dr hab. n. med. Marcin Sadowski, prof. UJK
Zakład Anatomii, Instytut Nauk Medycznych
Collegium Medicum, Uniwersytet
Jana Kochanowskiego w Kielcach

Pracownia Hemodynamiki i Ośrodek Implantacji
Stymulatorów Serca, Świętokrzyskie Centrum Kardiologii
Wojewódzki Szpital Zespolony w Kielcach

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. Piotra Kuszmiersza

Zaburzenia aktywacji układu krzepnięcia oraz czynności śródbłonka w przebiegu wybranych chorób tkanki łącznej

Układowe choroby tkanki łącznej to grupa rzadko występujących schorzeń, których wspólnym elementem patofizjologicznym jest wytwarzanie autoprzeciwciał przeciwko antygenom zlokalizowanym w różnych tkankach i narządach. Bogactwo objawów klinicznych oraz złożone, zmieniające się kryteria klasyfikacyjne i diagnostyczne w połączeniu z małą częstością występowania skutkują opóźnieniami w rozpoznaniu, a tym samym nie pozwalają rozpocząć leczenia na wczesnym etapie choroby. Przewlekły stan zapalny oraz pośrednie lub bezpośrednie zajęcie układu krążenia stanowią o relatywnie wysokiej śmiertelności trudnej do wytłumaczenia wyłącznie występowaniem klasycznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. Za jedną z możliwych przyczyn uważa się dysfunkcję śródbłonka, która w połączeniu z przewlekle zwiększonym stężeniem cytokin prozapalnych odpowiada za zaburzenia funkcji naczynioruchowej oraz interakcje z białkami krzepnięcia i fibrynolizy, tym samym przyczyniając się do wzmożonej gotowości prozakrzepowej. Mechanizmy tych zmian są słabo poznane, a dostępne dane nieliczne i nierzadko sprzeczne ze względu na brak standaryzacji metod analitycznych w tej dziedzinie. Wykrywanie dysfunkcji śródbłonka oraz nieprawidłowych właściwości skrzepu fibrynowego może pomóc wyselekcjonować chorych o większym ryzyku zakrzepowo-zatorowym i przyczynić się do opracowania działań zapobiegających przedwczesnym zgonom w tej grupie chorych. Z tych powodów wysiłek badawczy Doktoranta dotyczący analizy aktywacji układu krzepnięcia oraz funkcji śródbłonka u pacjentów z autoimmunologicznymi miopatiami zapalnymi lub twardziną układową uważam za w pełni uzasadniony.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została zrealizowana w postaci zbioru trzech anglojęzycznych artykułów oryginalnych opublikowanych w indeksowanych czasopismach medycznych figurujących w wykazie Ministera Edukacji i Nauki:

1. *Thrombin generation potential is increased in patients with autoimmune inflammatory myopathies.* Adv Med Sci 2022; 67: 346-352. IF 2,852; MEiN 100.
2. *Thrombin generation potential is enhanced in systemic sclerosis: impact of selected endothelial biomarkers.* Clin Exp Rheumatol 2021; 39: S13-S19. IF 4,862; MEiN: 100.
3. *Endothelial dysfunction in patients with systemic sclerosis.* Postepy Dermatol Allergol 2020; 37: 495-502. IF 1,664; MEiN 70.

Została opatrzona wprowadzeniem dotyczącym epidemiologii, klasyfikacji, zarysu patofizjologii, objawów klinicznych oraz kwestii rokowniczych u chorych z twardziną układową (SSc), zapaleniem skórno-mięśniowym (DM) i zapaleniem wielomięśniowym (PM). Wyniki przedstawione są w krótko w podsumowaniu, a obszernie w załączonych artykułach. Rozprawę zamyka cykl oświadczeń współautorów publikacji wraz ze zgodami na ich wykorzystanie jako część rozprawy doktorskiej.

W uzasadnieniu podjęcia badań Doktorant wskazuje potrzebę oceny funkcji śródbłonka oraz wybranych parametrów układu krzepnięcia. Za główny cel rozprawy Doktorant obrał ocenę dynamiki procesu krzepnięcia krwi przy użyciu pomiaru generacji trombiny *in vitro* testem *Calibrated Automated Thrombogram* (CAT) w grupie chorych z SSc, DM i PM, a ponadto w grupie chorych z SSc ocenę czynności śródbłonka i ryzyka rozwoju miażdżycy przy wykorzystaniu metod obrazowych oraz laboratoryjnych. Dla uzyskania pełnej i obiektywnej oceny problemu sformułował następujące pytania badawcze:

1. Czy u pacjentów z SSc, DM i PM dynamika procesu krzepnięcia krwi oceniona w pomiarze generacji trombiny *in vitro* metodą CAT różni się od osób zdrowych?
2. Czy dynamika procesu krzepnięcia krwi wyrażona w pomiarze generacji trombiny *in vitro* metodą CAT wykazuje różnice w poszczególnych schorzeniach w zależności od obrazu klinicznego oraz obecności, typu i miana przeciwciał?
3. Czy stosowane leczenie immunosupresyjne jest dodatkowym czynnikiem wpływającym na dynamikę procesu krzepnięcia?
4. Czy u pacjentów z SSc uszkodzenie śródbłonka jest bardziej nasilone niż w grupie osób zdrowych?
5. Czy u pacjentów z SSc istnieje związek pomiędzy stopniem nasilenia uszkodzenia śródbłonka, a dynamiką procesu krzepnięcia krwi wyrażonej w pomiarze generacji trombiny?

Grupę badaną stanowiło 56 chorych na SSc oraz 58 chorych na DM/PM rekrutowanych w latach 2014 do 2019 z Poradni lub Oddziału Alergii i Immunologii Kliniki Chorób

Wewnętrznych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Rozpoznania zostały ustalone na podstawie odpowiednich kryteriów klasyfikacyjnych European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology (EULAR/ACR).

Zarówno pacjenci z rozpoznaniem SSc, jak i DM/PM w czasie przystąpienia do badania pozostawali w stadium remisji. Remisję zdefiniowano jako brak pogorszenia klinicznego, czynnościowego, laboratoryjnego lub obrazowego w ciągu ostatnich 6 miesięcy. Pacjenci z przewlekłą niewydolnością serca z obniżoną frakcją wyrzutową, niestabilną dusznicą bolesną, niekontrolowanym nadciśnieniem tętniczym, niewydolnością wątroby, wywiadem choroby zakrzepowo-zatorowej i będący w trakcie leczenia onkologicznego zostali wykluczeni z udziału w badaniu. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 67 zdrowych osób bez klinicznych cech miażdżycy (dobranych pod względem płci, wieku, indeksu masy ciała oraz chorób współistniejących) spośród personelu szpitala oraz ich krewnych. Kryteria wyłączenia pozostawały takie same jak w grupie badawczej. U wszystkich osób uczestniczących w badaniu wykonano rutynowe badania laboratoryjne: morfologię krwi obwodowej, stężenie elektrolitów, profil lipidowy, stężenie glukozy, białka C-reaktywnego. Oznaczono stężenie interleukiny 6. U pacjentów z grupy badawczej oznaczono obecność i miano autoprzeciwciał typowych dla danej jednostki chorobowej. U wszystkich pacjentów z rozpoznaniem SSc oraz w grupie kontrolnej zbadano również stężenie markerów uszkodzenia śródbłonka, tj.: cząsteczki adhezji komórkowej naczyń (VCAM-1) oraz rozpuszczalnej trombomoduliny. U wszystkich badanych przeprowadzono pomiar generacji trombiny z wykorzystaniem automatycznego trombogramu. W tym badaniu pomiar endogennego potencjału trombiny (ETP) wykonano przy użyciu skalibrowanej automatycznej trombografii. Każdą próbkę osocza analizowano w dwóch powtórzeniach. Szczegóły metodyczne zostały dokładnie opisane w załączonych publikacjach. Ponadto w grupie pacjentów z SSc oraz grupie kontrolnej wykonano rutynowe badanie echokardiograficzne. Dodatkowo wykonano pomiar poszerzenia związanego ze zwiększeniem przepływu w tętnicy ramiennej (FMD) w oparciu o zmodyfikowaną metodę Celermayera. Wykonano również obustronnie pomiar grubości kompleksu intima-media tętnicy szyjnej wspólnej (IMT) w zakresie ściany tylnej i przedniej tętnicy szyjnej wspólnej (2 cm poniżej opuszki), wykorzystując w analizie średnią wartość z pomiarów lewej i prawej tętnicy. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej (1964), a protokół był zaakceptowany przez komisję bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Doktorant przeanalizował dane dotyczące charakterystyki klinicznej, leczenia oraz wyników badań laboratoryjnych i czynnościowych oceniających funkcję śródbłonka oraz dynamikę procesu krzepnięcia w pomiarze generacji trombiny. Szczegółowy opis zastosowanych technik statystycznych wskazuje, że są one poprawnie dobrane i przyczyniają się do wysokiego poziomu naukowego rozprawy. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant uzyskał następujące wyniki charakteryzujące badaną grupę:

W badaniach opisanych w artykule *Thrombin generation potential is increased in patients with autoimmune inflammatory myopathies.* (Adv Med Sci 2022; 67: 346-352) oceniono dynamikę procesu krzepnięcia wykorzystując pomiar generacji trombiny *in vitro* w grupie pacjentów z DM/PM oraz zbadano jej związek z

obrazem klinicznym. Do tego badania zakwalifikowano 58 pacjentów z DM/PM (w tym 19 mężczyzn i 39 kobiet) z czego większość stanowiły osoby z PM (67%) oraz 67 zdrowych osób (16 mężczyzn i 51 kobiet) dopasowanych względem wcześniej określonych czynników demograficznych i chorób towarzyszących. Pacjenci z DM/PM wykazywali zwiększoną dynamikę generowania trombiny in vitro, co wyrażało się wyższym o 20,5% poziomem ETP, szczytowym stężeniem generowanej trombiny wyższym o 36,4% oraz krótszym czasem do osiągnięcia szczytu trombiny o 10,5% w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$ dla wszystkich parametrów, także po uwzględnieniu poprawki na potencjalne czynniki zakłócające). Ponadto pacjenci z PM/DM charakteryzowali się zauważalnie wyższym OR (2,33 [95% CI 1,57–3,44], $p<0,001$) zwiększonego ETP, zdefiniowanego jako wartości powyżej punktu odcięcia 1665,8 nmol/l trombiny x min, oraz 5,33 wyższym OR (95% CI 1,57–3,47) skróconego czasu do osiągnięcia szczytowego stężenia trombiny, zdefiniowanego jako wartości poniżej punktu odcięcia 5,33 min, w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej. W przeciwieństwie do wspomnianych parametrów czas do rozpoczęcia reakcji nie różnił się u pacjentów i w grupie kontrolnej. Ponadto czynniki demograficzne, takie jak wiek, płeć i BMI, nie miały wpływu na przebieg generacji trombiny. Podobnie choroby współistniejące, cechy kliniczne i zastosowana terapia immunosupresyjna nie były powiązane z tymi parametrami, z wyjątkiem obecności zapalenia stawów (n = 32, 55%), związanego z 13% wzrostem mediany wartości ETP ($p = 0,03$). Co ciekawe natomiast, osoby palące (n = 21, 36,2%) były bardziej narażone na uzyskanie wyższego ETP (OR 2,72 [95% CI 1,41–5,27], punkt odcięcia 1930 nmol/l trombiny x min, $p = 0,02$). Zgodnie z oczekiwaniami, fibrynogen i FVIII były powiązane ze stężeniem CRP ($r=0,4$, $p < 0,01$, dla obu), ale żaden z nich nie korelował z parametrami testu generacji trombiny. Udokumentowano silną ujemną korelację między stężeniem troponiny i parametrami generacji trombiny we krwi ($r=-0,67$ i $r=-0,71$ odpowiednio dla ETP i szczytowego stężenia trombiny; $p <0,001$) oraz silną dodatnią korelację z czasem opóźnienia reakcji i czasem do osiągnięcia szczytowego stężenia trombiny (odpowiednio $r=0,67$ i $r=0,69$; $p < 0,001$). Modele regresji wielokrotnej ujawniły, że różne czynniki przewidywały wyższe ETP w każdej z tych chorób. W **grupie z DM** ETP było podwyższone u pacjentów z zapaleniem stawów ($\beta= 0,36$ [95% CI 0,2 do 0,53]) i wyższą liczbą płytek krwi ($\beta=0,24$ [95% CI 0,07 do 0,4]). Przeciwnie, stężenie troponiny we krwi było jedynym ujemnym predyktorem niższego ETP ($\beta= -0,74$ [95%CI -0,9 do -0,57]); tym samym powyższe czynniki wyjaśniały aż 86% zmienności ETP w grupie DM. Z kolei **w grupie PM**, wyższe ETP miało związek z podwyższonym stężeniem fibrynogenu, CRP i cholesterolu całkowitego ($\beta=0,17$ [95%CI 0,16 do 0,36], $\beta=0,45$ [95% CI 0,28 do 0,62] i $\beta=0,18$ [95% CI odpowiednio 0,01 do 0,35]) oraz niższym stężeniem glukozy we krwi ($\beta=-0,35$ [95% CI -0,52 do -0,18]). Wszystkie wymienione powyżej parametry wyjaśniały jednak tylko 42% zmienności ETP.

W drugiej części badań oceniono dynamikę procesu krzepnięcia, wykorzystując pomiar generacji trombiny *in vitro* w grupie pacjentów z SSc oraz zbadano jej związek z obrazem klinicznym i cechami dysfunkcji śródbłonka. Wyniki przedstawiono w publikacji *Thrombin generation potential is enhanced in systemic sclerosis: impact of selected endothelial biomarkers.* Clin Exp Rheumatol 2021; 39: S13-S19. Do badania zakwalifikowano 56 pacjentów z twardziną układową (w tym 9 mężczyzn i 47 kobiet) z czego większość stanowiły osoby z postacią uogólnioną (66%) oraz 67 zdrowych osób (16 mężczyzn i 51 kobiet) dopasowanych względem wcześniej określonych czynników. Pacjenci z SSc mieli niekorzystnie zmieniony profil generacji trombiny w porównaniu z grupą kontrolną. SSc była związana ze zwiększonym o 18,3% ETP i wyższym o 14,5% stężeniem szczytowym trombiny (oba $p<0,001$, również po uwzględnieniu potencjalnych czynników zakłócających) w porównaniu z grupą kontrolną. Co ciekawe, grupa pacjentów charakteryzowała się również

wydłużonym o 6,7% czasem opóźnienia reakcji (p=0,01), ale podobnym czasem do osiągnięcia szczytowego stężenia trombiny. Pacjenci z SSc charakteryzowali się znacznie wyższym OR (2,45 [95% CI 1,65–3,64]) zwiększonego ETP, zdefiniowanym jako wartości powyżej punktu odcięcia 1614,3 nmol/l trombiny x min, a także 1,67 (95% CI 1,16 –2,41) wyższym ryzykiem wydłużenia czasu opóźnienia reakcji (definiowane jako wartości powyżej punktu odcięcia 3,07 min) w porównaniu z grupą kontrolną. W SSc ETP pozostawało w silnym dodatnim związku ze stężeniem fibrynogenu (β=0,36 [95%CI 0,19–0,52]) i triglicerydów (β=0,35 [95%CI 0,14– 0,56]), oraz w nieco słabszej zależności ze stężeniem CRP (β =0,2 [95%CI 0,04–0,38]) i eGFR (β=0,22 [95%CI 0,05–0,4]). Z kolei szczytowe stężenie generowanej trombiny było związane z aktywnością FVIII (β=0,42 [95%CI 0,26–0,58]), stężeniem fibrynogenu (β=0,23 [95%CI 0,06–0,4]), liczbą krwinek białych i czerwonych w badaniu morfotycznym krwi (odpowiednio β=0,4 [95% CI 0,23–0,56] i β=0,26 [95% CI 0,1–0,43]) oraz wydolnością nerek (β=0,46 [95% CI 0,29–0,61], dla eGFR). ETP i szczytowe stężenie trombiny, korelowały odwrotnie z parametrami laboratoryjnymi uszkodzenia śródbłonka trombomoduliną (β=- 0,26 [95% CI -0,47 do -0,05] i β=- 0,45 [95% CI -0,64 do - 0,25]) i VCAM-1 (odpowiednio β=-0,48 [95% CI -0,67 do -0,29] i β=-0,49 [95% CI -0,67 do -0,3]). W modelu regresji wielokrotnej ETP było determinowane w sposób dodatni przez aktywność czynnika VIII i markery stanu zapalnego, w tym stężenia CRP i IL-6, ale także przez eozynofilię we krwi. Z kolei krążąca trombomodulina, liczba płytek krwi i TAT (*thrombin-antithrombin complex*, kompleks trombina-antytrombina) przewidywały ETP w tym modelu negatywnie. Wszystkie wymienione parametry wyjaśniały 61% zmienności ETP. Czas opóźnienia reakcji pozostawał w silnym dodatnim związku ze stężeniem fibrynogenu (β=0,52 [95%CI 0,37–0,67]), cFN (β=0,47 [95%CI 0,31–0,62]), triglicerydów (β=0,39 [95 %CI 0,19–0,6]) i glukozy (β=0,35 [95%CI 0,19–0,52), podczas gdy jedyny ujemny i słaby związek wykazano ze stężeniem VCAM-1 (β=-0,24 [95%CI - 0,45 do -0,03]). W modelu regresji wielokrotnej dłuższy czas opóźnienia reakcji przewidywano na podstawie zwiększonego stężenia krążącej trombomoduliny i cFN, podwyższonego stężenia glukozy we krwi i dłuższego czasu trwania choroby. Pacjenci ze zlokalizowaną i uogólnioną postacią SSc nie różnili się profilem generacji trombiny. Jednak osoby z owrzodzeniami palców charakteryzowały się wydłużonym czasem do rozpoczęcia reakcji generacji trombiny (3,59 [2,75–4,43] n=20 vs. 3,09 [3,0–3,99] n=36, p=0,04). Pacjenci leczeni wcześniej cyklofosfamidem mieli znacznie większe ryzyko zaobserwowania wyższego ETP, definiowanego jako wartości powyżej punktu odcięcia 1697,3 nmol/l trombiny x min (OR 2,78 [95% CI 1,23–6,28], p=0,01), w porównaniu z pozostałymi przypadkami. Może to mieć związek z cięższą manifestacją kliniczną choroby w tej grupie. Choroby współistniejące, palenie tytoniu i leki stosowane w chorobach współistniejących nie miały wpływu na profil generacji trombiny.

W ostatniej części badań oceniono przy użyciu metod obrazowych i laboratoryjnych cechy uszkodzenia śródbłonka w grupie pacjentów z SSc. Wyniki przedstawiono w artykule *Endothelial dysfunction in patients with systemic sclerosis.* Postepy Dermatol Allergol 2020; 37: 495-502. Do badania zakwalifikowano 42 pacjentów z twardziną układową (w tym 7 mężczyzn i 35 kobiet), z czego większość stanowiły osoby z postacią uogólnioną (69%) oraz 36 zdrowych osób (11 mężczyzn i 25 kobiet) dopasowanych pod względem wcześniej określonych czynników. Stężenie trombomoduliny i VCAM-1 we krwi było podobne w obu grupach, jednak po standaryzacji do czynników zakłócających w analizie ANCOVA, okazało się, że stężenie trombomoduliny było istotnie wyższe u pacjentów z twardziną układową (p=0.03). Poza tym w grupie SSc stężenie trombomoduliny korelowało ze stężeniem mocznika (β=0.84 [95% CI 0.53-1.15]), kreatyniny (β=0.69 [95% CI 0.44-0.93])

i CRP (β=0.57 [95% CI 0.31-0.83]), natomiast stężenie VCAM-1 jedynie ze stężeniem kreatyniny (β=0.67 [95% CI 0.390.95]). Pacjenci z twardziną układową mieli o 45% niższą wartość FMD% oraz 13% wyższe IMT niż osoby z grupy kontrolnej (p<0.01, również po standaryzacji do czynników zakłócających). W analizie modelu regresji liniowej wartość FMD% u chorych na SSc była determinowana przede wszystkim przez wiek (β=-0.57 [95% CI -0.72 do -0.43]) oraz CRP (β=-0.38 [95% CI -0.55 do -0.22]). Wartość IMT w tej grupie była także skorelowana z wiekiem (β=0.64 [95% CI 0.52 do 0.67]), ale również ze wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej eGFR (β=-0.34 [95%CI -0.5 do -0.18]) oraz stężeniem trombomoduliny (β=0.45 [95% CI 0.13 do 0.76]), a w analizie podgrup była wyższa u pacjentów z towarzyszącym nadciśnieniem tętniczym. Pacjenci z postacią uogólnioną i ograniczoną SSc prezentowali zbliżone wartości laboratoryjnych i ultrasonograficznych parametrów uszkodzenia śródbłonka. Analiza podgrup względem chorób współistniejących i przyjmowanych leków również nie wykazała istotnych różnic.

W podsumowaniu wyników wszystkich analiz Doktorant stwierdza, co następuje:

1. Wśród chorych na SSc oraz DM/PM zaobserwowano wzmożoną aktywację krzepnięcia, co wskazuje na prozakrzepowe właściwości krążącej krwi i może odpowiadać za zwiększone ryzyko powikłań zakrzepowo-zatorowych i incydentów sercowo-naczyniowych.
2. Prozakrzepowe właściwości krwi krążącej były bardziej zaznaczone u chorych na SSc, którzy wymagali agresywniejszego leczenia immunosupresyjnego (np. zastosowania cyklofosfamidu) oraz chorowali dłużej. Natomiast sama postać SSc (układowa zlokalizowana lub układowa rozlana) czy rodzaj obecnych we krwi autoprzeciwciał nie wpływa na ten profil.
3. W przypadku stabilnych pacjentów chorujących na DM/PM zaobserwowano różnice w nasileniu procesu krzepnięcia wśród różnych grup pacjentów. Modele regresji wieloczynnikowej wskazywały na wyższe ETP wśród pacjentów z DM z manifestacją stawową. Wśród pacjentów z PM wykazano, iż największy wpływ na nasilony proces aktywacji krzepnięcia ma proces zapalny oraz zaburzenia metabolizmu lipidów i glukozy.
4. Potrzebne są dalsze, szeroko zakrojone badania obserwacyjne i eksperymentalne, które zweryfikowałyby rolę zmienionego profilu aktywacji krzepnięcia w przebiegu chorób układowych tkanki łącznej i jej przydatności w stratyfikacji ryzyka zdarzeń zakrzepowo-zatorowych.
5. Pacjenci z twardziną układową wykazują zaburzenia funkcji śródbłonka wyrażone obniżoną wartość FMD% i wzmożoną grubością IMT.
6. Pomiar FMD% i IMT może być przydatną metodą do przesiewowego badania u pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi, takimi jak twardzina układowa czy zapalenie skórno-mięśniowe/wielomięśniowe. Ich celem byłoby wskazanie osób ze zwiększonym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych, u których zasadne byłoby zastosowanie dodatkowej interwencji niefarmakologicznej lub nawet farmakologicznej, zmierzającej do minimalizacji tego ryzyka.

Mimo niewątpliwych walorów poznawczych i merytorycznych rozprawa zawiera drobne niejasności skutkujące wątpliwościami, które jestem zobowiązany wypunktować (w kolejności ich występowania w rozprawie). Część z nich dotyczy poprawności językowej lub pomyłek edytorskich. Zaznaczone czcionką wytłuszczoną kwestie istotne pod względem merytorycznym należy skomentować podczas publicznej obrony rozprawy.

s. 3, opis bibliograficzny publikacji wchodzącej w skład pracy doktorskiej (*Advances in Allergology and Dermatology* 2019; 31: 417-425) wskazuje na nieistniejący dokument, bowiem w roczniku 2019 czasopismo to było wydawane w woluminie 36; prawidłowy opis tej publikacji to Postepy Dermatol Alergol/Adv Dermatol Allergol 2020; 37: 495-502,

s. 3, styl opisu bibliograficznego powinien być jednolity, tymczasem na stronie 3 każdy opis jest sporządzony w innym stylu, jakże odmiennym od użytego na ss. 24-25,

s. 3, MNiSW nie istnieje od 01.01.2021., obecnie wykaz i punktacja publikacji są autoryzowane przez Ministra Edukacji i Nauki (MEiN),

s. 7, należy przeredagować pierwszy cel badawczy, aby uniknąć wrażenia, że dynamika procesu krzepnięcia różni się od osób zdrowych, powinno być „… jest inna u osób zdrowych i chorych" lub „… różni się od charakteryzującej osoby zdrowe" itp.,

s. 8 i następne, metodologia to nauka o badaniach naukowych stosowanych w danej dziedzinie wiedzy; Doktorant posługiwał się metodami, więc tytuł rozdziału i podtytuły w streszczeniu powinny brzmieć „Metody/Methods", tak jak w oryginalnych artykułach,

s. 9, brakuje informacji, na której części ciała (ramię *vs* przedramię) umieszczano mankiet sfigmomanometru do indukcji niedokrwienia w celu pomiaru FMD, ponieważ wyniki uzyskiwane w zależności od lokalizacji mankietu różnią się od siebie; ponadto publikacja z 1992 przywołana jako odniesienie do zmodyfikowanej metody Celermayera nie wyjaśnia tej nieścisłości,

s. 11 i następne, badano stężenie troponiny, nie podano jednak jakiej troponiny (przy założeniu, że chodzi o troponinę sercową, do wyboru jest T albo I), w artykule #1 nie podano, jakim testem badano to stężenie, nie podano również żadnego wyniku liczbowego, a jedynie korelację troponiny i markerów generacji trombiny; przy tak opisanej metodyce odtworzenie eksperymentu jest niemożliwe,

s. 13, „trójglicerydów" powinno być „triglicerydów"; „ETP było determinowane" powinno być „ETP był determinowany",

s. 15, wniosek #1: sformułowanie dotyczące zwiększonego ryzyka powikłań zakrzepowo-zatorowych i incydentów sercowo-naczyniowych jest nieuprawnione, ponieważ nie badano związku aktywacji krzepnięcia z tymi zdarzeniami; jest to wyłącznie hipoteza autora i nie może stanowić głównego wniosku,

s. 15, wniosek #2: skąd wynika sformułowanie, ze prozakrzepowe właściwości krwi były bardziej zaznaczone u chorych z SSc?; w przedstawionych pracach nie ma wyników potwierdzających porównanie chorych z SSc i DM/PM,

s. 15, wniosek #4 nie wynika z pracy i w całości jest uogólnieniem, które może znaleźć się w dyskusji,

s. 15, wniosek #6, drugie zdanie wniosku (choć niewątpliwie słuszne i taki efekt jest ze wszech miar pożądany) również jest uogólnieniem i nie wynika z pracy,

s. 16, CRP to białko C-reaktywne, a nie stężenie białka C-reaktywnego; nieprawidłowe rozwinięcie skrótu PM „polimiositi", powinno być „polymyositis", w tłumaczeniu skrótu SSc powinno być „twardzina układowa", nie „układowe",

s. 27, w opisie metod w artykule #1 podano, że w echokardiografii przezklatkowej mierzono skurczowe ciśnienie w tętnicy płucnej (sPAP), co jest zapewne skrótem myślowym, ponieważ w echokardiografii nie można zmierzyć sPAP, możliwe jest jedynie jego oszacowanie na podstawie maksymalnej prędkości fali niedomykalności trójdzielnej z uwzględnieniem ciśnienia w prawym przedsionku (również szacowanego na podstawie oddechowej zmienności wymiaru poprzecznego żyły głównej dolnej); ponadto nie podano żadnych wyników tych pomiarów, a jedynie częstość występowania sPAP>45mmHg; podobny błąd występuje w artykule #2, w którym dodatkowo jako piśmiennictwo uzasadniające „pomiar sPAP" w echokardiografii podano publikację (21) dotyczącą metaanalizy pomiaru poszerzenia tętnicy ramiennej u chorych na toczeń rumieniowaty układowy, która nie porusza zagadnień związanych z echokardiografią lub nadciśnieniem płucnym,

s. 27-28, w powiązaniu z powyższym należy zauważyć, że z badania wykluczono chorych z frakcją wyrzutową lewej komory (LVEF)<35% (s. 27, artykuł #1), co oznacza, że

w badaniu brali udział pacjenci z LVEF>35%, a zatem z lewokomorową niewydolnością serca przyczyniającą się do rozwoju nadciśnienia płucnego; nie można zatem wykluczyć, że szacowane sPAP>45mmHg wynikało również z choroby lewej części serca, nie zaś ze śródmiąższowej choroby płuc; nie byłoby tych wątpliwości, gdyby podano dane liczbowe dotyczące charakterystyki echokardiograficznej badanej grupy (jak w artykule #3) z uwzględnieniem odsetków chorych z prawidłową i obniżoną LVEF i zestawienia tych wyników z szacunkowym sPAP; samo porównanie z grupą kontrolną osób zdrowych nie znajduje uzasadnienia,

s. 35, w artykule #2 w tabeli 1 jednostka ETP wyrażona jest jako nM/min, podczas gdy powinno być nmol/l×min lub nM×min, wymaga to wyjaśnienia i ujednolicenia, ponieważ dotyczy kluczowego wyniku prac.

Zamieszczona powyżej lista wątpliwości i usterek nie wpływa negatywnie na końcową ocenę rozprawy, uzyskanych wyników oraz płynących z nich wniosków. Poza ewidentnym charakterem naukowym praca ma również istotny walor praktyczny, bowiem wyraźnie dokumentuje rezydualne ryzyko sercowo-naczyniowe u chorych, których widujemy rzadko, a postępowanie jest ukierunkowane głównie na chorobę podstawową. Wyniki z pewnością przyczynią się do lepszego zrozumienia patofizjologii PM/DM i SSc oraz powinny skłaniać klinicystów do intensyfikacji działań profilaktycznych w celu identyfikacji subklinicznych manifestacji zajęcia układu krążenia w przebiegu układowych chorób tkanki łącznej.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dn. 14.03.2003. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz wymogi stawiane kandydatom na stopień doktora nauk medycznych.

Jednocześnie mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie lek. Piotra Kuszmiersza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kielce, 02.08.2023.

Z-ca DYREKTORA
INSTYTUTU NAUK MEDYCZNYCH
ds. nauki

dr hab. n. med. Marcin Sadowski, prof. UJK