

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Krzysztof Krawczyk

Sezonowa zmiana ekspresji mikroRNA oraz stężeń cytokin
prozapalnych produkowanych przez monocyty u osób przewlekle
narażonych na zanieczyszczenie powietrza

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jadwiga Nessler

Pracę wykonano w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności
Serca, Instytut Kardiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium
Medicum

Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Jadwiga Nessler

Kraków, rok 2022

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojej pani promotor, Profesor Jadwidze Nessler – Kierownikowi Kliniki Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca UJ CM, w której mam zaszczyt pracować i w której rozprawa ta powstała.

Chciałem podziękować także Pani Profesor Ewie Kondurackiej, bez której wiedzy i nieustannego wsparcia praca ta nie mogłaby powstać. Dziękuję za zaufanie oraz daną mi szansę, za wiarę Pani Profesor we mnie oraz ciągłą motywację.

Pracę tę dedykuję moim Rodzicom – im zawdzięczam to, kim teraz jestem.

Każda pożoga sprawia, że natura odbiera to, co człowiek jej zabrał, a także odważnie sięga po same istoty ludzkie, próbując przywrócić je do stanu naturalnego.

Olga Tokarczuk

Praca doktorska została przedstawiona w formie monografii.

Niniejsza praca stanowi fragment badania zespołowego wykonanego w ramach grantu NCN OPUS 11 (projekt badawczy nr 2016/21/B/NZ7/01747) pt. „Zmiana ekspresji mikroRNA ludzkich monocytów krwi obwodowej wskutek ekspozycji na cząsteczki pyłu zawieszonego PM_{2,5} in vitro – potencjalny związek między zanieczyszczeniem powietrza a miażdżycą”. Kierownik projektu: prof. UJ, dr hab. n. med. Ewa Konduracka. Nr w systemie SAP: K/PBO/000495. Finansowanie badań i analiz przeprowadzonych w niniejszej monografii było realizowane w zakresie tego grantu.

Członkowie zespołu badawczego:

Ewa Konduracka¹ (kierownik projektu), Krzysztof Krawczyk², Marcin Surmiak³, Maciej Pudełek⁴, Krzysztof Malinowski⁵, Lucyna Mastalerz³, Mirosław Zimnoch⁶, Lucyna Samek⁶, Katarzyna Styszko⁷, Leszek Furman⁶, Michał Gałkowski⁶, Jadwiga Nessler¹, Kazimierz Różański⁶ i Marek Sanak³

¹*Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Instytut Kardiologii, Klinika Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca*

²*Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Zakład Ratownictwa Medycznego*

³*Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej*

⁴*Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biologii Komórki*

⁵*Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Zakład Bioinformatyki i Telemedycyny*

⁶*Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej*

⁷*Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, Wydział Energetyki i Paliw*

Wyżej wymieniony projekt, w ramach którego powstała niniejsza praca doktorska, został zrealizowany za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego (decyzja nr 122.6120.355.2016 z dnia 16 grudnia 2016 r.).

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW	3
2. WSTĘP	11
2.1. Problem zanieczyszczenia powietrza na świecie	11
2.2. Skład i pochodzenie zanieczyszczenia powietrza oraz związane z nim skutki zdrowotne	11
2.3. Początki badań nad problematyką zanieczyszczenia powietrza na świecie	16
2.4. Opis stanu rzeczy dla miasta Krakowa	18
2.5. Miażdżyca i choroba wieńcowa w kontekście zanieczyszczenia powietrza	22
2.6. Rola monocytów w procesie zapalnym i w rozwoju blaszki miażdżycowej	25
2.7. Potencjalny związek zmian ekspresji mikroRNA z patogenezą chorób sercowo-naczyniowych	28
3. CELE BADAWCZE	31
4. MATERIAŁ I METODYKA	33
4.1. Część kliniczna pracy	33
4.1.1. Sposób rekrutacji uczestników badania	33
4.1.2. Pobranie i zabezpieczanie próbek krwi żyłnej od pacjentów do badań molekularnych	38
4.2. Część eksperymentalna pracy	38
4.2.1. Izolacja monocytów z krwi żyłnej zdrowych ochotników	38
4.2.2. Pobieranie pyłu zawieszzonego (PM _{2,5})	39
4.2.3. Ekstrakcja i przygotowanie próbek PM _{2,5} do badań biologicznych	40
4.2.4. Analiza zmian ekspresji cząsteczek miRNA i stężeń cytokin prozapalnych	41

4.2.4.1. Analiza zmian ekspresji cząsteczek miRNA po ekspozycji ludzkich monocytów na próbki PM _{2,5}	41
4.2.4.2. Analiza zmian ekspresji cząsteczek miRNA w surowicy krwi pobranej od uczestników klinicznej części badania (przewlekle narażonych na PM _{2,5} mieszkańców Krakowa)	42
4.2.4.3. Analiza zmian stężeń cytokin prozapalnych po ekspozycji ludzkich monocytów na próbki PM _{2,5} oraz w surowicy krwi pobranej od uczestników części klinicznej badania (przewlekle narażonych mieszkańców Krakowa)	43
4.2.5. Obserwacja ludzkich monocytów (inkubowanych z próbkami PM _{2,5}) za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego	43
4.2.6. Analiza składu chemicznego zebranych próbek PM _{2,5}	44
4.3. Etyka	45
4.4. Analiza statystyczna	45
5. WYNIKI	47
5.1. Ocena zmian ekspresji miRNA i stężeń cytokin prozapalnych w zawiesinie ludzkich monocytów inkubowanych z próbkami PM _{2,5} o znanym składzie i pochodzeniu	47
5.1.1. Analiza zmian ekspresji cząsteczek miRNA po ekspozycji monocytów na PM _{2,5}	47
5.1.2. Analiza zmian stężenia cytokin prozapalnych po ekspozycji monocytów na PM _{2,5}	50
5.2. Ocena sezonowych zmian ekspresji miRNA i stężeń cytokin prozapalnych wśród uczestników badania (ocena przewlekłego narażenia mieszkańców Krakowa na PM _{2,5}) – kliniczna część badania	53
5.2.1. Charakterystyka badanej populacji	53
5.2.2. Analiza sezonowych zmian ekspresji miRNA w badanej populacji	56
5.2.3. Analiza sezonowych zmian stężenia cytokin prozapalnych w badanej populacji	57

5.3. Obserwacja ludzkich monocytów (inkubowanych z próbkami PM _{2,5}) za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego	62
5.4. Analiza sezonowych zmian składu chemicznego zebranych w Krakowie próbek PM _{2,5}	65
5.4.1. Pomiar sezonowych zmian stężenia PM _{2,5}	65
5.4.2. Analiza składu pierwiastkowego i pomiar sezonowych zmian stężenia wykrytych pierwiastków	65
5.4.3. Analiza zawartości jonów nieorganicznych i pomiar sezonowych zmian stężenia wybranych jonów	66
5.4.4. Analiza zawartości określonych PAHs i pomiar sezonowych zmian stężenia wybranych węglowodorów	68
5.4.5. Oznaczenie całkowitej zawartości węgla z podziałem na węgiel pierwiastkowy i organiczny	68
6. DYSKUSJA	70
7. WNIOSKI	85
8. PIŚMIENNICTWO	87
9. SPIS TABEL	99
10. SPIS RYCIN	101
11. STRESZCZENIE	103
12. SUMMARY	106

1. WYKAZ SKRÓTÓW

ACEIs – inhibitory konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*)

ACS – ostry zespół wieńcowy (ang. *acute coronary syndrome*)

AGH – Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie

AhR – receptor dla węglowodorów arylowych (ang. *aryl hydrocarbon receptor*)

ALT – aminotransferaza alaninowa (ang. *alanine aminotransferase*)

ARBs – antagoniści konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin receptor blockers*)

BMI – wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*)

CABG – pomostowanie aortalno-wieńcowe (ang. *coronary artery bypass grafting*)

CAD – choroba wieńcowa (ang. *coronary artery disease*)

CCBs – antagoniści kanału wapniowego (ang. *calcium channel blockers*)

CCS – przewlekły zespół wieńcowy (ang. *chronic coronary syndrome*)

CO – tlenek węgla

CO₂ – dwutlenek węgla

COX-2 – cyklooksigenaza 2 (ang. *cyclooxygenase-2*)

COPD – przewlekła obturacyjna choroba płuc (ang. *chronic obstructive pulmonary disease*)

CRP – białko C-reaktywne (ang. *C-reactive protein*)

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethylsulfoxide*)

EC – węgiel pierwiastkowy (ang. *elemental carbon*)

EDXRF – spektrometria fluorescencji rentgenowskiej z dyspersją energii (ang. *energy dispersive X-ray fluorescence*)

EEA – Europejska Agencja ds. Środowiska (ang. *European Environment Agency*)

eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (ang. *endothelial nitric oxide synthase*)

EUSAAR – ang. *European Supersites for Atmospheric Aerosol Research*

eGFR – szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej (ang. *estimated glomerular filtration rate*)

FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*)

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. *high-density lipoprotein*)

HF – niewydolność serca (ang. *heart failure*)

HGB – hemoglobina

HIV – ludzki wirus nabytego niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*)

HMG-CoA – syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A

HRV – dobowa zmienność rytmu serca (ang. *heart rate variability*)

IGF-1 – receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. *insulin-like growth factor 1*)

IgG – przeciwciała klasy G (ang. *immunoglobulin G*)

IL-1 – interleukina-1 (ang. *interleukin-1*)

IL-6 – interleukina-6 (ang. *interleukin-6*)

KDIGO – ang. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

KOBiZE – Krajowy Ośrodek Bilansowania i Zarządzania Emisjami

LDL – lipoproteina o niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*)

LDH – dehydrogenaza mleczanowa (ang. *lactate dehydrogenase*)

LPS – lipopolisacharyd

MI – zawał mięśnia sercowego (ang. *myocardial infarction*)

miRNA – mikroRNA

MPO – mieloperoksydaza

MRM – monitorowanie reakcji wielokrotnych (ang. *multiple reaction monitoring*)

mRNA – informacyjne RNA (ang. *messenger RNA*)

NADPH oksydaza – ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*

NRG – neuregulina-1 (ang. *neuregulin-1*)

NF-κB – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (ang. *nuclear factor kappa B*)

NO₂ – dwutlenek azotu

NOS – syntaza tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthase*)

OC – węgiel organiczny (ang. *organic carbon*)

OGTT – doustny test obciążenia glukozą (ang. *oral glucose tolerance test*)

PAHs – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (ang. *polycyclic aromatic hydrocarbons*)

PBL – planetarna warstwa graniczna (ang. *planetary boundary layer*)

PBMCs – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*)

PCI – przezskórna angioplastyka wieńcowa (ang. *percutaneous coronary intervention*)

PI3K-AKT – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu i kinaza białkowa AKT

PM – drobne cząsteczki stałe pyłu zawieszonego (ang. *particulate matter*)

PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter 2.5 μm*)

PPM – liczba części na milion (ang. *parts per million*)

RBC – erytrocyt (ang. *red blood cell*)

ROs – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

RPMI – ang. *Roswell Park Memorial Institute*

SO₂ – dwutlenek siarki

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor β*)

Th1 – limfocyty pomocnicze typu 1 (ang. *helper T lymphocyte type 1*)

Th2 – limfocyty pomocnicze typu 2 (ang. *helper T lymphocyte type 2*)

TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*)

UE – Unia Europejska

UJ CM – Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*)

VSMCs – komórki mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*)

WBC – leukocyt (ang. *white blood cell*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

Z/L – stosunek zima/lato

2. WSTĘP

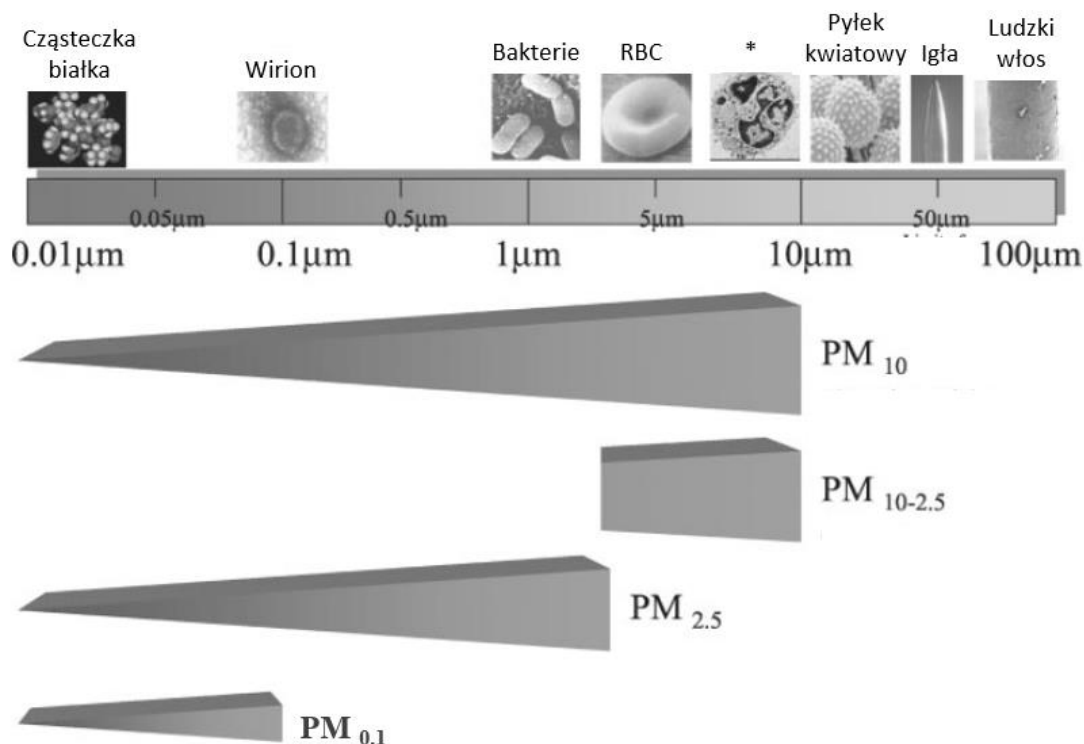
2.1. Problem zanieczyszczenia powietrza na świecie

W ostatnim czasie obserwuje się wzrost zainteresowania zagadnieniami związanymi z zanieczyszczeniem powietrza. Wynika to m.in. z rosnącej świadomości społecznej na temat wpływu jakości powietrza na zdrowie człowieka i środowisko naturalne. Ocenia się, że zanieczyszczenia powietrza są jednym z 10 najważniejszych czynników ryzyka zgonu na świecie [1] [2]. Nawet 1/3 populacji Europy zamieszkująca obszary miejskie jest narażona na zanieczyszczenie powietrza przekraczające normy zalecane w standardach Unii Europejskiej (UE) [3]. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) oraz wyników licznych badań epidemiologicznych zanieczyszczenie powietrza było odpowiedzialne za co najmniej 3,7 mln zgonów w roku 2012 r. (6,7% wszystkich zgonów na świecie) oraz 7 mln zgonów w 2016 r. 16% z tych zgonów spowodowane było rakiem oskrzela, 11% przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (COPD, ang. *chronic obstructive pulmonary disease*), 13% infekcjami układu oddechowego i aż 29% przyczynami sercowo-naczyniowymi [4] [5] [6] [7] [8]. Według Europejskiej Agencji ds. Środowiska (EEA, ang. *European Environment Agency*) zanieczyszczenie powietrza przyczynia się każdego roku do przedwczesnego zgonu ok. 0,5 mln mieszkańców UE, w tym ponad 44 tys. w Polsce [9]. Do najbardziej narażonych grup należą osoby z chorobami współistniejącymi dotyczącymi przede wszystkim układu krążenia i układu oddechowego, a także z otyłością i cukrzycą. Dzieci, kobiety w ciąży, osoby w zaawansowanym wieku oraz z niższym wykształceniem lub statusem społeczno-ekonomicznym także stanowią populacje szczególnie narażone na niekorzystne zdrowotne skutki zanieczyszczenia powietrza [10] [11] [12] [13]. W jednym z badań oszacowano średnią utratę lat życia od 1,8 do 3,1 roku w najbardziej uprzemysłowionych i zanieczyszczonych miastach w Stanach Zjednoczonych Ameryki [14]. W wielu miejscach na świecie zanieczyszczenie powietrza może skracać przeciętną długość trwania życia o ponad rok [15] [16].

2.2. Skład i pochodzenie zanieczyszczenia powietrza oraz związane z nim skutki zdrowotne

Zanieczyszczenie powietrza oznacza obecność w nim złożonej mieszaniny różnych substancji chemicznych. Głównymi składowymi są tzw. pył zawieszony składający się

z drobnych stałych cząsteczek (PM, ang. *particulate matter*) oraz substancje gazowe w postaci aerozoli (ryc. 1.) [17]. PM jest najważniejszym i jednym z najczęściej badanych składników zanieczyszczenia powietrza [18]. Istnieje bardzo dużo różnych substancji chemicznych, które zostały dotąd wykryte w PM w zależności od lokalizacji geograficznej a także źródeł emisji [19]. Wspólne składniki PM to azotany, siarczany, metale, węgiel organiczny i pierwiastkowy, a także związki organiczne – przede wszystkim wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAHs, ang. *polycyclic aromatic hydrocarbons*), polichrowane dibenzodioskyny i dibenzofurany oraz związki biologiczne (np. endotoksyny, bakterie, wirusy itd.) [20] [21]. Rdzeń PM składa się przede wszystkim z węgla organicznego i pierwiastkowego pokrytego wymienionymi pozostałymi związkami chemicznymi [20] [22]. Większość cytowanych do tej pory badań, poświęconych problemowi wpływu zanieczyszczenia środowiska na zdrowie ludzi, dotyczyło właśnie PM.



Rycina 1. Rozkład i porównanie wielkości cząsteczek PM jako zasadniczego składnika zanieczyszczenia powietrza.

Zmodyfikowano na podstawie: Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Tager I, and Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 2004; 109: 2655–2671.

Legenda: * – przykład niewielkiej komórki eukariotycznej.

Skróty: μm – mikrometr; PM – drobne cząsteczki stałe pyłu zawieszonego (ang. *particulate matter*); $\text{PM}_{2,5}$ – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*); RBC – erytrocyt (ang. *red blood cell*).

Unoszące się w powietrzu pyłowe zanieczyszczenia, składające się z niejednorodnej mieszaniny PM oraz aerozoli, cały czas zmieniają się pod względem wielkości oraz składu chemicznego [21]. Zanieczyszczenia emitowane są do atmosfery zarówno bezpośrednio w postaci substancji pierwotnych np. sadzy z silników wysokoprężnych (Diesla) jak i w formie cząsteczek wtórnych powstających w wyniku przemian fizykochemicznych gazów, w tym pod wpływem promieniowania ultrafioletowego [19]. Jak już wspomniano istnieją różne naturalne i antropogeniczne źródła PM. Wg KOBiZE (Krajowy Ośrodek Bilansowania i Zarządzania Emisjami) głównym źródłem $\text{PM}_{2,5}$ jest tzw. niska emisja – w wyniku nieefektywnego spalania paliw kopalnych (przede wszystkim węgla) w budynkach mieszkalnych lub dla celów

przemysłowego wytwarzania energii. W dalszej kolejności obejmują one emisje z pojazdów mechanicznych, ponowne zawieszenie w powietrzu pyłu drogowego w wyniku rozdrobnienia przez koła samochodów, wytapianie i obróbka metali, rolnictwo (w tym spalanie odpadów rolniczych), budownictwo, erozję wietrzną gleby, pyłki roślin i pleśnie, pożary lasów, emisje wulkaniczne oraz erozyjne działanie fal morskich [20] [22] [21] [23].

Wpływ PM na zdrowie człowieka zależy między innymi od wielkości cząsteczki. Bardzo małe cząsteczki PM (o średnicy aerodynamicznej $2,5 \mu\text{m}$ i mniejszej) mogą przedostawać się z pęcherzyków płucnych do naczyń krwionośnych i dalej wraz z prądem krwi do narządów wewnętrznych, wywołując proces zapalny i progresję blaszek miażdżycowych w tętnicach [8] [24] [6] [7] [25]. Obecność $\text{PM}_{2,5}$ we krwi i narządach wewnętrznych potwierdzono metodami radioizotopowymi [26] [27]. Co więcej, rośnie liczba dowodów na to, że to właśnie małe PM stanowią największe zagrożenie ze względu na wysoką zawartość szkodliwych substancji chemicznych (w tym związków organicznych) i potencjał oksydacyjny [28] [29] [25].

Negatywne skutki oddziaływania PM na organizm człowieka zależą jednak nie tylko od ich wielkości, stężenia w powietrzu, czasu ekspozycji i stanu zdrowia osoby narażonej, ale także od składu chemicznego, który może zmieniać się sezonowo i jest ściśle związany ze źródłami emisji zanieczyszczenia powietrza [24]. W różnych publikacjach na przestrzeni ostatnich lat postuluje się związek z rozwojem choroby wieńcowej (CAD, ang. *coronary artery disease*) przede wszystkim następujących składników zanieczyszczenia powietrza: dwutlenku siarki (SO_2), dwutlenku azotu (NO_2), tlenku węgla (CO), benzo[a]pirenu, $\text{PM}_{2,5}$ i $\text{PM}_{1,0}$ a także ultradrobnych cząsteczek PM o średnicy $< 0,1 \mu\text{m}$ [6] [7] [8] [30] [31] [32] [17]. O ile skład chemiczny $\text{PM}_{2,5}$ najpewniej ma istotny wpływ na zdrowie człowieka, to w Polsce jak dotąd – wg wiedzy autora – istnieje niewiele grup badawczych zajmujących się analizą składu chemicznego $\text{PM}_{2,5}$ i jego bezpośredniego oddziaływania na zdrowie człowieka [19].

Badania epidemiologiczne wskazują na związek $\text{PM}_{2,5}$ z rozwojem nie tylko CAD, ale także innych chorób układu krążenia, w tym niewydolności serca (HF, ang. *heart failure*), zaburzeń rytmu serca i udaru mózgu [7] [8] [24] [33] [34] [35]. Wieloletnia ekspozycja na zanieczyszczenie powietrza zwiększa również ryzyko wystąpienia lub nasilenia objawów astmy oskrzelowej, COPD, alergii oraz powstawania niektórych nowotworów takich jak rak oskrzela czy pęcherza moczowego (ryc. 2.) [6] [31] [36] [17]. Obecnie wpływ $\text{PM}_{2,5}$ na zdrowie porównywany jest do wpływu palenia tytoniu. Warto podkreślić, że niezależnie od wpływu $\text{PM}_{2,5}$ współistnienie CAD, HF, COPD, cukrzycy i nikotynizmu zwiększa ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych [13] [37] [38]. Obecność ciężkich chorób układu

oddechowego (przede wszystkim COPD) wraz z przewlekłą niewydolnością oddechową może mieć u tych pacjentów wpływ na nasilenie niedotlenienia mięśnia sercowego. Potwierdzają to prace, które wskazują na zwiększone ryzyko wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego (ACS, ang. *acute coronary syndrome*) po zaostrzeniu COPD [39] [40] [20] [41] [42] [43]. Pojawiają się także pewne sugestywne dane, że częstość wad wrodzonych serca u dzieci jest większa na uprzemysłowionych obszarach o dużym poziomie zanieczyszczenia powietrza [44] [45] [46] [47] [48] [49].



Rycina 2. Ogólna kaskada prawdopodobnego wpływu PM_{2,5} na zdrowie człowieka.

Źródło: opracowanie własne.

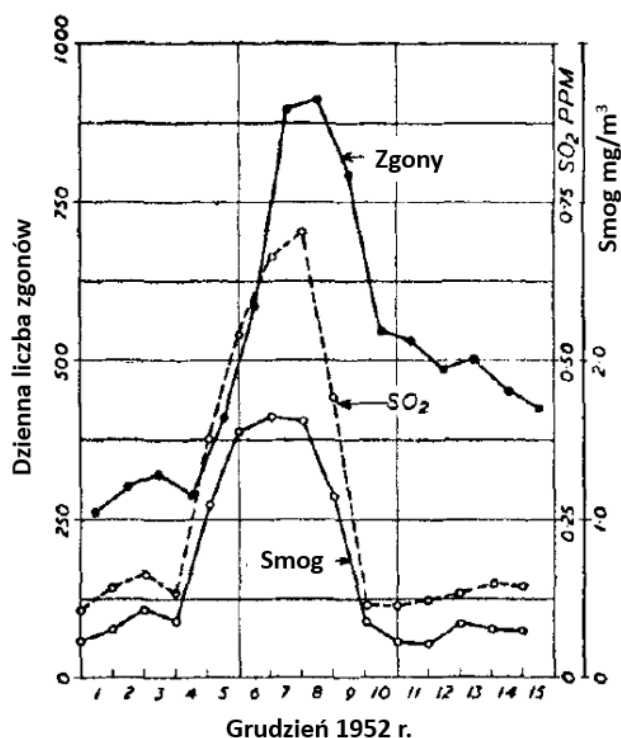
Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*).

Generalnie badania dotyczące wpływu zanieczyszczenia powietrza – w tym PM_{2,5} – na zdrowie ludzi można podzielić na te dotyczące narażenia krótko- i długoterminowego [6] [38]. Jak dotąd więcej obserwacji związanych jest z oceną niekorzystnego stanu zdrowia dla ekspozycji krótkoterminowej [20] [41] [50] [12] [51] [52] [53]. Publikacje dotyczące skutków zdrowotnych długotrwałego narażenia na PM_{2,5} są w porównaniu z tym stosunkowo nieliczne, szczególnie te dotyczące polskiej populacji [54] [55]. Według danych literaturowych ryzyko zgonu z jakiegokolwiek przyczyny jest wyższe w przypadku długotrwałego narażenia na PM_{2,5} w porównaniu z narażeniem krótkoterminowym [56]. Wyniki niedawnej metaanalizy kilku europejskich badań w ramach projektu ELAPSE (27 mln uczestników) wykazały, że narażenie

na PM_{2,5}, NO₂ i związki węgla wiązało się ze wzrostem śmiertelności ogólnej, a także ryzyka zgonu z przyczyn oddechowych oraz sercowo-naczyniowych [57].

2.3. Początki badań nad problematyką zanieczyszczenia powietrza na świecie

Związek pomiędzy wysokim poziomem zanieczyszczenia powietrza pochodzenia antropogenicznego i pogorszeniem stanu zdrowia ludzi jest znany od ponad pół wieku [23]. Jednym z pierwszych udokumentowanych przypadków choroby na znaczną skalę wywołanej zanieczyszczeniem powietrza był smog w belgijskiej Dolinie Mozy [58]. Na początku grudnia 1930 r. w tym przemysłowym regionie w ciągu kilku dni tysiące mieszkańców zostało dotkniętych objawami wywołanymi przede wszystkim przez zaburzenia oddychania, a ponad 60 z nich zmarło [59]. W 1952 r. w wyniku tzw. Wielkiego Smogu trwającego przez 4 dni w Londynie, ok. 4 tys. ludzi zmarło nagle z powodu niewydolności układu krążenia i/lub układu oddechowego. Zwiększona śmiertelność – na skutek znacznego wzrostu stężeń PM i SO₂ (ryc. 3.) – związana z tymi chorobami utrzymywała się jeszcze długo po epizodzie smogu. Kolejnych 8 tys. osób zmarło w ciągu następnych kilku tygodni [60] [61]. Warto przy tej okazji zaznaczyć, że redukcja stężeń PM prowadzi do istotnego spadku śmiertelności ludzi na zanieczyszczonych obszarach [16] [62] [63] [64].



Rycina 3. Związek pomiędzy dziennym poziomem zanieczyszczeniem powietrza i zgonami w czasie Wielkiego Smogu w Londynie w grudniu 1952 r.

Zmodyfikowano na podstawie: Wilkins ET. Air pollution aspects of the London fog of December 1952. Q J R Meteorol Soc. 1954; 80: 267–271.

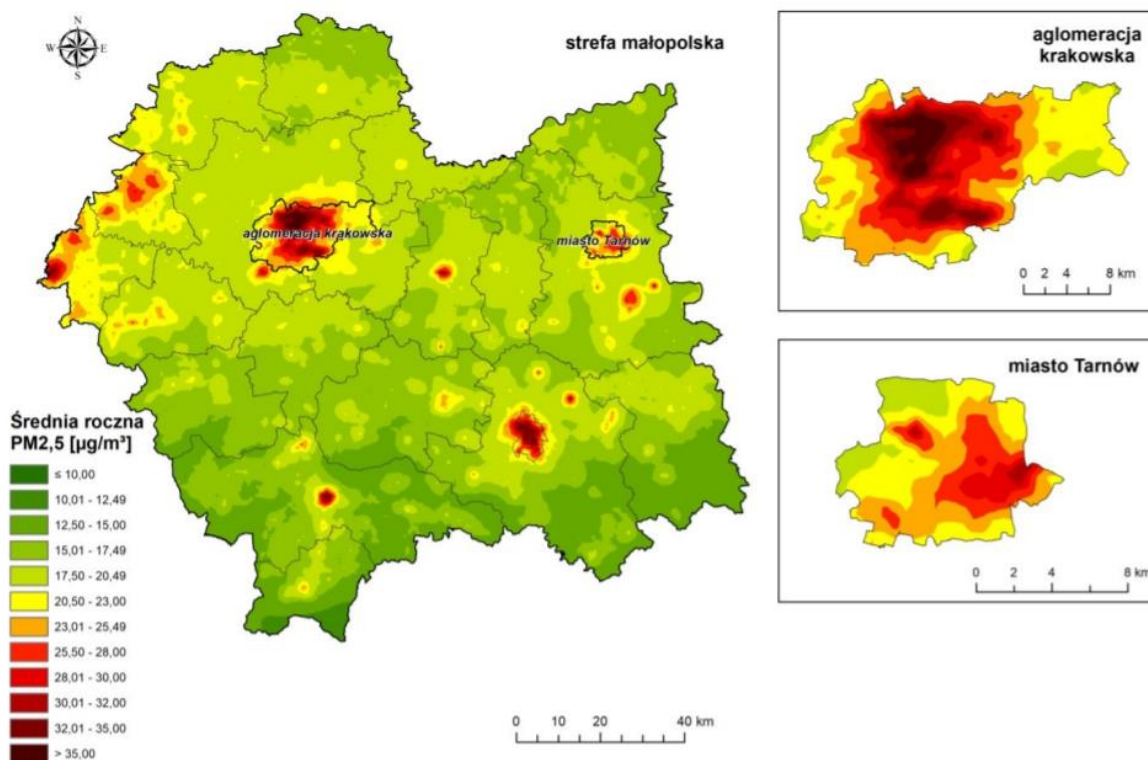
W Wielkiej Brytanii w latach 50. ubiegłego wieku stężenia pyłu zawieszonego mierzono metodą reflektometryczną i wyrażano jako tzw. *British Smoke*. W tym czasie nie mierzono – jak ma to miejsce obecnie – stężenia PM o określonej średnicy aerodynamicznej (np. PM_{2,5} czy PM₁₀).

Skróty: SO₂ – dwutlenek siarki; PPM – liczba części na milion (ang. *parts per million*); mg/m³ – miligram/metr sześcienny.

2.4. Opis stanu rzeczy dla miasta Krakowa

Miasto stanowi specyficzne środowisko, w którym skupia się większość procesów społeczno-przyrodniczych. Warto zaznaczyć, że większość z cytowanych dotąd publikacji dotyczyła badań nad zurbanizowanymi populacjami Północnej Ameryki i Europy, których narażenie na zanieczyszczenie powietrza było najczęściej mniejsze niż w przypadku mieszkańców południowej Polski. Z uwagi na bardzo wysokie stężenia poszczególnych składowych zanieczyszczenia powietrza – w tym PM – również liczba zgonów przypisywanych temu czynnikowi ryzyka jest w Polsce wysoka [9] [65].

Kraków i wiele innych miast w Polsce należą do najbardziej zanieczyszczonych miast w Europie pod względem stężenia cząsteczek $PM_{2,5}$ w powietrzu atmosferycznym [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72]. Na niezadowalającą jakość powietrza wskazują pomiary wykonywane przez Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Krakowie. Z pomiarów tych wynika, że w ciągu roku dochodzi tu wielokrotnie do przekroczenia dopuszczalnych poziomów PM ($PM_{2,5}$ i PM_{10}), NO_2 i benzo[a]pirenu (ryc. 4) [73]. Warto tu dodać, że nie można zidentyfikować progu stężeń PM, poniżej których nie stwierdza negatywnych skutków dla zdrowia, gdyż w populacji ludzkiej jest tak szeroki zakres wrażliwości biologicznej, że niektóre osoby są zagrożone nawet przy najniższym poziomie stężeń [4]. Zgony przypisane zanieczyszczeniu powietrza szacuje się w Krakowie na 300–600 rocznie, co jednak i tak wydaje się być wartością zaniżoną [74]. Połowa z nich spowodowana jest chorobami sercowo-naczyniowymi, a więc 5-krotnie więcej niż zgonów wywołanych przez choroby układu oddechowego [68].



Rycina 4. Rozkład rocznych stężeń PM_{2,5} (µg/m³) wg raportu za 2017 r. Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska w Krakowie.

Źródło: Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Krakowie – Monitoring powietrza. Dostęp na 01.10.2021: <http://krakow.pios.gov.pl/stan-srodowiska/monitoring-powietrza/>

Skróty: mg/m³ – miligram/metr sześcienny; km – kilometr; PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 µm (ang. *particulate matter*).

W przemysłowych obszarach Polski – takich jak Kraków oraz położony niedaleko Krakowa Śląsk – wielokrotnie w ciągu roku rejestruje się przekroczenia dopuszczalnych stężeń dobowych PM_{2,5} (25 µg/m³) określonych w Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/50/WE, która to dyrektywa została ratyfikowana przez Polskę i znajduje normatywne odzwierciedlenie w aktualnym krajowym ustawodawstwie [75] [3] [18] [72]. Również WHO zaleca dla PM_{2,5} określone wartości stężeń „bezpiecznych” dla zdrowia, które pokrywają się z unijnymi i polskimi wytycznymi: średnie stężenie roczne < 10 µg/m³, średnie stężenie dobowe < 25 µg/m³ [4] [5].

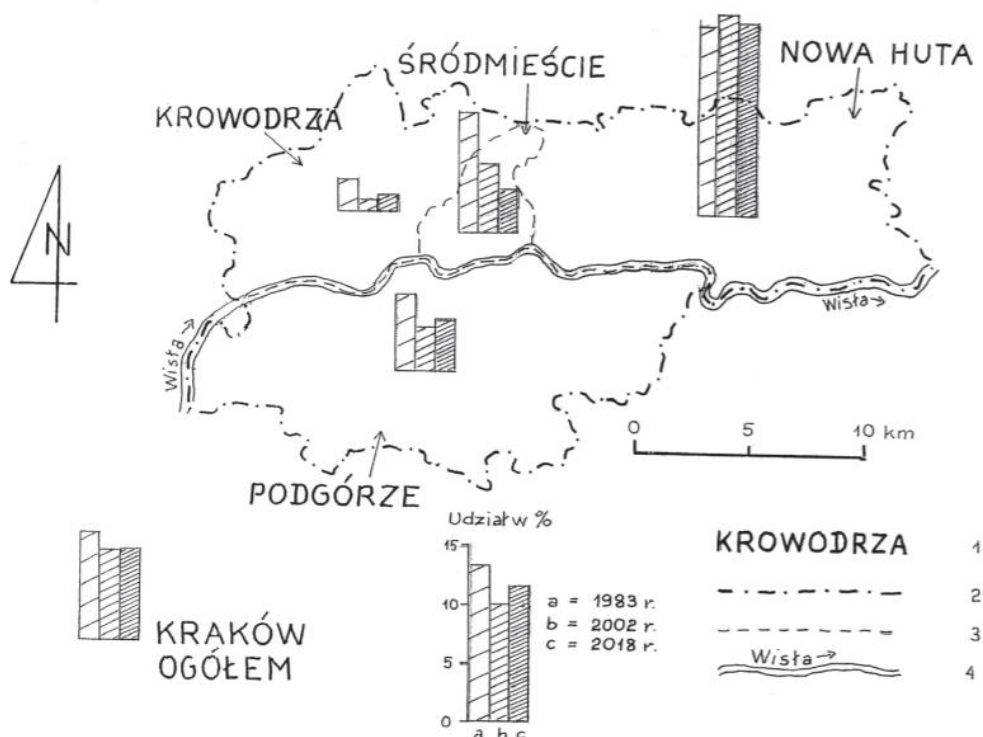
W Krakowie, w sezonie grzewczym, regularnie odnotowywane są dobowe stężenia PM_{2,5} przekraczające 35 µg/m³, istotne przekroczenia dotyczą także m.in. PM₁₀ i benzo[a]pirenu. Najwyższa zanotowana średnia roczna wartość stężenia PM_{2,5} wystąpiła w 2010 r. (stacja pomiarowa na al. Krasieńskiego) i wyniosła 61 µg/m³, czyli ponad 2-krotnie przekroczyła dopuszczalną wartość 25 µg/m³. W 2014 r. stężenie PM_{2,5} w Krakowie

było mniejsze (rocznie średnio $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$), ale i tak znacznie przekraczało dopuszczalne wartości określone przez WHO i UE [76]. Według danych WHO i EEA w 2010 i 2011 r. Kraków był trzecim najbardziej zanieczyszczonym miastem UE, zarówno pod względem ilości dni z przekroczeniem dopuszczalnego poziomu dobowego stężenia PM_{10} (150 dni), jak i średniego rocznego stężenia PM_{10} ($64 \mu\text{g}/\text{m}^3$) [4] [5] [9] [76]. W Krakowie – tak jak i w wielu innych polskich miastach – całodobowe przekroczenia dopuszczalnych poziomów $\text{PM}_{2,5}$ można odnotowywać przez nawet 130 dni w roku [72]. Przy czym stężenie $\text{PM}_{2,5}$ w atmosferze Krakowa jest 2,6 razy wyższe zimą niż latem [77]. Zgodnie z danymi WHO średnie stężenie roczne $\text{PM}_{2,5}$ na poziomie $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (vs $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) wiąże się z o 15% wyższym, odległym ryzykiem zgonu. Redukcja stężenia $\text{PM}_{2,5}$ z $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ tylko do $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ mogłaby zmniejszyć ryzyko przedwczesnej śmierci nawet o 6%. W samym tylko Krakowie z powodu zanieczyszczenia powietrza umiera – jak wspomniano – co najmniej kilkaset osób rocznie. Jeśli zredukowano by średnie roczne stężenie $\text{PM}_{2,5}$ do $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$, przeciętny stały mieszkaniec Krakowa żyłby średnio o rok dłużej. Przykładem może być Dublin, w którym liczba zgonów zmniejszyła się o 8% w wyniku istotnej poprawy jakości powietrza po wprowadzeniu zakazu palenia węglem w roku 1990 r. [76] [63]. Wiele (ok. 30%) zgonów, których w ten sposób uniknięto związana była w poprzednich latach z chorobami układu krążenia.

Kraków – liczący 779 966 mieszkańców (dane GUS za 2020 r.) – stanowi drugie co do wielkości miasto położone w południowej części Polski (327 km^2). Częste epizody smogu występują tu głównie w okresie zimowym i są wywoływane oraz podtrzymywane zasadniczo przez trzy czynniki [68] [69] [70]. Pierwszy z nich jest związany z emisją zanieczyszczeń pochodzących ze spalania paliw stałych w domowych piecach (rozmieszczonych nie tylko na terenie miasta, ale także okolicznych mniejszych miejscowościach i wsi) [77]. Drugie ważne źródło zanieczyszczenia powietrza w Krakowie jest związane z nasilonym ruchem samochodów, zarówno osobowych jak i ciężarowych. Część tych pojazdów wciąż napędzana jest paliwem spełniających niskie normy emisyjne (poniżej Euro 4 i 5) [70] [78] [79] [80].

Kolejne istotne źródło zanieczyszczeń stanowi przemysł. Główny obszar przemysłowy Krakowa – którego tradycje sięgają połowy XIX w. – znajduje się we wschodniej części miasta (ryc. 5.). Tutaj skupia się większa część Krakowskiego Okręgu Przemysłowego [81]. Obejmuje on przede wszystkim hutnictwo (żelaza i stali) i przemysł elektromaszynowy (gł. maszyny budowlane oraz urządzenia dla górnictwa i hutnictwa). Huta im. Tadeusza Sendzimira (dawna Huta im. Lenina) jeszcze do niedawna stanowiła jeden z największych zakładów przemysłowych w Polsce i jednocześnie duże obciążenie środowiskowe dla samego miasta i jego otoczenia. Poza tym Kraków to ważny ośrodek przemysłu chemicznego, cementowego,

ceramicznego, farmaceutycznego, tytoniowego, związanego z materiałami budowlanymi oraz energetycznego [82] [83] [84].



Rycina 5. Rozmieszczenie głównych terenów przemysłowych Krakowa w latach 1983, 2002 i 2018 r.

Źródło: B. Luchter. Przemiany rozmieszczenia terenów przemysłowych w Krakowie jako następstwo realizacji zasad gospodarki rynkowej. Świat nieruchomości. 2019; 107: 6–16.

Legenda: 1 – nazwy byłych dzielnic administracyjnych (obecnie jednostek ewidencyjnych) miasta Krakowa; 2 – współczesne granice administracyjne Krakowa (stan na 31.08.2019 r.); 3 – granice byłych dzielnic administracyjnych (obecnie jednostek ewidencyjnych) Miasta Krakowa; 4 – ważniejsze ciekii wodne, ich nazwy i kierunek spływu.

Skróty: N – północ (ang. *north*); km – kilometr.

Dodatkowym niekorzystnym czynnikiem jest położenie miasta w głębokiej, podmokłej i wąskiej dolinie Wisły (dokładniej wschodniej części rowu tektonicznego – tzw. Bramy Krakowskiej), otoczonej wyżynnym oraz pagórkowatym terenem. Panujący tu specyficzny mikroklimat sprawiał, że utrzymanie dużego ośrodka miejskiego stanowiło wyzwanie w każdej epoce. Taka lokalizacja sprzyja częstym inwersjom temperatur i zmniejsza prędkość wiatru w mieście, tym samym zwiększając akumulację zanieczyszczeń w obrębie tzw. planetarnej warstwy granicznej (PBL, ang. *planetary boundary layer*) [70]. Jest to najniższa część

atmosfery, która znajduje się pod bezpośrednim wpływem procesów zachodzących na powierzchni planety. Na zmniejszoną prędkość wiatru w Krakowie – i tym samym obniżenie poziomu oczyszczania PBL – istotny wpływ może mieć także intensywna zabudowa deweloperska oraz związane z nią potencjalne błędy dotyczące planów zagospodarowania przestrzennego miasta. Zdarzenia masowe opisane w rozdziale 2.3. miały miejsce w sezonie grzewczym, a więc w chłodnych porach roku. W tych przypadkach kluczowe było występowanie – na stosunkowo niewielkiej wysokości – tzw. warstwy inwersyjnej, kiedy to dochodzi do wzrostu temperatury powietrza wraz z wysokością nad poziomem morza. Uniemożliwia to rozpraszanie się zanieczyszczenia powietrza. W Polsce dochodzi to tego nietypowego zjawiska stosunkowo często, szczególnie w miejscowościach położonych w dolinach i kotlinach, tak jak w przypadku Krakowa.

2.5. Miażdżyca i choroba wieńcowa w kontekście zanieczyszczenia powietrza

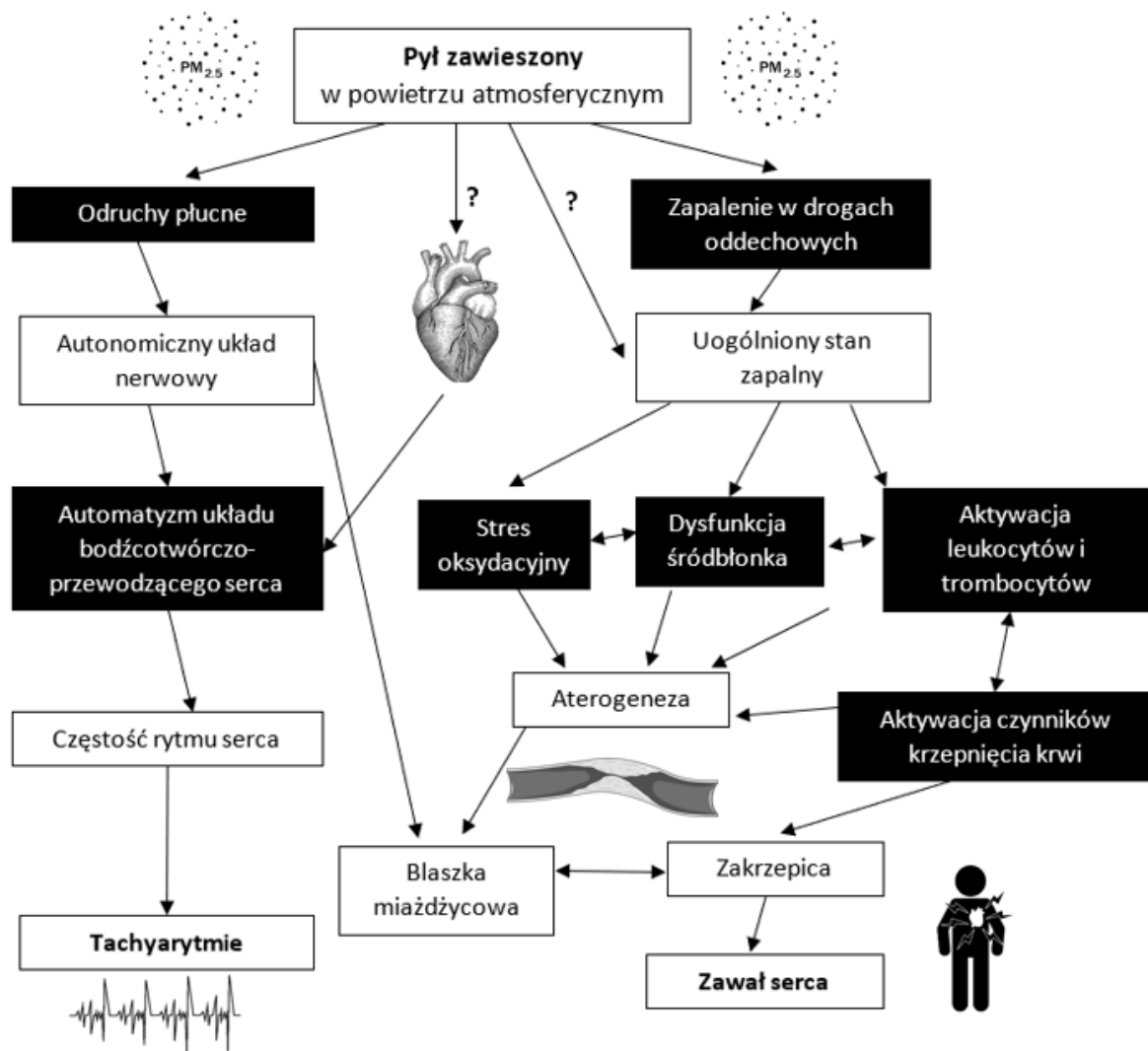
W patogenezie miażdżycy – poza rozwijającym się w ścianie tętnicy zapaleniem – zasadnicze znaczenie ma tworzenie się blaszek miażdżycowych. Składają się one z określonej struktury lipidowej, rdzenia martwiczego, zwapnień, komórek mięśni gładkich (VSMC, ang. *vascular smooth muscle cell*), komórek śródbłonna, komórek układu odpornościowego oraz komórek piankowatych [85]. Obecność leukocytów w ścianach tętnic zmienionych miażdżycowo obserwowano już w latach 80. ubiegłego wieku [86]. Początkowo to makrofagi były opisywane jako dominujący typ komórek związanych z rozwojem blaszki miażdżycowej. Później wykazano także współwystępowanie w tym procesie innych typów leukocytów – neutrofilii, limfocytów T i B i komórek tucznych.

Miażdżyca tętnic – leżąca u podstaw znacznej liczby chorób sercowo-naczyniowych – pozostaje jedną z główną przyczyn zachorowalności i umieralności na całym świecie [87] [88] [89]. Choroby układu sercowo-naczyniowego (przede wszystkim CAD i udary mózgu), pozostają największym zagrożeniem dla zdrowia Polaków oraz główną przyczyną zgonów w Polsce [90]. CAD dotyczy ponad 1,5 mln ludzi w Polsce, zaś u około 140 tys. dochodzi do jej zaostrzeń pod postacią ACSs [91].

Amerykańskie badanie ESCAPE wykazało, że długoterminowa ekspozycja na każdy wzrost stężenia $PM_{2,5}$ o $5 \mu g/m^3$ powoduje wzrost ryzyka wystąpienia zawału serca mięśniowego (MI, ang. *myocardial infarction*) o 13% [92]. Obecnie stosunkowo dobrze ustalono także, że zarówno krótkoterminowe, jak i szczególnie przewlekłe narażenie na zanieczyszczenie powietrza jest negatywnie powiązane z chorobami układu sercowo-

naczyniowego [8] [30] [68] [32] [33] [24] [93] [56] [57].

Jak już częściowo wspomniano, w kontekście miażdżycy i CAD, na szczególną uwagę zasługuje kilka składowych zanieczyszczenia powietrza, do których należy zaliczyć gł. PM o różnej średnicy aerodynamicznej (zwłaszcza PM_{2,5}), CO, NO₂, SO₂, ołów oraz benzo[a]piren. Niekorzystne ostre następstwa zdrowotne – w tym wzrost ryzyka wystąpienia ACS i zgonu – wskutek ekspozycji na PM_{2,5} można obserwować przede wszystkim do 4. dnia od narażenia [94]. Wymienione składniki zanieczyszczenia powietrza wiążą się ze zwiększoną hospitalizacją i śmiertelnością z przyczyn sercowo-naczyniowych, zwłaszcza u pacjentów obciążonych HF [95] [96] [10] [97]. Ugruntowane związki przyczynowo-skutkowe pomiędzy aktywnym i biernym paleniem tytoniu m.in. z CAD i udarem mózgu zwiększają prawdopodobieństwo niekorzystnego wpływu PM na układ krążenia [98] [35]. Współczesne badania wskazują zatem, że możliwe są powiązania pomiędzy ostrym i przewlekłym narażeniem na poszczególne składowe zanieczyszczenia powietrza a incydentami sercowo-naczyniowymi takimi jak MI, udar mózgu, zaostrzenie HF oraz zaburzenia rytmu serca (ryc. 6.) [41] [99]. Mogą być one związane m.in. ze wzrostem częstości rytmu serca i ciśnienia tętniczego krwi oraz zmniejszonej dobowej zmienności rytmu serca (HRV, ang. *heart rate variability*), zwiększeniem poziomu fibrynogenu oraz czynników krzepnięcia krwi, dysfunkcji śródbłonna, wzrostem stężenia mediatorów stanu zapalnego, rozwojem miażdżycy i zwężeń naczyń tętniczych [67] [100]. Badanie AIRCMD-China potwierdziło związek podwyższonego poziomu PM_{2,5} ze wzrostem skurczowego ciśnienia tętniczego krwi, pogorszeniem metabolizmu glukozy i funkcji śródbłonna [101]. Konsekwencje tych efektów mogą prowadzić do rozwoju CCS objawiającej się dławicą piersiową, spadkiem tolerancji wysiłku fizycznego a także komorowymi i nadkomorowymi zaburzeniami rytmu serca. Progresa blaszek miażdżycowych w naczyniach wieńcowych i wzrost gotowości pozakrzepowej zwiększa z kolei ryzyko wystąpienia ACS [102] [103] [104]. Należy tu jednak zauważyć, że wpływ zanieczyszczenia powietrza na układ krzepnięcia jest nie został do końca zbadany, zaś opublikowane dotąd wyniki badań są sprzeczne.



Rycina 6. Potencjalne patomechanizmy określające wpływ PM_{2,5} na układ sercowo-naczyniowy.

Zmodyfikowano na podstawie: Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Tager I, and Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004; 109: 2655–2671.

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*).

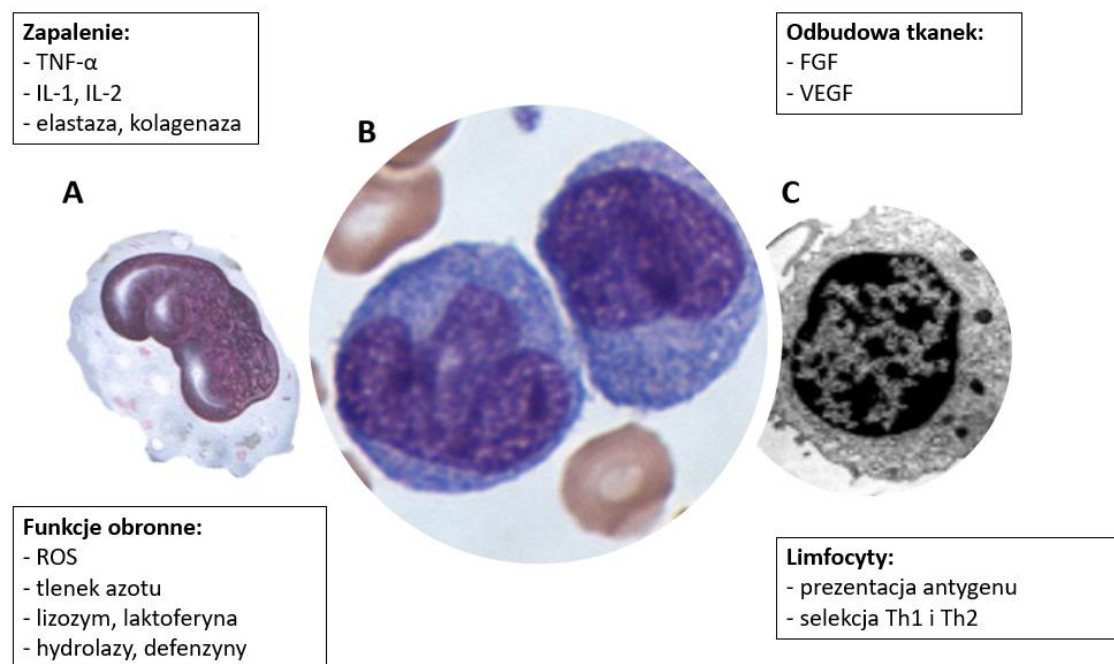
Istnieje zatem coraz więcej dowodów na to, że długotrwała ekspozycja na zanieczyszczenia powietrza (szczególnie PM_{2,5}) przyczynia się do rozwoju miażdżycy, wpływając zarówno na powstawanie, jak i na progresję zwężeń w tętnicach wieńcowych [24] [105] [106]. Opublikowane do tej pory prace eksperymentalne wskazują na ważną rolę w tym procesie makrofagów płucnych i uogólnionego procesu zapalnego zapoczątkowanego w płucach [6] [7] [107] [29] [30] [68] [31] [32] [24] [33]. Jednak mechanizmy wiążące

długotrwałą ekspozycję na PM_{2,5} z progresją miażdżycy i rozwojem CAD nie zostały w pełni wyjaśnione.

2.6. Rola monocytów w procesie zapalnym i w rozwoju blaszki miażdżycowej

Monocyty stanowią niejednorodną populację komórek o różnych funkcjach, fenotypach i lokalizacjach (ryc. 7.). Komórki te krążą gł. we krwi obwodowej, ale znajdują się także w szpiku kostnym i śledzionie [108] [109]. Żyją krótko i nie namnażają się we krwi, po przekroczeniu bariery szpik-krew przebywają we krwi obwodowej zaledwie 1–3 dni. Monocyty są największymi elementami morfotycznymi krwi (o średnicy do 20 µm) i stanowią 3–8% wszystkich leukocytów obecnych we krwi obwodowej. W miejscach, w których rozwija się stan zapalny, monocyty mogą przedostawać się poza światło naczyń krwionośnych (diapedeza), różnicując się przy tym w makrofagi, które nabierają zdolności do szybkiego ruchu pełzakowatego usprawniającego proces chemotaksji. Monocyty mogą się różnicować także w komórki piankowate i komórki dendrytyczne [110] [111].

Monocyty są komórkami o znacznych zdolnościach do fagocytozy i odgrywają ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej zarówno swoistej jak i nieswoistej. Opisano dotąd ponad 100 różnych aktywnych biologicznie związków, które są wytwarzane przez monocyty. Należą do nich interleukiny, prostaglandyny, interferony, składniki dopełniacza oraz reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) (ryc. 7.). Rola monocytów w warunkach fizjologicznych pozostaje niejasna, przy czym postuluje się, że mogą być one zaangażowane w oczyszczanie tkanek z martwych komórek i toksycznych związków chemicznych oraz brać udział w odtwarzaniu populacji makrofagów tkankowych (w tym licznej płucnej subpopulacji). Aktywowane stanem zapalnym monocyty krwi obwodowej migrują do tkanek limfoidalnych i nielimfoidalnych w odpowiedzi na pochodzące z nich sygnały spowodowane np. infekcją lub uszkodzeniem komórek (chemotaksja) (ryc. 8.) [112].



Rycina 7. Monocyty zaprezentowane w formie graficznej (A) oraz w obrazach z mikroskopu świetlnego (B) i elektronowego (C) wraz z zarysem ich zasadniczej roli w mechanizmach odporności naturalnej i nabytej.

Opracowano na podstawie: Swirski FK Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009; 32: 612–616.

<https://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowmonocytematuration.html>

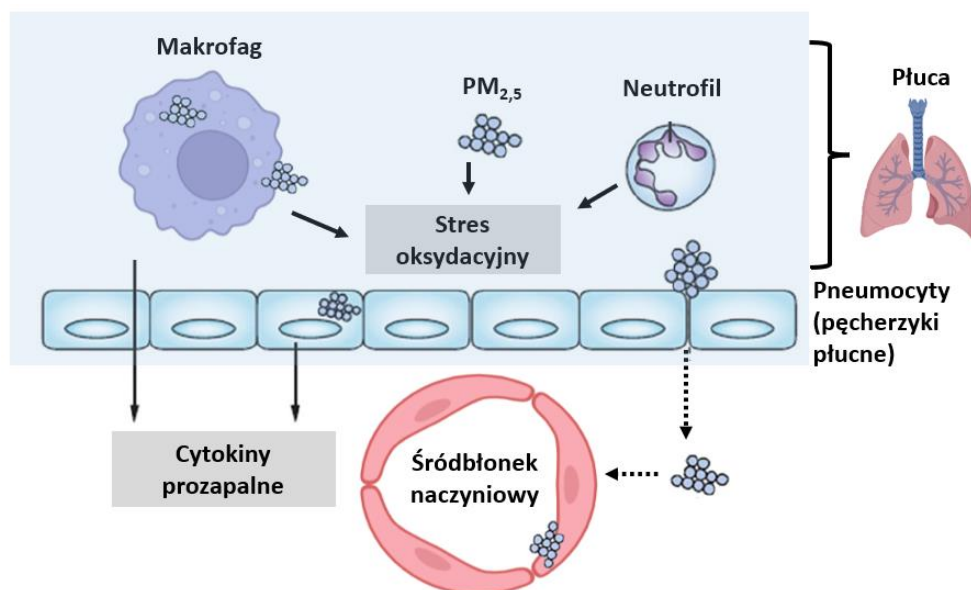
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/monocyte>

Skróty: TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. tumor necrosis factor α); IL-1 – interleukina 1 (ang. *interleukin-1*); IL-6 – interleukina 6 (ang. *interleukin-6*); FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*); VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor*); Th1 – limfocyty pomocnicze typu 1 (ang. *helper T lymphocyte type 1*); Th2 – limfocyty pomocnicze typu 2 (ang. *helper T lymphocyte type 2*); ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*).

Migracja monocytów do tkanek i ich różnicowanie do różnych typów komórek mogą być częściowo zdeterminowane przez miejscowy stan zapalny, który wydaje się leżeć u podstawy plastyczności tych komórek. Cytokiny stanowią ważny element tego zjawiska. Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) pobudza monocyty do różnicowania się odpowiednio w komórki dendrytyczne i makrofagi [112]. Przyjęta obecnie koncepcja zakłada, że monocyty – przynajmniej częściowo – są zdeterminowane fenotypowo przez mikrośrodowisko, w którym się znajdują. Stanowią zatem stosunkowo niejednorodną grupę

komórek, których poszczególne subpopulacje mogą pełnić w organizmie różne funkcje [112] [113].

Wykazano dotąd, że monocyty biorą udział w rozwoju miażdżycy, zapalenia i angiogenezy (ryc. 7. i 8.) [114]. Monocyty i makrofagi były pierwszymi komórkami zapalnymi powiązanymi z miażdżycą [113]. Monocyty/makrofagi zostały także zidentyfikowane jako główny składnik komórkowy blaszek miażdżycowych w próbkach pochodzących od świń [115]. W innym modelu zwierzęcym (badania na królikach) zmniejszenie ilości monocytów we krwi obwodowej było związane z ograniczeniem progresji blaszek miażdżycowych, co wskazuje na znaczenie monocytów w tym procesie [116]. Miażdżycy u ludzi jest procesem słabiej poznany niż w modelach zwierzęcych, głównie w związku z licznymi ograniczeniami dotyczącymi prowadzenia eksperymentów na ludziach. Niejednoznaczne jest także ekstrapolowanie interpretacji wyników uzyskanych w modelach zwierzęcych na ludzi. U zdrowych osób 85–95% monocytów krwi obwodowej stanowią dwie główne subpopulacje komórek: CD14+ i CD16+ [117]. Rola każdej z tych grup komórek w patogenezie miażdżycy u ludzi pozostaje niejasna. Co ciekawe, blaszki miażdżycowe w ludzkich tętnicach wieńcowych zawierają subpopulacje makrofagów o różnych wzorcach ekspresji genów, co wskazuje na istnienie heterogeniczności wśród tych komórek [118]. Pacjenci z chorobą wieńcową mają wyższe poziomy monocytów CD14+ i CD16+ w porównaniu z osobami zdrowymi. Ponadto liczba tych komórek koreluje z nieprawidłowymi wynikami lipidogramu, a zaburzenia gospodarki lipidowej są – jak już wspomniano – uznanym czynnikiem rozwoju miażdżycy [119]. Wyższe poziomy monocytów CD14+ i CD16+ obserwowano także po MI, zaś spadek ich ilości był skorelowany z pozawałowym powrotem funkcji skurczowej lewej komory [120].



Rycina 8. Prawdopodobny udział monocytów patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego związanych z $PM_{2,5}$.

Zmodyfikowano na podstawie: Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009, 6; 36–44.

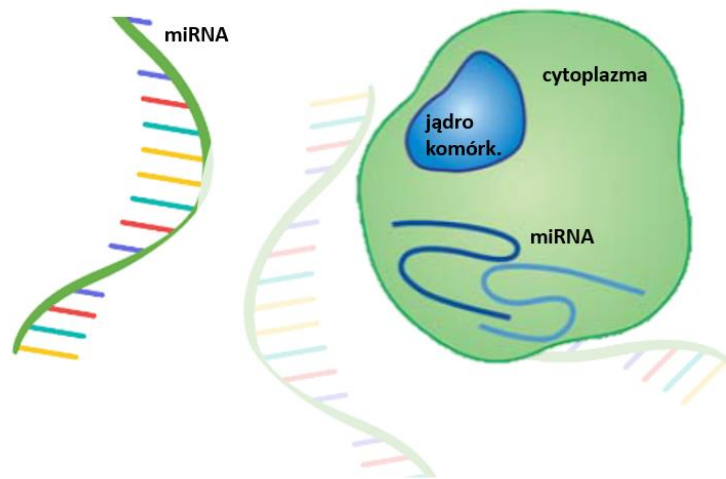
Skróty: $PM_{2,5}$ – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*).

2.7. Potencjalny związek zmian ekspresji mikroRNA z patogenezą chorób sercowo-naczyniowych

MikroRNA (miRNA) to małe, endogenne, niekodujące, jednoniciowe cząsteczki kwasu rybonukleinowego (mające zwykle 21–23 nukleotydy), które odgrywają znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym (ryc. 9.) [121] [122]. Zostały opisane po raz pierwszy u nicieni w 1993 r. Ocenia się, że regulują około 30% kodujących genów wchodzących w skład ludzkiego genomu [123]. Nieprawidłowa ekspresja miRNA została powiązana z wieloma procesami komórkowymi i szlakami metabolicznymi biorącymi udział w patogenezie różnych chorób, w tym także dotyczących układu sercowo-naczyniowego [124]. Obecnie u człowieka zidentyfikowano prawie 3 tys. różnych rodzajów miRNA. Badania *in vitro* oraz analizy bioinformatyczne wykazały, że nawet powyżej 500 genów może być celem działania pojedynczej cząsteczki miRNA [122]. MiRNA uczestniczą w licznych procesach biologicznych, takich jak angiogeneza oraz proliferacja, różnicowanie i apoptoza komórek. Spośród wielu rodzajów miRNA opisanych do tej pory u ludzi, znaczny odsetek wykazuje wzorce ekspresji specyficzne dla poszczególnych tkanek, w tym co najmniej 100–150 z nich

dla mięśnia sercowego [125]. Zmieniony poziom ekspresji różnych rodzajów miRNA obserwowano w procesach związanych z:

- stanem zapalnym (miR-1, miR-128, miR-135a, miR-146a, miR-147, miR-155, miR-21 i miR-94-8),
- dysfunkcją śródbłonna (miR-126 i miR-218),
- rozwojem miażdżycy (np. miR-125a-5p, miR-125b, miR-155, miR-222 i miR-96).

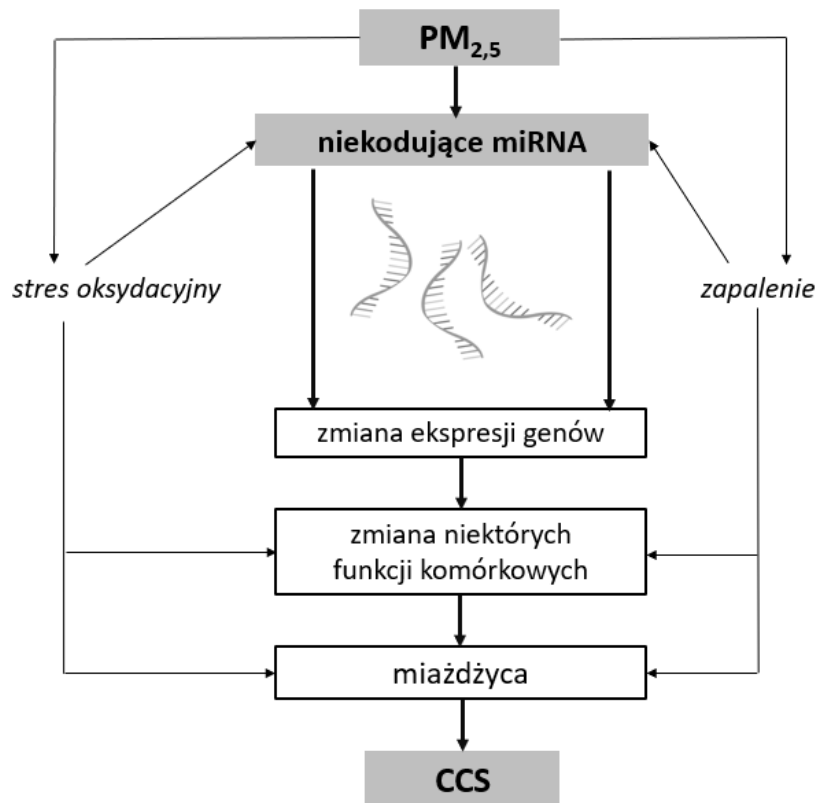


Rycina 9. Cząsteczki mikroRNA (miRNA).

Źródło: opracowanie własne.

Cząsteczki miRNA odgrywają ważną rolę w regulacji homeostazy śródbłonna i angiogenezy w modelach zwierzęcych. Przykładowo celowe usunięcie miR-126 ograniczone do komórek śródbłonna powoduje nieszczelność naczyń, krwawienia i zwiększoną śmiertelność embrionów z powodu utraty integralności naczyń oraz defektów proliferacji komórek śródbłonna [126] [127]. Cząsteczki miRNA mają także istotne znaczenie w regulacji rozwoju i funkcji monocytów, w tym wpływają na ich heterogeniczność [122] [128]. Zanieczyszczenie powietrza wpływa na wiele mechanizmów epigenetycznych, w tym na metylację DNA i modyfikację histonów [107]. Aktualne dane sugerują, że sygnalizacja z udziałem cząsteczek miRNA może być aktywną częścią odpowiedzi komórkowej na różne substancje chemiczne, w tym także na zanieczyszczenia powietrza [121] [129]. Powiązanie ekspresji poszczególnych rodzajów miRNA z różnymi związkami chemicznymi obecnymi w otoczeniu (w tym w powietrzu atmosferycznym) – w połączeniu z istotną rolą miRNA w regulacji ekspresji genów – powoduje, że te wyjątkowe cząsteczki mogą stanowić w przyszłości potencjalne biomarkery pomagające lepiej zrozumieć złożone patomechanizmy

chorób środowiskowych (ryc. 10.) [124] [130]. Ponieważ jednak zmiany ekspresji miRNA w odpowiedzi na zmiany środowiska są często niewielkie i mogą się kumulować w czasie, trudno jest precyzyjnie określić związki przyczynowo-skutkowe pomiędzy poszczególnymi substancjami, zmianami aktywności różnych rodzajów miRNA i konkretnymi chorobami [124]. Tym bardziej, że skład zanieczyszczenia powietrza – będący jednym z przedmiotów zainteresowania niniejszej pracy – zmienia się w czasie i przestrzeni. Indukowane pod wpływem otoczenia zmiany ekspresji miRNA są często odwracalne po usunięciu lub zmniejszeniu narażenia na dany czynnik środowiskowy. Sugeruje to, że właśnie przewlekłe narażenie może stanowić gł. czynnik trwałej zmiany aktywności miRNA w kontekście PM_{2,5} [131].



Rycina 10. Uproszczony, hipotetyczny model współzależności pomiędzy PM_{2,5}, miRNA i CCS.

Zmodyfikowano na podstawie: Hou L Wang D, Baccarelli A. Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat Res.* 2011; 714(0): 105–112.

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki pyłu zawieszonego o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*); CCS – przewlekły zespół wieńcowy (ang. *chronic coronary syndrome*); miRNA – mikroRNA.

3. CELE BADAWCZE

Cele pracy:

1. Ocena wpływu zanieczyszczonego powietrza na zmianę ekspresji genów (miRNA) i stężeń cytokin prozapalnych u stałych mieszkańców Krakowa (osób z CCS oraz grupy kontrolnej) – kliniczna część badania.
2. Ocena ekspresji wybranych rodzajów miRNA, stężeń określonych cytokin prozapalnych oraz aktywności ludzkich monocytów krwi obwodowej po stymulacji próbkami PM_{2,5} (o znanym składzie chemicznym i pochodzeniu) zebranymi w Krakowie w okresie zimowym oraz letnim. Część eksperymentalna badania – po zestawianiu z wynikami klinicznej strony projektu – ma na celu przybliżyć potencjalną rolę monocytów w rozwoju zapalenia śródbłonna i blaszki miażdżycowej pod wpływem PM_{2,5}.

Hipotezy badawcze:

1. Zakłada się występowanie istotnych różnic w rozkładzie poziomów ekspresji wybranych cząsteczek miRNA oraz w rozkładzie stężeń cytokin prozapalnych po stymulacji ludzkich monocytów próbkami PM_{2,5} zebranymi w Krakowie w okresie zimowym i letnim a także z porównaniu z komórkami niestymulowanymi.
2. Zakłada się występowanie istotnych różnic w rozkładzie poziomów ekspresji wybranych cząsteczek miRNA oraz w rozkładzie stężeń cytokin prozapalnych w próbkach surowicy krwi pobranych od stałych mieszkańców Krakowa w okresie zimowym i letnim.
3. Zakłada się, że poziomy ekspresji wybranych rodzajów miRNA i stężenia określonych cytokin prozapalnych będą różne dla osób z CCS (grupa badawcza) w porównaniu z osobami bez CCS (grupa kontrolna).
4. Zakłada się, że powtarzalność części wzorców miRNA (związanych z procesem zapalnym i rozwojem miażdżycy) – obecnych zarówno w eksperymencie jak i w klinicznej części badania – będzie mogła wskazywać na udział monocytów w szlakach molekularnych aterogenezy pod wpływem PM_{2,5}.

5. Zakłada się, że obserwowana w mikroskopie elektronowym aktywność i morfologia monocytów będą różne dla zawiesiny komórek stymulowanych pyłem zebrany w okresie zimowym w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.
6. Zakłada się, że stężenia $PM_{2,5}$ oraz innych głównych składowych zanieczyszczenia powietrza będą wyższe w okresie zimowym w porównaniu z sezonem letnim.

4. MATERIAŁ I METODYKA

4.1. Część kliniczna pracy

4.1.1. Sposób rekrutacji uczestników badania

Część kliniczną zaplanowano i przeprowadzono jako prospektywne badanie kohortowe. Łącznie w procesie rekrutacji wzięło udział 356 osób. Ostatecznie do projektu włączono 140 pacjentów, którzy spełnili kryteria włączenia i wyłączenia. Uczestników rekrutowano kolejno spośród pacjentów hospitalizowanych planowo (w latach 2017–2019) w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (UJ CM).

Kryteria włączenia:

- wiek > 18 r.ż.,
- świadoma zgoda pacjenta na udział w badaniu,
- stały/a mieszkaniec/mieszkanka Krakowa \geq 10 lat.

Kryteria wyłączenia:

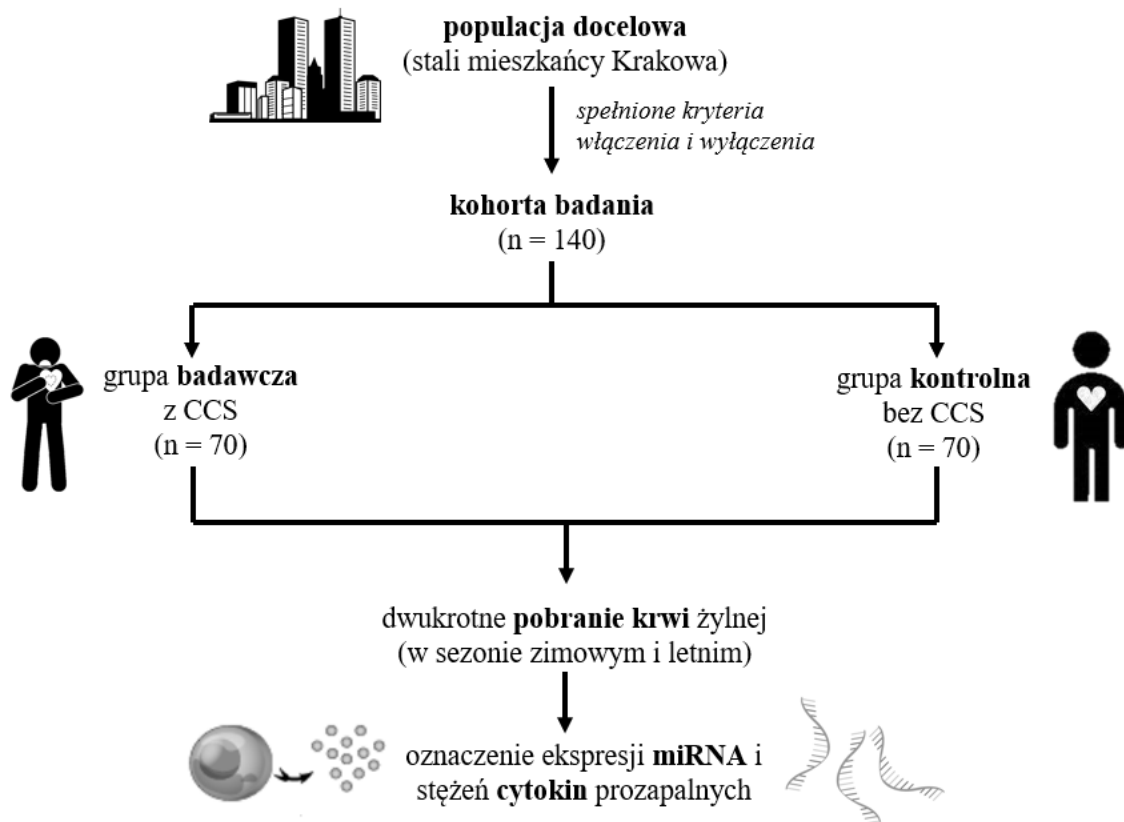
- przyjęcie do szpitala w trybie pilnym,
- MI lub udar mózgu w ciągu ostatniego miesiąca,
- infekcja lub antybiotykoterapia w ciągu ostatniego miesiąca (CRP < 10 mg/l i WBC < 10 tys.),
- uraz lub operacja w ciągu ostatniego miesiąca,
- niewygojone rany lub owrzodzenia skórne lub śluzówkowe,
- inna niż pomostowanie aortalno-wieńcowe (CABG, ang. *coronary artery bypass grafting*) operacja lub wymagający hospitalizacji uraz w ciągu ostatnich 3 miesięcy,
- zabieg CABG w ciągu ostatnich 6 miesięcy,
- HF lub bezobjawowa dysfunkcja lewej komory (frakcja wyrzutowa lewej komory < 50%),
- złożona wrodzona wada serca,
- ciężka nabyta zastawkowa wada serca,
- przewlekła choroba płuc (przede wszystkim COPD i astma oskrzelowa),
- zawodowe narażenie na pyły w wywiadzie (np. górnicy, hutnicy),
- przewlekła sterydoterapia wziewna lub systemowa,

- cukrzyca lub wynik glikemii po 2 godzinach w doustnym teście obciążenia glukozą (OGTT, ang. *Oral Glucose Tolerance Test*) w dawce 75g > 10 mmol/l,
- choroby autoimmunizacyjne (w tym autoimmunologiczne zapalenia tarczycy, choroby zapalne jelit, choroby tkanki łącznej),
- czynna choroba nowotworowa, w tym chory w trakcie leczenia radio- i/lub chemioterapią lub takie leczenie poniżej 6 miesięcy przed włączeniem do badania,
- przewlekła choroba nerek w stadium G3a wg KDIGO (eGFR < 45 ml/min./1,73 m²),
- marskość wątroby lub jej istotne czynnościowe uszkodzenie (poziom ALT > 1,5 raza powyżej górnej granicy zakresu referencyjnego),
- otyłość ≥ II stopnia (BMI ≥ 35 kg/m²),
- palenie tytoniu w ciągu ostatniego roku,
- nadużywanie alkoholu (spożywanie dziennie ekwiwalentu > 20 g czystego alkoholu przez kobiety i > 40 g przez mężczyzn, więcej niż trzy 3 razy w tygodniu),
- ciąża.

Głównymi ograniczeniami procesu rekrutacji były liczne przypadki cukrzycy i nikotynizmu w populacji docelowej oraz stosunkowo duży odsetek pacjentów z CAD przyjmowanych do oddziału w trybie pilnym. Dodatkowo rekrutację kohorty utrudniały inne, liczne kryteria wykluczające, mające na celu ograniczyć wpływ na ekspresję miRNA i stężenia cytokin prozapalnych innych – poza PM_{2,5} – czynników.

Uczestników badania podzielono na dwie grupy o równej liczebności. Kryterium przydziału do grup stanowiła obecność CCS (ryc. 11.):

- n = 70, pacjenci z CCS (grupa badawcza),
- n = 70, pacjenci bez CCS (grupa kontrolna).



Rycina 11. Schematyczne przedstawienie klinicznej części badania.

Źródło: opracowanie własne.

Skróty: n – liczebność populacji; CCS – przewlekły zespół wieńcowy (ang. *chronic coronary syndrome*).

Niezbędną liczebność badanej próby oszacowano przy pomocy oprogramowania STATISTICA 13.3.721.1 64-bit PL (moduł Analiza mocy testu). Podstawowe założenia dla zakładanych wielkości efektu: poziom istotności statystycznej $\alpha = 0,05$; moc testu 0,8; hipotezy dwustronne. Dla każdej z badanych grup minimalną liczebność próby oszacowano na ok. 60 osób.

Udokumentowaną CCS w grupie badawczej definiowano jako stan po MI i/lub po CABG lub PCI (przezskórna angioplastyka wieńcowa, ang. *percutaneous coronary intervention*) potwierdzony w dokumentacji medycznej danego uczestnika badania. U każdego z pacjentów bez CCS w wywiadzie wykonano – w zależności od wskazań klinicznych i poziomu ryzyka sercowo-naczyniowego zgodnie z ówczesnymi wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego – jedno z poniższych badań nieinwazyjnych, celem wykluczenia obecności istotnej CAD de novo. Kryterium przydziału do grupy kontrolnej był ujemny wynik jednego z poniższych badań:

- angiotomografia tętnic wieńcowych (indeks zwapnień < 400 wg Agatstona oraz brak zwężeń $> 50\%$),
- scyntygrafia serca na bieżni ruchomej z użyciem radioizotopu Tc-99m-MIBI (ubytek perfuzji $< 7\%$),
- echokardiografia obciążeniowa z zastosowaniem bieżni ruchomej (wynik ujemny klinicznie i echokardiograficznie; dodatni echokardiograficznie wynik badania był zdefiniowany jako wysiłkowe pogorszenie kurczliwości ≥ 2 segmentów mięśnia lewej komory),
- elektrokardiograficzna próba wysiłkowa na bieżni ruchomej (wynik ujemny klinicznie i elektrokardiograficznie; dodatni elektrokardiograficznie wynik badania był zdefiniowany jako wysiłkowe poziome lub skośne w dół obniżenie odcinka ST ≥ 1 mm mierzone w punktach położonych 60–80 ms za punktem J i/lub uniesienie odcinka ST > 1 mm w odprowadzeniach bez załamka Q).

Ponadto u wszystkich uczestników badania:

- pobrano krew żylną i oznaczono podstawowe parametry laboratoryjne: morfologia krwi z rozmazem, kreatynina z eGFR, sód, potas, CRP, TSH, ALT, lipidogram, przeciwciała przeciwjądrowe i przeciwcyaoplazmatyczne oraz OGTT,
- wykonano 12-odprowadzeniowe spoczynkowe EKG,
- wykonano przekłatkowe badanie echokardiograficzne celem wykluczenia funkcji skurczowej lewej komory i istotnych wad zastawkowych,

- przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe oraz dokonano analizy dokumentacji medycznej,
- zmierzono wzrost i wagę ciała (na podstawie których wyliczono wartość BMI), ciśnienie tętnicze krwi oraz częstość rytmu serca.

Badania nieinwazyjne wykluczające istotną CAD w grupie kontrolnej wykonano w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca UJ CM (Krakowski Specjalistyczny Szpital im. Jana Pawła II).

Oznaczenia biochemiczne wykonano w Ośrodku Nowoczesnej Diagnostyki laboratoryjnej Krakowskiego Specjalistycznego Szpitala im. Jana Pawła II. Poziom LDL-cholesterolu w surowicy krwi wyliczono się ze wzoru Friedewalda: LDL-cholesterol = cholesterol całkowity – HDL-cholesterol – trójglicerydy/5.

Pomiarów wzrostu [m] i wagi ciała [kg] dokonywano w czasie rekrutacji, posługując się elektroniczną wagą medyczną ze wzrostomierzem (WPT 100/200 OW, Radwag). Następnie obliczano wartość BMI wg uznanego wzoru: $BMI = \text{waga [kg]} / \text{wzrost [m]}^2$. Ciśnienie tętnicze krwi [mmHg] wyliczano jako średnią arytmetyczną z pomiarów dokonywanych w czasie rekrutacji (w pozycji siedzącej, dwukrotnie w odstępie 15 min. na obu kończynach górnych – tętnicach ramiennych) oraz podczas drugiego pobrania krwi (wg analogicznego schematu) za pomocą elektronicznego ciśnieniomierza medycznego (OMRON M7 Intelli IT). Zastosowano mankiety o szerokości co najmniej 2/3 obwodu ramienia, który zakładano 2–3 cm powyżej zgięcia łokciowego. Częstość akcji serca wyliczano na podstawie średniej arytmetycznej z zapisów spoczynkowego EKG wykonywanych w czasie rekrutacji oraz przy drugim pobraniu krwi, posługując się aparatem EKG Mint v.07.102 (Aspel).

Za dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób sercowo-naczyniowych przyjęto występowanie u krewnych I stopnia (rodzice, rodzeństwo, dzieci) CAD lub udaru mózgu w przypadku kobiet < 65 r.ż., a w przypadku mężczyzn < 55 r.ż.

Dane dotyczące pacjentów gromadzono za pomocą bezpośredniego wywiadu z pacjentami, na podstawie analizy udostępnionej przez uczestników badania dokumentacji medycznej, wyników badań dodatkowych wykonanych podczas hospitalizacji, w ramach której zrekrutowano chorego oraz podczas badania podmiotowego pacjentów.

4.1.2. Pobranie i zabezpieczanie próbek krwi żyłnej od pacjentów do badań molekularnych

U wszystkich zrekrutowanych uczestników badania ($n = 140$) pobrano i zabezpieczono obwodową krew żylną (7,50 ml) celem późniejszej analizy ekspresji miRNA i stężeń cytokin prozapalnych. Proces ten przeprowadzono dwukrotnie (ryc. 11.):

- w sezonie zimowym od stycznia do lutego (okres grzewczy o zakładanej wysokiej ekspozycji na zanieczyszczenie powietrza = zakładane wyższe dobowe stężenia $PM_{2,5}$),
- w sezonie letnim od czerwca do sierpnia (okres niskiej ekspozycji na zanieczyszczenie powietrza = zakładane niższe dobowe stężenia $PM_{2,5}$).

Średni czas pomiędzy pobraniem krwi w okresach zimowym i letnim wynosił 172 dni (± 15 dni).

Okresy pobierania materiału dobrano na podstawie analizy dobowych stężeń $PM_{2,5}$ z dwóch lat poprzedzających rekrutację uczestników badania (lata 2015 i 2016). Wykorzystano dane pochodzące ze stacji monitoringu jakości powietrza zlokalizowanej w dzielnicy Krowodrza w Krakowie (Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska) [73].

Obwodową krew żylną pobierano przy użyciu standaryzowanego systemu próżniowego bez antykoagulantu a następnie rozdzielano w sposób:

- 5 ml krwi oddzielano bezpośrednio do próbek do stabilizacji RNA (Cell-Free RNA BCT CE firmy Streck, USA),
- 2,50 ml krwi umieszczano w odrębnych, standardowych i dostępnych komercyjnie probówkach bez antykoagulantu, które następnie odwirowywano w procesie standardowej laboratoryjnej procedury (10 min., 4 tys. obrotów/min.). Uzyskaną w ten sposób surowicę rozdzielono na 5 porcji (po 0,50 ml) i przechowywano w temp. $-80^{\circ}C$.

Opisany proces przeprowadzono w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca UJ CM (Krakowski Specjalistyczny Szpital im. Jana Pawła II).

4.2. Część eksperymentalna pracy

4.2.1. Izolacja monocytów z krwi żyłnej zdrowych ochotników

Źródłem komórek do eksperymentu mającego na celu określenie wpływu $PM_{2,5}$ na aktywność ludzkich monocytów, była obwodowa krew żylna pobrana od 3 zdrowych ochotników. Miało to ograniczyć wpływ różnic międzyosobniczych. Ochotników wybrano losowo spośród zdrowych i niepalących osób – personelu Kliniki Choroby Wieńcowej

i Niewydolności Serca UJ CM (Krakowski Specjalistyczny Szpital im. Jana Pawła II). Po uzyskaniu od każdej z tych osób świadomej zgody na udział w badaniu, pobrano od nich do próbek z antykoagulantem (cytrynianem sodu) po 7,50 ml obwodowej krwi żyłnej. Następnie krew żylna cytrynianowa, po rozcieńczeniu roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanami w stosunku 1:1, została nawarstwiona na roztwór separujący Histopaque-1077 i poddana wirowaniu (30 min., 500 g) w celu uzyskania warstwy jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs, ang. *peripheral blood mononuclear cells*). Pływającą warstwę PMBCs zebrano przez odessanie i przemyto dwukrotnie pożywką do hodowli komórek RPMI (ang. *Roswell Park Memorial Institute*), stosując wirowanie (12 min., 200 g) w celu zebrania osadu komórkowego. Następnie z PMBCs wyizolowano frakcję monocytów za pomocą komercyjnego zestawu do magnetycznej selekcji negatywnej, zgodnie z protokołem producenta (zestaw EasySep Human Monocytes Enrichment Kit, STEMCELL Technologies Inc., Kanada). Czystość monocytów oceniono metodą cytometrii przepływowej, stosując barwienie CD14 i CD16 leukocytów CD45+. Jednocześnie oceniano żywotność komórek, stosując bramkowanie z wykluczeniem barwnika. Cały proces przeprowadzono w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej (II Katedra Chorób Wewnętrznych UJ CM).

4.2.2. Pobieranie pyłu zawieszonego (PM_{2,5})

Próbki cząsteczek PM_{2,5} były pobierane sezonowo (okres zimowy i letni) na filtrach kwarcowych o średnicy 47 mm za pomocą dwóch niskoobjętościowych próbników LVS-3 o przepływie 2,30 m³/h (Sven Leckel GmbH). Miejscem zbierania materiału był dach budynku Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie (AGH), ok. 20 m nad powierzchnią gruntu. Wydział ten zlokalizowany jest w dzielnicy Krowodrza w odległości ok. 1 km na zachód od centrum miasta (50°4'0.205"N 19°54'47.179"E) (ryc. 12.). Pozwoliło to na uzyskanie materiału reprezentacyjnego dla całego miasta. W pobliżu tego obszaru mieszkała również większość uczestników badania. Zwiększa to prawdopodobieństwo rzeczywistego istnienia zakładanego związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy stężeniami pobieranych próbek PM_{2,5} a skutkami zdrowotnymi przewlekłe narażanych mieszkańców. Co więcej, w części eksperymentalnej badania monocyty (pobrane od zdrowych ochotników) poddane były ekspozycji na PM_{2,5} o możliwie zbliżonym stężeniu i składzie chemicznym do PM_{2,5} na jakie narażeni byli w tym czasie stali mieszkańcy Krakowa.

Próbki PM_{2,5} były pobierane dwukrotnie: przez 50 dni w okresie letnim (czerwiec–lipiec

2017 r.) oraz przez analogiczny okres 50 dni w sezonie zimowym (styczeń–luty 2018 r.). Łącznie zebrano 200 filtrów (100 par próbek), co pozwoliło na uzyskanie wymaganej masy suchego ekstraktu z PM_{2,5} do badań biologicznych (co najmniej 25 mg ekstraktu na każdy sezon) oraz na wykonanie zaplanowanych analiz dotyczących składu chemicznego próbek.



Rycina 12. Lokalizacja miejsca pobierania próbek PM_{2,5}.

Źródło: opracowanie własne.

Legenda: Czarny okrąg – dokładna lokalizacja miejsca pobierania materiału (budynek Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie, 50°40.205"N 19°54'47.179"E).

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*).

4.2.3. Ekstrakcja i przygotowanie próbek PM_{2,5} do badań biologicznych

Filtry przeznaczone do uzyskania materiału do testów biologicznych zostały pofragmentowane na szklanej szalce Petriego na mniejsze części w celu zwiększenia efektywności ekstrakcji i ułatwienia dostępu rozpuszczalnika do całej powierzchni filtra. W celu przeprowadzenia testów biologicznych z części próbek filtracyjnych przygotowano dwie próbki suchej pozostałości (suchego ekstraktu), odpowiednio dla okresu zimowego oraz letniego. Próbka reprezentująca dany sezon została uzyskana przez połączenie materiału uzyskanego z filtrów (zawierających zebraną frakcję pyłu PM_{2,5}) z okresu 50 dni – osobno dla sezonu letniego 2017 r. i zimowego 2018 r. Każdą próbkę z filtrów poddano dwukrotnej ekstrakcji (przy użyciu 2 ml cykloheksanu i 3 ml dichlorometanu) za pomocą poziomej wirówki

(40 min., 50 obrotów/min.). Do badań ilościowych wydajności procedury ekstrakcji zastosowano wzorce wewnętrzne znakowane izotopowo, benzo[a]piren d12 oraz perylen d12. Objętość połączonych ekstraktów (osobno połączone ze sobą ekstrakty z próbek letnich i zimowych) zmniejszono następnie do 0,5 ml poprzez ich odparowanie w termobloku (AccuBlock Digital Dry Bath Labnet, Woodbridge, USA), stosując delikatny strumień argonu o temp. 35°C. Następnie połączone ekstrakty (osobno z próbek zebranych w okresie letnim i zimowym) umieszczono w dwóch uprzednio zważonych fiolkach i ostatecznie odparowano do sucha. Na podstawie różnicy masy pustej fiolki i fiolki po odparowaniu ekstraktu, została określona dokładna masa uzyskanej suchej pozostałości przeznaczonej do analiz biologicznych. Masy suchych pozostałości wyniosły odpowiednio 31,70 mg oraz 30,90 mg dla okresów letniego i zimowego. Następnie tak uzyskane ekstrakty PM_{2,5} oceniono pod kątem obecności lipopolisacharydu (LPS), który jest potencjalnym aktywatorem monocytów. Wykryty w ten sposób w próbkach LPS został od razu usunięty za pomocą zestawu Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit i żywicy do usuwania endotoksyn o dużej pojemności (Thermo Scientific Pierce, UK) zgodnie z instrukcjami producenta. Uzyskane w ten sposób ostateczne ekstrakty przechowywano w ciemnym szkle i zamrażarce do czasu wykorzystania w badaniach biologicznych. Proces przeprowadzono na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH w Krakowie.

4.2.4. Analiza zmian ekspresji cząsteczek miRNA i stężeń cytokin prozapalnych

Analizę molekularną przeprowadzono w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej (II Katedra Chorób Wewnętrznych UJ CM).

4.2.4.1. Analiza zmian ekspresji cząsteczek miRNA po ekspozycji ludzkich monocytów na próbki PM_{2,5}

Eksperyment polegający na inkubacji ludzkich monocytów z zawiesiną PM_{2,5} o znanym składzie przeprowadzono w tryplikatach technicznych z trzema różnymi stężeniami PM_{2,5}, oddzielnie dla pyłu zebranego w sezonie zimowym i letnim (łącznie 6 eksperymentów). Zastosowano seryjne rozcieńczenie przygotowanego wcześniej preparatu PM_{2,5} w stężeniach 50 µg/ml, 10 µg/ml i 1 µg/ml. We wstępnym, kontrolnym eksperymencie sprawdzono cytotoksyczność zawiesiny pyłu przez oznaczenia dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang.

lactate dehydrogenase) w zawiesinie z hodowli. Sprawdzono również żywotność monocytów w zawiesinie przy użyciu cytometru przepływowego.

Eksperyment dotyczący ekspresji wybranych miRNA przeprowadzono na płytkach wielodołkowych do hodowli komórek. Zastosowano ludzkie monocyty w stężeniu $0,50 \times 10^6$ /ml/dołek. Na podstawie analizy dostępnej literatury, ustalono 24-godzinny okres inkubacji dla komórek, które ponownie zawieszono w pożywce RPMI uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą (PAN-Biotech, Aidenbach, Niemcy). Nadsącze z hodowli było przechowywane po jego zamrożeniu w temp. -80°C . Całkowity RNA wyizolowano z surowicy i pożywki do hodowli komórkowych zebranych po stymulacji monocytów przy użyciu komercyjnego zestawu (mirVana™ PARIS™ RNA and Native Protein Purification Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA), a następnie poddano odwrotnej transkrypcji zgodnie z zaleceniami producenta (TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Profilowanie miRNA (754 rodzajów cząsteczek miRNA) w pożywce do hodowli komórkowych przeprowadzono przy użyciu paneli TaqMan™ OpenArray™ Human Advanced MicroRNA i systemu QuantStudio™ 12K Flex PCR (oba Thermo Fisher Scientific). Spośród wszystkich oznaczonych w eksperymencie na ludzkich monocytach miRNA wybrano 24 rodzaje cząsteczek o zróżnicowanej ekspresji. Następnie do badań określających zbieżność zmian ekspresji poszczególnych wybranych miRNA w eksperymencie na komórkach z przewlekłym narażeniem na PM_{2,5} u ludzi wykorzystano materiał zebrany od uczestników badania (rozd. 4.1.2. oraz 4.2.4.2.).

4.2.4.2. Analiza zmian ekspresji cząsteczek miRNA w surowicy krwi pobranej od uczestników klinicznej części badania (przewlekłe narażonych na PM_{2,5} mieszkańców Krakowa)

W ciągu 7 dni od pobrania od uczestników badania (część kliniczna) obwodowej krwi żyłnej do próbek do stabilizacji RNA przeprowadzono – zgodnie z zaleceniami producenta (Streck) – izolację cząsteczek miRNA. Izolację miRNA przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu (mirVana™ PARIS™ RNA and Native Protein Purification Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) i poddano odwrotnej transkrypcji zgodnie z zaleceniami producenta (TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Separacja magnetyczna cząsteczek RNA pozwoliła na minimalizację strat miRNA spowodowanych preparatyką.

Pomiary ekspresji 24 cząsteczek miRNA (wybranych podczas eksperymentu na monocytach, rozdz. 4.2.4.1.) przeprowadzono przy użyciu wykonanych na zamówienie macierzy TaqMan™ o niskiej gęstości i ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (Thermo Fisher Scientific).

4.2.4.3. Analiza zmian stężeń cytokin prozapalnych po ekspozycji ludzkich monocytów na próbki PM_{2,5} oraz w surowicy krwi pobranej od uczestników części klinicznej badania (przewlekle narażonych mieszkańców Krakowa)

Do pomiarów stężeń cytokin prozapalnych wykorzystano technikę immunofluorymetryczną Lumineks z zastosowaniem typowego biopleksu Human Inflammation Panel (14 cząsteczek: TNF- α , IL-6, MMP-9, MMP-3, IL-8, MMP-1, CCL-2, IL-1b, MMP-13, CCL-3, CCL-4, IL-1a, progranulina, IL-23). Pomiarów dokonano – analogicznie jak dla analizy zmian ekspresji miRNA – zarówno w preparacie ludzkich monocytów (inkubowanych przez 24 godziny z zawiesiną PM_{2,5} o znanym składzie i pochodzeniu), jak i w surowicy krwi uzyskanej od uczestników części klinicznej badania. Na podstawie wyników uzyskanych podczas analizy zmian ekspresji cząsteczek miRNA w części eksperymentalnej badania, przeprowadzono ocenę zakładanych zmian stężeń cytokin prozapalnych w zawieszynie monocytów z pożywką do hodowli komórkowej, które były wcześniej poddane inkubacji z próbkami PM_{2,5} o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ (rodz. 3.2.4.1 oraz 4.1.1).

4.2.5. Obserwacja ludzkich monocytów (inkubowanych z próbkami PM_{2,5}) za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego

W celu udokumentowania fagocytozy cząsteczek PM_{2,5} przez monocyty a także zmian w morfologii tych komórek po ekspozycji na próbki PM_{2,5}, izolowane uprzednio monocyty (rozd. 4.2.1.) poddano inkubacji analogicznie jak w przypadku eksperymentu dotyczącego zmian stężeń cytokin prozapalnych (24-godzinny okres inkubacji z próbkami PM_{2,5} o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$, rozdz. 4.2.4.3.). Zastosowano próbki PM_{2,5} z okresu zimowego z uwagi na zaobserwowane wcześniej różnice w ekspresji miRNA (rozd. 5.1.1.). Następnie preparaty z monocytami utrwalono standardowo w 2,50% aldehydzie glutarowym w 0,10-M buforze kakodylowym (przez 2 godziny w temp. 20°C). W kolejnym etapie próbki utrwalono w 1% roztworze tetratlenku osmu (przez 1 godzinę), a następnie odwodniono poprzez przepuszczenie przez szereg stopniowanych etanoli i zatopiono (celem bezpiecznego osadzenia próbki)

w dostępnym komercyjnie materiale epoksydowym PolyBed 812 w temp. 68°C. Ultracienkie skrawki zebrano na 300-oczkowych siatkach wykonanych z miedzi, dodatkowo pokrytych folią formvarową. Do cięcia skrawków zastosowano ultramikrotom Leica EM UC7. Przekroje skonstrastowano przy użyciu octanu uranylu i cytrynianu ołowiu, a następnie analizowano za pomocą mikroskopu elektronowego JEOL JEM 2100HT (Jeol Ltd, Tokio, Japonia) przy napięciu przyspieszającym 80 kV. Proces ten przeprowadzono w Zakładzie Biologii Komórki (Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ).

4.2.6. Analiza składu chemicznego zebranych próbek PM_{2,5}

W celu analizy składu chemicznego zebranych próbek PM_{2,5} (użytego następnie w eksperymencie na ludzkich monocytach) wykonano następujące pomiary:

- ocena stężenia PM_{2,5},
- analiza składu pierwiastkowego,
- analiza stężenia jonów nieorganicznych,
- oznaczenie stężeń wybranych PAHs,
- oznaczenie całkowitej zawartości węgla z podziałem na węgiel pierwiastkowy i organiczny.

Stężenia PM_{2,5} w zebranych próbkach oznaczono metodą grawimetryczną zgodnie z procedurą PN-EN 123417 [132].

W skład przeanalizowanych pierwiastków wchodziły chlor (Cl), potas (K), wapń (Ca), tytan (Ti), wanad (V), chrom (Cr), mangan (Mn), żelazo (Fe), nikiel (Ni), miedź (Cu), cynk (Zn), brom (Br), stront (Sr), rubid (Rb), arsen (As) i ołów (Pb). Stężenia pierwiastków w próbkach PM_{2,5} oznaczono techniką spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej z dyspersją energii (EDXRF, ang. *energy dispersive X-Ray fluorescence*) z zastosowaniem lampy rentgenowskiej chłodzonej wodą. Do detekcji promieniowania rentgenowskiego zastosowano detektor Si(Li) chłodzony ciekłym azotem.

Wśród nieorganicznych anionów i kationów analizowano: sód (Na⁺), potas (K⁺), magnez (Mg²⁺), wapń (Ca²⁺), amon (NH₄⁺), azotan (NO₃⁻), chlorek (Cl⁻) i siarczan (SO₄²⁻). Stężenia tych jonów oznaczano za pomocą izokratycznej chromatografii jonowej z wykorzystaniem aparatu ICS-1100 (Thermo Scientific), wyposażonego w autosampler AS-DV i kolumny jonowymienne [77] [18].

Oznaczenia stężeń PAHs zostały wykonane z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią masową za pomocą chromatografu gazowego Thermo

Scientific GC Trace 1310 sprzężonego ze spektrometrem masowym z pułapką jonową ITQ 900. Dane zostały zebrane, przeanalizowane i przetworzone przy użyciu oprogramowania Xcalibur®.

Badania dotyczące zawartości węgla w pobranych próbkach obejmowały analizę węgla pierwiastkowego i organicznego. Ilość węgla pierwiastkowego oznaczono metodą transmisji światła na spektrofotometrze UV-VIS. Pomiary termooptyczne węgla organicznego i węgla pierwiastkowego przeprowadzono za pomocą instrumentu SUNSET przy użyciu protokołu EUSAAR (ang. *European Supersites for Atmospheric Aerosol Research*) [77].

Proces analizy składu chemicznego zebranych próbek PM_{2,5} przeprowadzono na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej oraz Wydziale Energetyki i Paliw AGH w Krakowie.

4.3. Etyka

Kliniczna część badania została przeprowadzona zgodnie z Deklaracją Helsińską. Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Etyki UJ CM nr 122.6120.355.2016 z 19.12.2016 r. Każdy uczestnik badania:

- został dokładnie poinformowany o istocie i celach projektu oraz o zakresie bezpośredniego udziału jego osoby w badaniu,
- otrzymał pełną informację o tym, że w każdej chwili może zrezygnować z udziału w projekcie bez podawania przyczyny,
- miał możliwość zadawania pytań i omówienia z badaczem wszystkich wątpliwości dotyczących jego udziału w projekcie,
- przedstawił pisemną, świadomą zgodę przed włączeniem do badania,
- został poinformowany o sposobie przetwarzania danych osobowych zgodnie z art. 13 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w sprawie ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych,
- przed włączeniem do badania podpisał formularz pisemnej, świadomej zgody na przetwarzanie danych osobowych.

4.4. Analiza statystyczna

Zmienne nominalne podsumowano w formie liczebności i odsetek. Zmienne ciągłe podsumowano jako średnie z odchyleniami standardowymi lub medianę z pierwszym i trzecim

kwartylem w zależności od normalności rozkładu z wyjątkiem wyników poziomów ekspresji miRNA, które każdorazowo były przedstawiane jako mediany i kwartyle w notacji 10^{-3} .

Różnice pomiędzy pacjentami z CCS a grupą kontrolną analizowano za pomocą testu t-Studenta lub testu Welcha, w zależności od równości wariancji dla zmiennych o rozkładzie normalnym. Dla zmiennych ciągłych o rozkładzie innym niż normalny zastosowano test U Manna-Whitneya. Zmienne nominalne porównywano testem chi-kwadrat Pearsona lub dokładnym testem Fishera, jeśli 20% komórek miało oczekiwaną liczbę mniejszą niż 5 (symulacja Monte Carlo dla testu Fishera przy użyciu tabel o wymiarach wyższych niż 2x2).

Różnice między latem a zimą porównano – w zależności od zgodności rozkładu zmiennych z rozkładem normalnym – za pomocą testu t-Studenta dla grup zależnych lub testu kolejności par Wilcoxon.

We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności statystycznej $\alpha = 0,05$.

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu R 4.0.4 (R Foundation for Statistical Computing, Wiedeń, Austria, 2021). Do gromadzenia i opracowywania danych wykorzystano program Exel (Microsoft Office 365).

Wybrane ryciny zostały przygotowane z wykorzystaniem aplikacji BioRender (<https://app.biorender.com/>).

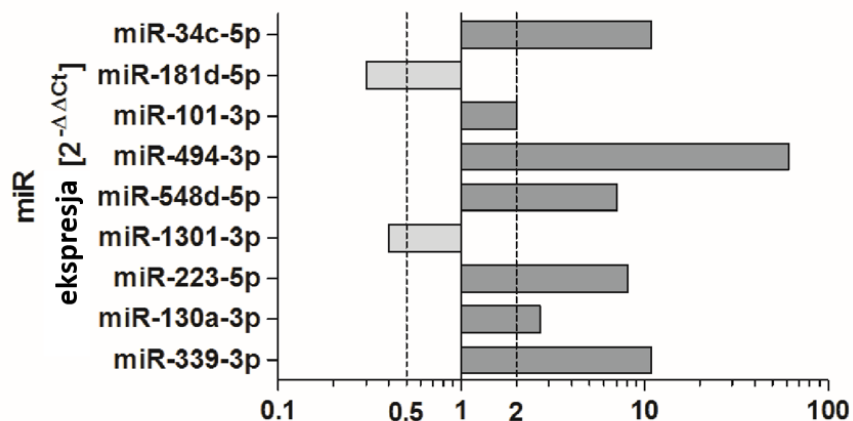
5. WYNIKI

5.1. Ocena zmian ekspresji miRNA i stężeń cytokin prozapalnych w zawiesinie ludzkich monocytów inkubowanych z próbkami PM_{2,5} o znanym składzie i pochodzeniu

5.1.1. Analiza zmian ekspresji cząsteczek miRNA po ekspozycji monocytów na PM_{2,5}

Poziom ekspresję miRNA obliczono ze wzoru $2^{-\Delta\Delta Ct}$ przy użyciu małego jąderkowego RNA (RNU-44) jako kontroli endogennej. Ekspozycja monocytów na próbki zebranego PM_{2,5} o stężeniu 50 µg/ml spowodowała zmianę poziomu ekspresji niektórych zbadanych cząsteczek miRNA.

Porównanie zawiesin z monocytami stymulowanymi próbkami PM_{2,5} pobranymi w okresie zimowym z komórkami niestymulowanymi wykazało zwiększony poziom ekspresji następujących rodzajów cząsteczek miRNA: miR-34c-5p, miR-101-3p, miR-494-3p, miR-548d-5p, miR-223-5p, miR-130a-3p i miR-339-3p (ryc. 13.). Z kolei ekspresja cząsteczek miR-181d-5p i miR-1301-3p była obniżona w zawiesinie z komórkami stymulowanymi pyłem zimowym (ryc. 13.).



Rycina 13. Zmiana poziomów ekspresji wybranych cząsteczek miRNA w zawieszynie monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM_{2,5} pobrane w okresie zimowym w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.

Dane wyrażono jako medianę zmiany krotności ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) poziomu ekspresji miRNA pomiędzy zawiesziną monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM_{2,5} pobrane w okresie zimowym w porównaniu z zawiesziną monocytów niestymulowanych.

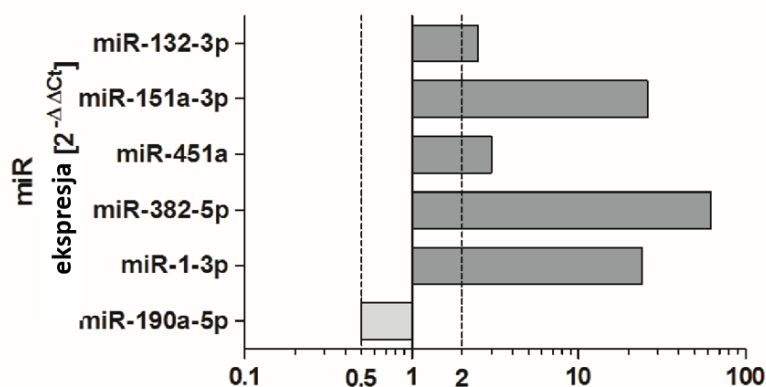
Znamienne statystycznie zwiększenie poziomu ekspresji miRNA (zmiana krotności $< 0,50$; wartość $p < 0,05$) zaznaczono na kolor ciemnoszary.

Znamienne statystycznie zmniejszenie poziomu ekspresji miRNA (zmiana krotności $< 0,50$; wartość $p < 0,05$) zaznaczono na kolor jasnoszary.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*).

W zawieszynie z monocytami stymulowanymi próbkami PM_{2,5} zebranymi w okresie letnim (w porównaniu z komórkami niestymulowanymi) obserwowano zwiększoną ekspresję 5 cząsteczek miRNA: miR-132-3p, miR-151a-3p, miR-451a, miR-382-5p i miR-1-3p (ryc. 14.). Podczas gdy zmniejszoną ekspresję – w zawieszynie z komórkami stymulowanymi pyłem letnim – wykryto tylko dla jednego rodzaju cząsteczek – miR-190a-5p (ryc. 14.).



Rycina 14. Zmiana poziomów ekspresji wybranych cząsteczek miRNA w zawieszynie monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM_{2,5} pobrane latem w porównaniu z komórkami niestymulowanymi. Dane wyrażono jako medianę zmiany krotności (2^{-ΔΔCt}) poziomu ekspresji miRNA pomiędzy zawiesziną monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM_{2,5} pobrane w okresie letnim w porównaniu z zawiesziną monocytów niestymulowanych.

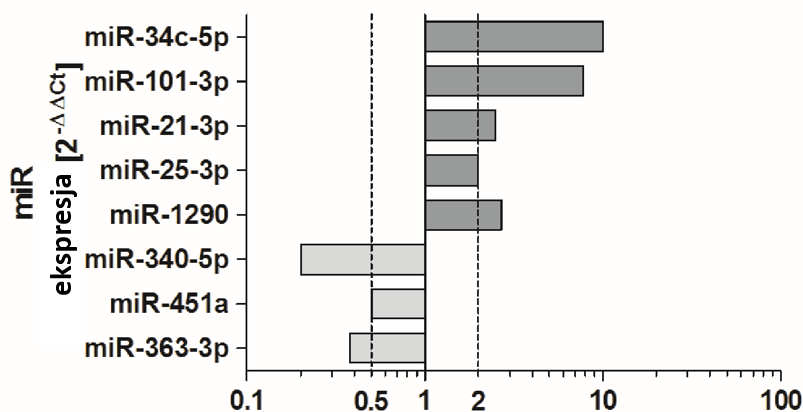
Znamienne statystycznie zwiększenie poziomu ekspresji miRNA (zmiana krotności < 0,50; wartość $p < 0,05$) zaznaczono na kolor ciemnoszary.

Znamienne statystycznie zmniejszenie poziomu ekspresji miRNA (zmiana krotności < 0,50; wartość $p < 0,05$) zaznaczono na kolor jasnoszary.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*).

Porównanie zawiesziny monocytów poddanych stymulacji próbkami PM_{2,5} zebranymi w okresie zimowym z zawiesziną komórek poddanych ekspozycji próbkami PM_{2,5} zebranymi w okresie letnim wykazało zwiększoną ekspresję 5 rodzajów miRNA: miR-34c-5p, miR-101-3p, miR-21-3p, miR-25-3p i miR-1290 (ryc. 15.). Zmniejszona ekspresja była obserwowana w przypadku 3 cząsteczek miRNA: miR-340-5p, miR-451a i miR-363-3p (ryc. 15.).



Rycina 15. Zestawienie poziomów ekspresji miRNA w zawieszynie z monocytyami stymulowanymi próbkami $PM_{2,5}$ zebranymi w okresie zimowym oraz letnim.

Dane wyrażono jako medianę zmiany krotności ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) poziomu ekspresji miRNA pomiędzy zawieszyną monocytów poddanych ekspozycji na próbki $PM_{2,5}$ pobrane w okresie zimowym w porównaniu z zawieszyną monocytów niestymulowanych.

Znamienne statystycznie zwiększenie poziomu ekspresji miRNA (zmiana krotności $< 0,50$; wartość $p < 0,05$) zaznaczono na kolor ciemnoszary.

Znamienne statystycznie zmniejszenie poziomu ekspresji miRNA (zmiana krotności $< 0,50$; wartość $p < 0,05$) zaznaczono na kolor jasnoszary.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: $PM_{2,5}$ – cząsteczki stałe o średnicy $2,5 \mu m$ (ang. *particulate matter*).

Dodatkowo zbadano profil cząsteczek miRNA w pożywce do hodowli komórkowej monocytów po ekspozycji komórek na próbki zebranego $PM_{2,5}$ o stężeniu $10 \mu g/ml$. W zawieszynie zaobserwowano znamienne wzrost ekspresji 2 cząsteczek miR-101-3p oraz miR-25-3p. W przeciwieństwie do tego, inkubacja ludzkich monocytów z próbkami $PM_{2,5}$ o stężeniu $1 \mu g/ml$ nie indukowała istotnych zmian w ekspresji miRNA.

5.1.2. Analiza zmian stężenia cytokin prozapalnych po ekspozycji monocytów na $PM_{2,5}$

Na podstawie wyników uzyskanych dla oceny poziomu ekspresji cząsteczek miRNA, analizę poziomów cytokin prozapalnych w zawieszynie monocytów z pożywką do hodowli komórkowej przeprowadzono dla inkubacji próbkami $PM_{2,5}$ o stężeniu $50 \mu g/ml$ (rodz. 3.2.4.1. oraz 4.1.1.).

Porównanie zawiesiny zawierającej monocyty stymulowane próbkami $PM_{2,5}$ pobranymi w okresie zimowym z zawieszyną z komórkami niestymulowanymi nie wykazało znamienych różnic w rozkładzie stężeń poszczególnych cytokin prozapalnych (tab. 1.).

Tabela 1. Analiza stężeń cytokin prozapalnych w zawieszynie monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM_{2,5} pobrane w okresie zimowym w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.

Cytokina	Kontrola (pg/ml)	Pył zimowy (pg/ml)	Wartość p
TNF- α	14,05 (5,45; 20,41)	12,93 (6,01; 20,41)	1,000
IL-6	41,73 (16,15; 113,50)	20,58 (17,63; 38,72)	0,900
MMP-9	3336,70 (514,05; 5840,20)	1805,72 (445,42; 3318,83)	0,657
MMP-3	276,39 (188,65; 295,64)	297,77 (287,08; 299,91)	0,390
IL-8	4945,40 (2419,20; 5688,00)	5303,20 (5185,08; 5572,47)	0,900
MMP-1	50,20 (30,18; 117,13)	51,61 (50,20; 88,87)	0,973
CCL-2	465,36 (222,23; 1391,40)	187,59 (123,37; 384,88)	0,390
IL-1b	10,97 (6,19; 20,81)	10,19 (6,19; 12,52)	0,973
MMP-13	69,27 (48,20; 69,32)	48,20 (48,20; 88,40)	1,000
CCL-3	334,68 (275,24; 343,43)	344,65 (340,95; 350,71)	0,390
CCL-4	341,54 (249,00; 1071,71)	328,93 (322,46; 821,93)	1,000
IL-1a	8,07 (5,94; 11,90)	8,07 (7,03; 11,45)	1,000
Progranulina	1104,21 (334,33; 2755,31)	647,08 (595,29; 1267,54)	1,000
IL-23	471,19 (289,64; 485,37)	492,44 (392,38; 513,61)	0,657

Dane wyrażono jako medianę \pm rozstęp międzykwartyłowy stężenia danej cytokiny.

Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: pg/ml – pikogramy/mililitr; p – poziom prawdopodobieństwa; PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 mikrometra (ang. *particulate matter*); TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*); IL – interleukina (ang. *interleukin*); MMP – metaloproteinaza (ang. *matrix metalloproteinase*); CCL – chemokina (ang. *chemokine ligand*).

Porównanie zawiesiny zawierającej monocyty stymulowane próbkami PM_{2,5} pobranymi w okresie letnim z zawiesiną z komórkami niestymulowanymi również nie wykazało znamienych różnic w rozkładzie stężeń poszczególnych cytokin prozapalnych (tab. 2.).

Tabela 2. Analiza stężeń cytokin prozapalnych w zawieszynie monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM_{2,5} pobrane w okresie letnim w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.

Cytokina	Kontrola (pg/ml)	Pył letni (pg/ml)	Wartość p
TNF- α	14,05 (5,45; 20,41)	35,39 (31,83; 64,97)	0,188
IL-6	41,73 (16,15; 113,50)	29,49 (19,97; 32,47)	0,900
MMP-9	3336,70 (514,05; 5840,20)	12464,64 (7210,38; 13381,35)	0,188
MMP-3	276,39 (188,65; 295,64)	321,29 (310,60; 329,84)	0,188
IL-8	4945,40 (2419,20; 5688,00)	5944,84 (5592,00; 6868,74)	0,390
MMP-1	50,20 (30,18; 117,13)	83,43 (55,82; 97,00)	0,900
CCL-2	465,36 (222,23; 1391,40)	1434,73 (1118,72; 1744,62)	0,390
IL-1b	10,97 (6,19; 20,81)	80,29 (16,71; 94,79)	0,390
MMP-13	69,27 (48,20; 69,32)	88,40 (69,27; 88,40)	0,499
CCL-3	334,68 (275,24; 343,43)	376,05 (361,33; 526,20)	0,188
CCL-4	341,54 (249,00; 1071,71)	513,14 (455,35; 1785,02)	0,657
IL-1a	8,07 (5,94; 11,90)	16,25 (13,69; 21,07)	0,188
Progranulina	1104,21 (334,33; 2755,31)	1964,59 (1843,44; 9807,22)	0,657
IL-23	471,19 (289,64; 485,37)	534,68 (492,44; 618,18)	0,188

Dane wyrażono jako medianę \pm rozstęp międzykwartyłowy stężenia danej cytokiny.

Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: pg/ml – pikogramy/mililitr; p – poziom prawdopodobieństwa; PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 mikrometra (ang. *particulate matter*); TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*); IL – interleukina (ang. *interleukin*); MMP – metaloproteinaza (ang. *matrix metalloproteinase*); CCL – chemokina (ang. *chemokine ligand*).

Podobnie porównanie zawiesin z monocytami stymulowanymi próbkami PM_{2,5} pobranymi w okresie zimowym oraz letnim nie wykazało istotnych różnic w rozkładzie stężeń poszczególnych cytokin prozapalnych (tab. 3.).

Tabela 3. Analiza stężeń cytokin prozapalnych w zawieszynie monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM_{2,5} pobrane w okresach zimowym oraz letnim.

Cytokina	Pył letni (pg/ml)	Pył zimowy (pg/ml)	Wartość p
TNF- α	35,39 (31,83; 64,97)	12,93 (6,01; 20,41)	0,188
IL-6	29,49 (19,97; 32,47)	20,58 (17,63; 38,72)	1,000
MMP-9	12464,64 (7210,38; 13381,35)	1805,72 (445,42; 3318,83)	0,188
MMP-3	321,29 (310,60; 329,84)	297,77 (287,08; 299,91)	0,188
IL-8	5944,84 (5592,00; 6868,74)	5303,20 (5185,08; 5572,47)	0,188
MMP-1	83,43 (55,82; 97,00)	51,61 (50,20; 88,87)	0,657
CCL-2	1434,73 (1118,72; 1744,62)	187,59 (123,37; 384,88)	0,188
IL-1b	80,29 (16,71; 94,79)	10,19 (6,19; 12,52)	0,188
MMP-13	88,40 (69,27; 88,40)	48,20 (48,20; 88,40)	0,613
CCL-3	376,05 (361,33; 526,20)	344,65 (340,95; 350,71)	0,188
CCL-4	513,14 (455,35; 1785,02)	328,93 (322,46; 821,93)	0,657
IL-1a	16,25 (13,69; 21,07)	8,07 (7,03; 11,45)	0,188
Progranulina	1964,59 (1843,44; 9807,22)	647,08 (595,29; 1267,54)	0,188
IL-23	534,68 (492,44; 618,18)	492,44 (392,38; 513,61)	0,510

Dane wyrażono jako medianę \pm rozstęp międzykwartyłowy stężenia danej cytokiny.

Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: pg/ml – pikogramy/mililitr; p – poziom prawdopodobieństwa; PM_{2,5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 mikrometra (ang. *particulate matter*); TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*); IL – interleukina (ang. *interleukin*); MMP – metaloproteinaza (ang. *matrix metalloproteinase*); CCL – chemokina (ang. *chemokine ligand*).

5.2. Ocena sezonowych zmian ekspresji miRNA i stężeń cytokin prozapalnych wśród uczestników badania (ocena przewlekłego narażenia mieszkańców Krakowa na PM_{2,5}) – kliniczna część badania

5.2.1. Charakterystyka badanej populacji

Charakterystyka demograficzna i kliniczna uczestników badania wraz z podziałem na grupy została przedstawiona w tabeli nr 4. Większość badanych pacjentów mieszkała w obszarze dokonywanych pomiarów PM_{2,5} (ryc. 12.).

Tabela 4. Charakterystyka demograficzna i kliniczna uczestników badania z podziałem na pacjentów z CCS (grupa badawcza) i bez CCS (grupa kontrolna).

Parametr	Grupa badawcza (CCS) n = 70	Grupa kontrolna (bez CCS) n = 70	Wartość p
Wiek (lata)*	66,73 ± 10,86	62,80 ± 14,46	0,060
Płeć męska, n (%)	40 (57,14)	50 (71,42)	0,220
BMI (kg/m ²)*	26,56 ± 3,50	24,45 ± 4,50	0,001
Częstość rytmu serca (liczba/min.)*	63,67 ± 8,71	63,32 ± 9,34	0,879
Skurczowe CTK (mmHg)*	126,03 ± 14,12	121,75 ± 10,9	0,190
Rozkurczowe CTK (mmHg)*	73,64 ± 7,99	72,75 ± 9,10	0,679
LDL (mmol/l)*	2,73 ± 1,05	3,13 ± 0,92	0,125
Trójglicerydy (mmol/l)*	1,34 ± 0,63	1,39 ± 0,54	0,731
MI w wywiadzie, n (%)	8 (11,42)	0	0,140
PCI w wywiadzie, n (%)	67 (95,71)	0	< 0,001
CABG w wywiadzie, n (%)	2 (2,85)	0	0,900
Nadciśnienie tętnicze, n (%)	69 (98,57)	10 (14,28)	< 0,001
Zaburzenia gospodarki lipidowej w wywiadzie, n (%)	60 (85,71)	15 (21,42)	< 0,001
Statyny, n (%)	69 (98,57)	14 (20)	< 0,001
ACEIs, n (%)	69 (98,57)	8 (11,42)	< 0,001
ARBs, n (%)	1 (1,42)	2 (2,85)	0,950
β-blokery, n (%)	60 (85,71)	10 (14,28)	< 0,001
CCBs, n (%)	66 (94,28)	9 (12,85)	< 0,001
Terapia p-platekowa, n (%)	69 (98,57)	0	< 0,001
Dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób sercowo-naczyniowych, n (%)	31 (44,28)	25 (35,70)	0,481
Okres stałego pobytu w Krakowie (lata)*	54,50 ± 16,12	49,89 ± 19,60	0,302

*Zmienne ciągle przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe.

Zmienne nominalne wyrażono w postaci wartości bezwzględnych oraz odsetka (%).

Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: n – liczebność populacji; p – poziom prawdopodobieństwa; CCS – przewlekły zespół wieńcowy (ang. *chronic coronary syndrome*); BMI – wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*); CTK – ciśnienie tętnicze krwi; LDL – lipoproteina o niskiej gęstości (LDL, ang. *low-density lipoprotein*); MI – zawał serca (ang. *myocardial infarction*); PCI – przezskórna angioplastyka wieńcowa (ang. *percutaneous coronary intervention*); CABG – pomostowanie aortalno-wieńcowe (ang. *coronary artery bypass grafting*); ACEIs – inhibitory konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*); ARBs – antagoniści konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin receptor blockers*); CCBs – blokery kanału wapniowego (ang. *calcium channel blockers*).

Drugie pobranie krwi nie było możliwe jedynie u 3 osób, powodami tego faktu były: zgon, odmowa udziału w dalszej części badania oraz utrata kontaktu (uczestnik zmienił adres zamieszkania oraz nie odbierał telefonu). Badane grupy (badawcza z CCS i kontrolna bez CCS) były zbliżone pod względem wieku, płci, BMI, częstość rytmu serca, ciśnienia tętniczego krwi, poziomu LDL-cholesterolu, trójglicerydów oraz obecności dodatniego wywiadu rodzinnego (tab. 4.). Obydwie badane grupy nie różniły się także istotnie w zakresie średniego czasu stałego zamieszkania w Krakowie – odpowiednio 55 lat dla pacjentów z CCS i 50 lat dla osób bez CCS (tab. 4.). W obu grupach uśrednione wartości ciśnienia tętniczego krwi mieściły się w granicach obowiązującej normy, co świadczy o skutecznym leczeniu hipotensyjnym w całej badanej populacji [1]. Z kolei w przypadku średnich stężeń LDL-cholesterolu zarówno w grupie badawczej jak i w grupie kontrolnej wartości te były przekroczone (tab. 4.) [1]. Większość osób z grupy badawczej (z CCS) miała w wywiadzie PCI, dzięki czemu zaawansowana CCS została u tych osób udowodniona (tab. 4.). Ponadto w grupie badawczej – w porównaniu z pacjentami bez CCS – istotnie częściej w wywiadzie występowały nadciśnienie tętnicze oraz zaburzenia gospodarki lipidowej (tab. 4.). Co więcej znamienne częściej osoby z CCS były w trakcie farmakoterapii lekami stosowanymi w leczeniu chorób układu krążenia. Większość z nich przyjmowało co najmniej jednej z następujących leków: inhibitory konwertazy angiotensyny, β -blokery, blokery kanału wapniowego, statyny oraz leki p-płytkowe (tab. 4). Lokalizacja Kliniki Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca UJ CM jest bliska miejscu pobierania próbek PM_{2,5} (ta sama dzielnica Krakowa – Krowodrza).

5.2.2. Analiza sezonowych zmian ekspresji miRNA w badanej populacji

Część wykrytych – w surowicy krwi uczestników badania – cząsteczek miRNA pokrywało się z tymi rodzajami miRNA, które zostały oznaczone w pożywce do hodowli komórkowej otrzymanej po stymulacji ludzkich monocytów próbkami PM_{2,5} (rozdz. 4.1.1.). Do tych miRNA należało pięć cząsteczek: miR-101-3p, miR-223-5p, miR-25-3p, miR-34c-5p, miR-382-5p (tab. 5. i 6.).

W próbkach surowicy krwi pobranych od pacjentów w sezonie zimowym – w porównaniu z próbkami pobranymi w okresie letnim – obserwowano zwiększony poziom ekspresji następujących rodzajów miRNA: miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p i miR-25-3p (tab. 5.). Zwiększona ekspresja miR-382-5p była z kolei obecna w próbkach surowicy pobranych latem (tab. 5.).

Tabela 5. Analiza pomiarów ekspresji miRNA w całej populacji badawczej (n = 140) z podziałem na próbki surowicy krwi pobierane w okresach zimowym oraz letnim.

miRNA	Okres zimowy [x10 ⁻³] n = 140	Okres letni [x10 ⁻³] n = 140	Wartość p
101-3p	55,36 (39,27; 91,68)	38,55 (23,72; 78,23)	0,008
34c-5p	50,29 (32,63; 91,83)	0,25 (0; 2,49)	< 0,001
223-5p	2223,76 (1143,39; 3671,97)	770,57(170,83; 1565,24)	< 0,001
25-3p	111,32 (63,24; 160,15)	90,00 (57,32; 134,62)	0,020
382-5p	1,25 (0,45; 6,25)	20,25 (10,75; 30,36)	< 0,001

Dane wyrażono jako medianę ± rozstęp międzykwartyłowy względnej ekspresji miRNA obliczoną przy użyciu wzoru $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i miR-16-5p jako standardu wewnętrznego.

Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: n – liczebność populacji; p – poziom prawdopodobieństwa.

W próbkach pobranych w okresie zimowym w grupie z CCS (w porównaniu z grupą kontrolną bez CCS) obserwowano zwiększoną ekspresję następujących cząsteczek miRNA: miR-101-3p, miR-34c-5, miR-223-5p i miR-25-3p (tab. 6.).

W próbkach pobranych latem w grupie z CCS (w porównaniu z grupą kontrolną) obserwowano zwiększony poziom ekspresji jedynie dla cząsteczki miR-34c-5p. Nie wykazano znamienych różnic w rozkładzie poziomów ekspresji pozostałych rodzajów miRNA (tab. 6.).

Tabela 6. Analiza pomiarów ekspresji miRNA w próbkach krwi pobranych od pacjentów w okresach zimowym i letnim z uwzględnieniem podziału uczestników badania na poszczególne grupy: z CCS (n = 70) i bez CCS (n = 70).

miRNA	Okres zimowy			Okres letni		
	Grupa badawcza z CCS [x10 ⁻³] n = 70	Grupa kontrolna bez CCS [x10 ⁻³] n = 70	Wartość p	Grupa badawcza z CCS [x10 ⁻³] n = 70	Grupa kontrolna bez CCS [x10 ⁻³] n = 70	Wartość p
101-3p	79,17 (56,00; 112,01)	46,42 (36,72; 65,36)	0,001	48,15 (21,29; 82,81)	33,80 (25,37; 67,59)	0,360
34c-5p	52,14(30,22; 98,83)	39,35 (20,44; 78,54)	0,003	0,20 (0,25; 2,59)	0,08 (0,00; 1,76)	0,001
223-5p	2761,36 (1399,80; 5963,95)	1730,27 (919,81; 2803,06)	0,030	871,32 (177,69; 1660,08)	657,93 (155,29; 1314,94)	0,300
25-3p	84,82 (53,25; 163,23)	122,60 (77,39; 157,07)	0,020	90,78 (48,13; 172,65)	84,67 (65,20; 113,13)	0,570
382-5p	1,20 (0,15; 6,15)	1,19 (0,17;5,99)	0,770	23,61 (11,14; 31,02)	19,25 (9,97; 28,66)	0,640

Dane wyrażono jako medianę ± rozstęp międzykwartyłowy względnej ekspresji miRNA obliczoną przy użyciu wzoru $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i miR-16-5p jako standardu wewnętrznego.

Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: n – liczebność populacji; p – poziom prawdopodobieństwa; CCS – przewlekły zespół wieńcowy (ang. *chronic coronary syndrome*).

5.2.3. Analiza sezonowych zmian stężenia cytokin prozapalnych w badanej populacji

W próbkach surowicy krwi pobranych u wszystkich uczestników badania obserwowano wyższe stężenie IL-8 i MMP-13 w okresie letnim w porównaniu z okresem zimowym (tab. 7.). Poza tym nie wykryto znamienych różnic w rozkładzie stężeń cytokin prozapalnych pomiędzy próbkami krwi pobranymi w okresach zimowym i letnim (tab. 7.).

Tabela 7. Porównanie stężeń cytokin prozapalnych w całej populacja badawczej (n = 140) z podziałem na próbki pobierane w okresach zimowym oraz letnim.

Cytokina	Okres zimowy (pg/ml) n = 140	Okres letni (pg/ml) n = 140	Wartość p
TNF- α	9,40 (7,90; 10,90)	10,15 (8,65; 12,21)	0,352
IL-6	5,72 (4,20; 7,22)	5,72 (4,20; 6,97)	0,051
MMP-9	30397,09 (19000,83; 46474,49)	32281,34 (19913,85; 45301,70)	0,273
MMP-3	13910,96 (11164,94; 21503,35)	17719,69 (11885,72; 27355,28)	0,103
IL-8	14,88 (11,76; 19,53)	15,52 (11,76; 21,86)	0,033
MMP-1	4425,39 (2290,95; 5402,71)	5167,75 (2431,00; 7212,96)	0,197
CCL-2	396,86 (291,15; 548,03)	419,80 (328,47; 557,98)	0,647
IL-1b	7,40 (3,91; 9,08)	7,88 (4,35; 10,75)	0,238
MMP-13	176,80 (96,40; 270,83)	212,55 (96,40; 294,61)	0,031
CCL-3	433,17 (357,75; 479,37)	441,64 (394,68; 512,07)	0,957
CCL-4	698,40 (644,91; 787,51)	759,77 (670,57; 850,93)	0,434
IL-1a	27,37 (25,61; 32,49)	30,81 (23,81; 35,38)	0,084
Progranulina	44246,76 (35939,36; 48881,33)	45189,71 (37453,20; 52703,69)	0,846
IL-23	427,94 (334,56; 489,03)	397,06 (358,12; 489,03)	0,630

Dane wyrażono jako medianę \pm rozstęp międzykwartyłowy stężenia danej cytokiny.

Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: pg/ml – pikogramy/mililitr; p – poziom prawdopodobieństwa; PM_{2,5} – cząsteczki stałe średnicy 2,5 mikrometra (ang. *particulate matter*); TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*); IL – interleukina (ang. *interleukin*); MMP – metaloproteinaza (ang. *matrix metalloproteinase*); CCL – chemokina (ang. *chemokine ligand*).

Zarówno w grupie badawczej (pacjenci z CCS) jak i kontrolnej (pacjenci bez CCS) nie wykryto znamienych różnic w rozkładzie stężeń cytokin prozapalnych pomiędzy próbkami krwi pobranymi w okresie zimowym i letnim (tab. 8.).

Tabela 8. Porównanie stężeń cytokin prozapalnych u pacjentów z CCS (n = 70) i w grupie kontrolnej (n = 70) z uwzględnieniem okresu pobierania próbek krwi od uczestników badania (zima/lato).

Cytokina	Grupa badawcza z CCS (pg/ml)			Grupa kontrolna bez CCS (pg/ml)		
	n = 70			n = 70		
	Okres zimowy	Okres letni	Wartość p	Okres zimowy	Okres letni	Wartość p
TNF- α	9,96 (8,55; 10,90)	10,52 (9,40; 12,40)	0,167	9,02 (7,43; 10,62)	9,02 (7,90; 11,83)	0,908
IL-6	6,22 (4,96; 8,72)	5,72 (4,45; 7,72)	0,933	5,21 (3,69; 6,35)	5,21 (4,07; 5,97)	0,999
MMP-9	37159,46 (22533,34; 53034,86)	35161,79 (31140,99; 50572,57)	0,994	27746,89 (15444,24; 40385,76)	25211,86 (14694,40; 33447,44)	0,949
MMP-3	13910,96 (11692,60; 21165,56)	18292,82 (11812,21; 28958,05)	0,362	13766,43 (9622,82; 22248,23)	16626,63 (11922,50; 27075,26)	0,616
IL-8	15,77 (12,16; 19,96)	16,53 (11,09; 23,20)	0,968	14,63 (11,49; 19,28)	15,39 (12,75; 21,80)	0,782
MMP-1	4312,13 (1839,77; 5418,76)	4638,48 (2387,10; 7277,85)	0,663	4659,13 (2593,08; 5507,46)	5370,62 (2414,74; 7203,88)	0,963
CCL-2	407,90 (310,75; 495,91)	422,77 (332,78; 559,09)	0,666	394,43 (263,06; 596,95)	383,67 (310,67; 556,51)	0,998
IL-1b	7,40 (3,91; 9,08)	7,88 (5,68; 10,75)	0,740	7,40 (3,45; 10,75)	7,40 (3,91; 10,95)	0,998
MMP-13	176,80 (96,40; 246,47)	229,71 (138,53; 278,95)	0,453	176,80 (96,40; 286,78)	212,55 (72,06; 310,27)	1,000
CCL-3	447,85 (356,40; 475,57)	445,79 (392,28; 517,28)	0,737	420,05 (373,51; 495,87)	431,02 (394,66; 494,13)	0,942
CCL-4	704,45 (644,91; 787,51)	765,38 (670,57; 850,93)	0,278	695,36 (618,26; 822,36)	754,11 (667,40; 853,48)	0,545

IL-1a	27,37 (23,81; 31,23)	30,81 (23,81; 37,40)	0,377	28,24 (25,61; 32,91)	29,96 (23,81; 34,35)	0,970
Progranulina	43467,80 (38254,37; 46512,07)	45189,71 (36773,89; 50873,36)	0,470	44882,22 (34477,04; 55640,79)	44718,24 (37514,93; 53094,82)	0,999
IL-23	420,23 (334,56; 489,03)	427,94 (365,95; 519,29)	0,994	427,94 (318,75; 477,64)	389,30 (326,64; 489,03)	0,976

Dane wyrażono jako medianę \pm rozstęp międzykwartyłowy stężenia danej cytokiny.

Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: pg/ml – pikogramy/mililitr; p – poziom prawdopodobieństwa; PM_{2,5} – cząsteczki stałe średnicy 2,5 mikrometra (ang. *particulate matter*); TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*); IL – interleukina (ang. *interleukin*); MMP – metaloproteinaza (ang. *matrix metalloproteinase*); CCL – chemokina (ang. *chemokine ligand*); CCS – przewlekły zespół wieńcowy (ang. *chronic coronary syndrome*).

W próbkach pobranych w okresie letnim obserwowano wyższe stężenie MMP-9 w grupie badawczej (z CCS) w porównaniu z grupą kontrolną (bez CCS) (tab. 9.). Poza tym w próbkach pobranych w okresie zimowym, jak i letnim nie wykryto znamienych różnic w rozkładzie stężeń cytokin prozapalnych w grupie badawczej (z CCS) w porównaniu z grupą kontrolną (bez CCS) (tab. 9.).

Tabela 9. Porównanie stężeń cytokin prozapalnych w próbkach krwi pobranych od pacjentów w okresach zimowym i letnim z uwzględnieniem podziału uczestników badania na poszczególne grupy: z CCS (n = 70) i w grupie kontrolnej (n = 70).

Cytokina	Okres zimowy		Wartość p	Okres letni		Wartość p
	Grupa badawcza z CCS (pg/ml) n = 70	Grupa kontrolna bez CCS (pg/ml) n = 70		Grupa badawcza z CCS (pg/ml) n = 70	Grupa kontrolna bez CCS (pg/ml) n = 70	
TNF- α	9,96 (8,55; 10,90)	9,02 (7,43; 10,62)	0,798	10,52 (9,40; 12,40)	9,02 (7,90; 11,83)	0,277
IL-6	6,22 (4,96; 8,72)	5,21 (3,69; 6,35)	0,225	5,72 (4,45; 7,72)	5,21 (4,07; 5,97)	0,274
MMP-9	37159,46 (22533,34; 53034,86)	27746,89 (15444,24; 40385,76)	0,145	35161,79 (31140,99; 50572,57)	25211,86 (14694,40; 33447,44)	0,011
MMP-3	13910,96 (11692,60; 21165,56)	13766,43 (9622,82; 22248,23)	0,999	18292,82 (11812,21; 28958,05)	16626,63 (11922,50; 27075,26)	0,994
IL-8	15,77 (12,16; 19,96)	14,63 (11,49; 19,28)	0,956	16,53 (11,09; 23,20)	15,39 (12,75; 21,80)	0,999
MMP-1	4312,13 (1839,77; 5418,76)	4659,13 (2593,08; 5507,46)	0,698	4638,48 (2387,10; 7277,85)	5370,62 (2414,74; 7203,88)	0,998
CCL-2	407,90 (310,75; 495,91)	394,43 (263,06; 596,95)	0,999	422,77 (332,78; 559,09)	383,67 (310,67; 556,51)	0,716
IL-1b	7,40 (3,91; 9,08)	7,40 (3,45; 10,75)	0,999	7,88 (5,68; 10,75)	7,40 (3,91; 10,95)	0,923
MMP-13	176,80 (96,40; 246,47)	176,80 (96,40; 286,78)	0,937	229,71 (138,53; 278,95)	212,55 (72,06; 310,27)	0,917
CCL-3	447,85 (356,40; 475,57)	420,05 (373,51; 495,87)	0,999	445,79 (392,28; 517,28)	431,02 (394,66; 494,13)	0,976

CCL-4	704,45 (644,91; 787,51)	695,36 (618,26; 822,36)	0,998	765,38 (670,57; 850,93)	754,11 (667,40; 853,48)	0,999
IL-1a	27,37 (23,81; 31,23)	28,24 (25,61; 32,91)	0,812	30,81 (23,81; 37,40)	29,96 (23,81; 34,35)	0,949
Progranulina	43467,80 (38254,37; 46512,07)	44882,22 (34477,04; 55640,79)	0,944	45189,71 (36773,89; 50873,36)	44718,24 (37514,93; 53094,82)	0,989
IL-23	420,23 (334,56; 489,03)	427,94 (318,75; 477,64)	0,971	427,94 (365,95; 519,29)	389,30 (326,64; 489,03)	0,713

Dane wyrażono jako medianę \pm rozstęp międzykwartylowy stężenia danej cytokiny.

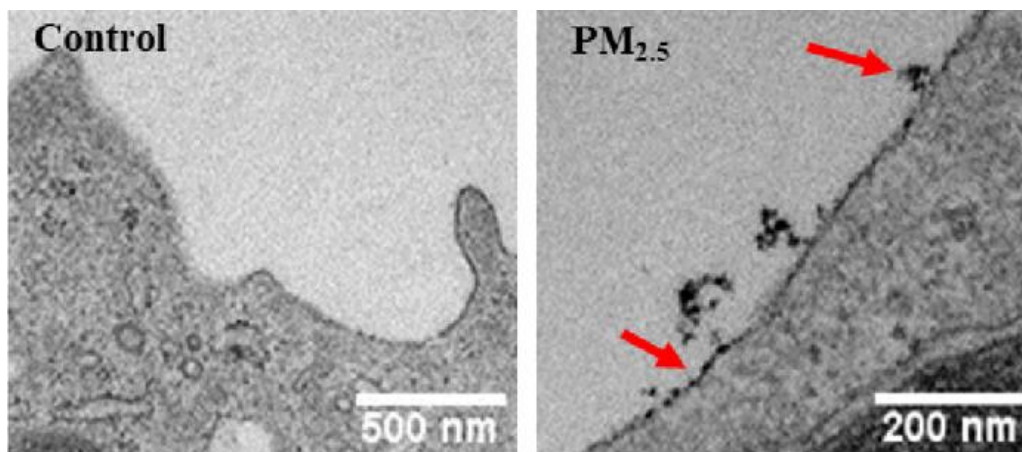
Przyjęto poziom istotności statystycznej na poziomie $\alpha = 0,05$.

Użyte testy statystyczne zostały opisane w rozdziale 4.4. Analiza statystyczna.

Skróty: pg/ml – pikogramy/mililitr; p – poziom prawdopodobieństwa; PM_{2,5} – cząsteczki stałe średnicy 2,5 mikrometra (ang. *particulate matter*); TNF- α – czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*); IL – interleukina (ang. *interleukin*); MMP – metaloproteinaza (ang. *matrix metalloproteinase*); CCL – chemokina (ang. *chemokine ligand*); CCS – przewlekły zespół wieńcowy (ang. *chronic coronary syndrome*).

5.3. Obserwacja ludzkich monocytów (inkubowanych z próbkami PM_{2,5}) za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego

Zawiesinę ludzkich monocytów z pożywką do hodowli komórkowej poddano działaniu próbkami PM_{2,5} w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ (o znanym składzie i pochodzeniu), które zostały pobrane w okresie zimowym (rozd. 4.2.2.). Przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego zaobserwowano proces fagocytozy cząsteczek PM_{2,5} przez monocyty, a także związane z tym zmiany w ich wewnątrzkomórkowej morfologii (ryc. 16. i 17.). Ekspozycja monocytów na dimetylosulfotlenek jako kontrolę nie wiązała się z żadnymi uchwytymi w mikroskopie elektronowym skutkami biologicznymi.

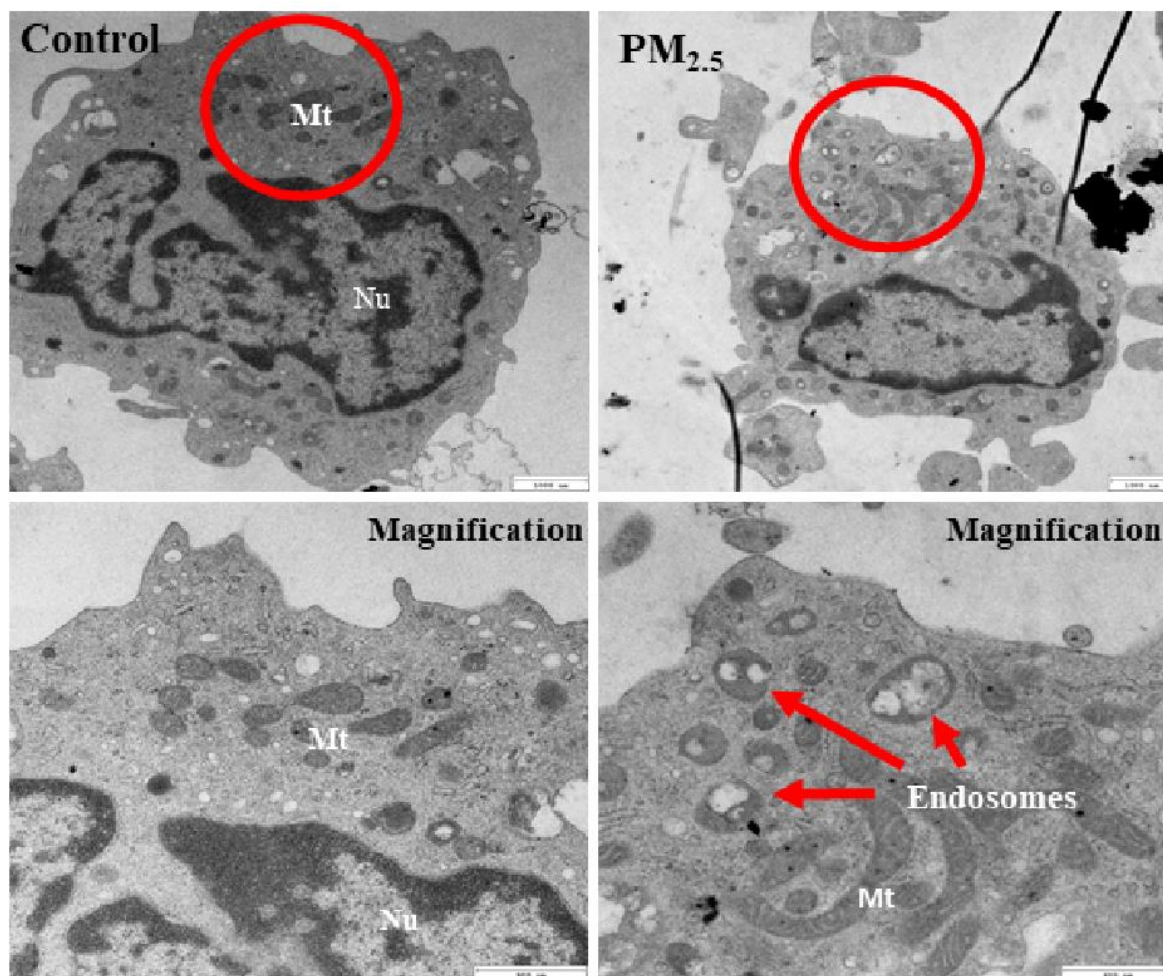


Rycina 16. Zaobserwowany w transmisyjnym mikroskopie elektronowym proces fagocytozy cząsteczek $PM_{2.5}$ (próbki zebrane w okresie zimowym) przez ludzkie monocyty.

Legenda: Zdjęcie po lewej stronie przedstawia błonę komórkową monocytów po ekspozycji na DMSO (brak widocznej aktywności). Na zdjęciu po prawej stronie widoczne jest nagromadzenie cząsteczek $PM_{2.5}$ (czerwone strzałki) w błonie komórkowej monocytów co wskazuje na zjawisko fagocytozy tych cząsteczek przez monocyty.

Komórki wysiano w gęstości 20 tys. komórek/studzienkę na membranach Thermanox wysterylizowanych z użyciem promieniowania ultrafioletowego (o długości fali 100–280 nm) w 12-studzienkowych płytkach do hodowli komórkowych.

Skróty: $PM_{2.5}$ – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*); DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethylsulfoxide*); nm – nanometry.



Rycina 17. Zaobserwowane w transmisyjnym mikroskopie elektronowym zmiany morfologii wewnątrzkomórkowej ludzkich monocytów po sfagocytowaniu cząstek PM_{2.5} (próbki zebrane w okresie zimowym).

Legenda: Zdjęcia po lewej stronie (kontrola) obrazują ekspozycję monocytów na DMSO, która nie powoduje widocznych zmian struktur wewnątrzkomórkowych. Na zdjęciach po prawej stronie widoczna jest akumulacja endosomów/fagolizosomów (czerwone strzałki) w cytoplazmie monocytów po sfagocytowaniu cząstek PM_{2.5}.

Komórki wysiano w gęstości 20 tys. komórek/studzienkę na membranach Thermanox wysterylizowanych z użyciem promieniowania ultrafioletowego (o długości fali 100–280 nm) w 12-studzienkowych płytkach do hodowli komórkowych.

Skróty: PM_{2.5} – cząsteczki stałe o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*); DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethylsulfoxide*); Mt – mitochondria; Nu – jądro komórkowe.

5.4. Analiza sezonowych zmian składu chemicznego zebranych w Krakowie próbek PM_{2,5}

5.4.1. Pomiar sezonowych zmian stężenia PM_{2,5}

W tabeli nr 10 przedstawiono – pochodzące z analizy grawimetrycznej – stężenia PM_{2,5} uśrednione dla okresów tygodniowych. W okresie pobierania próbek średnie stężenia PM_{2,5} w powietrzu w Krakowie były znamienne wyższe w okresie zimowym w porównaniu analogicznie długotrwałym (50 dni) okresem latem (odpowiednio $47 \pm 24 \mu\text{g}/\text{m}^3$ i $18 \pm 5 \mu\text{g}/\text{m}^3$; $p = 0,010$).

Tabela 10. Stężenie PM_{2,5} w próbkach pyłu pobranych w okresach tygodniowych w sezonach zimowym i letnim.

Okres zimowy	PM _{2,5} (μg/m ³)	Okres letni	PM _{2,5} (μg/m ³)
03.01–10.01.2018	34,32	05.06–12.06.2017	16,37
11.01–21.02.2018	34,81	13.06–21.06.2017	19,24
22.01–28.01.2018	86,26	22.06–29.06.2017	17,81
29.01–05.02.2018	31,12	30.06–07.07.2017	18,93
06.02–14.02.2018	59,36	08–15.07.2017	20,94
15.02–21.02.2018	45,39	16.07–23.07.2017	18,41

Dane wyrażono jako średnia ± odchylenie standardowe.

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki pyłu zawieszonego o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*), μg/m³ – mikrogram/metr sześcienny.

5.4.2. Analiza składu pierwiastkowego i pomiar sezonowych zmian stężenia wykrytych pierwiastków

W pobranych próbkach PM_{2,5} zbadano (osobno dla okresu zimowego i letniego) zawartość 16 pierwiastków (tab. 11.). W skład analizowanych pierwiastków wchodziły: chlor (Cl), potas (K), wapń (Ca), tytan (Ti), wanad (V), chrom (Cr), mangan (Mn), żelazo (Fe), nikiel (Ni), miedź (Cu), cynk (Zn), brom (Br), stront (Sr), rubid (Rb), arsen (As) i ołów (Pb).

Tabela 11. Średnie stężenia wybranych pierwiastków w analizowanej frakcji aerozoli atmosferycznych PM_{2,5} z okresów zimowego i letniego.

Pierwiastek	Stężenie (ng/m ³)		Wskaźnik Z/L*
	Okres zimowy (Z)	Okres letni (L)	
Cl	1390 ± 890	< pd	nd
K	394 ± 180**	654 ± 410	0,60
Ca	< pd	230 ± 200	nd
Ti	15 ± 5	17 ± 3	0,87
Cr	6 ± 1	8 ± 3	0,76
Mn	13,11 ± 4,50	9,92 ± 4,30	1,32
Fe	203 ± 140	88 ± 45	2,30
Ni	3,62 ± 1,10	2,84 ± 0,60	1,30
Cu	8 ± 5	5,11 ± 2,50	1,55
Zn	107 ± 70	46 ± 30	2,32
Br	17 ± 10	3 ± 1	5,55
Rb	1,90 ± 0,80	1,60 ± 0,40	1,23
Sr	3,85 ± 0,7	1,09 ± 0,40	3,79
Pb	26 ± 17	12 ± 6	2,28

Dane wyrażono jako średnia ± odchylenie standardowe.

* Wskaźnik Z/L (stosunek stężenia pierwiastka w zimie do stężenia latem) wyliczono ze średnich stężeń.

** Wykryto tylko w jednej próbce.

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki pyłu zawieszonego o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*), ng/m³ – nanogram/metr sześcienny; < pd – poniżej progu detekcji; nd – nie dotyczy.

5.4.3. Analiza zawartości jonów nieorganicznych i pomiar sezonowych zmian stężenia wybranych jonów

W pobranych próbkach pyłu zbadano stężenie 8 jonów. Wśród nich znalazły się: sód (Na⁺), potas (K⁺), magnez (Mg²⁺), wapń (Ca²⁺), amon (NH₄⁺), azotan (NO₃⁻), chlorek (Cl⁻) i siarczan (SO₄²⁻). Średnie stężenia analizowanych jonów uzyskane dla próbek filtrów pobranych w okresach letnim i zimowym przedstawia tabela nr 12.

Tabela 12. Średnie stężenia wybranych jonów w analizowanej frakcji aerozoli atmosferycznych PM_{2,5} z okresów zimowego i letniego.

Jon	Stężenie (ng/m ³)		Wskaźnik Z/L*
	Okres zimowy (Z)	Okres letni (L)	
Li ⁺	0,34 ± 0,17	0,01 ± 0,002	32
Na ⁺	1700 ± 300	240 ± 34	7,22
NH ₄ ⁺	5670 ± 2700	1600 ± 430	3,54
Mg ²⁺	280 ± 25	240 ± 22	1,14
K ⁺	280 ± 74	150 ± 20	1,80
Ca ²⁺	580 ± 140	520 ± 140	1,12
NO ₂ ⁻	52 ± 12	50 ± 25	1,04
NO ₃ ⁻	5400 ± 2600	502 ± 160	11
SO ₄ ²⁻	6328 ± 2600	1593 ± 1380	3,97
PO ₄ ³⁻	2093 ± 680	134 ± 30	15,60
Cl ⁻	2147 ± 1400	112 ± 60	19

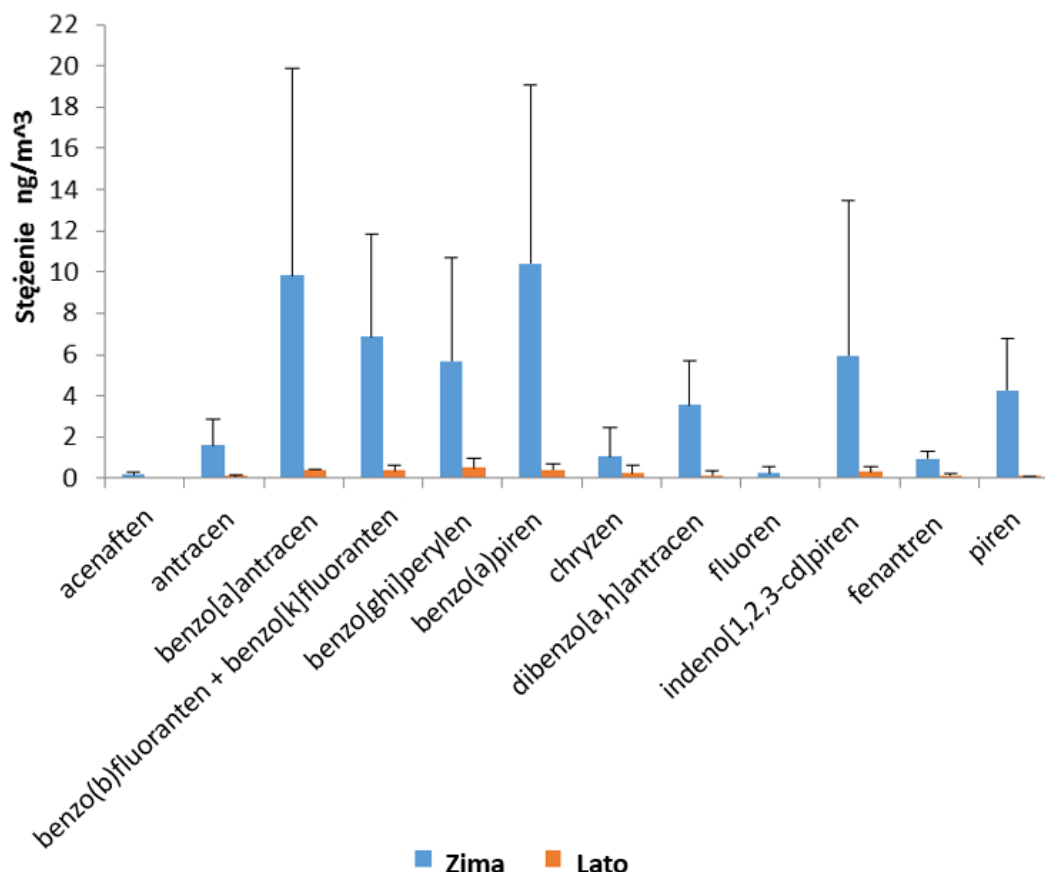
Dane wyrażono jako średnia ± odchylenie standardowe.

* Wskaźnik Z/L (stosunek stężenia jonu w zimie do stężenia latem) wyliczono ze średnich stężeń

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki pyłu zawieszonego o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*), ng/m³ – nanogram/metr sześcienny.

5.4.4. Analiza zawartości określonych PAHs i pomiar sezonowych zmian stężenia wybranych węglowodorów

W pobranych próbkach PM_{2,5} zbadano stężenie 12 różnych PAHs (ryc. 18.).



Rycina 18. Wykres ramka-wąsy przedstawiająca średnie stężenia analizowanych PAHs w okresach zimowym i letnim.

Dane wyrażono jako średnia (ramki) \pm odchylenie standardowe (wąsy).

Skróty: PAHs – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (ang. *polycyclic aromatic hydrocarbons*); ng/m³ – nanogram/metr sześcienny.

5.4.5. Oznaczenie całkowitej zawartości węgla z podziałem na węgiel pierwiastkowy i organiczny

W pobranych próbkach pyłu oceniono także (osobno dla okresu zimowego i letniego) zawartość węgla pierwiastkowego (EC, ang. *elemental carbon*) i organicznego (OC, ang. *organic carbon*) (tab. 13.).

Tabela 13. Średnia zawartość węgla pierwiastkowego i organicznego w analizowanych próbkach PM_{2,5} z okresów zimowego i letniego.

Zawartość węgla	Stężenie (ng/m ³)		Wskaźnik Z/L*
	Okres zimowy (Z)	Okres letni (L)	
OC	19060 ± 10000	4210 ± 860	4,52
EC	2910 ± 1300	690 ± 230	4,22

Dane wyrażono jako średnia ± odchylenie standardowe.

* Wskaźnik Z/L (stosunek stężenia związku węgla w zimie do stężenia latem) wyliczono ze średnich stężeń.

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki pyłu zawieszonego o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*); ng/m³ – nanogram/metr sześcienny; OC – węgiel organiczny (ang. *organic carbon*); EC – węgiel pierwiastkowy (ang. *elemental carbon*).

6. DYSKUSJA

Wyniki licznych opublikowanych dotąd badań wskazują, że zachowanie zdrowia zależy od wielu czynników. Należą do nich m.in. styl życia, uwarunkowania genetyczne i funkcjonowanie systemu ochrony zdrowia. Coraz bardziej docenianym elementem jest także wpływ środowiska zewnętrznego, ze szczególnym uwzględnieniem szeroko pojętego zanieczyszczenia środowiska naturalnego [133] [134]. Akcenty dotyczące promocji zdrowia i profilaktyki chorób z obszaru medycznego, przenoszą się częściowo na przestrzeń gospodarczą i społeczną, w tym także dotyczącą jakości środowiska naturalnego. Jednak podczas gdy nadal zwraca się szczególną uwagę na właściwą kontrolę klinicznych czynników ryzyka chorób cywilizacyjnych i zmianę stylu życia, to czynniki środowiskowe, takie jak jakość powietrza, często są wciąż ignorowane zarówno przez pracowników ochrony zdrowia jak i samych pacjentów. Dzieje się tak pomimo tego, że wpływ zanieczyszczenia środowiska (w tym powietrza) na zdrowie człowieka oraz zmiany klimatyczne są z naukowego punktu widzenia udowodnione i niepodważalne.

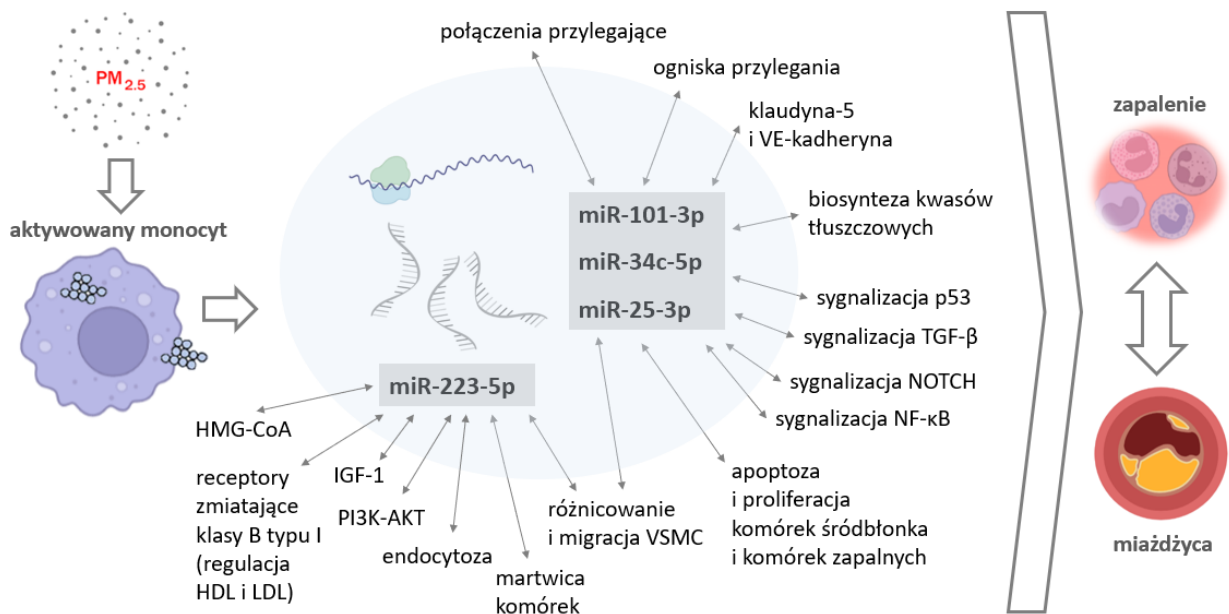
Monocyty mają udokumentowany wpływ na różne etapy aterogenezy, jednak ich funkcja jako mediatora tego procesu u ludzi eksponowanych na zanieczyszczenie powietrza pozostaje niejasna. Niewiele badań oceniało zmiany ekspresji miRNA w odpowiedzi na zanieczyszczenie środowiska, a jeszcze mniej dotyczyło narażenia na PM, w tym PM_{2,5} [121] [122] [129] [131]. Podobnie wciąż zbyt mało jest analiz dotyczących wpływu ekspresji poszczególnych rodzajów miRNA na aktywność prozapalną i aterogenną monocytów [124] [125] [128]. W niniejszej pracy wykazano, że ekspozycja monocytów krwi obwodowej na sezonowo pobierane próbki PM_{2,5} (o znanym składzie chemicznym i pochodzeniu) doprowadziła do istotnych zmian w poziomach ekspresji różnych cząsteczek miRNA. Wykazano istotne różnice pomiędzy poziomami ekspresji wybranych cząsteczek miRNA w hodowli komórkowej po stymulacji PM_{2,5} zebranych w sezonie zimowym z porównaniem z okresem letnim. Zmiana ekspresji tych samych rodzajów miRNA w zawiesinie monocytów oraz w próbkach surowicy krwi pobranej od mieszkańców Krakowa może potencjalnie wskazywać na udział monocytów w produkcji cząsteczek miRNA pod wpływem PM_{2,5}. W surowicy krwi pobranej od pacjentów (stałych mieszkańców Krakowa) poziom ekspresji kilku analizowanych cząsteczek miRNA (miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p, miR-25-3p) był istotnie wyższy w okresie zimowym (kiedy stężenia PM_{2,5} były zdecydowanie większe) w porównaniu z sezonem letnim. Zaobserwowano jednak także, że niektóre rodzaje miRNA

mają poziom ekspresji znamienne wyższy w surowicy krwi pobranej w okresie letnim. Dotyczyło to jednakże niewielu cząsteczek (miR-382-5p) i może być związane z zakłócającym wpływem alergenów (vide poniżej). Żeby wyeliminować wpływ innego ważnego czynnika zakłócającego, jaki może stanowić obecność komórek bakterii lub ich fragmentów, w badanych próbkach PM_{2,5} oceniono obecność LPS. Ta endotoksyna, będąca koniecznym składnikiem błony komórkowej bakterii jest także potencjalnym aktywatorem monocytów (rozdz. 4.2.3.). Wzrost poziomów ekspresji określonych cząsteczek miRNA (miR-101-3p, miR-34c-5, miR-223-5p i miR-25-3p) w okresie zimowym u pacjentów z CCS w porównaniu z grupą kontrolną sugeruje, że osoby z CCS są bardziej podatne na negatywne skutki kliniczne zanieczyszczenia powietrza. Jednak, aby udowodnić tę hipotezę, potrzebne są kolejne badania.

Praca doktorska wskazała 4 potencjalne rodzaje miRNA (miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p i miR-25-3p) jako cząsteczki biorące udział w odpowiedzi monocytów na PM_{2,5} – wskutek zarówno ekspozycji w eksperymencie na komórkach, jak i wskutek przewlekłego narażenia mieszkańców Krakowa. Na podstawie analizy dostępnych danych z literatury, wybrano kilka szlaków biologicznych wiążących zwiększoną ekspresję wymienionych rodzajów miRNA z rozwojem stanu zapalnego i progresją miażdżycy. Dotyczą one m.in. biosyntezy kwasów tłuszczowych, sygnalizacji p53, martwicy komórek oraz połączeń międzykomórkowych (gł. ognisk przylegania i połączeń przylegających) (ryc. 19.) [135].

Połączenia przylegające są ważnymi strukturami subkomórkowymi odpowiedzialnymi m.in. za połączenia międzykomórkowe komórek śródbłonna naczyń. Badania opisujące wpływ zakażenia HIV (ludzki wirus nabytego niedoboru odporności, ang. *human immunodeficiency virus*) na komórki śródbłonna ujawniły, że zwiększona ekspresja miR-101-3p może powodować obniżenie poziomu kładyny-5 i VE-kadheryny, czyli białek regulujących połączenie przylegające [136]. W innym badaniu powiązано obniżony poziom VE-kadheryny z neowaskularyzacją, która zaburza integracje sąsiadujących komórek błony wewnętrznej, co może mieć znaczenie w patogenezie miażdżycy [137]. Eksperymentalnie wykazano także, że ekspresja mi-R101-3p wpływa na kontrolę apoptozy i proliferacji komórek śródbłonna [138]. Procesy te mogą być determinowane poprzez regulowanie dioksygenazy tet-metylocytozyny 2, która wpływa na wytwarzanie ROS i jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB, ang. *nuclear factor kappa B*) a także może indukować dysfunkcję śródbłonna [139]. Wreszcie, miR-101-3p może regulować poziom p53 – innego kluczowego białka w patogenezie nie tylko niektórych nowotworów, ale także miażdżycy [140] [141]. W modelu zwierzęcym wykazano, że obniżenie poziomu p53 w komórkach mięśni gładkich naczyń (VSMCs, ang. *vascular smooth muscle cells*) zwiększa tworzenie podosomów

i migrację komórek zapalnych, a także przyspiesza rozwój blaszki miażdżycowej [142]. Jednak w innej obserwacji opisano ochronny wpływ białka p53 na komórki śródbłonna i ograniczanie rozwoju miażdżycy poprzez hamowanie podziału oraz nasilenie apoptozy monocytów i makrofagów [143]. Wyjaśnienie roli białka p53 w patogenezie miażdżycy wymaga dalszych badań.



Rycina 19. Możliwe szlaki powiązań pomiędzy aktywowanymi przez PM_{2.5} monocytami a rozwojem zapalenia śródbłonna i blaszki miażdżycowej (szczegółowy opis w tekście).

Źródło: opracowanie własne.

Skróty: PM_{2.5} – cząsteczki pyłu zawieszonego o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*); HMG-CoA-syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A; HDL-lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. *high – density lipoprotein*); LDL-lipoproteina o niskiej gęstości (LDL, ang. *low-density lipoprotein*); IGF-1 – receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. *insulin-like growth factor 1*); PI3K-AKT – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu i kinaza białkowej AKT; VSMCs – komórki mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*); TGF-β – transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor β*); NF-κB – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (ang. *nuclear factor kappa B*).

Innym możliwym powiązaniem pomiędzy ekspresją wybranych cząsteczek miRNA a rozwojem blaszki miażdżycowej może być sygnalizacja NOTCH, która jest ważnym systemem komunikacji międzykomórkowej w większości komórek zwierzęcych. Bierze także udział w kontroli proliferacji i różnicowania komórek. W blaszce miażdżycowej szlak sygnałowy NOTCH jest powiązany z podziałem makrofagów oraz funkcjami komórek

śródbłonna [144] [145]. NOTCH może sprzyjać progresji miażdżycy poprzez wpływ na poziom limfocytów Th i CD8. Chociaż nie ma bezpośrednich dowodów na udział poszczególnych miRNA w sygnalizacji NOTCH w miażdżycy, to eksperymenty na komórkach HeLa (linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy) wykazały, że miR-34c-5p może mieć bezpośredni wpływ na szlak NOTCH 1 [146]. Ponadto inna analizowana w niniejszej pracy doktorskiej cząsteczka miRNA (miR-25-3p) może modulować sygnalizację NOTCH w komórkach gwiaździstych wątroby poprzez wpływ na TGF- β . Zwiększony poziom ekspresji miR-25-3p hamuje zarówno TGF- β jak receptor typu 1 dla tej cząsteczki (TGFB1) [147].

W pracy doktorskiej wykazano zwiększony poziom ekspresji miR-34c-5p w ludzkich monocytach stymulowanych próbkami PM_{2,5} zebranymi w okresie zimowym, a także w surowicy ludzkiej pobranej od uczestników badania w sezon zimowym. Udział tych cząsteczek miRNA w rozwoju miażdżycy u ludzi nie był jak dotąd szerzej badany, ale w jednej z dostępnych, eksperymentalnych analiz w modelu zwierzęcym wykazano, że poziom ekspresji miR-34c był zwiększony w ścianie tętnic wskutek ich ostrego uszkodzenia. Jednym ze skutków zwiększonej ekspresji miR-34c było skrócenie przeżycia i ograniczenie migracji VSMCs [148]. Możliwe, że podobne wyniki będziecie można zaobserwować także u ludzi.

Wykazano dotąd, że zwiększona ekspresja cząsteczek miR-25 jest związana z wieloma różnymi procesami na poziomie komórkowym, takimi jak różnicowanie, proliferacja, migracja i apoptoza komórek, odpowiedź na stres oksydacyjny i stan zapalny. miR-25 biorą udział nie tylko w rozwoju różnych stadiów miażdżycy, ale także w patogenezie niedokrwienia mięśnia sercowego i HF, przerostu lewej komory, cukrzycy, astmy oskrzelowej i chorób neurodegeneracyjnych. Cząsteczki miR-25 są również dobrze opisanymi onkogennymi rodzajami miRNA, odgrywającymi ważną rolę w rozwoju wielu typów nowotworów, w tym mózgu, płuc, piersi, jajnika, prostaty, tarczycy, przełyku, żołądka, jelita grubego oraz raka wątrobowokomórkowego [135] [123] [149].

Należy zauważyć, że poszczególne rodzaje miRNA mogą wiązać i regulować dużą liczbę informacyjnego RNA (mRNA, ang. *messenger RNA*). Zmiana ekspresji pojedynczej cząsteczki miRNA może mieć zatem różny wpływ na poszczególne szlaki sygnalizacji komórkowej w zależności od rodzaju tkanki [138]. Przykładem takiego rodzaju miRNA analizowanego w niniejszej pracy była cząsteczka miR-223-5p, której poziom ekspresji był istotnie zwiększony zarówno w zawieszynie ludzkich monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM_{2,5} pobrane w okresie zimowym, jak i w surowicy krwi pobranej od stałych mieszkańców Krakowa w sezonie zimowym. Co więcej ekspresja miR-223-5p była istotnie większa u pacjentów z CCS (grupa badawcza) w porównaniu z osobami bez CCS (grupa

kontrolna). Wykazano dotąd związek pomiędzy zwiększoną ekspresją cząsteczek miR-223-5p a uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym w modelu mysim [150]. W ciągu godziny od ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego ekspresja miR-223-5p wzrosła ponad dwukrotnie. Co ciekawe, pomimo że zwiększona ekspresja cząsteczek miR-223-5p indukuje proces zapalny i martwicę kardiomiocytów, to związana jest również z poprawą funkcji mięśnia sercowego po ostrym niedokrwieniu [150]. Poziom ekspresji cząsteczek miR-223-5p badano również w komórkach mikrogleju u szczurów w oparciu o model uszkodzenia rdzenia kręgowego [151]. Ekspresja cząsteczek miR-223-5p była zwiększona w mikrogleju typu M1 i obniżona w komórkach typu M2. Komórki M1 i M2 mikrogleju funkcjonalnie odpowiadają wspomnianym powyżej subpopulacjom monocytów/makrofagów. Hamowanie ekspresji miR-223-5p *in vitro* ograniczało odpowiedź zapalną komórek M1 – w tym syntazę tlenu azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*) – i nasilało odpowiedź zapalną komórek M2 mikrogleju. Zmniejszenie poziomu ekspresji cząsteczek miR-223-5p hamowało odpowiedź zapalną i podnosiło poziom neureguliny-1 (NRG-1, ang. *neuregulin 1*) redukując aktywność mikrogleju i ograniczając apoptozę neuronów [151]. Jak dotąd nie udało się ustalić znaczenia zwiększonej ekspresji tej konkretnej nici (5p) miR-223 w procesie aterogenezy. Przegląd aktualnego piśmiennictwa wykazał, że ostatnie badania skupiały się przede wszystkim na zagadnieniu globalnej ekspresji miR-223 lub samej nici 3p (miR-223-3p). Potencjalnym celem uchwytu cząsteczek miR-223 są także receptory zmiatające klasy B typu I, które pośredniczą w wychwytywaniu lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL, ang. *high-density lipoprotein*) w wątrobie, ale także kontrolują poziom cholesterolu w osoczu poprzez endocytozę bogatych w cholesterol lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, ang. *low-density lipoprotein*). MiR-223 hamują geny zaangażowane w syntezę cholesterolu, takie jak sterol-C4-metylooksydaza i syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA) [152] [153]. W innym z badań eksperymentalnych wykazano, że cząsteczki miR-223 (wydzielane między innymi przez leukocyty krwi obwodowej) hamują migrację i proliferację VSMCs, a także nasilają apoptozę tych komórek poprzez bezpośredni wpływ na receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1, ang. *insulin-like growth factor 1*) i dalej na szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K-AKT) [154].

W patogenezę chorób układu sercowo-naczyniowego wywołanych przez zanieczyszczenie powietrza są zaangażowane co najmniej 3 niezależne procesy. Poza bezpośrednim wpływem poszczególnych składników PM (zwłaszcza PM_{2,5}) i aktywacją układu współczulnego (w tym zmniejszenie HRV i wzrost częstości tachyarytmii komorowych, co podnosi ryzyko nagłego zgonu sercowego) kluczowe znaczenie ma odpowiedź zapalna

mediowana m.in. przez cytokiny prozapalne [155] [156] [157] [158] [159] [160] [161] [162] [163] [164]. W opublikowanych dotąd badaniach u osób przewlekle narażonych na zanieczyszczenie powietrza obserwowano podwyższone stężenie limfocytów, mastocytów i cytokin prozapalnych w tkance płucnej, a także podwyższone stężenie leukocytów i trombocytów w krążeniu ogólnoustrojowym. Obserwowano ponadto wzrost poziomu endoteliny-1, obniżenie stężenia śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS; ang. *endothelial nitric oxide synthase*), wzrost stężenia cyklooksygenazy 2 (COX-2; ang. *cyclooxygenase-2*), czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor α*) i interleukiny 6 (IL-6, ang. *interleukin-6*) w modelu mysim [159]. Narażenie na zanieczyszczenie powietrza zwiększa również krzepliwość krwi i liczbę trombocytów [160]. Wzrost liczby płytek we krwi krążącej wynika zarówno bezpośrednio z przewlekłej ekspozycji na drobne cząsteczki pyłu zawieszonego (PM_{2,5} i mniejsze) jak i pośrednio z wpływu mediatorów stanu zapalnego (uwolnionych z komórek układu odpornościowego – zarówno w tkanki płucnej jak i krwi obwodowej – w tym monocytów i makrofagów) aktywowanych na skutek kontaktu ze stałymi i gazowymi składowymi zanieczyszczenia powietrza. Jak wspomniano we wstępie niniejszej monografii, stan zapalny śródbłonka jest ważnym czynnikiem rozwoju blaszki miażdżycowej, zaś monocyty, jako jedne z kluczowych komórek wpływających na ten proces, po swojej aktywacji wydzielają liczne substancje, w tym cytokiny prozapalne. W związku z tym – poza badaniem ekspresji miRNA – dokonano także analizy poziomów wybranych cytokin zapalnych – produkowanych przez monocyty. W przypadku większości z nich nie zaobserwowano jednak istotnych różnic w rozkładzie stężeń pomiędzy okresami zimowym i letnim oraz pomiędzy grupą badawczą (z CCS) i kontrolną (bez CCS). Brak znamiennych różnic poziomów cytokin prozapalnych dotyczył nie tylko surowicy krwi pobranej od stałych mieszkańców Krakowa, ale także zawiesiny ludzkich monocytów poddanych ekspozycji na cząsteczki PM_{2,5}. Wynika to najpewniej ze zbyt małej liczebności próby przy stosunkowo dużym – większym niż założony podczas szacowania minimalnej liczebność próby – rozrzucie stężeń poszczególnych cytokin. Dotyczyło to zwłaszcza części eksperymentalnej badania, w której z uwagi na zakładaną międzyosobniczą zmienność fenotypową monocytów, pobrano krew jedynie od 3 zdrowych ochotników. Brak znamiennych różnic w stężeniach cytokin prozapalnych może także świadczyć o obecności innych niż związane z tymi cytokinami szlaków metabolicznych i endokrynych, poprzez które aktywowane monocyty wpływają na rozwój stanu zapalnego w śródbłonku naczyniowym oraz progresję blaszki miażdżycowej. Ta interesująca – różna od zakładanej – obserwacja wymaga dalszych badań. W kolejnym planowanym – jako bezpośrednia kontynuacji omawianej pracy – projekcie dotyczącym innych komórek

fagocytarnych – neutrofilów, określenie minimalnej liczebności próby będzie się opierało na doświadczeniach uzyskanych w niniejszej analizie. W klinicznej części badania (w analizie przeprowadzonej dla wszystkich 140 pacjentów bez podziału względem kryterium jakim była obecność CCS) obserwowano istotnie wyższe stężenie IL-8 i MMP-13 w okresie letnim w porównaniu z okresem zimowym. Ponadto w okresie letnim zaobserwowano znamienne większy poziom MMP-9 w grupie badawczej (z CCS) w porównaniu z grupą kontrolną (bez CCS). Obserwacja ta jest odwrotna od założeń, w których spodziewano się wyższego stężenia cytokin prozapalnych w surowicy krwi pobranej od pacjentów w sezonie zimowym, z uwagi na skład i stężenie PM_{2,5} (vide poniżej). Może to wynikać m.in. z obecności różnych alergenów unoszących się w atmosferze, zwłaszcza pyłków roślin, na które ludzie narażeni są szczególnie w okresie wiosenno-letnim. Choć pyłki roślin mają przeciętnie większe rozmiary niż cząsteczki PM_{2,5} (ryc. 1.) to już poszczególne białka antygenowe wchodzące w skład cząsteczek pyłku roślinnego mogą osadzać się na powierzchni PM i niezależnie od antropogenicznych składników zanieczyszczenia powietrza stymulować odpowiedź zapalną [20]. Spostrzeżenia te zostaną wzięte pod uwagę we wspomnianych planowanych dalszych badaniach nad wpływem zanieczyszczenia powietrza na rozwój miażdżycy, będących kontynuacją niniejszego projektu.

Najważniejszym zadaniem komórek fagocytarnych pozostaje usuwanie drobnoustrojów, wybranych ksenobiotyków oraz zużytych i uszkodzonych fragmentów własnych tkanek. Choć wiele komórek w organizmie człowieka jest zdolnych do fagocytozy, to w największym stopniu są za to odpowiedzialne neutrofile i monocyty. Co więcej, monocyty – poza różnymi receptorami nieimmunologicznymi (przede wszystkim mannozowymi i fosfolipidowymi) – posiadają w błonie komórkowej receptory dla fragmentu Fc przeciwciał klasy G (IgG, ang. *immunoglobulin G*) i składnika C3 dopełniacza. Dzięki temu są zdolne do fagocytozy immunologicznej, która jest znacznie wydajniejsza. Fagocytoza obejmuje kilka etapów, których końcowym efektem jest zamknięcie otoczonej cząsteczki wewnątrzcytoplazmny w fagosomie, w którym po połączeniu z lizosomem (powstanie fagolizosomu) dochodzi do wewnątrzkomórkowej enzymatycznej degradacji pochłoniętych substancji. Po utworzeniu fagolizosomu wzmagają się metabolizm komórki z aktywacją oksydazy NADPH (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) i zwiększonym zużyciem tlenu. Poza enzymami lizosomalnymi monocyty wykształciły także inne mechanizmy wewnątrzkomórkowego niszczenia drobnoustrojów i obcych cząsteczek. Należy do nich przede wszystkim układ związany z generowaniem ROS, działający zarówno niezależnie, jak i zależnie od mieloperoksydazy (MPO). W omawianej pracy doktorskiej aktywność fagocytarna oraz zmiana morfologii wewnątrzkomórkowej monocytów po ekspozycji na

cząsteczki PM_{2,5} została zaobserwowana w mikroskopie elektronowym (ryc. 16. i 17.). Zmiany w komórkach obejmowały wzmożoną endocytozę w wyniku wytwarzania wypukłości makropinocytotycznych i fagocytarnych zamykających się nad materiałem fagocytarnym (cząsteczkami PM_{2,5}). Doprowadziło to w kolejnym etapie do szybkiej akumulacji endosomów i fagolizosomów w cytoplazmie monocytów (ryc. 17.). Zmian takich nie zaobserwowano w kontroli podczas inkubacji z dimetylosulfotlenkiem (DMSO, ang. *dimethylsulfoxide*). Obserwacja ta może potwierdzać jedną z hipotez postawionych w niniejszej pracy, mianowicie że cząsteczki miRNA wykryte w zawieszynie ludzkich monocytów (inkubowanych z próbkami PM_{2,5}) pochodziły z aktywowanych w ten sposób monocytów. Ludzkie monocyty stanowią więc jedne z komórek wydzielających miRNA i cytokiny prozapalne po kontakcie z cząsteczkami PM_{2,5} i w związku z tym mogą odgrywać ważną rolę w rozwoju stanu zapalnego i progresji miażdżycy u osób narażonych na zanieczyszczenie powietrza.

Jak opisano we wstępie, PM stanowi złożoną mieszaninę nie tylko pierwotnych cząsteczek (gł. sadzy), ale także wtórnych cząsteczek (np. różnych związków węgla organicznego) i aerozoli zawierających m. in. siarczany i azotany. Te poszczególne substancje chemiczne mogą oddziaływać na organizm człowieka (w tym leukocyty, tkankę płucną i śródbłonek naczyń krwionośnych) poprzez różne mechanizmy, zarówno pośrednio, jak bezpośrednio. W celu dokładnego określenia składu i stężenia poszczególnych związków w próbkach PM_{2,5} (zebranych w Krakowie latem 2017 r. i zimą 2018 r.) przeprowadzono kompleksową, wieloskładnikową charakterystykę próbek PM_{2,5} (tab. 11–14, ryc. 18.). W pobranych w okresie zimowym próbkach poza stężeniem PM_{2,5} przeanalizowano stężenia 16 pierwiastków, 8 jonów nieorganicznych, 12 PAHs oraz EC i OC. W próbkach PM_{2,5} zebranych w okresie zimowym średnie stężenia PM_{2,5}, niektórych pierwiastków (Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr i Pb), jonów (SO₄²⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, Cl⁻, Li⁺, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ i Mg²⁺), określonych PAHs (przede wszystkim benzo[a]pirenu, benzo[a]antracenu, benzo[b]- i benzo[k]fluorantenu, indeno[1,2,3-cd]pirenu, pirenu i dibenzo[a,h]antracenu) oraz EC i OC były wyższe niż w próbach pobranych w sezonie letnim. Udział całkowitego węgla w masie PM_{2,5} wyniósł 27% w okresie letnim 47% w sezonie zimowym, przy czym frakcja węglowa powstaje głównie w wyniku spalania węgla i biomasy [18] [77] [72] [67]. Wszystko to może tłumaczyć zwiększoną ekspresję wybranych rodzajów miRNA (zarówno w eksperymencie jak i części klinicznej badania) w okresie zimowym oraz zwiększoną aktywność fagocytarną monocytów (inkubowanych z próbkami PM_{2,5} pobranymi w sezonie zimowym) zaobserwowaną w mikroskopie elektronowym.

Średnie stężenie PM_{2,5} dla próbek pobranych w okresie letnim 2017 r. wynosiło 18

$\mu\text{g}/\text{m}^3$, co odpowiada dobrej jakości powietrza obserwowanej w całym okresie pobierania próbek, często obserwowanej o tej porze roku (tab. 11.). Natomiast w sezonie zimowym 2018 r. zaobserwowano spodziewaną znacznie większą zawartość frakcji $\text{PM}_{2,5}$ w lokalnej atmosferze ze średnimi wartościami stężenia $\text{PM}_{2,5}$ wynoszącymi $47 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (tab. 11.). Wskazuje to na istotnie gorszą jakość powietrza w okresie grzewczym w Krakowie w kontekście przewlekłego narażenia stałych mieszkańców. Wartości te istotnie przekraczały „bezpieczne” poziomy $\text{PM}_{2,5}$ określone przez WHO, EEA oraz zatwierdzoną przez polskie ustawodawstwo Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/50/WE (rozdz. 2.4.).

Dostępne dane literaturowe wskazują, że analizowane pierwiastki mogą uczestniczyć w rozwoju i progresji miażdżycy poprzez tworzenie reaktywnych form tlenu i azotu, które następnie wpływają na ekspresję określonych genów (w tym miRNA) oraz zwiększają stężenie cytokin, chemokin i innych mediatorów stanu zapalnego, prowadząc w ten sposób do uszkodzenia białek, kwasów nukleinowych i lipidów [165] [166] [167] [20] [28]. Stężenia analizowanych pierwiastków (w odniesieniu do ich sumy) wahały się od 1,09 (nie licząc Cl, którego stężenie było poniżej progu detekcji dla zastosowanej metody) do $654 \text{ ng}/\text{m}^3$ latem i od 1,90 do $1390 \text{ ng}/\text{m}^3$ (nie licząc Ca, którego stężenie było poniżej progu detekcji dla zastosowanej metody) w próbkach zimowych (tab. 12). Wskaźnik zima/lato (Z/L) obliczony dla każdego analizowanego pierwiastka wahał się od 0,60 (K) do 5,55 (Br). Stężenia następujących pierwiastków były wyższe w próbkach zebranych zimą w porównaniu z okresem letnim: Cl, Fe, Zn, Br, Sr i Pb. Stężenia K, Ca, Ti i Cr były wyższe w próbach letnich niż zimowych. Podobne stężenia w okresach letnim i zimowym zaobserwowano dla pierwiastków Mn, Ni, Cu, Rb. Głównym źródłem tych pierwiastków może być pył glebowy i powtórnie zawieszony pył uliczny [168]. Stężenie Fe, Zn, Pb, Sr w próbkach zimowych było ponad dwukrotnie wyższe niż w próbkach zebranych w sezonie letnim. Źródłem Pb i Br w okresie zimowym może być spalanie węgla [169]. Zimą stężenie Br było ponad 5-krotnie wyższe niż latem. Dodatkowe źródło Br istnieje zimą. Latem stężenia Br i Pb oscylowały wokół naturalnych poziomów tych pierwiastków. Obecność zwiększonych poziomów Fe, Zn i Sr może wskazywać na udział spalania węgla [170]. Inne źródło Fe i Zn stanowi przemysł stalowy (zakład taki znajduje się we wschodniej, przemysłowej części Krakowa). Najbardziej prawdopodobnym źródłem Cl (o znacznie większym stężeniu w próbkach zimowych) jest utrzymanie chodników i dróg w okresie zimowym (odladzanie), chociaż spalanie węgla i inne emisje komunalne również mogą wprowadzać Cl do lokalnej atmosfery [168] [171] [172]. K i Ca były obecne głównie w frakcji letniej $\text{PM}_{2,5}$. K jest wskaźnikiem spalania biomasy. W związku z tym zaobserwowano wyższą koncentrację tego pierwiastka w okresie zimowym (w sezonie letnim potas wykryto

tylko w jednej próbce) (tab. 12) [18] [77].

Zmierzone stężenia SO_4^{2-} , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , Cl^- , Li^+ i Na^+ były znacznie wyższe zimą niż latem (tab. 13.). Stosunek Z/L wahał się dla tych jonów w przedziale od 3,54 do 32. Wysoka koncentracja wymienionych jonów nieorganicznych w okresie zimowym wynika głównie ze spalania węgla kamiennego i brunatnego do produkcji energii, szczególnie intensywnego w południowej Polsce (w samym Krakowie znajduje się duża elektrociepłownia – rozdz. 2.4.). Głównym antropogenicznym źródłem NO_3^- w otaczającym powietrzu jest spalanie paliw kopalnych w pojazdach silnikowych oraz w procesach przemysłowych, zwłaszcza w energetyce. Źródłem PO_4^{3-} w okresie zimowym może być także spalanie biomasy [18] [77].

Średnie stężenia analizowanych PAHs były, jak zakładano, znacznie wyższe w próbach $\text{PM}_{2,5}$ pobranych w okresie zimowym (ryc. 18.). Jak wspomniano, dotyczyło to przede wszystkim: benzo[a]pirenu, benzo[a]antracenu, benzo[b]- i benzo[k]fluorantenu, indeno[1,2,3-cd]pirenu, pirenu i dibenzo[a,h]antracenu. Za główne źródła PAHs w Krakowie uważa się zanieczyszczenia związane z ruchem drogowym i działalnością przemysłową. Dodatkowo sprzyjające warunki meteorologiczne często występujące w Krakowie, szczególnie niska temperatura, mała prędkość wiatru i niska wilgotność względna wymuszają akumulację i adsorpcję związków organicznych na powierzchni PM [71]. Toksyczność PAHs jest związana m. in. z różnymi funkcjami receptora dla węglowodorów arylowych (AhR, ang. *aryl hydrocarbon receptor*). Z uwagi na wielość aktywności transkrypcyjnej AhR istnieje pula genów (w tym także miRNA), poprzez które jego ligandy mogą wywoływać różne skutki biologiczne, takie jak indukcja stanu zapalnego, dysfunkcja śródbłonna, rozwój komórek piankowatych, wzrost gotowości prozakrzepowej i zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Istnieje szereg dobrze udokumentowanych negatywnych skutków sercowo-naczyniowych związanych z AhR, co podkreśla ważną rolę tego receptora w patogenezie chorób układu krążenia [173] [174] [175]. Specyficzne badania z PAHs na modelach zwierzęcych wskazują bezpośrednią kardiotoxycywność benzo[a]pirenu, który może wywoływać wzrost ciśnienia tętniczego i przyspieszać rozwój miażdżycy [175]. Co ważne, negatywne oddziaływanie PAHs na układ krążenia nie jest ograniczone jedynie do benzo[a]pirenu, bowiem podobny wpływ odnotowano również dla pirenu i fenantrenu. W jednej z analiz eksperymentalnych zidentyfikowano 8 rodzajów miRNA (przede wszystkim miRNA-29b, miRNA-26a-1 oraz miRNA-122), które były związane ze specyficzną odpowiedzią szlaków metabolicznych – związanych z genotoksycznością – na ekspozycję na benzo[a]piren. Wymienione cząsteczki miRNA biorą udział w regulacji cyklu komórkowego, sygnalizacji związanej z apoptozą komórek oraz reakcji na procesy uszkodzenia i naprawy

DNA [176].

Wykazane w niniejszej pracy różnice składu chemicznego próbek $PM_{2,5}$, zebranych w okresach zimowym i letnim, są związane z różnymi źródłami emisji zanieczyszczenia powietrza w Krakowie. W ich ocenie szczególnie ważne okazują się analizy izotopowe rezerwuaru węgla obecnego we frakcjach PM, połączone z obliczeniami bilansu izotopowego i masowego [70]. Pozwalają one na identyfikację gł. źródeł węgla (spalanie węgla kamiennego, emisje biogeniczne w tym spalanie biomasy oraz emisje związane z transportem) a także kwantyfikację ich sezonowej zmienności. Dominujące źródła węgla w Krakowie stanowią latem emisje biogeniczne oraz emisje związane z ruchem drogowym (łącznie 92,6%), zaś zimą – niska emisja związana ze spalaniem węgla (54,3%) [70]. Udział źródeł emisji dwutlenku węgla (CO_2) związanych ze spalaniem węgla kamiennego latem wynosi zaledwie 7,2% i prawdopodobnie dotyczy gł. źródeł przemysłowych. Emisje komunikacyjne stanowią 40,3%, zaś emisje biogeniczne 52,3%. Tak wysoki udział węgla biogenicznego jest najprawdopodobniej związany z aktywnością biosfery (emisją lotnych związków organicznych), która pełni rolę prekursora dla wtórnych aerozoli organicznych. Podział źródeł emisji zmienia się w Krakowie znacznie w okresie zimowym. Dominującym źródłem frakcji węglowej $PM_{2,5}$ zimą staje się spalanie węgla (54,3%). Drugie co do wielkości źródło stanowią emisje biogeniczne spowodowane gł. spalaniem biomasy (drewna i produktów drzewnych). Emisje z transportu drogowego stanowią jedynie ok. 8,6% całkowitej frakcji węglowej $PM_{2,5}$ w okresie grzewczym [70]. Dane te pokrywają się z Raportem KOBiZE, w którym wykazano, że zasadniczym źródłem emisji $PM_{2,5}$ w wymiarze krajowym są źródła związane ze spalaniem paliw kopalnych do produkcji energii (84% całkowitej emisji $PM_{2,5}$), w tym głównie ze spalaniem węgla kamiennego i drewna w gospodarstwach domowych (49%) – niska emisja [177] [178].

Przedstawione w ramach pracy doktorskiej badanie ma kilka ograniczeń. Żadne badanie epidemiologiczne nie może udowodnić jednoznacznie związku przyczynowo-skutkowego, jednak zbliżone wyniki badań prowadzonych w wielu miejscach o różnym klimacie i warunkach meteorologicznych wyraźnie sugerują obecność takiego związku pomiędzy umieralnością a krótko- i długoterminową ekspozycją na zanieczyszczenie powietrza [62] [66]. Biorąc pod uwagę ciągłą zmienność przestrzenną i czasową zanieczyszczenia powietrza (w tym codzienne przemieszczanie się pyłów przez liczne zróżnicowane lokalne mikrośrodowiska), ocena narażenia zawsze będzie podlegała różnym błędom pomiarowym. Wspomniana zmienność stężeń zanieczyszczenia powietrza powoduje, że w przypadku dużej części populacji miejskiej ocena narażenia oparta o stężenia typowe dla tła miejskiego może skutkować niedoszacowaniem wpływu $PM_{2,5}$ na zdrowie. Uogólnianie wyników na inne

populacji niż docelowa jest ograniczone, ponieważ zbadano jedynie grupę długoletnich mieszkańców Krakowa, w którym poziom zanieczyszczenia powietrza i jego skład chemiczny mogą się różnić od innych środowisk zarówno dużych miast jak i w szczególności terenów mniej zurbanizowanych. Dodatkowym problemem jest fakt, że uczestników badania zrekrutowano wśród pacjentów oddziału szpitalnego o określonej charakterystyce diagnostyczno-leczniczej (kardiologia). Były to zatem w większości osoby obciążone chorobami przewlekłymi, w dodatku sprofilowanymi na te związane z układem sercowo-naczyniowym (szczególnie w grupie pacjentów z CCS). Z kolei monocyty do części eksperymentalnej badania uzyskano od osób zdrowych. Kryterium wyłączenia z części klinicznej badania była cukrzyca, co – jak wspomniano – znacznie utrudniło rekrutację populacji badawczej (pacjenci z CCS), z uwagi na to, że stany te często współistnieją. Aż u 20–30% chorych CCS towarzyszy cukrzyca, zaś wśród pozostałych 80–70% pacjentów obserwuje się często stany przedcukrzycowe takie jak nieprawidłowa glikemia na czczo i nieprawidłowa tolerancja glukozy. Sama tylko cukrzyca aż 2-krotnie zwiększa ryzyko wystąpienia CAD [179] [180] [181] [182]. Z drugiej strony wykluczenie tak powszechnie występującej w krajach rozwiniętych choroby jaką stanowi cukrzyca, istotnie ogranicza przenoszenie uzyskanych w badaniu wyników na tę liczną i ważną klinicznie grupę pacjentów.

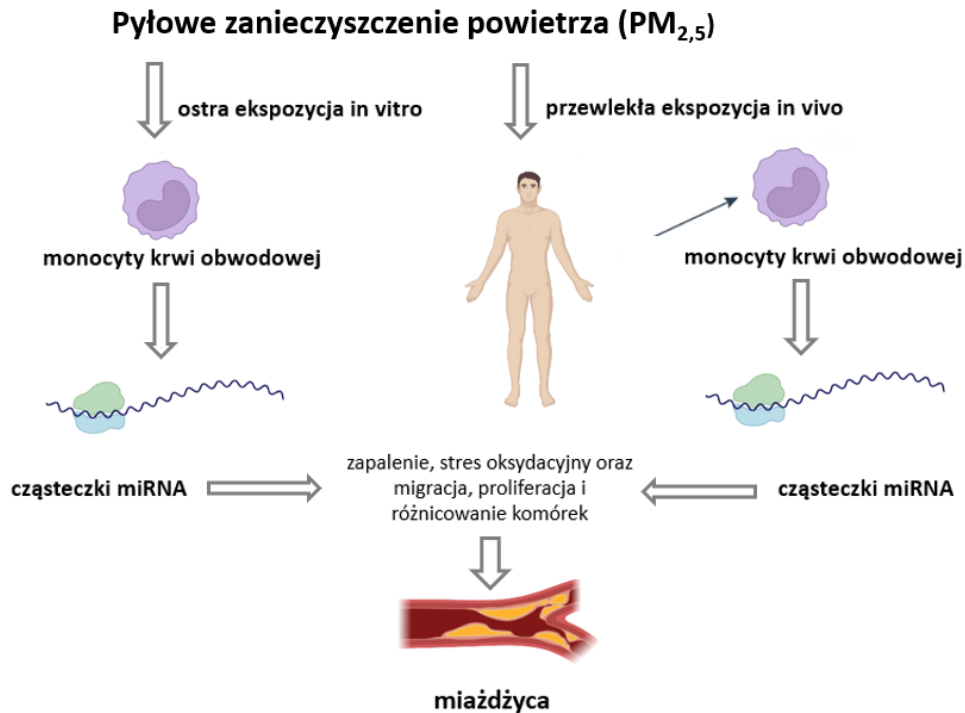
Część z ograniczeń badania jest związana z podejściem eksperymentalnym opartym na uproszczonym modelu, w którym wykorzystano przesiewowo pobrane próbki krwi do oceny odpowiedzi ludzkich monocytów na ekspozycję $PM_{2,5}$. Pomimo zaobserwowanej ekspresji niektórych analogicznych rodzajów miRNA w częściach eksperymentalnej i klinicznej badania, interpretacja tych wyników jest bardziej skomplikowana u ludzi niż w warunkach *in vitro*. Ograniczenie to podnoszone jest także we wcześniej cytowanych pracach. Po pierwsze organizm człowieka poddawany jest szeregowi różnych czynników wpływających nie tylko na monocyty, ale także na inne komórki układu odpornościowego. Po drugie, ludzie są również narażeni na szereg alergenów unoszących się w atmosferze (przede wszystkim pyłków roślin), gazowych zanieczyszczenia powietrza, roztoczy oraz inne mikroorganizmów, które mogą modyfikować poziom i rodzaj odpowiedzi immunologicznej a także wpływać ilościowo i jakościowo na poziom ekspresji poszczególnych rodzajów miRNA oraz na stężenia cytokin prozapalnych. Bioaerozole (np. endotoksyny, bakterie i ich fragmenty, wirusy, pyłki roślin czy zarodniki grzybów) znajdują się głównie w frakcji większych cząsteczek PM, chociaż zarówno LPS, jak i białka antygenowe cząsteczek pyłku roślinnego mogą osadzać się także na powierzchni cząsteczek $PM_{2,5}$ [20]. Ponadto, choć monocyty do części eksperymentalnej badania pozyskano od zdrowych ochotników (niebędących stałymi mieszkańcami Krakowa) to

jednak bardzo trudno precyzyjnie określić wpływ zanieczyszczenia powietrza, na jakie byli narażeni w swoim stałym miejscu zamieszkania oraz podczas okresowych pobytów w Krakowie. Innymi słowy, pozyskane monocyty przed poddaniem ich ekspozycji na zebrane próbki $PM_{2,5}$ nie były pozbawione wcześniejszego – mniej lub bardziej długotrwałego – wpływu zanieczyszczenia powietrza o niesprecyzowanym składzie. Badanie przeprowadzono w taki sposób, żeby – na ile było to możliwe przy obecnych ograniczeniach metodologicznych i organizacyjnych – wykluczyć lub przynajmniej istotnie ograniczyć wpływ czynników zakłócających. Przede wszystkim dotyczyło to palenia tytoniu, zawodowego narażenia na pyły oraz ostrych i przewlekłych chorób zapalnych i autoimmunologicznych (w tym cukrzyca), które mogą zmieniać poziomy ekspresji wielu rodzajów miRNA i stężenia cytokin prozapalnych, niezależnie od bezpośredniego wpływu samego $PM_{2,5}$ (rozdz. 4.1.1.). MiRNA są cząsteczkami specyficznymi tkankowo. Badanie makrofagów i komórek dendrytycznych obecnych w blaszkach miażdżycowych byłoby najpewniej bardziej reprezentatywne niż ocena monocytów krwi krążącej. Jednak pozyskanie przyżyciowo wspomnianych, specyficznych tkankowo komórek nie jest możliwe z oczywistych względów. Krew obwodowa stanowi natomiast bezpieczny i stosunkowo łatwy do pozyskania materiał do badań. Co więcej w przytaczanych wcześniej publikacjach, stan zapalny i proces aterogenezy zostały powiązane przede wszystkim z leukocytami krwi obwodowej, nie można więc bezpośrednio porównać tych modeli badawczych z wynikami potencjalnych eksperymentów z wykorzystaniem innych rodzajów tkanek. Poza wymienionymi ograniczeniami, możliwa jest także nieprecyzyjna ocena czasu i miejsca przewlekłej ekspozycji na $PM_{2,5}$ poszczególnych uczestników klinicznej części badania. Częściowo nie sposób tego uniknąć przy założonej metodologii badania oraz limitach organizacyjnych i finansowych. Informacje dotyczące stałego pobytu w Krakowie zbierane były na podstawie wywiadu z pacjentami. Wywiad ten dotyczył wielu lat wstecz i ograniczony był przez procesy pamięciowe tych osób. Trudny do oceny jest także wpływ krótkoterminowej zmiany stałego pobytu na przestrzeni lat. Może to prowadzić do niedoszacowania lub, co mniej prawdopodobne, przeszacowania niektórych skutków zdrowotnych wynikających z narażenia na zanieczyszczenie powietrza. Otwartym pozostaje pytanie czy i jak duży mogło to mieć wpływ na zakłócenie uzyskanych w badaniu wyników. $PM_{2,5}$ zbierano tylko w jednej dzielnicy Krakowa (Krowodrza). Założono w koniecznym uproszczeniu, że pozwoliło to na uzyskanie materiału reprezentacyjnego dla całego miasta (rozdz. 4.2.2). Należy jednak brać pod uwagę, że stężenia $PM_{2,5}$ (jak i innych składowych zanieczyszczenia powietrza) prawdopodobnie różnią się w poszczególnych lokalizacjach Krakowa. Wyższe stężenia $PM_{2,5}$ obserwuje się zapewne we wschodniej przemysłowej części miasta, z drugiej strony należy uwzględnić zarówno

krótko- jak i długoterminowe przemieszczanie się mas powietrza (wraz z zanieczyszczeniami) w obrębie Krakowa i jego okolic. Trzeba tu także zwrócić uwagę na specyficzną lokalizację miasta otoczonego przez liczne miejscowości obciążające Kraków tzw. niską emisją, szczególnie w sezonie grzewczym.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska wskazuje na negatywny związek pomiędzy stężeniem pyłu zawieszonego $PM_{2,5}$ (stanowiącego gł. składnik zanieczyszczenie powietrza) a zdrowiem ludzi (ryc. 20.). W monografii tej wskazano, że ekspozycja ludzkich monocytów krwi obwodowej na cząsteczki $PM_{2,5}$ może przyczyniać się do rozwoju stanu zapalnego, stresu oksydacyjnego oraz miażdżycy (ryc. 20.). Wyniki pracy doktorskiej pozwoliły przybliżyć mechanizmy leżące u podstaw ogólnoustrojowego wpływu $PM_{2,5}$ na progresję chorób układu krążenia oraz pokazać, że $PM_{2,5}$ może być istotnym czynnikiem zwiększającym ryzyko sercowo-naczyniowe zarówno w wyniku ekspozycji krótkoterminowej, jak i przewlekłego narażenia. Niniejsze badanie poszerza także wiedzę na temat epigenetyki i etiopatogenezy CAD. Zmiana ekspresji niektórych cząsteczek miRNA w monocytach w części eksperymentalnej badania oraz sezonowe zmiany profilu miRNA w ludzkiej surowicy krwi sugerują, że monocyty mogą brać udział w rozwoju miażdżycy także w wyniku ekspozycji na cząsteczki $PM_{2,5}$ (ryc. 20.). Jak wykazano w bieżącej monografii, niektóre miRNA mogą uczestniczyć w poszczególnych etapach aterogenezy. Opisywane w pracy zmiany w ekspresji miRNA mogą zmieniać się w zależności od składu chemicznego $PM_{2,5}$, dlatego wyniki uzyskane w biologicznej części projektu poparto wieloskładnikową charakterystyką zebranych próbek $PM_{2,5}$. Uznano, że odkrycia te mogą stanowić argument wskazujący na potrzebę prowadzenia kolejnych badań mających na celu przybliżanie mechanizmów leżących u podstaw ogólnoustrojowego wpływu zanieczyszczenia powietrza na układ sercowo-naczyniowy człowieka. Jako kontynuację badania, w kolejnym etapie zaplanowano próbę określenia roli w tych procesach innych komórek immunologicznych – w pierwszej kolejności neutrofilii, z uwagi na ich licznosc w populacji leukocytów krwi obwodowej oraz duże zdolności do fagocytozy. Rodzaje miRNA, względem których zaobserwowano istotną różnicę poziomów ekspresji w próbkach pobranych zimą jedynie częściowo pokrywają się z cząsteczkami miRNA, których związek wykazano dotąd (zebrane dane literaturowe) z procesem zapalnym, dysfunkcją śródbłonna i aterogenezą. Świadczyć to może o tym, że w patogenezie miażdżycy bierze udział więcej rodzajów miRNA niż dotąd sądzono. Wyjaśnienie tego fenomenu wymaga dalszych prospektywnych eksperymentów i obserwacji porównawczych. Cząsteczki miRNA mogą stanowić nowy cel terapeutyczny dla proliferacyjnych chorób naczyniowych, takich jak miażdżycy rozwijająca się *de novo*,

restenoza po PCI, waskulopatia po CABG, arteriopatia transplantacyjna czy udar mózgu. U wszystkich uczestników klinicznej części badania ekspresja cząsteczek miR-34c-5p i miR-223-5p była istotnie wyższa po ekspozycji na próbki PM_{2,5} zebrane w okresie zimowym. Sugeruje to, że mogą one w przyszłości posłużyć jako potencjalne markery narażenia na zanieczyszczenie powietrza, które jest ważnym modyfikowalnym czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego.



Rycina 20. Podsumowanie kluczowych etapów oceny wpływu zanieczyszczenia powietrza (PM_{2,5}) na rozwój blaszki miażdżycowej u ludzi, przeprowadzanych w niniejszej pracy.

Źródło: opracowanie własne.

Skróty: PM_{2,5} – cząsteczki pyłu zawieszonego o średnicy 2,5 μm (ang. *particulate matter*); miRNA – mikroRNA.

7. WNIOSKI

1. Wykazano zwiększoną ekspresję miRNA po stymulacji próbkami PM_{2,5} zebranych w sezonie zimowym dla cząsteczek miR-34c-5p, miR-101-3p, miR-494-3p, miR-548d-5p, miR-223-5p, miR-130a-3p i miR-339-3p (w porównaniu z komórkami niestymulowanymi) oraz dla cząsteczek miR-34c-5p, miR-101-3p, miR-21-3p, miR-25-3p i miR-1290 (w porównaniu ze stymulacją próbkami PM_{2,5} zebranych w okresie letnim). Wymienione rodzaje miRNA mogą stanowić część odpowiedzi układu odpornościowego na kontakt z cząsteczkami PM_{2,5}. Potencjalna rola tych miRNA w procesach rozwoju zapalenia i patogenezie miażdżycy – oceniona na podstawie dostępnej literatury (rozdz. 6.) – może wskazywać także na niekorzystny wpływ PM_{2,5} na zdrowie człowieka, przy czym efekt ten jest większy pod wpływem ekspozycji na próbki zebrane w okresie zimowych, kiedy stężenie PM_{2,5} było wyższe (vide poniżej pkt. 6.).

Nie zaobserwowano natomiast znamienych różnic w rozkładzie stężeń cytokin prozapalnych. Wynika to najpewniej ze zbyt małej liczebności próby przy stosunkowo dużym – większym niż zakładano – rozrzucie stężeń poszczególnych cytokin. Może to jednak również świadczyć o obecności innych – niż związane z tymi cytokinami – szlaków metabolicznych i endokrynych, poprzez które aktywowane monocyty wpływają na rozwój stanu zapalnego w śródbłonku naczyniowym oraz progresję blaszki miażdżycowej. Wymaga to dalszych badań w tym zakresie.

2. Wykazano zwiększoną ekspresję cząsteczek miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p i miR-25-3p w próbkach surowicy krwi pobranych od uczestników badania w okresie zimowym. Może to być spowodowane gorszą jakością powietrza w sezonie zimowym (w tym wyższymi stężeniami PM_{2,5}), zwłaszcza że koreluje to z wnioskami płynącymi w części eksperymentalnej badania (vide powyżej pkt. 1. oraz poniżej pkt. 6.).

Wykazano ponadto wyższe stężenie IL-8 i MMP-13 w próbkach surowicy krwi pobranych latem od stałych mieszkańców Krakowa (w porównaniu z okresem zimowym), natomiast nie zaobserwowano występowania znamienych różnic w rozkładzie stężeń pozostałych analizowanych cytokin prozapalnych. Wynika to najpewniej ze zbyt małej liczebności próby przy stosunkowo dużym – większym niż zakładano – rozrzucie stężeń poszczególnych cytokin. Wyższe stężenia IL-8 i MMP-13

w letnich próbkach surowicy mogą wynikać z obecności różnych alergenów unoszących się w atmosferze, zwłaszcza pyłków roślin, na które ludzie narażeni są szczególnie w okresie wiosenno-letnim.

3. Wykazano zwiększoną ekspresję cząsteczek miR-101-3p, miR-34c-5, miR-223-5p i miR-25-3p w próbkach surowicy krwi pobranych od osób z CCS w okresie zimowym (w porównaniu z osobami bez CCS). Sugeruje to, że osoby z CCS są bardziej podatne na negatywne skutki kliniczne zanieczyszczeń powietrza.
4. Wykazano powtarzalność części wzorców miRNA (miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p, miR-25-3p i miR-382-5p) – związanych z procesem zapalnym i rozwojem miażdżycy – zarówno w eksperymencie jak i w klinicznej części badania. Świadczy to o udziale monocytów w produkcji wymienionych rodzajów miRNA pod wpływem PM_{2.5}. Zebrane dane z piśmiennictwa mogą wskazywać na udział tych cząsteczek miRNA w szlakach molekularnych aterogenezy (rozdz. 6.).
5. Zaobserwowano w mikroskopie elektronowym wzmożoną aktywność fagocytarną monocytów w preparatach przygotowanych z zawiesiny komórek stymulowanych próbkami PM_{2.5} zebranymi w okresie zimowym w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (brak uchwytnych zmian w morfologii monocytów) co może świadczyć o tym, że cząsteczki miRNA – których wzrost ekspresji zaobserwowano w okresie zimowym (vide powyżej pkt. 1–2.) – są produkowane i wydzielane przez monocyty.
6. Stężenia PM_{2.5} były wyższe w okresie zimowym w porównaniu z sezonem letnim. Dotyczyło to także innych analizowanych składowych zanieczyszczenia powietrza: pierwiastków (Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr i Pb), jonów nieorganicznych (SO₄²⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, Cl⁻, Li⁺, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ i Mg²⁺), PAHs (przede wszystkim benzo[a]pirenu, benzo[a]antracenu, benzo[b]- i benzo[k]fluorantenu, indeno[1,2,3-cd]pirenu (vide powyżej pkt. 1. oraz poniżej pkt. 6.), pirenu i dibenzno[a,h]antracenu) oraz EC i OC. Pogorszenie jakości powietrza w sezonie zimowym w Krakowie koreluje z wynikami uzyskanymi w omówionych powyżej pkt. 1–3. oraz 5.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020; 41(3): 407 – 477.
2. Brook RD, Newby DE, Rajagopalan S, et al. Air pollution and cardiometabolic disease: an update and call for clinical trials. *Am J Hypertens*. 2017; 31: 1 – 10.
3. Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe.
4. The World health statistics report 2021 – Monitoring Health for the SDGs.
5. WHO 2021 global air quality guidelines: particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide.
6. Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the Air: A Review of the Effects of Particulate Matter Air Pollution on Human Health. *J Med Toxicol*. 2012; 8: 166 – 173.
7. Lee BJ, Kim B, Lee K. Air Pollution Exposure and Cardiovascular Disease. *Toxicol Res*. 2014; 30(2): 71 – 75.
8. Du Y, Xu X, Chu M. Air particulate matter and cardiovascular disease: the epidemiological, biomedical and clinical evidence. *J Thorac Dis*. 2016; 8(1): E8 – E19.
9. Air quality in Europe – 2020 European Environment Agency (EEA) report.
10. Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002; 287: 1132 – 1141.
11. Dockery DW, Pope CA, Xu X, et al. An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Engl J Med*. 1993; 329: 1753 – 1759.
12. Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, et al. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 Project. *Epidemiology*. 2001; 12: 521 – 531.
13. Goldberg MS, Burnett RT, Bailar JC, et al. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ Health Perspect*. 2001; 109 (suppl 4): 487 – 494.
14. Pope CA. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect*. 2000; 108: 713 – 723.
15. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 2002; 19(360): 1233 – 42.
16. Kim SY, Pope AC, Marshall JD, et al. Reanalysis of the association between reduction in long-term PM_{2.5} concentrations and improved life expectancy. *Environ Health*. 2021; 20(1): 02.
17. Konduracka E. A link between environmental pollution. *Rev Environ Health*. 2019; 34(3): 227 – 233.

18. Samek L, Stegowski Z, Furman L, et al. Quantitative Assessment of PM_{2.5} Sources and Their Seasonal Variation in Krakow. *Water Air and Soil Pollution*. 2017; 11: 228(8).
19. Samek L, Zwoździak A, Sówka I. Chemical characterization and source identification of particulate matter PM₁₀ in a rural and urban site in Poland. *Environmental Protection Engineering*. 2013; 4: 91 – 103.
20. Brook RD, Franklin B, Cascio W, et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004; 109: 2655 – 2671.
21. Sówka I, Zwoździak A, Trzepla-Nabagło K, et al. PM_{2.5} elemental composition and source apportionment in a residential area of Wrocław, Poland. *Environmental Protection Engineering*. 2012; 38(1): 73 – 79.
22. Samek L. Source apportionment of the PM₁₀ fraction of particulate matter collected in Kraków, Poland. *NUKLEONIKA*. 2012; 57(4): 601 – 606.
23. Pant P, Baker S, Shukla A, et al. The PM₁₀ fraction of road dust in the UK and India: Characterization, source profiles and oxidative potential. 2015; 530 – 531: 445 – 452.
24. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA III, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010; 121: 2331 – 2378.
25. Mills NL, Amin N, Robinson SD, et al. Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173(4): 426 – 431.
26. Nemmar A, Holme JA, Rosas I, et al. Recent Advances in Particulate Matter and Nanoparticle Toxicology: A Review of the In Vivo and In Vitro Studies. *BioMed Research International*. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 279371.
27. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, et al. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 1665 – 1668.
28. Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, et al. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res*. 2008; 102: 589 – 596.
29. Lodovici M, Bigagli E. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *Journal of Toxicology*. 2011; 2011: 487074.
30. Araujo JA, Nel AE. Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Particle and Fibre Toxicology*. 2009; 6: 24.
31. Watterson TL, Hamilton B, Martin R, et al. Urban Particulate Matter Causes ER Stress and the Unfolded Protein Response in Human Lung Cells. *Toxicol Sci*. 2009; 112 (1): 111 – 122.
32. Suwa T, Hogg J, Quinlan K, et al. Particulate Air Pollution Induces Progression of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39: 935 – 42.

33. Brook R, Rajagopalan S. Particulate Matter Air Pollution and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2010; 12: 291 – 300.
34. Ohlwein S, Klumper C, Vossoughi M, et al. Air pollution and diastolic function in elderly women - results from the SALIA study cohort. *Int J Hyg Environ Health.* 2016; 219: 356 – 363.
35. Stafoggia M, Cesaroni G, Peters A, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and incidence of cerebrovascular events: results from 11 European cohorts within the ESCAPE project. *Environ Health Perspect.* 2014; 122: 919 – 25.
36. Medina-Ramón M, Zanobetti A, Schwartz J. The effect of ozone and PM10 on hospital admissions for pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease: a national multicity study. *Am J Epidemiol.* 2006; 163: 579 – 588.
37. Zanobetti A, Schawart J. Are diabetics more susceptible to the health effects of airborne particles? *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 831 – 833.
38. Goldberg MS, Burnett R, Bailar JC, et al. The association between daily mortality and ambient air particle pollution in Montreal, Quebec: 2: cause-specific mortality. *Environ Res.* 2001; 86: 26 – 36.
39. Donaldson GC, Hurst JR, Smith CJ, et al. Increased risk of myocardial infarction and stroke following exacerbation of COPD. *Chest.* 2010; 137: 1091 – 1097.
40. Rothnie KJ, Yan R, Smeeth L, Quint JK. Risk of myocardial infarction (MI) and death following MI in people with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2015; 5.
41. Pope CA, Muhlestein JB, Anderson JL, et al. Short-term exposure to fine particulate matter air pollution is preferentially associated with the risk of ST-segment elevation acute coronary events. *J Am Heart Assoc.* 2015; 4.
42. Takizawa H. Impact of air pollution on allergic diseases. *Korean J Intern Med.* 2011; 26(3): 262 – 73.
43. Guo B, Guo Y, Nima Q, et al. Exposure to air pollution is associated with an increased risk of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. *J Hepatol.* 2021; S0168-8278(21): 02153 – X.
44. Higgins IT. The epidemiology of congenital heart disease. *J Chronic Dis.* 1965; 18: 699 – 721.
45. Nora JJ. Etiologic factors in congenital heart diseases. *Pediatr Clin North Am.* 1971; 18: 1059 – 1074.
46. Smrcka V, Leznarova D. Environmental pollution and the occurrence of congenital defects in a 15-year period in a south Moravian district. *Acta Chir Plast.* 1998; 40: 112 – 114.
47. Norska-Borowka I, Bursa J. Infant morbidity and mortality in a region of ecological disaster. *Folia Med Cracov.* 1993; 34: 73 – 83.
48. Antipenko EN, Kogut NN. The results of an epidemiological study of congenital developmental defects in children in cities with different levels of atmospheric pollution. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 1993; 3: 32 – 36.

49. Ritz B, Yu F, Fruin S, et al. Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California. *Am J Epidemiol.* 2002; 155: 17 – 25.
50. Shang Y, Sun Z, Cao J, et al. Systematic review of Chinese studies of short-term exposure to air pollution and daily mortality. *Environ Int.* 2013; 54: 10011.
51. Samoli E, Aga E, Touloumi G, et al. Short-term effects of nitrogen dioxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Eur Respir J.* 2006; 27(6): 1129 – 38.
52. Stafoggia M, Zauli-Sajani S, Pey J, et al. Desert Dust Outbreaks in Southern Europe: Contribution to Daily PM₁₀ Concentrations and Short-Term Associations with Mortality and Hospital Admissions. *Environ Health Perspect.* 2016; 124(4): 413 – 9.
53. Tzima K, Analitis A, Katsouyanni K, Samoli E. Has the risk of mortality related to short-term exposure to particles changed over the past years in Athens, Greece? *Environ Int.* 2018; 113: 306 – 312.
54. Spix C, Heinrich J, Dockery D, et al. Air pollution and daily mortality in Erfurt, east Germany, 1980-1989. *Environ Health Perspect.* 1993; 101(6): 518 – 26.
55. Dockery DW, Pope CA, Xu X, et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med.* 1993; 329(24): 1753 – 9.
56. Konduracka E, Rostoff P (2021) Relationships Between Outdoor Ambient Air Pollution and Cardiovascular Disorders. In: Morin-Crini N, Lichtfouse E, Crini G (eds). *Emerging Contaminants. Vol. 1.: Occurrence and Impact.* 261-305. Cham: Springer International Publishing.
57. Rodopoulou S, Stafoggia M, Chen J, et al. Long-term exposure to fine particle elemental components and mortality in Europe: Results from six European administrative cohorts within the ELAPSE project. *Sci Total Environ.* 2021; 809: 152205.
58. Nemery B, Hoet P, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *The Lancet.* 2001; 357: 704 – 08.
59. Firket J. Sur les causes des accidents survenus dans la vallée de la Meuse, lors des brouillards de décembre 1930: résultats de l'expertise judiciaire faite par MM Dehalu, Schoofs, Mage, Batta, Bovy et Firket. *Bull Acad R Méd Belg.* 1931; 11: 683 – 734.
60. Wilkins ET. Air pollution aspects of the London fog of December 1952. *Q J R Meteorol Soc.* 1954; 80: 267 – 271.
61. Dockery DW, Schwartz J, Spengler JD. Air pollution and daily mortality: associations with particulates and acid aerosols. *Environ Res.* 1992; 59: 362 – 73.
62. Schwartz J, Marcus A. Mortality and air pollution in London: a time series analysis. *Am J Epidemiol.* 1990; 131: 185 – 94.
63. Clancy L, Goodman P, Sinclair, et al. Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. *Lancet.* 2002; 19: 360.
64. Dockery DW, Rich DQ, Goodman PG, et al. Effect of air pollution control on mortality and hospital admissions in Ireland. *Res Rep Health Eff Inst.* 2003; 176: 3 – 109.

65. Krzyżanowski M. Wpływ zanieczyszczenia powietrza pyłami na układ krążenia i oddychania. *Lek Wojskowy*. 2016; 1: 17 – 22.
66. Schwartz J, Dockery DW. *Am Rev Respir Dis*. Increased mortality in Philadelphia associated with daily air pollution concentrations. 1992; 145: 600 – 4.
67. Styszko K, Szramowiat K, Kistler M, et al. Mercury in atmospheric aerosols: A preliminary case study for the city of Krakow, Poland. *Comptes Rendus Chimie*. 2015; 18(10): 1183-1191.
68. Samek L. Overall human mortality and morbidity due to exposure to air pollution. *Int J of Occup Med and Envir Health*. 2016; 29(3): 417 – 426.
69. Zimnoch M. Stable isotope composition of carbon dioxide emitted from anthropogenic sources in the Krakow region, Southern Poland. *Nukleonika*. 2009; 54(4): 291 – 295.
70. Zimnoch M, Samek L, Furman L, et al. Application of natural carbon isotopes for emission source apportionment of carbonaceous particulate matter in urban atmosphere: a case study from Krakow, Southern Poland. *Sustainability*. 2020; 12: 5777 – 5780.
71. Styszko K, Szramowiat K, Kistler M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives associated with PM10 from Krakow city during heating season. 1st International Conference on the Sustainable Energy and Environment Development (SEED). Vol. 10. 2016. Krakow, EDP Science.
72. Styszko K, Samek L, Szramowiat K, et al. Oxidative potential of PM10 and PM2.5 collected at high air pollution site related to chemical composition: Krakow case study. *Air Quality Atmosphere and Health*. 2017; 10(9): 1123 – 1137.
73. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Krakowie – Monitoring powietrza. Dostęp na 01.10.2021: <http://krakow.pios.gov.pl/stan-srodowiska/monitoring-powietrza/>
74. Ballester F, Medina S, Boldo E, et al. Reducing ambient levels of fine particulates could substantially improve health: a mortality impact assessment for 26 European cities. *J Epidemiol Community Health*. 2008; 62(2): 98 – 105.
75. Obwieszczenie Ministra Klimatu i Środowiska z dnia 12 kwietnia 2021 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie poziomów niektórych substancji w powietrzu (Dz.U. 2021 poz. 845).
76. Uchwała Nr XVIII/243/16 Sejmiku Województwa Małopolskiego z dnia 15 stycznia 2016 r. w sprawie wprowadzenia na obszarze Gminy Miejskiej Kraków ograniczeń w zakresie eksploatacji instalacji, w których następuje spalanie paliw (DZ. URZ. WOJ. 2016.812).
77. Samek L, Stegowski Z, Styszko K. et al. Seasonal variations of chemical composition of PM2.5 fraction in the urban area of Krakow, Poland: PMF source attribution. *Air Quality, Atmosphere & Health*. 2020; 13: 89 – 96.
78. Miller MR, Newby DE. Air pollution and cardiovascular disease: car sick. *Cardiovasc Res*. 2020; 116(2): 279 – 294.
79. Generalna Dyrekcja Dróg Krajowych i Autostrad – Serwis informacyjny. Dostęp na 01.10.2021: <https://drogi.gddkia.gov.pl/>

80. INRIX 2021 Global Traffic Scorecard - Report. Dostęp na 01.10.2021: <https://inrix.com/scorecard/>
81. Luchter B. Przemiany rozmieszczenia terenów przemysłowych w Krakowie jako następstwo realizacji zasad gospodarki rynkowej. *Świat nieruchomości*. 2019; 107: 6 – 16.
82. Izba Przemysłowo - Handlowa w Krakowie. Dostęp na 01.10.2021: https://www.iph.krakow.pl/pl/?fbclid=IwAR2mxDq6N45CviZTORR8IygsbIveBkkWNGAFqDb137vaLaqZOZWg_cUxdaE
83. Rocznik Statystyczny Województwa Małopolskiego - 2020. Dostęp na 01.10.2021: <https://krakow.stat.gov.pl/publikacje-i-foldery/roczniki-statystyczne/rocznik-statystyczny-województwa-malopolskiego-2020,8,17.html>
84. <https://pgeenergiasciepla.pl/spolki-i-oddzialy/elektrocieplownie/PGE-Energia-Ciepła-Oddział-nr-1-w-Krakowie> (dostęp na 01.10.2021)
85. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *Engl J Med*. 1999; 340: 115 – 126.
86. Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol*. 1979; 95(3): 775 – 92.
87. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 508 – 519.
88. Galkina Em, Ley K. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 1239 – 1248.
89. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 802 – 815.
90. Strzelecki Z, Szymborski J. Morbidity and mortality in cardiovascular diseases and demographic situation of Poland [in Polish]. *Public Information Bulletin. Statistics Poland website*. Warsaw, Poland. 2015.
91. Poloński L, Gąsior M, Gierlotka M, et al. Polish Registry of Acute Coronary Syndromes (PL-ACS) Characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndromes in Poland. *Kardiologia Pol*. 2007; 65 (8): 861-872.
92. Cesaroni G, Forastiere F, Stafoggia M, et al. Long term exposure to ambient air pollution and incidence of acute coronary events: prospective cohort study and meta-analysis in 11 European cohorts from the ESCAPE Project. *BMJ*. 2014; 348: 7412.
93. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004; 364(9438): 937 – 52.
94. Teng T-HK, Williams TA, Bremner A, et al. Teng T-HK, Williams TA, Bremner A, et al. A systematic review of air pollution and incidence of out-of-hospital cardiac arrest. *J Epidemiol Community Health*. 2014; 68: 37 – 43.
95. Poloniecki JD, Atkinson RW, de Leon AP, et al. Daily time series for cardiovascular hospital admissions and previous day's air pollution in London, UK. *Occup Environ Med*. 1997; 54: 535 – 540.

96. Pope CA, Burnett RT, Thurston GD, et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004; 109: 71 – 77.
97. Samet JM, Dominici F, Currier FC, et al. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987–1994. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1742 – 1749.
98. Mann JK, Tager IB, Lurmann F, et al. Air pollution and hospital admissions for ischemic heart disease in persons with congestive heart failure or arrhythmia. *Environ Health Perspect*. 2002; 110: 1247 – 1252.
99. Argacha JF, Collart P, Wauters A, et al. Air pollution and ST-elevation myocardial infarction: A case-crossover study of the Belgian STEMI registry 2009-2013. *Int J Cardiol*. 2016; 223: 300 – 305.
100. Louwies T, Panis LI, Kicinski M, et al. Retinal microvascular responses to short-term changes in particulate air pollution in healthy adults. *Environ Health Perspect*. 2013; 121: 1011 – 1016.
101. Liu S, Brook RD, Huang W, et al. Extreme levels of ambient air pollution adversely impact cardiac and central aortic hemodynamics: the AIRCMD-China study. *J Am Soc Hypertens*. 2017; 11: 754 – 761.
102. Pekkanen J, Peters A, Hoek G, et al. Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: the Exposure and Risk Assessment for Fine and Ultrafine Particles in Ambient Air (ULTRA) study. *Circulation*. 2002; 106: 933 – 938.
103. Kuźma Ł, Pogorzelski S, Struniawski K, et al. Exposure to air pollution-a trigger for myocardial infarction? A nine-year study in Bialystok-the capital of the Green Lungs of Poland (BIA-ACS registry). *Int J Hyg Environ Health*. 2020; 229: 113578.
104. Kuźma Ł, Pogorzelski S, Struniawski K, et al. Effect of air pollution on the number of hospital admissions for acute coronary syndrome in elderly patients. *Pol Arch Intern Med*. 2020; 130(1): 38 – 46.
105. Konduracka E, Rostoff P. Relationships Between Outdoor Ambient Air Pollution and Cardiovascular Disorders. In: Morin-Crini N, Lichtfouse E, Crini G. *Emerging Contaminants* Vol. 1. Springer; 2021: 261 – 296.
106. Kålsch H, Hennig F, Moebus S, et al. Are air pollution and traffic noise independently associated with atherosclerosis: the Heinz Nixdorf recall study. *Eur Heart J*. 2014; 35: 853 – 860.
107. Newby DE, Mannucci P, Tell GS, et al. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. *E Heart J*. 2015; 36: 83 – 93.
108. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 669 – 692.
109. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009; 325(5940): 612 – 6.

110. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. 2006; 211: 609 – 618.
111. Varol C, Yona S, Jung S. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol. Cell Biol*. 2009; 87: 30 – 38.
112. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol*. 2008; 86: 398 – 408.
113. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010; 7: 77 – 86.
114. Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009; 6(1): 36 – 44.
115. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2680 – 2690.
116. Ylitalo R, Oksala O, Yla-Herttuala S, Ylitalo P. Effects of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *J Lab Clin Med*. 1994; 123: 769 – 776.
117. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989; 74: 2527 – 2534.
118. Salomon RN, Underwood R, Doyle M, et al. Increased apolipoprotein E and c-fms gene expression without elevated interleukin 1 or 6 mRNA levels indicates selective activation of macrophage functions in advanced human atheroma. *Proc Natl Acad Sci*. 1992; 89: 2814–2818.
119. Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, et al. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost*. 2004; 92: 419 – 424.
120. Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, et al. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: 130 – 138.
121. Fossati S, Baccarelli A, Zanobetti A, et al. Ambient particulate air pollution and microRNAs in elderly men. *Epidemiology*. 2014; 25: 68 – 78.
122. Duroux-Richard I, Robin M, Peillex C, Apparailly F. MicroRNAs: Fine Tuners of Monocyte Heterogeneity. *Front Immunol*. 2019; 10: 2145.
123. Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2007; 100: 1579 – 1588.
124. Hou L, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat Res*. 2011; 714(0): 105– 112.

125. Condorelli G, Latronico MV, Dorn GW 2nd. microRNAs in heart disease: putative novel therapeutic targets? *Eur Heart J.* 2010; 31: 649 – 658.
126. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell.* 2008; 15: 261 – 271.
127. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell.* 2008; 15: 272 – 284.
128. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* 2009; 325: 612 – 6.
129. Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016; 118: 703 – 720.
130. Motta V, Angelici L, Nordio F, et al. Integrative Analysis of miRNA and Inflammatory Gene Expression After Acute Particulate Matter Exposure. *Toxicological Sciences.* 2013; 132(2): 307 – 316.
131. Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res.* 2006; 66: 10843 – 10848.
132. Atmospheric air - Standard gravimetric measurement method for determining the mass concentrations of PM10 or PM2.5 fractions of particulate matter. Polish Committee for Standardization, 2014. PN EN 12, 341.
133. Wysocki M, Miller M. Lalonde's paradigm, WHO and new public health. *Przegl Epidemiol.* 2003; 505-512.
134. Woźniak M, Brukwicka AD, Kopański ZB, et al. Zdrowie jednostki i zbiorowości. *Journal of Clinical Healthcare.* 2015; 4: 1 – 3.
135. Fasolo F, Di Gregoli K, Maegdefessel L, Johnson JL. Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2019; 115: 1732 – 1756.
136. Mishra R, Singh SK. HIV-1 Tat C modulates expression of miRNA-101 to suppress VE-cadherin in human brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci.* 2013; 33: 5992 – 6000.
137. Bobryshev YV, Cherian SM, Inder SJ, Lord RS. Neovascular expression of VE-cadherin in human atherosclerotic arteries and its relation to intimal inflammation. *Cardiovasc Res.* 1999; 43: 1003 – 1017.
138. Surmiak M, Kosalka-Węgiel J, Polański S, et al. Endothelial cells response to neutrophil-derived extracellular vesicles miRNAs in anti-PR3 positive vasculitis. *Clin Exp Immunol.* 2021; 204: 267 – 282.
139. Qiaoli Chen, Xiaoye Li, Lingjun Kong, et al. miR-101-3p induces vascular endothelial cell dysfunction by targeting tet methylcytosine dioxygenase 2. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 2020; 52: 180 – 191.
140. Mercer J, Bennett M. The role of p53 in atherosclerosis. *Cell Cycle.* 2006; 5: 1907 – 1909.
141. Parfenyev S, Singh A, Fedorova O, et al. Interplay between p53 and non-coding RNAs in the regulation of EMT in breast cancer. *Cell Death Dis.* 2021; 12: 17.

142. Cao RY, Eves R, Jia L, et al. Effects of p53-knockout in vascular smooth muscle cells on atherosclerosis in mice. *PLoS One*. 2017; 12: e0175061.
143. Mercer J, Figg N, Stoneman V, et al. Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Circ Res*. 2005; 96: 667 – 674.
144. Vieceli Dalla Sega F, Fortini F, Aquila G, et al. Notch Signaling Regulates Immune Responses in Atherosclerosis. *Front Immunol*. 2019; 10: 1130.
145. Briot A, Civelek M, Seki A, et al. Endothelial NOTCH1 is suppressed by circulating lipids and antagonizes inflammation during atherosclerosis. *J Exp Med*. 2015; 212: 2147 – 2163.
146. Wei H, Wang X, Niu X, et al. miR-34c-5p targets Notch1 and suppresses the metastasis and invasion of cervical cancer. *Mol Med Rep*. 2021; 23: 120.
147. Genz B, Coleman MA, Irvine KM, et al. Overexpression of miRNA-25-3p inhibits Notch1 signaling and TGF- β -induced collagen expression in hepatic stellate cells. *Sci Rep*. 2019; 9: 8541.
148. Choe N, Kwon JS, Kim YS, et al. The microRNA miR-34c inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia by targeting stem cell factor. *Cell Signal*. 2015; 27: 1056 – 1065.
149. Sárközy M, Kahán Z, Csont T. A myriad of roles of miR-25 in health and disease. *Oncotarget*. 2018; 9: 21580 – 21612.
150. Qin D., Wang X, Li Y, et al. MicroRNA-223-5p and -3p cooperatively suppress necroptosis in ischemic/reperfused hearts. *J Biol Chem*. 2016; 291: 20247 – 20259.
151. Huan Y-Z, Sun C, Wang H-L, et al. Mir-223-5p inhibitor supresses microglia inflammation and promotes Nrg-1 in rats of spinal cord injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019; 23: 9746 – 9753.
152. Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*. 2013; 12: 984 – 995.
153. Wang J, Bai X, Song Q, et al. miR-223 Inhibits Lipid Deposition and Inflammation by Suppressing Toll-Like Receptor 4 Signaling in Macrophages. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 24965 – 24982.
154. Shan Z, Qin S, Li W, et al. An Endocrine Genetic Signal Between Blood Cells and Vascular Smooth Muscle Cells: Role of MicroRNA-223 in Smooth Muscle Function and Atherogenesis. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 65: 2526 – 2537.
155. Hajat A, Allison M, Diez-Roux AV, et al. Long-term exposure to air pollution and markers of inflammation, coagulation, and endothelial activation: a repeat-measures analysis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Epidemiology*. 2015; 26(3): 310 – 20.
156. Green R, Broadwin R, Mali B, et al. Long- and short-term exposure to air pollution and inflammatory/hemostatic markers in midlife women. *Epidemiology*. 2016; 27: 211 – 220.
157. Bai Y, Sun Q. Fine particulate matter air pollution and atherosclerosis: mechanistic insights. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1860: 2863 – 2868.

158. Akintoye E, Shi L, Obaitan I, et al. Association between fine particulate matter exposure and subclinical atherosclerosis: a meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol.* 2016; 23: 602 – 612.
159. Zhang Y, Ji X, Ku T, Sang N. Inflammatory response and endothelial dysfunction in the hearts of mice co-exposed to SO₂, NO₂, and PM 2.5. *Environ Toxicol.* 2016; 31(12): 1996 – 2005.
160. Viehmann A, Hertel S, Fuks K, et al. Long-term residential exposure to urban air pollution, and repeated measures of systemic blood markers of inflammation and coagulation. *Occup Environ Med.* 2015; 72: 656 – 663.
161. Pieters N, Plusquin M, Cox B, et al. An epidemiological appraisal of the association between heart rate variability and particulate air pollution: a meta-analysis. *Heart.* 2012; 98: 1127 – 1135.
162. Pope CA, Verrier RL, Lovett EG, et al. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J.* 1999; 138 (pt 1): 890 – 899.
163. Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, et al. Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J.* 2003; 21(suppl 40): 76 – 80.
164. Wellenius GA, Saldiva PH, Batalha JR, et al. Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol Sci.* 2002; 66: 327 – 335.
165. Meng X, Zhang Y, Yang K-Q, et al. Potential harmful effects of PM_{2.5} on occurrence and progression of acute coronary syndrome: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 13.
166. Visentin M, Pagnoni A, Sarti E, Pietrogrande MC. Urban PM_{2.5} oxidative potential: Importance of chemical species and comparison of two spectrophotometric cell-free assays. *Environ Pollut.* 2016; 219: 72 – 79.
167. Signorelli SS, Oliveri Conti G, Zanobetti A, et al. Effect of particulate matter-bound metals exposure on prothrombotic biomarkers: a systematic review. *Environ Res.* 2019; 177: 108573.
168. Vallius M, Janssen NAH, Heinrich J, et al. Sources and elemental composition of ambient PM_{2.5} in three European cities. *Science of the Total Environment.* 2005; 337(1-3): 147 – 162.
169. Lammel G, Rohrl A, Schreiber H. Atmospheric lead and bromine in Germany - Post-abatement levels, variabilities and trends. *Environmental Science and Pollution Research.* 2002; 9(6); 39 – 404.
170. Kabata-Pendias A, Pendias H. *Biogeochemia pierwiastków śladowych.* 1999. Wyd. 2 zm ed. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
171. Samek L, Stegowski Z, Furman L. Preliminary PM_{2.5} and PM₁₀ fractions source apportionment complemented by statistical accuracy determination. *Nukleonika.* 2016; 61(1): 75 – 83.
172. Chueinta W, Hopke PK, Paatero P. Investigation of sources of atmospheric aerosol at urban and suburban residential areas in Thailand by positive matrix factorization. *Atmospheric Environment.* 2000; 34(20): 3319 – 3329.

173. Ha MH, Lee DH, Jacobs DR. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and self-reported cardiovascular disease prevalence: results from the national health and nutrition examination survey, 1999-2002. *Environ Health Perspect.* 2007; 115: 1204 – 1209.
174. Holme JA, Brinchmann BC, Refsnes M, et al. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons as mediators of cardiovascular effects from combustion particles. *Environ Health.* 2019; 18: 74.
175. Marris CR, Kompella SN, Miller MR, et al. Polyaromatic hydrocarbons in pollution: a heart-breaking matter. *J Physiol.* 2020; 598: 227 – 247.
176. Lizarraga D, Gaj S, Brauers KJ, et al. Benzo[a]pyrene-induced changes in microRNA-mRNA networks. *Chem Res Toxicol.* 2012; 4: 838 – 849.
177. Krajowy Ośrodek Bilansowania i Zarządzania Emisjami. Dostęp na 01.10.2021: <https://www.kobize.pl/>
178. Weichenthal S, Hatzopoulou M, Goldberg MS. Exposure to traffic-related air pollution during physical activity and acute changes in blood pressure, autonomic and micro-vascular function in women: a cross-over study. *Part Fibre Toxicol.* 2014; 11: 70.
179. Emerging Risk Factors Collaboration – Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet.* 2010; 375: 2215 – 2222.
180. Norhammar A, Tenerz A, Nilsson G, et al. Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study. *Lancet.* 2002; 359: 2140– 2144.
181. Arnold SV, Lipska KJ, Li Y, et al. Prevalence of glucose abnormalities among patients presenting with an acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2014; 168: 466 – 470.
182. Bartnik M, Ryden L, Ferrari R, et al. The prevalence of abnormal glucose regulation in patients with coronary artery disease across Europe. The Euro Heart Survey on diabetes and the heart. *Eur Heart J.* 2004; 25: 1880 – 1890.

9. SPIS TABEL

Tabela 1. Analiza stężeń cytokin prozapalnych w zawiesinie monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM _{2,5} pobrane w okresie zimowym w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.	51
Tabela 2. Analiza stężeń cytokin prozapalnych w zawiesinie monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM _{2,5} pobrane w okresie letnim w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.	52
Tabela 3. Analiza stężeń cytokin prozapalnych w zawiesinie monocytów poddanych ekspozycji na próbki PM _{2,5} pobrane w okresach zimowym oraz letnim.	53
Tabela 4. Charakterystyka demograficzna i kliniczna uczestników badania z podziałem na pacjentów z CCS (grupa badawcza) i bez CCS (grupa kontrolna).	54
Tabela 5. Analiza pomiarów ekspresji miRNA w całej populacji badawczej (n = 140) z podziałem na próbki surowicy krwi pobierane w okresach zimowym oraz letnim.	56
Tabela 6. Analiza pomiarów ekspresji miRNA w próbkach krwi pobranych od pacjentów w okresach zimowym i letnim z uwzględnieniem podziału uczestników badania na poszczególne grupy: z CCS (n = 70) i bez CCS (n = 70).	57
Tabela 7. Porównanie stężeń cytokin prozapalnych w całej populacji badawczej (n = 140) z podziałem na próbki pobierane w okresach zimowym oraz letnim.	58
Tabela 8. Porównanie stężeń cytokin prozapalnych u pacjentów z CCS (n = 70) i w grupie kontrolnej (n = 70) z uwzględnieniem okresu pobierania próbek krwi od uczestników badania (zima/lato).	59

Tabela 9. Porównanie stężeń cytokin prozapalnych w próbkach krwi pobranych od pacjentów w okresach zimowym i letnim z uwzględnieniem podziału uczestników badania na poszczególne grupy: z CCS (n = 70) i w grupie kontrolnej (n = 70).	61
Tabela 10. Stężenie PM _{2,5} w próbkach pyłu pobranych w okresach tygodniowych w sezonach zimowym i letnim.	65
Tabela 11. Średnie stężenia wybranych pierwiastków w analizowanej frakcji aerozoli atmosferycznych PM _{2,5} z okresów zimowego i letniego.	66
Tabela 12. Średnie stężenia wybranych jonów w analizowanej frakcji aerozoli atmosferycznych PM _{2,5} z okresów zimowego i letniego.	67
Tabela 13. Średnia zawartość węgla pierwiastkowego i organicznego w analizowanych próbkach PM _{2,5} z okresów zimowego i letniego.	69

10. SPIS RYCIN

Rycina 1. Rozkład i porównanie wielkości cząsteczek PM jako zasadniczego składnika zanieczyszczenia powietrza.	13
Rycina 2. Ogólna kaskada prawdopodobnego wpływu PM _{2,5} na zdrowie człowieka.	15
Rycina 3. Związek pomiędzy dziennym poziomem zanieczyszczeniem powietrza i zgonami w czasie Wielkiego Smogu w Londynie w grudniu 1952 r.	17
Rycina 4. Rozkład rocznych stężeń PM _{2,5} (µg/m ³) wg raportu za 2017 r. Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska w Krakowie.	19
Rycina 5. Rozmieszczenie głównych terenów przemysłowych Krakowa w latach 1983, 2002 i 2018 r.	21
Rycina 6. Potencjalne patomechanizmy określające wpływ PM _{2,5} na układ sercowo-naczyniowy.	24
Rycina 7. Monocyty zaprezentowane w formie graficznej wraz z zarysem ich zasadniczej roli w mechanizmach odporności naturalnej i nabytej.	26
Rycina 8. Prawdopodobny udział monocytów w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego związanych z PM _{2,5} .	28
Rycina 9. Cząsteczki mikroRNA (miRNA).	29
Rycina 10. Uproszczony, hipotetyczny model współzależności pomiędzy PM _{2,5} , miRNA i CCS.	30
Rycina 11. Schematyczne przedstawienie klinicznej części badania.	35
Rycina 12. Lokalizacja miejsca pobierania próbek PM _{2,5} .	40

Rycina 13. Zmiana poziomów ekspresji wybranych cząsteczek miRNA w zawiesinie monocytów poddanych ekspozycji na PM _{2,5} pobrany w okresie zimowym w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.	48
Rycina 14. Zmiana poziomów ekspresji wybranych cząsteczek miRNA w zawiesinie monocytów poddanych ekspozycji na PM _{2,5} pobrany latem w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.	49
Rycina 15. Zestawienie poziomów ekspresji miRNA w zawiesinie z monocytami stymulowanymi PM _{2,5} zebranymi w okresie zimowym oraz letnim.	50
Rycina 16. Zaobserwowany w transmisyjnym mikroskopie elektronowym proces fagocytozy cząsteczek PM _{2,5} przez ludzkie monocyty.	63
Rycina 17. Zaobserwowane w transmisyjnym mikroskopie elektronowym zmiany morfologii wewnątrzkomórkowej ludzkich monocytów po sfaagocytowaniu cząsteczek PM _{2,5} (próbki zebrane w okresie zimowym).	64
Rycina 18. Wykres ramka-wąsy przedstawiająca średnie stężenia analizowanych PAHs w okresach zimowym i letnim.	68
Rycina 19. Możliwe szlaki powiązań pomiędzy aktywowanymi przez PM _{2,5} monocytami a rozwojem zapalenia śródbrzońka i progresją blaszki miażdżycowej.	72
Rycina 20. Podsumowanie prezentowanych w niniejszej pracy kluczowych etapów oceny wpływu zanieczyszczenia powietrza (PM _{2,5}) na rozwój blaszki miażdżycowej u ludzi.	84

11. STRESZCZENIE

Wstęp

Ocenia się, że zanieczyszczenia powietrza są jednym z 10 najważniejszych czynników ryzyka zgonu na świecie. Kraków należy do najbardziej zanieczyszczonych miast w Europie pod względem stężenia cząsteczek stałych o średnicy 2,5 μm (PM_{2,5}) w powietrzu atmosferycznym. Miażdżyca leży u podstaw znacznej liczby chorób sercowo-naczyniowych i pozostaje jedną z główną przyczyn zachorowalności i umieralności na całym świecie. Miażdżyca jest wieloczynnikową, postępującą chorobą, której istotą jest stan zapalny rozwijający się w ścianie naczynia. Choroba niedokrwienna serca polega gł. na tworzeniu się blaszek miażdżycowych w odcinkach nasierdziowych tętnic wieńcowych. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że długotrwałe narażenie na zanieczyszczenia powietrza (przede wszystkim PM_{2,5}) przyczynia się do patogenezы miażdżycy i jej powikłań w tym choroby wieńcowej. Chociaż postulowane patomechanizmy działań niepożądanych zanieczyszczenia powietrza obejmują aktywację odpowiedzi zapalnej, stres oksydacyjny, dysfunkcję śródbłónka i zaburzenia krzepnięcia, to dokładne mechanizmy prowadzące do rozwoju miażdżycy wciąż pozostają nieznane. Monocyty stanowią niejednorodną populację komórek o różnych funkcjach, fenotypach i lokalizacjach. Wykazano dotąd, że monocyty biorą udział w rozwoju miażdżycy, zapalenia i angiogenezy. MikroRNA (miRNA) to małe, endogenne, niekodujące, jednoniciowe cząsteczki kwasu rybonukleinowego (złożone zwykle z 21–23 nukleotydów), które odgrywają znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Nieprawidłowa ekspresja miRNA została powiązana z wieloma procesami komórkowymi i szlakami metabolicznymi biorącymi udział w patogenezie różnych chorób, w tym także dotyczących układu sercowo-naczyniowego. Aktualne dane sugerują, że sygnalizacja z udziałem cząsteczek miRNA może być aktywną częścią odpowiedzi komórkowej na różne substancje chemiczne, w tym także na PM_{2,5}.

Cele

Celem badania była ocena wpływu naturalnej, długotrwałej, sezonowej (zima/lato) ekspozycji mieszkańców Krakowa na zanieczyszczenie powietrza (szczególnie PM_{2,5}). Ma to odpowiedzieć na pytanie czy zakładane wyższe stężenia różnych składowych zanieczyszczenia powietrza w okresie zimowym prowadzą do istotnych zmian ekspresji genów (miRNA) i stężeń cytokin prozapalnych u stałych mieszkańców Krakowa i czy istnieją znamienne różnice

w ekspresji miRNA i poziomach cytokin prozapalnych pomiędzy osobami z przewlekłymi zespołami wieńcowymi (CCS, ang. *chronic coronary syndrome*) i bez CCS – kliniczna część badania. Oceniano także ekspresję wybranych rodzajów miRNA, stężeń określonych cytokin prozapalnych oraz aktywności i morfologii komórek w zawiesinie ludzkich monocytów krwi obwodowej po stymulacji próbkami PM_{2,5} (o znanym składzie chemicznym i pochodzeniu) zebranych w Krakowie w okresach zimowym oraz letnim. Część eksperymentalna badania – po zestawianiu z wynikami klinicznej strony projektu – ma na celu przybliżyć potencjalną rolę monocytów w rozwoju zapalenia śródbłonna i blaszki miażdżycowej pod wpływem PM_{2,5}.

Material i metodyka

Część kliniczną badania przeprowadzono jako prospektywne badanie kohortowe. Do projektu włączono 140 stałych mieszkańców Krakowa, zrekrutowanych w latach 2017–2019 spośród pacjentów hospitalizowanych w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca UJ CM. Uczestników badania podzielono na dwie grupy o równej liczebności. Grupę badawczą stanowili pacjenci z CCS (n = 70), zaś grupę kontrolną osoby bez CCS (n = 70). U wszystkich uczestników badania pobrano obwodową krew żylną (dwukrotnie w sezonach zimowym i letnim), którą zabezpieczono do oceny poziomów ekspresji wybranych rodzajów miRNA oraz stężeń określonych cytokin prozapalnych. Źródłem komórek do eksperymentu, mającego na celu określenie wpływu PM_{2,5} na aktywność ludzkich monocytów, była obwodowa krew żylna pobrana od 3 zdrowych ochotników. Próbki PM_{2,5} były pobierane sezonowo (okresy zimowy i letni) na dachu budynku Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH (dzielnica Kraków – Krowodrza). W celu przeprowadzenia eksperymentu (ocena poziomów ekspresji wybranych rodzajów miRNA oraz stężeń określonych cytokin prozapalnych w zawiesinie ludzkich monocytów inkubowanych z próbkami PM_{2,5}) z części próbek przygotowano suchy ekstrakt, odpowiednio dla okresów zimowego oraz letniego. W pozostałym materiale przeprowadzono kompleksową, wieloskładnikową charakterystykę składu i stężenia PM_{2,5}. W celu wykazania aktywności fagocytarnej monocytów względem cząsteczek PM_{2,5} przeprowadzono obserwację – w mikroskopie elektronowym – zmian morfologii komórek poddanych ekspozycji na zebrane próbki PM_{2,5}.

Wyniki

W badaniu wykazano występowanie istotnych różnic w rozkładzie poziomów ekspresji wybranych cząsteczek miRNA po stymulacji ludzkich monocytów próbkami PM_{2,5} zebranych w Krakowie w okresach zimowym i letnim oraz w porównaniu z komórkami

niestymulowanymi. Wykazano także istotnie zwiększoną ekspresję miRNA (miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p i miR-25-3p) w próbkach surowicy krwi pobranych od uczestników badania w okresie zimowym w porównaniu z sezonem letnim. Wykazano zakładaną powtarzalność części wzorców miRNA (miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p, miR-25-3p i miR-382-5p) – związanych z procesem zapalnym i rozwojem miażdżycy – zarówno w eksperymencie jak i w klinicznej części badania. Może to wskazywać na udział monocytów w szlakach molekularnych aterogenezy pod wpływem PM_{2,5}. W mikroskopie elektronowym zaobserwowano wzmożoną aktywność fagocytarną monocytów w preparatach przygotowanych z zawiesiny komórek stymulowanych próbkami PM_{2,5} zebranymi w okresie zimowym, w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (brak uchwytanych zmian w morfologii monocytów). Wykazano, że stężenia PM_{2,5} były wyższe w okresie zimowym w porównaniu z sezonem letnim. Dotyczyło to także innych analizowanych składowych zanieczyszczenia powietrza: pierwiastków (Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr i Pb), jonów nieorganicznych (SO₄²⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, Cl⁻, Li⁺, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ i Mg²⁺), wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (przede wszystkim benzo[a]pirenu, benzo[a]antracenu, benzo[b]- i benzo[k]fluorantenu, indeno[1,2,3-cd]pirenu, pirenu i dibenzo[a,h]antracenu) oraz węgla pierwiastkowego i organicznego.

Wnioski

Badanie wykazało negatywny związek pomiędzy zanieczyszczeniem powietrza (PM_{2,5}) a zdrowiem ludzi. Wykazano, że ekspozycja ludzkich monocytów krwi obwodowej na cząsteczki PM_{2,5} powoduje istotną zmianę ekspresji różnych rodzajów miRNA, które regulują liczne funkcje komórkowe i mogą przyczyniać się do rozwoju miażdżycy oraz innych zaburzeń związanych ze stanem zapalnym, stresem oksydacyjnym oraz proliferacją i różnicowaniem komórek. Zmiana ekspresji niektórych cząsteczek miRNA w monocytach oraz sezonowe zmiany profilu miRNA w ludzkiej surowicy krwi sugerują, że monocyty biorą udział w rozwoju miażdżycy w wyniku ekspozycji na cząsteczki PM_{2,5}. Niektóre z analizowanych rodzajów miRNA mogą stanowić nowy cel terapeutyczny dla proliferacyjnych chorób naczyniowych oraz służyć jako potencjalne markery narażenia na zanieczyszczenia powietrza. W badaniu potwierdzono także gorszą jakość powietrza w Krakowie w sezonie grzewczym.

12. SUMMARY

Introduction

It is estimated that air pollution is among the top 10 risk factors for death in the world. Cracow is one of the most polluted cities in Europe in terms of particulate matter 2.5 (PM_{2.5}) concentrations in the air. Atherosclerosis is implicated in the pathogenesis of numerous cardiovascular diseases and remains among the leading causes of morbidity and mortality worldwide. It is a multifactorial progressive disease characterized by inflammation of the vessel wall. Coronary artery disease involves the formation of atherosclerotic plaques in epicardial coronary arteries. There is growing evidence that long-term exposure to air pollutants (primarily PM_{2.5}) contributes to the pathogenesis of atherosclerosis and its complications, including coronary artery disease. Although the postulated pathomechanisms of air pollution side effects include inflammatory response, oxidative stress, endothelial dysfunction, and coagulation disorders, the exact mechanisms leading to the development of atherosclerosis remain unknown. Monocytes constitute a heterogeneous population of cells with different functions, phenotypes, and locations. They have been shown to be involved in the development of atherosclerosis, inflammation, and angiogenesis. MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous non-coding single-stranded RNA molecules (typically consisting of 21 to 23 nucleotides) that play a significant role in regulating gene expression at the posttranscriptional level. Abnormal miRNA expression has been associated with numerous cellular processes and metabolic pathways implicated in the pathogenesis of various diseases, including those affecting the cardiovascular system. Current data suggest that miRNA signaling may be actively involved in the cellular response to different chemicals, including PM_{2.5}.

Aims

This study was designed to assess the impact of natural long-term seasonal (winter – summer) exposure to air pollution (especially PM_{2.5}) among the permanent residents of Cracow. Specifically, the aim of the study was to investigate whether the assumed higher concentrations of various air pollutants in winter lead to significant changes in gene expression (miRNA) and concentrations of proinflammatory cytokines. The clinical part of the study was designed to assess if miRNA expression and proinflammatory cytokine levels differ significantly between individuals with chronic coronary syndrome (CCS) and those without CCS. As part of the *in vitro* study, the following parameters were assessed: expression of selected miRNAs,

concentrations of selected proinflammatory cytokines, as well as activity and morphology of human peripheral blood monocytes exposed to PM_{2.5} samples of known chemical composition and origin, collected in Cracow during winter and summer. The aim of the experiment – in combination with clinical results – is to explore the potential role of monocytes in the development of endothelial and atherosclerotic plaque inflammation following exposure to PM_{2.5}.

Materials and methods

The clinical part of the project was conducted as a prospective cohort study. It included 140 permanent residents of Cracow, recruited between 2017 and 2019 from among patients hospitalized at the Department of Coronary Disease and Heart Failure of Jagiellonian University Medical College. Study participants were divided into two groups of equal size. The research group included patients with CCS (n = 70), and the control group – patients without CCS (n = 70). Peripheral venous blood was collected twice from all participants (in the winter and summer seasons). The samples were secured for the subsequent evaluation of the expression of selected miRNAs and concentrations of specific proinflammatory cytokines. The effect of PM_{2.5} on the activity of human monocytes was determined in cells derived from peripheral venous blood obtained from 3 healthy volunteers. PM_{2.5} samples were collected seasonally (winter and summer) on the roof of the Faculty of Physics and Applied Computer Science's building at AGH University of Science and Technology in the Cracow district of Krowdrza. For an *in vitro* experiment (evaluation of the expression levels of selected miRNAs and concentrations of specific proinflammatory cytokines in the suspension culture of human monocytes incubated with PM_{2.5} samples), a dry extract was prepared from selected samples separately for the winter and summer seasons. The remaining samples were used for a comprehensive and multicomponent analysis of PM_{2.5} composition and concentration. The phagocytic activity of monocytes against PM_{2.5} particles was assessed by using electron microscopy to examine the morphological changes of cells subjected to acute *in vitro* exposure to PM_{2.5} samples.

Results

The study confirmed significant differences in the expression of selected miRNAs after stimulation of human monocytes with PM_{2.5} samples collected in Cracow during winter and summer, when compared with unstimulated cells. Significant overexpression of miRNAs (miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p, and miR-25-3p) was also shown in serum samples

obtained from participants during the winter when compared with the summer season. The assumed reproducibility of some miRNA patterns associated with inflammation and atherosclerosis (miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p, miR-25-3p, and miR-382-5p) was confirmed both in the in vitro and clinical studies. This indicates that monocytes participate in the molecular pathways of atherogenesis after exposure to PM_{2.5}. Electron microscopy revealed increased phagocytic activity of monocytes exposed to PM_{2.5} samples collected during the winter, as compared with unstimulated cells (without noticeable changes in monocyte morphology). PM_{2.5} concentrations were higher in the winter than in the summer season. Similar findings were observed for other air pollution components including elements (Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, and Pb), inorganic ions (SO₄²⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻, Cl⁻, Li⁺, K⁺, Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺), polycyclic aromatic hydrocarbons (mainly benzo[a]pyrene, benzo[a]anthracene, benzo[b]- and benzo[k]fluoranthene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, pyrene and dibenz[a,h]anthracene), as well as elemental and organic carbon.

Conclusions

The study confirmed a negative association between air pollution (PM_{2.5}) and human health. The exposure of human peripheral blood monocytes to PM_{2.5} was shown to cause significant changes in the expression of various miRNAs that regulate numerous cellular functions and possibly contribute to atherosclerosis and other disorders related to inflammation, oxidative stress, as well as cell proliferation and differentiation. The in vitro changes in monocyte expression of selected miRNAs as well as the seasonal changes in the miRNA profile in human serum suggest that monocytes are involved in the development of atherosclerosis following exposure to PM_{2.5}. Some of these miRNAs may represent new therapeutic targets for vascular proliferative diseases and serve as potential markers of exposure to air pollutants. The study also showed a worse air quality in Cracow during the heating season.