

dr hab. n. farm. Małgorzata Wrzosek, prof. UJK
Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki
Wydział Farmaceutyczny

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Napiórkowskiej-Mastalerz w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne, promotor dr hab. Barbara Ciastek, prof. UO; promotor pomocniczy dr Tomasz Wybranowski, pt. „Znaczenie kliniczne i prognostyczne zaawansowanych produktów utleniania białek (AOPPs) w chorobach związanych ze stresem oksydacyjnym”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa podejmuje ważną z medycznego i klinicznego punktu widzenia problematykę dotyczącą produktów zaawansowanego utleniania białek (ang. advanced oxidation protein products, AOPPs) oraz ich potencjalnego zastosowania jako biomarkerów stresu oksydacyjnego. Głównym przedmiotem badań była ocena klinicznego i prognostycznego znaczenia AOPPs w wybranych chorobach związanych z przewlekłym stanem zapalnym oraz zaburzeniami homeostazy redoks. Szczególną uwagę poświęcono możliwości wykorzystania oznaczeń AOPPs jako parametrów wspomagających ocenę przebiegu choroby, określenie rokowania oraz stratyfikację ryzyka niekorzystnego przebiegu choroby. Potencjalną przydatność AOPPs analizowano w trzech odmiennych klinicznie jednostkach chorobowych: COVID-19, pozaszpitalnym zapaleniu płuc oraz wczesnym raku piersi. U pacjentek z wczesnym rakiem piersi oceniono zależności pomiędzy stężeniem AOPPs a wybranymi markerami angiogenezy oraz cechami biologicznymi nowotworu, natomiast u pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc analizę rozszerzono o oznaczenie albuminy modyfikowanej niedokrwieniem (IMA) oraz ocenę chorób współistniejących z wykorzystaniem indeksu Charlson (CCI).

Uzyskane wyniki wskazują na związek stężenia AOPPs z nasileniem stanu zapalnego, uszkodzeniem narządowym i ciężkością przebiegu COVID-19. W przypadku wczesnego raka piersi wyższe stężenia AOPPs były związane z bardziej agresywnymi cechami biologicznymi nowotworu, markerami angiogenezy oraz gorszym rokowaniem. Z kolei u pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc podwyższone stężenia AOPPs i IMA obserwowano u chorych charakteryzujących się niekorzystnym przebiegiem klinicznym i większą śmiertelnością. Wyniki te wskazują zatem na potencjalną przydatność AOPPs jako biomarkera wspomagającego ocenę przebiegu i rokowania w badanych jednostkach chorobowych, a także sugerują

możliwy związek AOPPs z procesami angiogenezy i zmianami zachodzącymi w mikrośrodowisku nowotworu.

Wybór tematu i problematyki badawczej uważam za w pełni uzasadniony oraz istotny zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i potencjalnego zastosowania klinicznego. Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i leczeniu chorób zapalnych oraz nowotworowych nadal istnieje potrzeba poszukiwania biomarkerów, które mogłyby wspomagać ocenę nasilenia i ciężkości przebiegu choroby, umożliwiać identyfikację pacjentów obciążonych większym ryzykiem niekorzystnego przebiegu klinicznego oraz dostarczać dodatkowych informacji prognostycznych. Podjęcie badań nad AOPPs w tym kontekście należy zatem uznać za zasadne i aktualne.

Wyniki badań eksperymentalnych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej zostały przedstawione w cyklu trzech oryginalnych prac naukowych, opublikowanych w latach 2022–2026, w międzynarodowych czasopismach posiadających współczynnik Impact Factor (IF). Łączna wartość współczynnika IF dla publikacji wynosi 13,9, natomiast ich łączna punktacja MEiN to 420 punktów. W dwóch pracach Pani mgr Marta Napiórkowska-Mastalerz jest pierwszą autorką, natomiast w trzeciej pracy – drugą autorką.

Poszczególne publikacje obejmowały ocenę oksydacyjnych modyfikacji albuminy u pacjentów z COVID-19, analizę zależności pomiędzy stężeniem AOPPs a markerami angiogenezy u pacjentek z wczesnym rakiem piersi oraz ocenę znaczenia prognostycznego AOPPs i albuminy modyfikowanej niedokrwieniem (IMA) u pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc. Pomimo różnic w badanych populacjach wszystkie trzy prace łączy wspólna problematyka zaburzeń homeostazy redoks, stresu oksydacyjnego i jego znaczenia w przebiegu chorób zapalnych i nowotworowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójną całość obejmującą wymieniony cykl publikacji. We Wstępie teoretycznym Autorka szczegółowo przedstawiła zagadnienia dotyczące homeostazy redoks i stresu oksydacyjnego, oksydacyjnych uszkodzeń biomolekuł, ze szczególnym uwzględnieniem białek. Szczególną uwagę Autorka poświęciła AOPPs, omawiając ich właściwości biochemiczne, metody oznaczania i związane z nimi ograniczenia. Na szczególne podkreślenie zasługuje krytyczne omówienie przez Autorkę metod analitycznych stosowanych do oznaczania AOPPs, ze zwróceniem uwagi na ich ograniczenia, możliwe interferencje oraz problemy związane ze standaryzacją oznaczeń. Takie podejście świadczy o dojrzałym warsztacie analitycznym Autorki, znajomości zasad diagnostyki laboratoryjnej oraz świadomości znaczenia czynników przedanalizy i analitycznych dla wiarygodności uzyskiwanych wyników. Autorka zwróciła również uwagę na fakt, że AOPPs nie powinny być traktowane wyłącznie jako bierne produkty oksydacyjnego uszkodzenia białek, ale mogą wykazywać aktywność biologiczną i uczestniczyć w podtrzymywaniu odpowiedzi zapalnej organizmu.

Cel pracy i sposób jego realizacji zostały jasno określone. Głównym celem rozprawy była ocena klinicznego i prognostycznego znaczenia AOPPs jako biomarkerów stresu oksydacyjnego w wybranych chorobach związanych ze stanem zapalnym i zaburzeniami homeostazy redoks oraz określenie ich potencjalnej przydatności w ocenie ryzyka niekorzystnego przebiegu choroby. Cele szczegółowe obejmowały ocenę znaczenia klinicznego AOPPs u chorych na zapalenie płuc w przebiegu COVID-19, określenie ich potencjalnej wartości prognostycznej u pacjentek z wczesnym rakiem piersi oraz ocenę ich znaczenia w przewidywaniu 100-dniowej śmiertelności u chorych z pozaszpitalnym zapaleniem płuc.

W rozdziale Materiały i Metody szczegółowo przedstawiono sposób realizacji badań. Analizą objęto trzy niezależne grupy pacjentów: 66 chorych hospitalizowanych z powodu zapalenia płuc w przebiegu COVID-19, 70 pacjentek z wczesnym rakiem piersi oraz 71 pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc. Dobór tak odmiennych klinicznie grup umożliwił ocenę znaczenia AOPPs zarówno w ostrych procesach zapalnych, jak i w chorobie nowotworowej. Na uwagę zasługuje również zastosowanie obserwacji odległej. W grupie chorych z COVID-19 pacjentów obserwowano przez 12 miesięcy, wykonując oznaczenia w ostrej fazie choroby oraz w kolejnych punktach czasowych. Z kolei u chorych z pozaszpitalnym zapaleniem płuc przeprowadzono 100-dniową obserwację, umożliwiającą ocenę znaczenia badanych biomarkerów w odniesieniu do śmiertelności.

Zastosowane metody analizy statystycznej umożliwiły ocenę zależności pomiędzy stężeniem AOPPs a parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi oraz określenie ich potencjalnej wartości prognostycznej. W analizie wyników dotyczących pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc zastosowano modele regresji logistycznej uwzględniające AOPPs, IMA oraz indeks chorób współistniejących Charlson (CCI), co umożliwiło ocenę łącznego znaczenia tych parametrów w prognozowaniu 100-dniowej śmiertelności. Analiza krzywych przeżycia Kaplana-Meiera pozwoliła natomiast na ocenę zależności pomiędzy stężeniem AOPPs i wartością IMA a czasem przeżycia pacjentów.

Autorka w sposób przekonujący zaprezentowała cykl trzech prac oryginalnych, wskazując na ich wspólny problem badawczy, pomimo wykorzystania odmiennych modeli klinicznych. Za szczególnie wartościowe uważam odniesienie oznaczeń AOPPs nie tylko do obecności stresu oksydacyjnego, lecz także do szeregu parametrów mających znaczenie kliniczne. W przypadku COVID-19 stężenia AOPPs analizowano w odniesieniu do markerów stanu zapalnego, uszkodzenia narządowego oraz zmian obserwowanych w badaniach obrazowych. U pacjentek z rakiem piersi oceniono zależności pomiędzy AOPPs a markerami angiogenezy, charakterystyką biologiczną nowotworu i rokowaniem, natomiast u pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc badano ich związek ze śmiertelnością oraz przydatność w modelach prognostycznych.

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że znaczenie AOPPs może wykraczać poza rolę prostego wskaźnika nasilenia stresu oksydacyjnego. U pacjentów z COVID-19 wykazano zależności pomiędzy stężeniem AOPPs a parametrami stanu zapalnego,

uszkodzenia narządowego i ciężkości przebiegu choroby. U pacjentek z wczesnym rakiem piersi stężenia AOPPs były związane z markerami angiogenezy oraz parametrami rokowniczymi, co może wskazywać na związek oksydacyjnych modyfikacji białek z procesami zachodzącymi w mikrośrodowisku nowotworu. Z kolei u pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc wyższe stężenia AOPPs oraz wartości IMA obserwowano u chorych, którzy zmarli w trakcie 100-dniowej obserwacji, a AOPPs i IMA wykazywały zdolność dyskryminacyjną w ocenie śmiertelności.

Istotnym osiągnięciem pracy jest wykazanie związku AOPPs z klinicznie istotnymi punktami końcowymi w trzech odmiennych modelach chorobowych: ciężkością i dynamiką ostrej infekcji w COVID-19, przeżyciem całkowitym i czasem wolnym od nawrotu w raku piersi oraz 100-dniową śmiertelnością w pozaszpitalnym zapaleniu płuc. Uzyskane wyniki wskazują zatem, że AOPPs mogą stanowić biomarker odzwierciedlający zaburzenia związane ze stresem oksydacyjnym i aktywacją zapalną oraz pozostający w związku z procesami dotyczącymi funkcji śródbłonna naczyniowego. Jednocześnie Autorka właściwie podkreśla, że potwierdzenie ich przydatności w praktyce klinicznej wymaga dalszych badań oraz standaryzacji metod oznaczania.

W kolejnej części rozprawy przedstawiono wnioski wynikające z przeprowadzonych badań oraz podsumowanie wraz z omówieniem ograniczeń pracy. Uważam, że przedstawione wnioski pozostają w bezpośrednim związku z założonymi celami i znajdują uzasadnienie w uzyskanych wynikach. Całość pracy tworzy logicznie powiązany cykl badań, w którym AOPPs oceniano w różnych sytuacjach klinicznych, ale w odniesieniu do wspólnego mechanizmu patofizjologicznego obejmującego zaburzenia homeostazy redoks, stres oksydacyjny i stan zapalny. Przedstawiona rozprawa wskazuje na dobre przygotowanie Autorki do prowadzenia badań klinicznych, analizy uzyskanych danych oraz ich krytycznej interpretacji.

Warstwę edycyjną rozprawy uważam za poprawną. W tekście rozprawy zwraca uwagę pewna niezręczność terminologiczna, wynikająca prawdopodobnie z bezpośredniego tłumaczenia wersji anglojęzycznej. Dotyczy ona określenia „zaawansowane produkty utleniania białek”, zastosowanego jako odpowiednik angielskiego *advanced oxidation protein products* (AOPPs). Bardziej precyzyjne wydaje się określenie „produkty zaawansowanego utleniania białek”, które jednoznacznie wskazuje, że termin „zaawansowane” odnosi się do procesu utleniania, a nie do samych produktów. Przedstawiona uwaga ma charakter terminologiczny i nie wpływa w sposób istotny na końcową ocenę rozprawy, która stanowi wartościową, uporządkowaną i spójną tematycznie całość.

W odniesieniu do niektórych zagadnień merytorycznych i metodologicznych nasuwają się pytania oraz uwagi, które przedstawiam poniżej:

1. W rozprawie AOPPs przedstawiane są nie tylko jako biomarkery oksydacyjnych modyfikacji białek, ale również jako biologicznie aktywne

cząsteczki mogące, poprzez oddziaływanie z receptorami RAGE i CD36 oraz aktywację szlaków zależnych od NF- κ B, uczestniczyć w podtrzymywaniu odpowiedzi zapalnej. Proszę o przedyskutowanie, w jakim stopniu wyniki uzyskane w przedstawionym cyklu prac pozwalają traktować AOPPs jako potencjalny element mechanizmu patofizjologicznego, a w jakim jedynie jako biomarker odzwierciedlający nasilenie stresu oksydacyjnego.

2. W nawiązaniu do powyższego, w zdaniu: „doniesienia Liu i wsp. [54], Xian i wsp. [106], Guo i wsp. [55] oraz Song i wsp. [107] sugerują, że produkty oksydacyjnej modyfikacji białek mogą wpływać na proliferację i migrację komórek, zwiększać ekspresję VEGF oraz aktywację komórek śródbłónka za pośrednictwem receptora RAGE lub poprzez zwiększoną produkcję RFT w odpowiedzi na powstające AOPPs” przywołano łącznie wyniki kilku prac przeprowadzonych w odmiennych modelach badawczych. W obecnej formie zdanie nie pozwala jednoznacznie określić, które z wymienionych efektów zostały wykazane w poszczególnych badaniach ani w jakim układzie eksperymentalnym. Praca Xian i wsp. [106] została opublikowana w języku chińskim, co utrudnia bezpośrednie odniesienie się do jej pełnej treści oraz ocenę przytoczonych na jej podstawie wniosków. Sugeruję krótkie omówienie każdej z cytowanych prac, ze wskazaniem zastosowanego modelu (in vitro/in vivo, rodzaju komórek) oraz najważniejszego wyniku. Pozwoli to precyzyjniej udokumentować przedstawiony mechanizm i ułatwi Czytelnikowi ocenę znaczenia przytoczonych doniesień.
3. W sformułowaniu „stratyfikacja ryzyka pacjentów” nie określono, jakiego rodzaju ryzyka dotyczy przeprowadzona ocena. Określenie to jest nieprecyzyjne i wymaga doprecyzowania. Proponuję zastąpienie go sformułowaniem: „identyfikacja pacjentów obciążonych zwiększonym ryzykiem niekorzystnego przebiegu choroby” lub, zależnie od analizowanego punktu końcowego, wskazanie konkretnego ryzyka, np. progresji choroby, powikłań lub zgonu.
4. Stwierdzenie: „Rosnące znaczenie oznaczania markerów zaburzeń homeostazy redoks w ostrych infekcjach płuc podkreślali również Muravlyova i wsp. [110], Molotov-Luchanskiy i wsp. [111], a także Bolatkale i wsp. [112]” wymaga doprecyzowania. W obecnej formie nie pozwala bowiem ocenić, jakie konkretnie markery analizowano w cytowanych badaniach, w jakich grupach pacjentów oraz jaki był kierunek i wielkość obserwowanych zmian. Zasadne byłoby krótkie przedstawienie najważniejszych wyników tych prac, w tym liczebności i charakterystyki badanych grup oraz wykazanych różnic w stężeniach analizowanych markerów stresu oksydacyjnego. Pozwoliłoby to również odnieść wyniki cytowanych badań do wyników uzyskanych przez Autorkę rozprawy i wskazać, czy są one z nimi zgodne, czy też występują między nimi różnice.
5. W badaniu dotyczącym pozaszpitalnego zapalenia płuc wykazano wartość prognostyczną AOPPs i IMA w odniesieniu do 100-dniowej śmiertelności, a

połączenie tych biomarkerów z indeksem chorób współistniejących Charlson (CCI) poprawiało ocenę rokowania. Proszę o odniesienie się do biologicznego uzasadnienia łącznego wykorzystania AOPPs i IMA. Czy markery te odzwierciedlają odmienne, a potencjalnie komplementarne aspekty zaburzeń homeostazy redoks, czy też informacje dostarczane przez oba parametry mogą częściowo się nakładać? Ponadto u pacjentów oznaczano, obok AOPPs i IMA, również aktywność peroksydazy glutationowej (GPx). Proszę o wyjaśnienie, dlaczego nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy aktywnością GPx a stężeniem AOPPs i wartością IMA. Jak można interpretować brak tych zależności w kontekście zaburzeń homeostazy redoks u badanych pacjentów?

6. AOPPs oznaczano metodą spektrofotometryczną, która pomimo prostoty i dostępności ma ograniczenia związane m.in. z heterogennym charakterem AOPPs oraz brakiem możliwości identyfikacji poszczególnych produktów oksydacyjnej modyfikacji białek. Proszę o odniesienie się do możliwości zastosowania bardziej swoistych metod analitycznych, które mogłyby umożliwić dokładniejszą charakterystykę AOPPs, oraz wskazanie, czy ich zastosowanie mogłoby zmienić interpretację uzyskanych wyników.
7. W rozprawie słusznie zwrócono uwagę na brak pełnej standaryzacji oznaczeń AOPPs oraz brak powszechnie przyjętych wartości referencyjnych i punktów odcięcia. Jednocześnie w badaniu dotyczącym pozaszpitalnego zapalenia płuc wartość AOPPs $>7 \mu\text{M}$ wiązała się z istotnie krótszym czasem przeżycia. Proszę o przedyskutowanie, w jakim stopniu zaproponowany punkt odcięcia może mieć znaczenie kliniczne oraz jakie warunki powinny zostać spełnione przed jego ewentualnym wykorzystaniem w stratyfikacji ryzyka.
8. W badaniu dotyczącym COVID-19 liczebność grupy zmniejszała się w kolejnych punktach obserwacji – od 66 pacjentów przy włączeniu do badania do 30 po 6 miesiącach i 27 po 12 miesiącach. Proszę o odniesienie się do możliwego wpływu utraty części pacjentów w trakcie obserwacji na interpretację zmian stężenia AOPPs oraz reprezentatywność uzyskanych wyników.
9. W badaniu *in vitro* AOPPs-HSA otrzymywano poprzez 60-minutową inkubację HSA z chloraminą T, wykazując zależność powstawania AOPPs od stężenia czynnika utleniającego, jednak nie analizowano kinetyki tego procesu w funkcji czasu. Z kolei w przypadku modyfikacji HSA przez MDA prowadzącej do powstawania ALEs-HSA obserwowano przebieg zmian w czasie. Proszę o odniesienie się do kinetyki powstawania AOPPs-HSA. Czy dostępne dane pozwalają określić, jak szybko powstają AOPPs po zadziałaniu czynnika oksydacyjnego oraz jak długo utrzymują się w krążeniu? Jak czas ich powstawania i eliminacji może wpływać na interpretację stężenia AOPPs oznaczonego u pacjenta w określonym momencie choroby?

Wymienione uwagi nie wpływają w sposób istotny na końcowy odbiór pracy, która stanowi wartościową, uporządkowaną i estetyczną całość.

Podsumowując, należy podkreślić trafność podjętej tematyki badawczej oraz znaczenie uzyskanych wyników zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i ich potencjalnego znaczenia klinicznego. Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę dotyczącą produktów utleniania białek (AOPPs) jako biomarkerów zaburzeń homeostazy redoks oraz ich związku z przebiegiem i rokowaniem w chorobach o zróżnicowanej etiologii. Analiza uzyskanych wyników wskazuje, że przedstawiona do recenzji rozprawa dostarcza nowych danych dotyczących potencjalnej przydatności AOPPs jako biomarkera wspomagającego ocenę przebiegu choroby i rokowania pacjentów. Jednocześnie Autorka właściwie wskazuje na ograniczenia związane z nieswoistością AOPPs oraz potrzebę dalszych badań i standaryzacji metod ich oznaczania przed ewentualnym szerszym wykorzystaniem tego biomarkera w praktyce klinicznej.

Biorąc pod uwagę walory poznawcze i metodologiczne rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że spełnia ona wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wobec powyższego przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wniosek o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Warszawa, 28.08.2026 r.



dr hab. n. farm. Małgorzata Wrzosek, prof. UJK