



NARODOWY INSTYTUT KARDIOLOGII
Stefana kardynała Wyszyńskiego
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

ul. Alpejska 42
04-628 Warszawa (Anin)
www.ikard.pl

Klinika Niewydolności Serca i Transplantologii
Oddział Mechanicznego Wspomagania i Transplantacji Serca

Warszawa 04/09/2022

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Krzysztofa Krawczyka

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

Zanieczyszczenie powietrza to jeden z nie do końca docenianych czynników ryzyka zgonu na świecie. Stopniowo, w społeczeństwie, również w grupie lekarzy, zwiększa się zainteresowanie problematyką zanieczyszczenia powietrza i wpływu na zdrowie, jednak stale nie są w pełni poznane mechanizmy tego niekorzystnego oddziaływania.

Pierwsze dane dotyczące niekorzystnego wpływu wysokiego poziomu zanieczyszczenia powietrza na pogorszenie stanu zdrowia ludzi uzyskano prawie 100 lat temu, bo w grudniu 1930 roku - smog w belgijskiej Dolinie Mozy. Nie wpłynęło to niestety na światową emisję zanieczyszczeń, podobnie jak kolejne zdarzenia związane z zanieczyszczeniami jak np. tzw. Wielki Smog w 1952 roku w Londynie. Obecnie szacuje się, że nawet 1/3 populacji Europy zamieszkująca obszary miejskie jest narażona na zanieczyszczenie powietrza przekraczające normy zalecane w standardach Unii Europejskiej. Prowadzi to według Europejskiej Agencji ds. Środowiska każdego roku do przedwczesnego zgonu ok. 0,5 mln mieszkańców Unii Europejskiej, w tym ponad 44 tys. w Polsce.

Szacunkowo, zależnie od miejsca zamieszkania, średnio na świecie zanieczyszczenie powietrza może skracać przeciętną długość trwania życia nawet o ponad rok.

W powietrzu znajduje się różne substancje chemiczne stanowiąc jego zanieczyszczenie, a wśród nich głównym składnikiem jest tzw. pył zawieszony składający się z drobnych stałych cząsteczek (PM, ang. particulate matter) oraz substancje gazowe w postaci aerozoli. Skład PM zależy od położenia geograficznego oraz źródeł emisji. Negatywne skutki oddziaływania PM na organizm człowieka zależą od bardzo wielu czynników takich jak ich wielkość, stężenie w powietrzu, czas ekspozycji, skład chemiczny ulegający zmianom sezonowym, będąc również ściśle związany ze źródłami emisji zanieczyszczenia powietrza.

Istotnym jest również fakt szkodliwości PM zależy od stanu zdrowia osoby narażonej, a publikacje wskazują na związek z rozwojem choroby wieńcowej, ostrym zespołem wieńcowym, jak również innymi chorobami układu krążenia, w tym niewydolnością serca, zaburzeniami rytmu serca czy udarem mózgu. Niekorzystny wpływ $PM_{2,5}$ na zdrowie ludzkie porównywany jest do wpływu palenia tytoniu.

W Polsce, jak dotąd niestety istnieje niewiele grup badawczych zajmujących się analizą składu chemicznego $PM_{2,5}$ i jego bezpośredniego oddziaływania na zdrowie człowieka. Tak więc praca prezentowana przez lekarza Krzysztofa Krawczyka przynosi bardzo ciekawe dane dotyczące zanieczyszczenia powietrza w Krakowie i wpływu ich na stan zdrowia mieszkańców Krakowa.

Autor do analizy wybrał Kraków który podobnie jak wiele innych miast w Polsce należy do najbardziej zanieczyszczonych miast w Europie pod względem stężenia cząsteczek $PM_{2,5}$ w powietrzu atmosferycznym. Powyższe obserwacje oparte są o wysoce wiarygodne pomiary wykonywane przez Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Krakowie, wskazujące na wielokrotne przekroczenia dopuszczalnych poziomów PM, szczególnie nasilone w sezonie grzewczym (stężenie $PM_{2,5}$ w atmosferze Krakowa - 2,6 razy wyższe zimą niż latem), co zgodnie z danymi WHO wiąże się z o 15% wyższym, odległym ryzykiem zgonu. Powyższe informacje stają się to szczególnie istotne, w obliczu danych dotyczących zgonów przypisywanych zanieczyszczeniu powietrza, a szacowanych na około 300–600 rocznie, co może być wartością zaniżoną.

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} , jak i średniego rocznego stężenia PM_{10} ($64 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Co więcej w Krakowie – całodobowe przekroczenia dopuszczalnych poziomów $PM_{2,5}$ można odnotowywać przez nawet 130 dni w roku.

Z drugiej zaś strony nawet umiarkowana redukcja stężenia $PM_{2,5}$ z $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ do $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ mogłaby zmniejszyć ryzyko przedwczesnej śmierci nawet o 6%. Tak więc szacunkowo gdyby w Krakowie

zredukowano średnie roczne stężenie PM_{2,5} do 15 µg/m³, przeciętny stały mieszkaniec żyłby średnio o rok dłużej.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma typowy układ, objętość 108 stron, zawiera 20 rycin, 13 tabel, 3 załączniki. Pierwsze rozdziały stanowią ciekawe i rzeczowe wprowadzenie w zagadnienia będąc przedmiotem pracy. Autor omówił szeroko i nowocześnie problem zanieczyszczenia powietrza na świecie oraz w Krakowie, z uwzględnieniem składu, pochodzenia zanieczyszczenia i powiązanych skutków zdrowotnych. W kolejnych rozdziałach Autor zarysował przejrzyste patologiczne zmiany, zachodzące pod wpływem zanieczyszczenia powietrza. W dalszej części wstępu Autor przedstawił ze zrozumieniem temat związku monocytów oraz procesu zapalnego w rozwoju blaszki miażdżycowej. Jednocześnie Autor wskazał na potencjalny związek zmian w ekspresji mikroRNA z patogenezą chorób sercowo-naczyniowych.

Prezentowana przez lekarza Krzysztofa Krawczyka praca przynosi bardzo ciekawe i kompleksowe informacje dotyczące wpływu naturalnej, długotrwałej, sezonowej (zima/lato) ekspozycji mieszkańców Krakowa na zanieczyszczenie powietrza, na zmiany w ekspresji wybranych niekodujących cząsteczek miRNA, oraz ekspresji na poziomie białkowym cytokin prozapalnych. Ocena ta przeprowadzona została w grupie osób już obciążonych przewlekłym zespołem wieńcowym w porównaniu do osób bez obecnej choroby wieńcowej. Autor przeprowadził również bardzo interesującą część eksperymentalną uzupełniającą część kliniczną projektu, w której ocenił aktywność i morfologię komórek w zawiesinie ludzkich monocytów krwi obwodowej, po ich stymulacji próbkami PM_{2,5}. Ta część pracy stanowił interesującą kontynuację badania, oceniającą potencjalną rolę monocytów w rozwoju zapalenia śródbłonna i blaszki miażdżycowej pod wpływem PM_{2,5}. Autor zachowując wysoką staranność badawczą, wykorzystując do stymulacji zawiesiny ludzkich monocytów krwi obwodowej zebrane w Krakowie w okresach zimowym oraz letnim próbki PM_{2,5} (o precyzyjnie ustalonym składzie chemicznym).

Prezentowana praca w części klinicznej to prospektywne badanie0 kohortowe, obejmujące 140 stałych mieszkańców Krakowa, hospitalizowanych w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca UJ CM, w podziale na dwie grupy - grupę badawczą którą stanowili pacjenci z chorobą wieńcową oraz grupę kontrolną osoby bez choroby wieńcowej. U wszystkich uczestników badania, dwukrotnie (w sezonach zimowym i letnim), w żyłnej krwi obwodowej, przeprowadzono ocenę ekspresji wybranych cząstek miRNA oraz ekspresji na poziomie białka określonych cytokin prozapalnych. W oparciu o monocyty uzyskane z obwodowej krwi żyłnej od 3 zdrowych ochotników Autor określił wpływ PM_{2,5} (próbki pobrane sezonowo zima/lato, na dachu w centrum Krakowa) na zmiany w ekspresji wybranych rodzajów miRNA oraz określonych cytokin prozapalnych w zawiesinie ludzkich monocytów. W mikroskopie elektronowym Autor ocenił

zmiany morfologii komórek poddanych ekspozycji na zebrane próbki PM_{2,5}, celem wykazania zmian aktywności fagocytarnej monocytów pod wpływem stymulacji.

Równolegle Autor przeprowadził kompleksową, wieloskładnikową charakterystykę składu i stężenia PM_{2,5}.

Tak zebrany materiał badawczy został wszechstronnie przeanalizowany zgodnie z przedstawionymi założeniami. W dysertacji doktorskiej lekarz Krzysztof Krawczyk przedstawił wyniki przeprowadzonych badań w sposób czytelny z dużym udziałem tabel i rycin. Autor wykazał znaczny wzrost stężenia zarówno PM_{2,5} jak innych analizowanych składowych zanieczyszczenia w okresie zimowym w porównaniu z sezonem letnim. Stymulacja kontrolnych monocytów z wykorzystaniem PM_{2,5} (w okresach zimowy/letni) prowadziła do istotnych zmian w poziomie ekspresji wybranych cząsteczek miRNA. Powyższe dane eksperymentalne pozostają w zgodzie z obserwowanymi zmianami ekspresji miRNA – związanymi z procesem zapalnym i rozwojem miażdżycy – (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. Zdaniem Autora może to wskazywać na udział monocytów w szlakach molekularnych aterogenezy pod wpływem PM_{2,5}. Dodatkowo za powyższą hipotezę mogą przemawiać zmiany obserwowane w mikroskopie elektronowym - wzmożona aktywność fagocytarną monocytów w preparatach przygotowanych z zawiesiny komórek stymulowanych próbkami PM_{2,5}.

Dyskusja uzyskanych przez Autora wyników przeprowadzona została w sposób wskazujący na dobrą znajomość problemu. Autor prezentuje najnowsze doniesienia (zarówno publikacje międzynarodowe, jak i również z piśmiennictwa polskiego) z zakresu tematu pracy, a w ich świetle komentuje i polemizując przedstawia wnioski z własnych badań. Wnioski pracy są odpowiedzią na założone cele. Autor wykazał w prezentowanej pracy, że istnieje negatywny związek pomiędzy zanieczyszczeniem powietrza (PM_{2,5}) a zdrowiem ludzi. Ekspozycja ludzkich monocytów krwi obwodowej na cząsteczki PM_{2,5} powoduje istotną zmianę ekspresji cząstek miRNA, regulujących funkcje komórkowe, mogące również przyczyniać się do rozwoju miażdżycy oraz zmian związanych ze stanem zapalnym, stresem oksydacyjnym oraz proliferacją i różnicowaniem komórek. Co więcej hipotetycznie niektóre z analizowanych rodzajów miRNA mogą stanowić nowy cel terapeutyczny dla hamowania zmian w chorobach naczyniowych. Również być może mogą one służyć jako potencjalne markery narażenia na zanieczyszczenia powietrza.

Uwagi recenzenta:

Pozwolę sobie przedstawić dwie drobne uwagi nie wpływających na całościową ocenę dysertacji.

Pierwsza z nich dotyczy kryteriów wyłączenia. Jednym z kryteriów wyłączenia z badania jest palenie tytoniu w ciągu ostatniego roku. To oczywisty warunek, w świetle dodatkowego

niekorzystnego oddziaływania dymu tytoniowego. Jednak moim zdaniem właśnie ten punkt powinien zostać doprecyzowany. Wątpliwości budzą następujące fakty – do grupy badanej zatem mogli być włączeni - zarówno osoby palące w przeszłości (nawet wiele lat) które nie palą od roku, osoby będące „biernymi” palaczami, oraz osoby używające e-papierosy. Może warto by uzupełnić dane i przeprowadzić dodatkową analizę w aspekcie wyżej wymienionym, gdyż każda z powyższych sytuacji choć nie jest paleniem tytoniu, może wpływać istotnie na badane parametry. Drugą wątpliwość budzi wniosek 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. To niewątpliwie celne spostrzeżenie, jednak warto zauważyć że ekspresja miR-34c-5 ulega zmianie w okresie zimowym zarówno w grupie z CCS jak i bez CCS. Ekspresja tej cząsteczki ulega zmianie w zależności od pory roku w obu grupach z CCS i bez CCS. Tak więc wydaje się że w tym przypadku należałoby skomentować powyższą zmianę, szczególnie biorąc pod uwagę fakt że cząsteczki z rodziny miR-34 są włączone w modyfikację sygnału komórkowego, metabolizmu i modyfikacji ekspresji białek poprzez drogi sygnałowe takie jak np. MAPK, Notch, Wnt, PI3K/AKT, p53, Ras.

Powyższe uwagi nie obniżają wartości pracy, są jedynie próbą pełniejszego wyjaśnienia zaobserwowanych prawidłowości.

W posumowaniu, otrzymana do recenzji pracę oceniam wysoko. Autor objął badaniami zróżnicowane grupy osób stosując prawidłową metodykę która umożliwiła uzyskanie ciekawych wyników. Wyniki przeprowadzonych badań mają znaczenie zarówno poznawcze jak i być może w przyszłości praktyczne. Sformułowane wnioski są odpowiedzią na wiele pytań stawianych w założeniach pracy na które dotychczas nie było jasnej odpowiedzi. Praca napisana jest starannie i przejrzysto. Praca jest unikalnym opracowaniem oceniającym wpływ naturalnej, długotrwałej, sezonowej (zima/lato) ekspozycji mieszkańców Krakowa na zanieczyszczenie powietrza (szczególnie PM_{2,5}).

Przedstawiona mi do recenzji praca odpowiada wymaganiom stawianym pracy doktorskiej. W mojej opinii recenzowana przeze mnie praca, ze względu na bardzo wysoki poziom naukowy, powinna zostać wyróżniona.

Wnioskuje do Rady Naukowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie lekarza Krzysztofa Krawczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Przemysław Deszek

