

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lekarza Krzysztofa Krawczyka pt. „Sezonowa zmiana ekspresji mikroRNA oraz stężeń cytokin prozapalnych produkowanych przez monocyty u osób przewlekle narażonych na zanieczyszczenie powietrza”

Wyniki wielu badań wskazują na dodatnią korelację pomiędzy długoterminowym narażeniem inhalacyjnym na cząstki niegazowe (ang. *particulate matter*) o średnicy aerodynamicznej $2.5\mu\text{m}$ lub mniejszej ($\text{PM}_{2.5}$, cząstki drobne – ang. *fine particles*) a umieralnością całkowitą i m.in. umieralnością spowodowaną chorobami układu krążenia. Oczywiście zwiększona umieralność przekłada się na skrócenie oczekiwanej długości życia. Zjawisko wpływu $\text{PM}_{2.5}$ na umieralność zaobserwowano również w przypadku poziomej ekspozycji poniżej wartości zalecanych komunalnych normatywów higienicznych. $\text{PM}_{2.5}$ absorbowane są w górnych i dolnych drogach oddechowych a $\text{PM}_{0.1}$ (cząstki ultradrobne, ang. *ultrafine particles*) należące do frakcji $\text{PM}_{2.5}$ przenikają do krwi inicjując zapalenie, aktywując układ krzepnięcia a także wpływają na układ współczulny czego skutkiem są m.in. zaostrzenie choroby niedokrwiennej i zawały serca, niebezpieczne dla życia zaburzenia rytmu serca, wzrost ciśnienia tętniczego, udary mózgu. Szkodliwy wpływ cząstek drobnych na układ krążenia jest obok działania rakotwórczego, najlepiej udokumentowany bogatym piśmiennictwem naukowym. Cząstki drobne odgrywają także znaczącą rolę w patogenezie miażdżycy i nadciśnienia tętniczego oraz cukrzycy.

PM są szczególnie ważne ze względu na ich zdolność do przenoszenia różnych związków chemicznych i pierwiastków. Powietrze zanieczyszczone PM jest aerozolem cząstek stałych (dymy) i płynnych (mgły), różniących się nie tylko rozmiarem, ale także składem chemicznym i rozmieszczeniem substancji chemicznych w cząstkach, właściwościami fizycznymi takimi jak masa, kształt, powierzchnia i jej struktura. Nie wszystkie PM charakteryzuje jednakowa szkodliwość. Z toksykologicznego punktu widzenia pyły mineralne prawdopodobnie charakteryzuje pięciokrotnie mniejsza szkodliwość od pyłów, których jądro utworzone jest z węgla. Te ostatnie są konglomeratami rozmaitych składników otaczających jądro. W ich skład wchodzi między innymi lotne związki organiczne w tym

węglowodory aromatyczne, metale, furany, dioksyne oraz składniki pochodzenia biologicznego. Skład chemiczny PM jest bardzo istotny ze względu na możliwość indukcji mutacji, kancerogenezy oraz zmian epigenetycznych.

Pomiędzy wynikami badań epidemiologicznych, dotyczących skutków zdrowotnych narażenia na zanieczyszczenia powietrza, czasami spotyka się znaczące rozbieżności. Wynikają one nie tylko z odmiennej oceny narażenia (w tym zastosowanych metod pomiarowych) ale także z braku danych o roli i obecności fazy ciekłej, składzie chemicznym cząstek, ekspozycji wewnątrzdomowej, otaczającym środowisku naturalnym i wielu potencjalnych czynnikach zakłócających. Nie jest możliwe określenie wpływu jednego, wyodrębnionego zanieczyszczenia powietrza komunalnego na zdrowie populacji. Informacje uzyskane z laboratoryjnych badań toksykologicznych nigdy w pełni nie odzwierciedlają skutków bardzo złożonej ekspozycji występujących w naturalnych warunkach.

Odczuwalny jest niedostatek wieloparametrycznych analiz w obszarze badawczym wpływu zanieczyszczeń powietrza na zdrowie. Jakkolwiek doskonałym źródłem informacji byłoby tutaj badanie odpowiednio licznej kohorty urodzeniowej połączone z dokładną oceną ekspozycji zewnętrznej i wewnętrznej za pomocą technik omikowych i analizą uzyskanych danych dokonaną przez sztuczną inteligencję, to przeprowadzenie takiego projektu nie jest w chwili obecnej prawdopodobne. A zatem realizacja projektów badawczych stawiających sobie za cel określenie wpływu ocenionej wieloczynnikowo ekspozycji na zanieczyszczenia powietrza komunalnego na występowanie potencjalnych skutków biologicznych w tym w zakresie choroby niedokrwiennej serca i etiopatologii miażdżycy jest niezwykle istotna. Dlatego też cele dysertacji przedłożonej do recenzji tj.

- ocena wpływu zanieczyszczeń powietrza na zmianę ekspresji genów (mikroRNA) i stężeń cytokin prozapalnych u stałych mieszkańców Krakowa (osób z przewlekłym zespołem wieńcowym w odniesieniu do grupy kontrolnej);

- ocena ekspresji wybranych rodzajów mikroRNA, stężeń określonych cytokin prozapalnych oraz aktywności ludzkich monocytów krwi obwodowej po stymulacji próbkami PM_{2.5} (o znanym składzie chemicznym i pochodzeniu) zebranych w Krakowie w okresie zimowym i letnim;

należy uznać za w pełni uzasadnione i bardzo ważne.

Analiza wyników części eksperymentalnej doktoratu w odniesieniu do wyników jego części klinicznej miała służyć określeniu potencjalnej roli monocytów w rozwoju zapalenia śródbłonna i blaszki miażdżycowej pod wpływem PM_{2.5}.

Projekt badawczy uzyskał aprobatę Komisji Etyki UJ CM.

Przedstawiona rozprawa zawiera łącznie 108 stron (w tym 13 tabel, 20 rycin, 3 załączniki). Układ pracy jest typowy o zachowanych proporcjach; składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, wstępu, celów pracy, opisu materiału i metod, prezentacji wyników, ich omówienia (dyskusji), wniosków, bibliografii obejmującej 182 pozycje, spisów tabel i rycin, streszczeń w języku polskim i angielskim.

Wstęp, wyczerpujący, napisany został w oparciu o kompletne, bogate i poprawnie dobrane piśmiennictwo, pozwalające na usystematyzowanie faktów dotyczących zagadnień będących przedmiotem rozprawy, logicznie wprowadza czytelnika w jasno sprecyzowane cele pracy.

Część kliniczną badania przeprowadzono jako prospektywne badanie kohortowe pacjentów hospitalizowanych w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności Serca UJ CM, których podzielono na równoliczne grupy – badawczą i kontrolną z zastosowaniem logicznie i precyzyjnie sformułowanych kryteriów włączenia i wyłączenia uczestnictwa w badaniu. U wszystkich uczestników badania dwukrotnie – zimą i latem – pobrano próbki obwodowej krwi żyłnej celem oznaczenia poziomów ekspresji adekwatnie dobranych rodzajów mikroRNA oraz stężeń cytokin prozapalnych. Źródłem monocytów do przeprowadzenia eksperymentu mającego na celu określenie wpływu PM_{2.5} na aktywność tych komórek była krew żylna zdrowych ochotników. Próbkami PM_{2.5} pobrano w okresie zimowym i letnim w lokalizacji odpowiadającej w przeważającej mierze terenowi zamieszkania uczestników badania a więc w dużej mierze odzwierciedlającej ich narażenie zewnątrz mieszkaniowe.

Poziom ekspresji wybranych mikroRNA i stężenia cytokin prozapalnych w części eksperymentalnej badania oceniono w nadsączu zawiesiny ludzkich monocytów inkubowanych z próbkami PM_{2.5} pozyskanymi w lecie i w zimą. Przeprowadzono wieloparametryczną analizę laboratoryjną składu i stężenia PM_{2.5} w próbkach uzyskanych w obu powyżej wzmiankowanych porach roku. Aktywność fagocytarną monocytów w odniesieniu do PM_{2.5} oceniono z użyciem mikroskopii elektronowej.

Zastosowane przez doktoranta metody badawcze nie budzą wątpliwości - zostały właściwie dobrane i odpowiadają obecnie przyjętym standardom. Celem dokonania analizy statystycznej doktorant posłużył się metodami odpowiednimi dla uzyskania koniecznych do racjonalnego wnioskowania danych wyjściowych.

Dyskusja, podobnie jak wstęp pracy, przeprowadzona jest w sposób uporządkowany i logiczny, świadczy o dużej wiedzy autora o poruszanych zagadnieniach.

Na podstawie uzyskanych wyników doktorant sformułował sześć korespondujących z celami dysertacji wniosków. Wg recenzenta na szczególną uwagę zasługuje wniosek trzeci. Zwiększona ekspresja czterech rodzajów mikroRNA w próbkach surowicy uzyskanych od osób z przewlekłym zespołem wieńcowym w okresie zimowym w (porównaniu do wyników grupy kontrolnej) sugeruje wg autora, że te osoby są bardziej podatne na szkodliwy wpływ zanieczyszczeń powietrza. Jednakże nie wiadomo (uwaga recenzenta) czy zaobserwowane zjawisko jest biomarkerem CCS czy też biomarkerem podatności na zachorowanie na CCS. Problem ten wymaga dalszych badań.

Uwagi krytyczne

Doktorant użył terminu „cząsteczki” w odniesieniu do PM. Cząsteczka jest to grupa atomowa połączona wiązaniami chemicznymi – w odniesieniu do PM należy używać terminu „cząstki”. PM są to cząstki materii. Jest to zresztą powszechnie spotykany błąd w polskim, także naukowym piśmiennictwie. Podobnie jak powtarzany w Polsce desygnat PM jako pyłu zawieszonego. Pojęcie PM nie dotyczy wyłącznie cząstek stałych - obejmuje zarówno fazę stałą jak i ciekłą aerozolu.

Wg. obecnie przyjętej terminologii (UPAC) należy używać terminu ditlenek a nie dwutlenek (w dysertacji – dwutlenek węgla, dwutlenek siarki itd).

Pyłki są nazwą własną – użycie terminów „pyłek kwiatowy” (ryc. 1, str. 13), „pyłki roślin” (str.14) nie jest właściwe.

Aktualnie przyjęto nazwę astma a nie astma oskrzelowa (str. 14, 33)

Europejskie standardy emisji spalin dotyczą pojazdów silnikowych a nie jakości paliwa. (str.20)

Kryteria wyłączenia z badania (str. 33): przebycie infekcji lub antybiotykoterapii - znak mniejszości w odniesieniu do stężeń CRP i liczby leukocytów powinien być zamieniony na znak większości.

„Wykonano ...badanie...celem wykluczenia funkcji lewej komory” – doktorantowi chodziło prawdopodobnie o wykluczenie dysfunkcji (str. 36).

Użycie przez doktoranta określenia „waga ciała” zamiast masa ciała (str.37).

Ww. uwagi nie umniejszają naukowej wartości dysertacji.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska lekarza Krzysztofa Krawczyka jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego będącym wynikiem własnych badań naukowych.

Podjęcie niezwykle istotnej tematyki badawczej, nakład pracy wykonanej przez doktoranta, jego wiedza z dziedziny, doborze literatury, umiejętności posługiwania się warsztatem naukowym w pełni upoważniają mnie do stwierdzenia, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia kryteria i warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w obowiązującej Ustawie o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 i wystąpienia do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie lekarza Krzysztofa Krawczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje o wyróżnienie rozprawy ze względu na jej wyjątkowo wysoki poziom naukowy.

Chęć / 08 / 08 2022

prof. dr hab. n. med. Cezary Pałczyński:
Specjalista chorób wewnętrznych
Specjalista alergolog
905710\$

