

### **Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Krzysztofa Krawczyka**

#### **Tytuł rozprawy doktorskiej „Sezonowa zmiana ekspresji mikroRNA oraz stężeń cytokin prozapalnych produkowanych przez monocyty u osób przewlekle narażonych na zanieczyszczenie powietrza”**

Zanieczyszczenie powietrza zalicza się do 10 najważniejszych czynników ryzyka zgonu, a najbardziej narażone na jego szkodliwe działanie są osoby z chorobami układu krążenia i układu oddechowego. Główne składniki zanieczyszczeń to substancje gazowe oraz pył zawieszony składający się z drobnych stałych cząsteczek (PM, ang. particulate matter). Bardzo małe cząsteczki PM (średnicy 2,5  $\mu\text{m}$ ) mają zdolność przedostawania się z pęcherzyków płucnych do tętnic wieńcowych, gdzie poprzez eskalację stanu zapalnego mogą prowadzić do progresji zmian miażdżycowych. Ich działanie na organizm człowieka zależy nie tylko od wielkości, ale także czasu ekspozycji, stężenia w powietrzu oraz składu chemicznego. W procesie zapalnym towarzyszącym inicjacji, jak i progresji miażdżycy istotną rolę odgrywają z kolei monocyty, które migrują przez śródbłonek do błony wewnętrznej i różnicują się w kierunku makrofagów. Stanowią źródło cytokin prozapalnych oraz metaloproteinaz przyczyniających się do destabilizacji blaszki. Za regulację funkcji monocytów i odpowiedzi immunologicznej odpowiedzialne są m.in. cząsteczki miRNA, których ekspresja może ulec zmianie pod wpływem ekspozycji na zanieczyszczenie środowiska. W związku z powyższym temat podjęty przez Doktoranta może być jak najbardziej istotny i aktualny w kontekście prewencji choroby wieńcowej i zwalczania modyfikowalnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego.

Układ rozprawy doktorskiej lek. Krzysztofa Krawczyka jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań. Został przygotowany w sposób systematyczny i przejrzysty, co wynika z właściwie przyjętej koncepcji badania. Praca liczy 108 stron i składa się z 12 następujących rozdziałów: 1. Wykaz stosowanych skrótów; 2. Wstęp; 3. Cele badawcze; 4. Materiał i metodyka; 5. Wyniki; 6. Dyskusja; 7. Wnioski; 8. Piśmiennictwo liczące 182

pozycje, 9. Spis tabel; 10. Spis rycin; 11. Streszczenie w języku polskim; 12. Streszczenie w języku angielskim.

Rozprawa zawiera 20 ciekawych, dokładnie opisanych, kolorowych rycin, w tym map Krakowa, które pozwalają na lepsze zrozumienie prezentowanych treści i wyników. W monografii znajduje się także 13 szczegółowych, a przy tym bardzo czytelnych tabel.

W obszernym **wprowadzeniu** Doktorant wprowadza czytelnika w problematykę zanieczyszczenia powietrza na świecie oraz jego wpływu na stan zdrowia człowieka i ryzyko rozwoju miażdżycy. W tym celu przywołuje także dane historyczne dotyczące znanych epizodów smogu i ich konsekwencji zdrowotnych. Należy docenić fakt, iż doktorant wychodzi poza ramy typowej pracy ze spektrum nauk medycznych i dokładnie zgłębia tematy z zakresu geografii i ochrony środowiska. Szczegółowo prezentuje problem zanieczyszczenia powietrza nie tylko na świecie, ale także w jego miejscu zamieszkania. Kraków należy bowiem do najbardziej zanieczyszczonych miast w Europie, a roczna liczba zgonów mieszkańców w następstwie zanieczyszczenia powietrza prawdopodobnie osiąga tu liczbę kilkuset. W Krakowie w ciągu roku wielokrotnie dochodzi do przekroczenia dopuszczalnych poziomów PM (drobnych cząsteczek stałych pyłu zawieszonego). Częste epizody smogu związane są emisją zanieczyszczeń przez sektor przemysłowy, nasilony ruch samochodowy oraz spalanie paliw stałych w piecach domowych. Na złą jakość powietrza wpływa też usytuowanie i panujący w Krakowie specyficzny mikroklimat.

Kolejno Doktorant przedstawia aktualne dane dotyczące epidemiologii i patofizjologii miażdżycy. Na podstawie dostępnej literatury nakreśla problem potencjalnego udziału monocytów oraz zmian ekspresji miRNA w patogenezie choroby wieńcowej.

Wstęp napisany został bardzo przejrzysto, a sposób przedstawienia problemu badawczego wskazuje na posiadaną wiedzę i zainteresowanie Doktoranta tematem badania.

Lek. Krzysztof Krawczyk prawidłowo formułuje dwa główne **cele pracy** i przedstawia hipotezy badawcze. Cele obejmują:

- 1) Ocenę wpływu zanieczyszczonego powietrza na zmianę ekspresji genów (miRNA) i stężeń cytokin prozapalnych u stałych mieszkańców Krakowa (osób z CCS oraz grupy kontrolnej).
- 2) Ocenę ekspresji wybranych rodzajów miRNA, stężeń określonych cytokin prozapalnych oraz aktywności ludzkich monocytów krwi obwodowej po stymulacji próbkami PM<sub>2,5</sub> zebranymi w Krakowie w okresie zimowym oraz letnim.

Następnie lek. Krzysztof Krawczyk opisuje skrupulatnie **metodykę** badania. Do projektu włączono 140 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Choroby Wieńcowej i Niewydolności

Serca Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (UJ CM) w latach 2017-2019, z czego 70 osób do grupy badanej i 70 do grupy kontrolnej. Liczne i dobrze przemyślane kryteria wyłączenia, jak np. cukrzyca, nikotynizm, aktywne stany zapalne czy autoimmunologiczne, pozwoliły na ograniczenie czynników modyfikujących profil immunologiczny chorych. Mimo rygorystycznych kryteriów doboru pacjentów, udało się zgromadzić grupę o dużej liczebności, znacznie przekraczającej oszacowaną minimalną liczebność potrzebną do analizy statystycznej.

Lek. Krzysztof Krawczyk dużo miejsca poświęca skrupulatnemu i wręcz imponującemu opisowi zastosowanej metodyki. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż badanie stanowi bardzo złożony i czasochłonny eksperyment badawczy. Składa się zarówno z części klinicznej, jak i eksperymentalnej, co w efekcie umożliwiło zaobserwowanie analogicznych zmian ekspresji niektórych cząsteczek miRNA w surowicy pacjentów oraz stymulowanych monocytach. Świadczy o wszechstronnej wiedzy i zaangażowaniu doktoranta. Praca wymagała współpracy z Wydziałem Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH w Krakowie, gdzie pobierano próbki PM<sub>2,5</sub>. Aby uzyskać wymaganą masę suchego ekstraktu cząsteczek do badań, zebrano łącznie aż 100 par próbek, które poddano następnie szczegółowej analizie składu chemicznego.

Celem przeprowadzenia analizy miRNA i cytokin prozapalnych w surowicy pacjentów krew pobierano dwukrotnie – w sezonie letnim i zimowym, a punkty czasowe pobrań dokładnie określono na podstawie analizy stacji monitoringu jakości powietrza Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska.

Dodatkowo w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej przeprowadzono molekularną analizę zmian ekspresji miRNA i cytokin w preparatach ludzkich monocytów poddanych stymulacji uzyskaną zawiesiną PM<sub>2,5</sub>. Na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ obserwowano ludzkie monocyty w transmisyjnym mikroskopie elektronowym dokumentując proces fagocytozy cząsteczek PM<sub>2,5</sub> oraz zmiany morfologii monocytów.

Niniejsza praca stanowi fragment badania zespołowego wykonanego w ramach grantu NCN OPUS 11 pt. „Zmiana ekspresji mikroRNA ludzkich monocytów krwi obwodowej wskutek ekspozycji na cząsteczki pyłu zawieszzonego PM<sub>2,5</sub> in vitro – potencjalny związek między zanieczyszczeniem powietrza a miażdżycą”.

**Wyniki** pracy zostały przedstawione w sposób przejrzysty, uporządkowane w postaci podzielonych tematycznie podpunktów. Oto najważniejsze:

- W próbkach surowicy krwi pobranych od pacjentów w sezonie zimowym – w porównaniu z próbkami pobranymi w okresie letnim – obserwowano zwiększony

poziom ekspresji: miR-101-3p, miR-34c-5p, miR-223-5p i miR-25-3p, a zmniejszony miR-382-5p.

- W surowicy pacjentów z CCS (w porównaniu z grupą kontrolną) w okresie zimowym obserwowano zwiększoną ekspresję: miR-101-3p, miR-34c-5, miR-223-5p i miR-25-3p. W próbkach pobranych latem obserwowano zaś jedynie zwiększony poziom ekspresji miR-34c-5p.
- U wszystkich uczestników badania wykazano w surowicy wyższe stężenie IL-8 i MMP-13 w okresie letnim w porównaniu z okresem zimowym.
- Pod wpływem stymulacji zawiesiny monocytów próbkami PM<sub>2,5</sub> zebranymi w sezonie zimowym odnotowano zwiększenie ekspresji miR-34c-5p, miR-101-3p, miR-494-3p, miR-548d-5p, miR-223-5p, miR-130a-3p i miR-339-3p, a zmniejszenie ekspresji cząsteczek miR-181d-5p i miR-1301-3p. Nie zaobserwowano natomiast znamiennych różnic w stężeniach prozapalnych cytokin.
- W mikroskopie elektronowym uwidoczniono wzmożoną aktywność fagocytarną monocytów stymulowanych próbkami PM<sub>2,5</sub> w porównaniu z komórkami niestymulowanymi.
- Wyniki uzyskane w biologicznej części projektu poparto dodatkowo wieloskładnikową charakterystyką zebranych próbek PM<sub>2,5</sub>. W okresie zimowym wykazano istotnie większe stężenia PM<sub>2,5</sub>, jak również innych składowych zanieczyszczenia powietrza, w tym pojedynczych pierwiastków, jonów nieorganicznych, czy też wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.

**Dyskusja** monografii stanowi bogatą i logicznie spójną analizę otrzymanych wyników, świadczy o doskonałej znajomości tematu i wiedzy Doktoranta. Uzyskane dane odniesiono do publikowanych światowych badań klinicznych i eksperymentalnych. Tekst jest czytelny i napisany wzorcowym słownictwem naukowym. Otrzymane wyniki badań stały się podstawą do sformułowania jasnych i konkretnych **wniosków**, dobrze odpowiadających postawionym celom pracy.

Uzyskanie pod wpływem stymulacji zawiesiny monocytów próbkami PM<sub>2,5</sub> zwiększonej ekspresji określonych miRNA, które na podstawie dostępnej literatury mogą brać udział w patogenezie miażdżycy, sugeruje możliwy niekorzystny wpływ cząsteczek PM<sub>2,5</sub> na zdrowie człowieka. Co istotne, wykazano powtarzalność niektórych z wzorców miRNA w części eksperymentalnej i klinicznej badania. Może to, według Doktoranta, świadczyć o udziale monocytów w produkcji tych miRNA w odpowiedzi na zanieczyszczenie powietrza. Przemawiać może za tym również zwiększona aktywność fagocytarna stymulowanych cząsteczkami PM<sub>2,5</sub> monocytów obserwowana w mikroskopie elektronowym.

Zwiększona ekspresja cząsteczek miRNA w surowicy uczestników badania w okresie zimowym związana jest z gorszą jakością powietrza w tym okresie. Obserwacja ta koreluje zarówno z ww. wnioskami części eksperymentalnej badania, jak również z odnotowanym w badaniu zwiększonym stężeniem analizowanych składowych zanieczyszczenia powietrza w próbkach w sezonie zimowym. Ponadto, Doktorant wnioskuje, iż zwiększona ekspresja określonych, mogących mieć związek z rozwojem miażdżycy, cząsteczek miRNA w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej, sugeruje większą podatność tej grupy na skutki kliniczne zanieczyszczeń powietrza.

Lek. Krzysztof Krawczyk potrafi się krytycznie odnieść do metodyki i wyników swojego badania. Szczegółowo przedstawia możliwe ograniczenia eksperymentu, które, jak słusznie ocenia, uniemożliwiają sformułowanie jednoznacznych związków przyczynowo-skutkowych. Zdobyte podczas obecnej analizy doświadczenia zamierza wykorzystać w planowanych dalszych eksperymentach, przykładowo do określenia minimalnej liczebności grupy.

W przedstawionej pracy zwróciłam uwagę na pewne ograniczenia merytoryczne i badawcze:

1. Doktorant uwzględnił podział monocytów na dwie subpopulacje – CD14<sup>+</sup> i CD16<sup>+</sup> cytując publikację z 1989r., przy czym obecnie wiadomo, iż wyróżnia się trzy subpopulacje monocytów. Zgodnie z opublikowaną w 2010r. przez the Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Societies pracą rekomenduje się podział na monocyty klasyczne (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), stanowiące aż 90% wszystkich monocytów krwi obwodowej, monocyty pośrednie (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) i nieklasyczne (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>).

2. Do grupy kontrolnej, zdefiniowanej jako „pacjenci bez CCS (przewlekłego zespołu wieńcowego)” włączono pacjentów na podstawie ujemnego wywiadu w kierunku MI/ PCI lub CABG oraz wykluczenia niedokrwienia w testach obciążeniowych lub obecności nieistotnych zmian w badaniu angiotomografii tętnic wieńcowych. Zgodnie z wytycznymi ESC nieinwazyjnych badań czynnościowych używa się do rozpoznawania choroby wieńcowej z istotnym zwężeniem tętnic wieńcowych a ujemne wyniki tych badań nie wykluczają obecności niewielkich blaszek ani przewlekłego zespołu wieńcowego. Dodatkowo należy pamiętać o możliwych ujemnych wynikach prób obciążeniowych lub tomografii np. w dławicy naczynioskurczowej lub mikronaczyniowej oraz często niediagnostycznych wynikach testów wysiłkowych u kobiet.

Przewlekły zespół wieńcowy jest chorobą dynamiczną, postępującą czasami w sposób niemy klinicznie. Nawet pacjentów bez istotnych zwężeń tętnic wieńcowych może charakteryzować gotowość prozakrzepowa prowadząc do zakrzepów na nieistotnych dotąd blaszkach. Szczególnie należy zwrócić uwagę na fakt, że do grupy kontrolnej także zrekrutowano pacjentów z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego (z HA, nadwagą, z podwyższonym

średnim stężeniem LDL). Poza tym, pacjenci mieli wcześniej wskazania do wykonania prób obciążeniowych, prawdopodobnie z powodu zgłaszanych dolegliwości. Stąd może bardziej sugerowałabym określenie grupy jako „grupa bez istotnego CCS/ bez przebytych incydentów sercowo-naczyniowych”.

3. Piśmiennictwo w monografii cytowane jest chaotycznie, sugerowałabym zachowaną kolejność numeryczną.

Chciałabym jednak zaznaczyć, iż niniejsze uwagi mają jedynie charakter marginalny i nie umniejszają wartości rozprawy.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa stanowi oryginalne dokonanie Doktoranta i świadczy o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu pracy naukowej wymaganym od kandydata na stopień doktora nauk medycznych. Cele i hipotezy zostały dobrze przemyślane a metodyka wnikliwie opracowana, co pozwoliło na kompleksową ocenę wpływu zanieczyszczeń na aktywność monocytów i zmiany w profilu molekularnym w odpowiednio określonych punktach czasowych. Materiał został rzetelnie opracowany, dyskusja logicznie przeprowadzona, a wysunięte wnioski świadczą o umiejętności samodzielnej i logicznej analizy. Praca zwraca uwagę czytelnika na często pomijany problem zanieczyszczenia powietrza w prewencji chorób sercowo-naczyniowych, czyta się ją z zaciekawieniem i zmusza do refleksji.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom określonym w *art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późn.zm.)* oraz w *art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r., poz. 1669 z późn.zm.)*. W związku z powyższym, przedstawiam Senatowi Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie lek. Krzysztofa Krawczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Agnieszka Tytus*