodowej, w skład których wchodzą najliczniejsze neutrofile oraz bazofile i eozynofile.

Ten krótki wstęp stanowi dobre wprowadzenie do określenia Założeń i Celu pracy.

W tej części Autorka zwróciła uwagę na występowanie w wielu komórkach układu odpornościowego enzymów docelowych dla sildenafilu: PDE5 oraz indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS). Przytoczyła szereg wyników badań wykazujących wpływ sildenafilu na różne rodzaje komórek immunologicznych, zarówno u zdrowych myszy, jak i w modelach zwierzęcych wybranych chorób. Jednakże, jak wskazuje Autorka, badania wpływu sildenafilu u ludzi były nieliczne i dotyczyły mężczyzn z zaburzeniami erekcji. Co więcej, wyniki otrzymane w różnych laboratoriach nie były jednoznaczne.

Do chwili obecnej nie było prowadzonych badań wpływu sildenafilu u zdrowych mężczyzn.

Biorąc to pod uwagę, Autorka określiła zakres celów, których wykonanie pozwoliłoby na weryfikację przedstawionej uprzednio hipotezy o wpływie sildenafilu na komórki układu immunologicznego u zdrowych mężczyzn w warunkach in vitro.

Cele to obejmowały ocenę wpływu sildenafilu na:

1. Proliferację limfocytów T i B pod wpływem wybranych miogenów
2. Proliferację limfocytów stymulowanych alloantygenami w mieszanej hodowli limfocytów
3. Produkcję cytokin prozapalnych (TNF-α, IL-1β, IL-6) przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
4. Ekspresję genu kodującego osteopontynę (OPN) oraz produkcję tej cytokiny
5. Aktywności komórek NK krwi obwodowej
6. Produkcję anionorodnika ponadtlenkowego (O_2-) przez granulocyty krwi obwodowej

W następnym rozdziale, Materiale i Metodach, Autorka przedstawiła grupę badaną, którą stanowiło 16 zdrowych ochotników, nie przyjmujących żadnych leków, oraz którzy wyrazili pisemną, świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniu. Materiał stanowiła pełna krew obwodowa pobrana na heparynę litową i wersenian dwupotasowy. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Następnie Autorka przedstawiła podstawowe metody zastosowane do przeprowadzenia zaplanowanych badań w tym: izolacji komórek jednojądrzastych (PBMC) i granulocytów metodą wirowania na gradiencie gęstości z wykorzystaniem Histopaque1007 i -1119, wyboru linii komórkowej K562 do przeprowadzenia testu cytotoksyczności komórek NK, przygotowania roztworu cytrynianu sildenafilu o stężeniu 100 μg/ml, oceny wpływu sildenafilu na proliferację: limfocytów T i B stymulowanych mitogenami, limfocytów stymulowanych alloantygenami w mieszanej hodowli limfocytów (MLR). Autorka opisała także metodę oceny wpływu sildenafilu na produkcję wybranych cytokin pozapalnych pod wpływem stymulacji PMA i jonomycyną. Przedstawiała też metody zastosowane do oceny wpływu sildenafilu na: ekspresję genu dla ostepontyny oraz produkcję tej cytokiny. Szczegółowo przedstawiła metodę oceny wpływu sildenafilu na aktywności komórek NK z wykorzystaniem komórek K562. Opisała także metodę oceny wpływu sildenafilu na produkcję anionorodnika ponadtlenkowego (O_2-) przez granulocyty krwi obwodowej.

Zastosowanie tych metod było konieczne, a zarazem wystarczające do przeprowadzenia zaplanowanych badań. Do analizy statystycznej otrzymanych wyników zastosowano odpowiednie testy statystyczne.

W następnym rozdziale, Wynikach Autorka przedstawiła otrzymane wyniki. Spośród zaprezentowanych wyników za najważniejsze uważam wykazanie, że w warunkach hodowli in vitro, sildenafil:

1. Nie wpływa na proliferację limfocytów.
2. Nie wpływa na produkcję IL-1β i IL-6.
3. Nie wpływa na zdolność granulocytów krwi obwodowej do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego (O_2-).
4. Podwyższa produkcję TNF przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.
5. Obniża produkcję osteopontyny (OPN).
6. Obniża aktywność cytotoksyczną komórek NK.

Co do ostatniego wyniku, Autorka błędnie przedstawiła/opisała słupki odzwierciedlające aktywność komórek NK. Według ryc.14 najsilniejszy efekt wywoływał sildenafil w stężeniu 400ng/ml, a nieco mniejszy w stężeniu 4μg/ml, natomiast brak wpływu, lub nawet tendencję wzrostową w stężeniu 10μg/ml.

Tymczasem poniżej Ryc.14 Autorka pisze: „Niniejsze badanie wykazało, iż sildenafil w stężeniu 4 μg/ml oraz 10μg/ml znacząco zmniejszał aktywność komórek NK krwi obwodowej mężczyzn ($p<0,05$). Nie zaobserwowano natomiast takiego efektu dla leku w stężeniu 400 ng/ml)".

Rozbieżności te, skłoniły Recenzenta do poszukiwań oryginalnych wyników, które zostały opublikowane w pracy Boguska et al. „Sildenafil, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor down-regulates natural kiler cells activity in healthy men in vitro" opublikowanej Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 2018; 75(1):211-216. Zgodnie z opublikowanymi danymi, rzeczywiście wystąpił błąd w opisie ryc.14. Autorka powinna przesłać do wszystkich kopii dysertacji erratę tego błędu.

W kolejnej części pracy, Dyskusji, Autorka ustosunkowała się do uzyskanych wyników na tle dostępnej literatury światowej. Zwraca uwagę na stosunkowo nieliczne doniesienia dotyczące wpływu sildenafilu na ludzkie komórki immunologiczne, a zwłaszcza brak danych dotyczących komórek pochodzących od zdrowych mężczyzn. Pomimo tego, część obserwacji dotyczących podwyższenia poziomu TNF czy obniżenia aktywności komórek NK u kobiet z nawracającymi poronieniami po zastosowaniu sildenafilu są zbieżne z wynikami Autorki. Podobnie, Autorka potwierdziła poprzednie badania opisujące brak wpływu sildenafilu na proliferację limfocytów u zdrowych krwiodawców.

Autorka wskazywała także na pewne analogie otrzymanych przez nią wyników z danymi literaturowymi pochodzącymi z badań prac prowadzonych na modelach zwierzęcych. Biorąc jednak pod uwagę, że nie wszystkie wyniki badań prowadzonych na zwierzętach, mają swoje odzwierciedlenie w badaniach na ludzkich komórkach, nie należy się dziwić, że te analogie nie zawsze są obserwowane.

Autorka wskazuje również na istnienie publikacji wskazujących na sprzeczne wyniki immunomodulacyjnego wpływu sildenafilu na komórki układu immunologicznego. Wyciąga z tego wniosek, że potrzebne są dalsze badania mogące ustalić prawdziwe efekty, oraz mechanizmy odpowiedzialne za immunomodulujące właściwości tego leku.

Całość Dyskusji jest przeprowadzona dobrze i wskazuje na znajomość Autorki z publikacjami dotyczącymi potencjalnych właściwości immunomodulujących sildenafilu, jak i jej zdolnością do ich przedstawienia w przejrzysty sposób.

W następnej części rozprawy Autorka przedstawiła 6 wniosków, które dobrze odzwierciedlają uzyskane wyniki.

Ogólnie biorąc, hipoteza Autorki częściowo została potwierdzona, gdyż sildenafil wpływał tylko na niektóre komórki układu odpornościowego zdrowych dawców krwi, a jego efekty były stosunkowo niewielkie.

Dodatkowo, występujące różnice indywidualne, mogły być odpowiedzialne za stosunkowo duże rozrzuty badanych parametrów.
Recenzent podziela zdanie Autorki, że otrzymane przez nią wstępne wyniki wymagają dalszych badań przeprowadzonych na większej grupie dawców krwi.

Przedstawiona rozprawa spełnia warunki ustawowe rozpraw doktorskich, w tym postawienie ważnej hipotezy naukowej, określenie celów do jej weryfikacji, zaplanowanie i wykonanie doświadczeń, przedstawienie wyników badań oraz przeprowadzenie dyskusji otrzymanych wyników w kontekście dostępnej wiedzy. Z tych powodów, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk o Zdrowiu, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie magister Agnieszki Boguskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 18.06.2020

Prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński

KIEROWNIK
ZAKŁADU PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie
prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński