



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2026 r.



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Marta Maria Napiórkowska-Mastalerz

**Znaczenie kliniczne i prognostyczne zaawansowanych produktów
utleniania białek (AOPPs) w chorobach związanych ze stresem
oksydacyjnym**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor:

Dr hab. n. med. Barbara Ciastek, prof. UO

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. inż. Tomasz Wybranowski

Bydgoszcz, 2026

Podziękowania

*Składam najserdeczniejsze podziękowania osobom,
których wsparcie przyczyniło się do powstania niniejszej pracy.*

*Pani dr hab. Barbarze Ciastek, prof. UO
-Promotorowi rozprawy - za obdarzenie mnie zaufaniem,
stworzenie możliwości realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej
oraz opiekę merytoryczną i wsparcie na każdym jej etapie.*

*Dr inż. Tomaszowi Wybranowskiemu
-Promotorowi pomocniczemu – za okazane wsparcie, zaangażowanie
oraz wspólne pokonywanie codziennych wyzwań badawczych.*

*Panu Profesorowi dr hab. Stefanowi Kruszewskiemu
- za wiarę we mnie oraz nieustanną motywację do rozwoju naukowego.*

*Koleżankom i kolegom z Katedry Biofizyki
- za nieustanną życzliwość, gotowość do pomocy
oraz stworzenie przyjaznej atmosfery pracy.*

*Mojemu mężowi, Rafałowi,
- za codzienną motywację i wyrozumiałość,
zwłaszcza w tych dniach, gdy moje myśli niemal
całkowicie pochłaniała praca nad tą rozprawą.*

WYKAZ SKRÓTÓW	6
I Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora	7
II Zgoda Komisji Bioetycznej	9
III Streszczenie w języku polskim	10
IV Streszczenie w języku angielskim	12
V Wstęp teoretyczny	14
1. Homeostaza redoks i stres oksydacyjny	14
1.1. Homeostaza redoks - definicja i znaczenie	14
1.2. Stres oksydacyjny - definicja i mechanizmy powstawania	14
2. Znaczenie stresu oksydacyjnego w patogenezie wybranych stanów chorobowych	16
2.1 Choroby zapalne	16
2.2 Zaburzenia immunologiczne i angiogeneza	17
2.3 Nowotwory	20
2.4 Miażdżyca	21
3. Oksydacyjne uszkodzenia biomolekuł i ich konsekwencje biologiczne	22
3.1 Lipidy	22
3.2 DNA	23
3.3 Białka	24
4. Wybrane biomarkery oksydacyjnie zmodyfikowanych białek o znaczeniu diagnostycznym	25
4.1 Zaawansowane produkty końcowej glikacji – AGEs (<i>ang. advanced glycation end products</i>)	26
4.2 Albumina modyfikowana niedokrwieniem – IMA (<i>ang. ischemia-modified albumin</i>).....	27
4.3 Zaawansowane produkty utleniania białek – AOPPs (<i>ang. advanced oxidation protein products</i>)	28
5. AOPPs – charakterystyka i znaczenie kliniczne	28
5.1 Właściwości biochemiczne	28
5.2 Metody oznaczania AOPPs oraz ich ograniczenia	29
5.3 AOPPs jako marker stresu oksydacyjnego	31
5.4 Rola AOPPs w chorobach zapalnych i nowotworowych	31
5.5 AOPPs jako czynnik prognostyczny	32

6. Graficzne podsumowanie wstępu	34
VI Cel rozprawy	35
VII Materiały i metody	36
VIII Wyniki i dyskusja	37
IX Wnioski	48
X Podsumowanie i ograniczenia badania	49
XI Piśmiennictwo	52
XII Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej	65
XIII Oświadczenia współautorów	68
XIV Spis rycin	80
XV Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej – kopie	81
1. Publikacja nr 1	82
2. Publikacja nr 2	98
3. Publikacja nr 3	125

Wykaz skrótów

AGEs	zaawansowane produkty końcowe glikacji (<i>ang. advanced glycation end products</i>)
AOPPs	zaawansowane produkty utleniania białek (<i>ang. advanced oxidation protein products</i>)
CCI	indeks chorób współistniejących Charlson (<i>ang. Charlson Comorbidity Index</i>)
DDR	odpowiedź na uszkodzenia DNA (<i>ang. DNA damage response</i>)
EPC	komórki progenitorowe śródbłónka (<i>ang. endothelial progenitor cells</i>)
HIF-1α	czynnik indukowany hipoksją (<i>ang. hypoxia-inducible factor 1α</i>)
IMA	albumina modyfikowana niedokrwieniem (<i>ang. ischemia-modified albumin</i>)
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (<i>ang. nuclear factor kappa B</i>)
OS	stres oksydacyjny (<i>ang. oxidative stress</i>)
oxLDL	utlenione lipoproteiny niskiej gęstości (<i>ang. oxidized low-density lipoprotein</i>)
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe (<i>ang. polyunsaturated fatty acids</i>)
RAGE	receptory dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji (<i>ang. receptor for advanced glycation end-products</i>)
VEGF	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (<i>ang. vascular endothelial growth factor</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (<i>ang. World Health Organization</i>)

I Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora

Podstawą do wnioskowania o uzyskanie tytułu doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne jest osiągnięcie naukowe składające się z trzech oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach indeksowanych na liście filadelfijskiej w latach 2022-2026. Sumaryczna wartość **współczynnika oddziaływania (IF) wynosi 13,9**, natomiast **punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MEiN) wynosi 420 punktów**. Publikacje zostały przedstawione w kolejności chronologicznej:

1. Wybranowski T., **Napiórkowska M.**, Bosek M., Pyskir J., Ziolkowska B., Cyrankiewicz M., Pyskir M., Pilaczyńska-Cemel M., Rogańska M., Kruszewski S., Przybylski G. Study of Albumin Oxidation in COVID-19 Pneumonia Patients: Possible Mechanisms and Consequences. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(17):10103. doi:10.3390/ijms231710103.

Impact Factor: 5,6

Punktacja MEiN: 140

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu analiz instrumentalnych, przeglądzie piśmiennictwa, współprzygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz udziale w jego redakcji i opracowaniu wersji końcowej. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 40%.

2. **Napiórkowska-Mastalerz M.**, Wybranowski T., Bosek M., Kruszewski S., Rhone P., Ruszkowska-Ciastek B. A Preliminary Evaluation of Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs) as a Potential Approach to Evaluating Prognosis in Early-Stage Breast Cancer Patients and Its Implication in Tumour Angiogenesis: A 7-Year Single-Centre Study. *Cancers*. 2024;16(5):1068. doi:10.3390/cancers16051068.

Impact Factor: 4,4

Punktacja MEiN: 140

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu analiz instrumentalnych, analizy statystycznej oraz wizualizacji wyników, formułowaniu wniosków, przeglądzie piśmiennictwa, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz jego redakcji i opracowaniu wersji końcowej. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 70%.

3. **Napiórkowska-Mastalerz M.**, Wybranowski T., Sikora J., Wszelaki P., Pyskir J., Michalska W., Pilaczyńska-Cemel M., Kruszewski S., Ciastek B. Advanced Oxidation Protein Products and Ischemia-Modified Albumin as Prognostic Biomarkers of Long-Term Mortality in Community-Acquired Pneumonia: A Prospective Observational Study. Scientific Reports. 2026;16:7809. doi:10.1038/s41598-026-36643-7.

Impact Factor: 3,9

Punktacja MEiN: 140

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współtworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu analiz instrumentalnych, analizie statystycznej oraz wizualizacji wyników, formułowaniu wniosków, przeglądzie piśmiennictwa, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz jego redakcji i opracowaniu wersji końcowej. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 60%.

II Zgoda Komisji Bioetycznej

Badania z udziałem ludzi stanowiące podstawę niniejszej rozprawy uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy (numery: KB343/2021, KB547/2015). Postępowanie badawcze prowadzono z poszanowaniem zasad etyki badań naukowych z udziałem ludzi, zgodnie z Deklaracją Helsińską oraz obowiązującymi regulacjami prawnymi. Od uczestników badań uzyskano świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu.

III Streszczenie w języku polskim

WPROWADZENIE: Stres oksydacyjny, będący wynikiem zaburzenia homeostazy redoks, odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu chorób przewlekłych. Coraz większe znaczenie przypisuje się biomarkerom odzwierciedlającym nasilenie uszkodzeń oksydacyjnych, takim jak zaawansowane produkty utleniania białek (AOPPs), które mogą wspomagać ocenę przebiegu choroby oraz rokowania pacjentów.

CEL: Celem rozprawy była ocena znaczenia klinicznego i prognostycznego AOPPs jako biomarkerów stresu oksydacyjnego w wybranych chorobach związanych z przewlekłym stanem zapalnym oraz zaburzeniami homeostazy redoks. Badano potencjalną przydatność AOPPs w ocenie przebiegu choroby i stratyfikacji ryzyka u pacjentów z COVID-19, pozaszpitalnym zapaleniem płuc oraz wczesnym rakiem piersi.

MATERIAŁY I METODY: Badania przeprowadzono w trzech grupach pacjentów: 66 chorych z COVID-19, 70 pacjentek z wczesnym rakiem piersi oraz 71 pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc. Oceniano stężenia AOPPs w odniesieniu do parametrów klinicznych, laboratoryjnych oraz rokowniczych. U pacjentek z rakiem piersi analizowano dodatkowo zależności pomiędzy AOPPs a wybranymi markerami angiogenezy oraz cechami biologicznymi nowotworu. W grupie pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc oceniano również albuminę modyfikowaną niedokrwieniem (IMA) oraz indeks chorób współistniejących Charlson (CCI).

WYNIKI: W badaniu obejmującym pacjentów z COVID-19 wykazano istotne zależności pomiędzy stężeniem AOPPs a markerami ciężkości przebiegu choroby, stanu zapalnego oraz uszkodzenia narządowego. Stężenie AOPPs ulegało obniżeniu w trakcie obserwacji. U pacjentek z wczesnym rakiem piersi wyższe stężenia AOPPs związane były z bardziej agresywnymi cechami biologicznymi nowotworu, markerami angiogenezy oraz gorszym rokowaniem. W grupie pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc podwyższone wartości AOPPs oraz IMA obserwowano u chorych z niekorzystnym przebiegiem klinicznym i wyższą śmiertelnością. Analizy statystyczne wskazały na potencjalną przydatność AOPPs w ocenie rokowania oraz stratyfikacji ryzyka u pacjentów.

WNIOSKI: AOPPs mogą stanowić użyteczny biomarker stresu oksydacyjnego związany z nasileniem procesów zapalnych, dysfunkcją śródbłonna naczyniowego oraz przebiegiem chorób przewlekłych i nowotworowych. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną wartość prognostyczną AOPPs oraz ich możliwy udział w procesach angiogenezy i przebudowy

mikrośrodowiska guza. AOPPs mogą wspomagać ocenę rokowania i stratyfikację ryzyka pacjentów, jednak potwierdzenie ich przydatności klinicznej wymaga dalszych badań.

IV Streszczenie w języku angielskim

INTRODUCTION: Oxidative stress, resulting from disturbances in redox homeostasis, plays an important role in the pathogenesis of many chronic diseases. Increasing attention has been given to biomarkers reflecting the intensity of oxidative damage, such as advanced oxidation protein products (AOPPs), which may support the assessment of disease course and patient prognosis.

AIM: The aim of the dissertation was to evaluate the clinical and prognostic significance of AOPPs as biomarkers of oxidative stress in selected diseases associated with chronic inflammation and disturbances of redox homeostasis. The potential usefulness of AOPPs in assessing disease course and risk stratification was investigated in patients with COVID-19, community-acquired pneumonia, and early-stage breast cancer.

MATERIALS AND METHODS: The study was conducted in three groups of patients: 66 patients with COVID-19, 70 patients with early-stage breast cancer, and 71 patients with community-acquired pneumonia. AOPPs concentrations were assessed in relation to clinical, laboratory, and prognostic parameters. In breast cancer patients, the associations between AOPPs, selected angiogenesis markers, and biological features of the tumor were additionally analyzed. In patients with community-acquired pneumonia, ischemia-modified albumin (IMA) and the Charlson Comorbidity Index (CCI) were also evaluated.

RESULTS: In patients with COVID-19, significant associations were found between AOPPs concentrations and markers of disease severity, inflammation, and organ damage. AOPPs concentrations decreased during the follow-up period. In patients with early-stage breast cancer, higher AOPPs concentrations were associated with more aggressive biological features of the tumor, angiogenesis markers, and poorer prognosis. In patients with community-acquired pneumonia, elevated AOPPs and IMA values were observed in individuals with unfavorable clinical outcomes and higher mortality. Statistical analyses indicated the potential usefulness of AOPPs in prognosis assessment and patient risk stratification.

CONCLUSIONS: AOPPs may serve as a useful biomarker of oxidative stress associated with the intensity of inflammatory processes, endothelial dysfunction, and the course of chronic and neoplastic diseases. The obtained results indicate the potential prognostic value of AOPPs and their possible involvement in angiogenesis and remodeling of the tumor

microenvironment. AOPPs may support prognosis assessment and patient risk stratification; however, confirmation of their clinical usefulness requires further research.

V Wstęp teoretyczny

1. Homeostaza redoks i stres oksydacyjny

1.1. Homeostaza redoks - definicja i znaczenie

Homeostaza redoks w komórkach to system precyzyjnej koordynacji pomiędzy wytwarzaniem a eliminacją reaktywnych form tlenu (RFT), azotu (RFA) i chloru (RFC), utrzymujący właściwe warunki chemiczne dla przebiegu procesów życiowych [1,2]. Nie oznacza ona całkowitego zniesienia reaktywności, lecz zachowania jej w zakresie kompatybilnym z fizjologią komórki. W tym ujęciu status redoks stanowi parametr porządkujący funkcjonowanie komórki, ponieważ wpływa na stabilność i aktywność makrocząsteczek, integralność struktur błonowych oraz podatność elementów komórkowych na modyfikacje utleniające [1-3].

Znaczenie homeostazy redoks wynika z jej roli w zapewnianiu powtarzalności i kontroli podstawowych procesów biologicznych [1,2]. Niewielkie i przejściowe zmiany warunków utleniająco-redukujących mogą towarzyszyć adaptacji komórki do zmiennych bodźców środowiskowych, natomiast przesunięcie długotrwałe lub o dużej amplitudzie sprzyja kumulacji modyfikacji chemicznych białek, lipidów i kwasów nukleinowych, co ogranicza sprawność mechanizmów regulacyjnych i zaburza homeostazę metaboliczną [1,3,4]. O konsekwencjach tych zmian decydują nie tylko ich nasilenie, lecz także czas trwania oraz zdolności buforujące komórek [1,2]. Status redoks jest również istotny dla utrzymania spójności fenotypowej komórek i stabilności ich funkcji w warunkach stresu. Jego deregulacja może prowadzić do stopniowej utraty kontroli nad procesami proliferacji i różnicowania, zaburzeń odpowiedzi immunologicznej oraz zwiększonej podatności na uszkodzenia [1]. Tym samym homeostaza redoks stanowi jeden z kluczowych warunków utrzymania równowagi pomiędzy wymaganiami adaptacyjnymi komórki a koniecznością ochrony jej struktur i funkcji [1-4].

1.2. Stres oksydacyjny - definicja i mechanizmy powstawania

Stres oksydacyjny (OS, *ang. oxidative stress*) definiuje się jako stan zaburzenia równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych cząsteczek (utleniaczy) a zdolnością układów antyoksydacyjnych do ich neutralizacji, prowadzący do akumulacji uszkodzeń oksydacyjnych biomolekuł. W organizmach żywych wyróżnia się trzy główne klasy reaktywnych cząsteczek: (1) RFT, (2) RFA oraz (3) RFC. Wśród RFT znajdują się zarówno rodniki

tlenowe, jak i cząsteczki nierodnikowe, powstające m.in. jako produkty uboczne metabolizmu tlenowego. Rodniki (dawniej nazywane wolnymi rodnikami) to reaktywne atomy lub cząsteczki zawierające co najmniej jeden niesparowany elektron [4].

RFT i RFA odgrywają podwójną rolę w utrzymaniu homeostazy redoks komórki. Z jednej strony w stężeniach fizjologicznych pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych w procesach sygnalizacji redoks, wspierając proliferację i różnicowanie komórek, a także uczestniczą w wewnątrzkomórkowym niszczeniu bakterii przez komórki fagocytarne, takie jak makrofagi i granulocyty [5-9]. Z drugiej strony, ich nadmierna produkcja i akumulacja prowadzą do uszkodzeń makrocząsteczek, inicjują szereg negatywnych reakcji łańcuchowych powodujących uszkodzenia błon komórkowych, inaktywację głównych enzymów, zakłócenie procesów komórkowych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórek oraz zahamowanie prawidłowego podziału komórek [5-10].

RFT mogą być wytwarzane w układach biologicznych zarówno pod wpływem czynników egzogennych, takich jak promieniowanie UV i jonizujące, chemioterapia, palenie tytoniu, nadmierne spożycie alkoholu czy metabolizm wielu leków i ksenobiotyków, jak również w wyniku procesów endogennych związanych z metabolizmem tlenowym komórki [4,10-12]. Zaburzenie homeostazy redoks, jakim jest OS, jest cechą charakterystyczną wielu chorób przewlekłych [1,8,13-15]. W związku z tym coraz większe znaczenie przypisuje się biomarkerom odzwierciedlającym nasilenie OS, które mogą dostarczać informacji o stopniu uszkodzeń oksydacyjnych w organizmie oraz potencjalnie wspomagać ocenę przebiegu choroby.

Z punktu widzenia niniejszej dysertacji szczególne znaczenie mają oksydacyjne uszkodzenia białek. Białka, ze względu na ich szybkie tempo reakcji z utleniaczami oraz dużą obfitość w komórkach, tkankach i płynach ustrojowych, należą do głównych celów działania RFT, RFA i RFC. Modyfikacje oksydacyjne mogą obejmować utlenianie reszt aminokwasowych, tworzenie grup karbonylowych, fragmentację łańcucha polipeptydowego, agregację białek oraz powstawanie wiązań krzyżowych. Procesy te mogą prowadzić do utraty aktywności enzymatycznej, zaburzenia struktury przestrzennej białek, zmiany ich podatności na degradację proteolityczną oraz powstawania trwałych produktów oksydacji, takich jak zaawansowane produkty utleniania białek (AOPPs, *ang. advanced oxidation protein products*) [4].

AOPPs powstają głównie w wyniku działania silnych utleniaczy na białka osocza, zwłaszcza albuminę. Ich struktura obejmuje m.in. utlenione reszty aminokwasowe oraz produkty sieciowania białek, co sprawia, że są względnie stabilnym wskaźnikiem oksydacyjnych modyfikacji białkowych. Z tego względu AOPPs są uznawane za biomarkery OS, odzwierciedlające nie tylko nasilenie uszkodzeń białek, lecz także przewlekły charakter zaburzeń redoks.

Znaczenie AOPPs wynika również z tego, że nie są one wyłącznie biernymi produktami uszkodzeń oksydacyjnych. AOPPs mogą być cząsteczkami efektorowymi zaangażowanymi w wiele procesów biologicznych, takich jak nasilenie odpowiedzi zapalnej, aktywacja komórek układu odpornościowego oraz podtrzymywanie OS. Dlatego ocena AOPPs wydaje się uzasadniona w analizie jednostek chorobowych, w których OS i zapalenie współuczestniczą w rozwoju i progresji zmian patologicznych.

2. Znaczenie stresu oksydacyjnego w patogenezie wybranych stanów chorobowych

Ze względu na kluczowe znaczenie homeostazy redoks dla prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych i metabolicznych, nie jest zaskakujące, że OS jest powiązany z rozwojem wielu stanów patologicznych i chorób, takich jak proces starzenia, infekcje, nowotwory, cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne czy układu rozrodczego [5,7,10].

2.1. Choroby zapalne

Stan zapalny oraz fizjologiczna produkcja RFT są istotnymi elementami prawidłowego funkcjonowania organizmu. Jednakże ich nadmierne wytwarzanie może aktywować prozapalne szlaki sygnałowe, prowadząc do zwiększonego uwalniania mediatorów zapalnych, takich jak cytokiny, chemokiny i eikozanoidy. W warunkach fizjologicznych reakcja zapalna, której towarzyszy przejściowy wzrost produkcji RFT, stanowi element wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na bodźce, w tym patogeny. Zakażenia bakteryjne, wirusowe i grzybicze mogą indukować rekrutację komórek układu odpornościowego do miejsca infekcji (np. w obrębie płuc), co wiąże się z uwalnianiem dużych ilości RFT oraz czynników prozapalnych [16]. W przypadku niekontrolowanej odpowiedzi zapalnej dochodzi do rozwoju OS, który, tworząc „błędne koło”, dodatkowo pobudza komórki zapalne do produkcji cytokin i innych mediatorów. Konsekwencją jest uszkodzenie lokalnych komórek i tkanek [6,17], a w ciężkich przypadkach (np. burzy cytokinowej obserwowanej w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2 lub

ciężkich postaci pozaszpitalnego zapalenia płuc) może dojść do niewydolności wielonarządowej [17,18]. Nadmiar RFT może szybko i nieswoiście modyfikować biomolekuły (DNA, lipidy i białka), prowadząc do zaburzeń metabolizmu komórkowego, nasilonej przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, zwiększonego wydzielania śluzu, zaburzeń apoptozy oraz włóknienia płuc [16].

Utrzymujące się wytwarzanie RFT oraz narastanie OS mogą podtrzymywać cykl zapalny, przyczyniając się do przewlekłego stanu zapalnego o niskim nasileniu. Taki fenotyp zapalenia sprzyja rozwojowi wielu chorób przewlekłych o składowej zapalnej, m.in. cukrzycy, nieswoistych chorób zapalnych jelit, zapalnych chorób stawów czy chorób neurologicznych [16, 19]. Stan zapalny i OS są zatem ze sobą nierozzerwalnie powiązane i wzajemnie się nasilają. Śródbłonek naczyniowy, jako kluczowy element odpowiedzi zapalnej i miejsce adhezji leukocytów, jest szczególnie wrażliwy na uszkodzenia. W odpowiedzi na sygnały prozapalne komórki układu odpornościowego są rekrutowane i przylegają do ściany naczynia, a następnie mogą ulegać transmigracji (diapedezie) do tkanek. W miejscu toczącego się stanu zapalnego uwalniają się RFT oraz inne reaktywne cząsteczki o właściwościach utleniających (m.in. anionorodnik nadadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy, kwas podchlorawy (HOCl)), a także liczne enzymy (np. elastaza, kolagenaza, hydrolazy kwaśne, fosfatazy i lipazy) oraz mediatory chemiczne (eikozanoidy, składniki dopełniacza, cytokiny, chemokiny, tlenek azotu). W rezultacie proces zapalny może prowadzić do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i uszkodzeń tkanek, wzmacniając samonapędzającą się dodatnią pętlę sprzężenia zwrotnego. RFT indukują ekspresję cząsteczek adhezyjnych oraz produkcję cytokin, chemokin i czynników wzrostu, co sprzyja nasileniu zapalenia; z kolei procesy zapalne, poprzez zwiększone wytwarzanie RFT, nasilają OS i uszkodzenia komórkowe [8,20].

2.2. Zaburzenia immunologiczne i angiogeneza

OS stanowi istotny czynnik modulujący zarówno odpowiedź immunologiczną jak i procesy naczyniotwórcze. RFT pełnią fizjologicznie funkcję cząsteczek sygnałowych, jednak ich nadmierna produkcja prowadzi do rozregulowania szlaków kontrolujących aktywację komórek odpornościowych, wydzielanie mediatorów zapalnych oraz przebudowę mikrośrodowiska tkankowego. Szczególnie wyraźnie mechanizmy te ujawniają się w stanach patologicznych, takich jak nowotworzenie, gdzie OS współtworzy warunki sprzyjające immunosupresji i równocześnie intensyfikuje angiogenezę, umożliwiając wzrost i progresję

guza [6,21-23]. Zależności te stanowią istotne tło teoretyczne dla badań nad powiązaniem OS, oksydacyjnych uszkodzeń białek i angiogenezy w raku piersi.

Angiogeneza jest procesem powstawania nowych naczyń krwionośnych z już istniejących i w warunkach fizjologicznych pozostaje ściśle kontrolowana, m.in. podczas rozwoju embrionalnego, gojenia ran i naprawy tkanek. W przebiegu chorób nowotworowych regulacja ta ulega zaburzeniu, a komórki nowotworowe inicjują nadmierną angiogenezę poprzez uwalnianie licznych cząsteczek sygnałowych, w tym przede wszystkim naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF, *ang. vascular endothelial growth factor*). Wykazano, że angiogeneza może być częściowo indukowana przez RFT, które działają jako wtórne przekaźniki w kaskadach sygnałowych komórek śródbłonka oraz komórek nowotworowych [6,21,24].

W miarę wzrostu guza dochodzi do niedostatecznego ukrwienia jego centralnych obszarów, co prowadzi do hipoksji. Aby sprostać zwiększonym wymaganiom metabolicznym i tlenowym, uruchamiane są mechanizmy naczyniotwórcze, które zwiększają dopływ tlenu i składników odżywczych do tkanek guza. Kluczowym elementem odpowiedzi na hipoksję jest wzrost produkcji mitochondrialnych RFT (mtRFT), które stabilizują czynnik indukowany hipoksją (HIF-1 α , *ang. hypoxia-inducible factor 1 α*), a w konsekwencji promują przeżycie komórek i progresję nowotworu [24].

W nowotworach szczególne znaczenie ma oś HIF-1 α /VEGF, aktywowana przez RFT pochodzące zarówno z mitochondriów, jak i enzymatycznych źródeł komórkowych, np. oksydaz NADPH. W mikrośrodowisku guza RFT mogą indukować ekspresję VEGF i tym samym aktywować angiogenezę guza. Podwyższone poziomy RFT pochodzące z oksydaz NADPH w komórkach raka jajnika aktywują szlak HIF-1 α /VEGF. Opisywano również, że zmutowane białko p53 sprzyja akumulacji RFT i aktywuje oś HIF-1 α /VEGF, nasilając angiogenezę w komórkach raka jelita grubego [22]. Dane te pozostają spójne z założeniem, że OS może stanowić istotny regulator angiogenezy nowotworowej. W tym kontekście zasadne jest poszukiwanie markerów, które pozwalają powiązać nasilenie uszkodzeń oksydacyjnych z aktywnością procesów angiogennych. Jednym z takich markerów mogą być AOPPs, odzwierciedlające oksydacyjne modyfikacje białek, oceniane w badaniach własnych u pacjentek z wczesnym rakiem piersi.

Zjawiska te przekładają się na wzrost produkcji wielu proangiogennych mediatorów w guzach. W rozwoju raka pęcherza moczowego obserwowano zwiększoną ekspresję

czynników stymulujących angiogenezę, takich jak VEGF, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, IL-8 oraz metaloproteinazy macierzy [6].

Rodzina VEGF u ssaków obejmuje pięć podstawowych ligandów: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oraz PlGF. Poszczególni członkowie rodziny wykazują odmienną specyfikę biologiczną, jednak kluczową rolę w angiogenezie odgrywa VEGF-A. VEGF-A zwiększa migrację i proliferację komórek śródbłónka, nasila aktywność metaloproteinaz macierzy oraz uczestniczy w procesach formowania światła naczyń i utrzymania nowo utworzonej sieci naczyniowej. Ligand ten wiąże się głównie z receptorem VEGFR2 na komórkach śródbłónka oraz komórkach progenitorowych śródbłónka pochodzących ze szpiku (EPC, *ang. endothelial progenitor cells*), uruchamiając szlaki prowadzące do wzrostu przepuszczalności naczyń, proliferacji i migracji komórek śródbłónka, rekrutacji EPC oraz stabilizacji powstającego unaczynienia [6]. Szczególne znaczenie VEGF-A w angiogenezie nowotworowej wskazuje na zasadność uwzględniania tego czynnika w ocenie aktywności procesów naczyniotwórczych w raku piersi. W badaniach własnych równoczesna analiza VEGF-A oraz rozpuszczalnych receptorów VEGFR1 i VEGFR2 pozwoliła odnieść nasilenie oksydacyjnych uszkodzeń białek, wyrażone stężeniem AOPPs, do układu regulującego równowagę pomiędzy sygnałami proangiogennymi i antyangiogennymi.

Proangiogenne działanie OS nie ogranicza się do osi HIF-1 α /VEGF. RFT mogą również aktywować szlaki PI3K/AKT/mTOR oraz MAPK/NF- κ B, które nasilają ekspresję VEGF, uwalnianie cytokin prozapalnych i aktywność metaloproteinaz macierzy. Sprzyja to przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej, migracji komórek śródbłónka, tworzeniu nowych naczyń oraz progresji nowotworu [21,22,25]. Ma to szczególne znaczenie w kontekście oznaczania AOPPs, ponieważ odzwierciedlają one nie tylko oksydacyjne uszkodzenia białek, ale mogą także aktywnie uczestniczyć w podtrzymywaniu sygnałów zapalnych i stymulowaniu angiogenezy w mikrośrodku nowotworowym.

Jednocześnie relacja pomiędzy RFT a angiogenezą nie zawsze ma charakter jednokierunkowy, a efekt zależy od poziomu i źródła RFT. Co ciekawe, zwiększoną angiogenezę obserwowano także w komórkach raka płuc po zastosowaniu antyoksydantów. Wykazano, że obniżenie poziomu RFT może promować angiogenezę również w mechanizmie niezależnym od HIF-1 α [22]. Obserwacje te podkreślają, że zasadne jest równoczesne analizowanie markerów oksydacyjnego uszkodzenia biomolekuł oraz parametrów angiogenezy.

Przedstawione dane wskazują, że OS stanowi istotny łącznik pomiędzy zaburzeniami immunologicznymi, przebudową mikrośrodowiska tkankowego a rozregulowaną angiogenezą. Hipoksja i RFT sprzyjają stabilizacji HIF-1 α , indukcji VEGF oraz aktywacji szlaków PI3K/AKT/mTOR i MAPK/NF- κ B, co prowadzi do proliferacji i migracji komórek śródbłonna, wzrostu przepuszczalności naczyń oraz nasilonej degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej. W warunkach nowotworzenia efektem jest powstanie sieci naczyń wspierającej wzrost guza i proces przerzutowania, a jednocześnie utrwalenie sygnałów zapalnych w mikrośrodowisku guza [6,9,22-24,26]. Tak zarysowane tło biologiczne stanowi podstawę do oceny zależności pomiędzy oksydacyjnymi uszkodzeniami białek, wyrażonymi stężeniem AOPPs, a markerami angiogenezy u pacjentek z rakiem piersi.

2.3. Nowotwory

Przewlekły stan zapalny oraz podwyższony poziom RFT są ważnymi czynnikami sprzyjającymi powstawaniu i rozwojowi wielu nowotworów [21,22]. RFT wiązano z inicjacją i progresją wielu nowotworów, w tym czerniaka, chłoniaka, raka trzustki, jajnika, szyjki macicy, pęcherza moczowego oraz prostaty [6,7,21,22]. OS działa jak silny katalizator transformacji komórek prawidłowych w fenotypy nowotworowe. Zwiększony poziom RFT oddziałuje na biomolekuły, takie jak DNA, RNA i białka, indukując mutacje DNA, pęknięcia nici, aberracje chromosomowe [5-7,10,21,22]. Zmiany te prowadzą do zaburzeń prawidłowego cyklu komórkowego, mechanizmów naprawy DNA oraz programowanej śmierci komórek (apoptozy) [22]. Prowadzi to do zaburzenia integralności genomu, skutkującego aktywacją onkogenów oraz inaktywacją genów supresorowych, które sprzyjają niekontrolowanej proliferacji komórek, procesowi nowotworzenia, ale również prowadzą do akumulacji RFT na skutek zmian szlaków sygnalizacji metabolicznej [21,22]. W kontekście niniejszej dysertacji szczególne znaczenie mają oksydacyjne uszkodzenia białek, odzwierciedlane przez stężenie AOPPs. Ocena AOPPs u pacjentek z wczesnym rakiem piersi pozwala odnieść nasilenie OS do przebiegu choroby, charakterystyki molekularnej guza oraz wybranych parametrów odzwierciedlających zaburzenia mikrośrodowiska nowotworu.

W warunkach niedotlenienia dochodzi także do aktywacji HIF-1 α , który, regulując glikolizę i funkcję mitochondriów, wpływa tym samym na generację i akumulację RFT [22]. Zmiany te mają charakter błędnego koła, które, utrzymując wysokie poziomy RFT, sprzyjają progresji guza. Komórki zapalne w mikrośrodowisku guza dodatkowo nasilają OS poprzez

zwiększoną produkcję RFT oraz aktywację szeregu enzymów, takich jak oksydazy NADPH, oksydaza ksantynowa, cyklooksygenazy i lipooksygenazy, powodując dalsze uszkodzenia oksydacyjne [8]. Z drugiej strony, nadmierna produkcja RFT może przekraczać zdolności adaptacyjne komórek nowotworowych, prowadząc tym samym do ich śmierci. Aby temu zapobiec, komórki nowotworowe zwiększają aktywność układów antyoksydacyjnych, co pozwala im utrzymywać poziom RFT w zakresie sprzyjającym proliferacji, przeżyciu i oporności na apoptozę [9]. Zależność pomiędzy RFT a progresją nowotworu ma zatem charakter dwufazowy. Umiarkowany wzrost może wspierać proliferację, angiogenezę i adaptację metaboliczną komórek nowotworowych, natomiast nadmiar RFT może prowadzić do uszkodzeń przekraczających próg tolerancji komórki i indukować śmierć komórkową. Jednocześnie nadmierna eliminacja RFT również może być niekorzystna poprzez zaburzenie fizjologicznej sygnalizacji redoks, która może sprzyjać adaptacji komórek nowotworowych do warunków stresowych. Warto więc zauważyć, że wpływ pronowotworowy wywierają nie same RFT, gdyż ich prawidłowe stężenie pełni kluczową funkcję w sygnalizacji komórkowej, a zaburzenie delikatnej równowagi pomiędzy produkcją RFT a mechanizmami antyoksydacyjnymi komórek. Z tego względu markery trwałych uszkodzeń oksydacyjnych, takie jak AOPPs, mogą stanowić użyteczne narzędzie do oceny biologicznych następstw zaburzonej równowagi redoks w chorobach nowotworowych, w tym w raku piersi.

2.4. Miażdżyca

OS odgrywa kluczową rolę w inicjacji i rozwoju blaszki miażdżycowej, która powstaje najczęściej w obszarach zaburzonego przepływu laminarnego i zmienionego naprężenia ścinającego. Zjawiska te prowadzą do zwiększenia przepuszczalności śródbłonna, sprzyjając przenikaniu lipidów oraz komórek układu odpornościowego do przestrzeni podśródbłonkowej ściany naczynia. Zatrzymane w tej lokalizacji cząsteczki LDL mogą ulegać modyfikacjom oksydacyjnym indukowanym przez RFT, a powstające utlenione lipoproteiny niskiej gęstości (oxLDL, *ang. oxidized low-density lipoprotein*) inicjują i podtrzymują odpowiedź zapalną [27,28,29]. W konsekwencji dochodzi do aktywacji śródbłonna, zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych oraz nasilenia wytwarzania mediatorów zapalnych, w tym cytokin, chemokin i czynników wzrostu. Następnie krążące monocyty są rekrutowane do ogniska uszkodzenia i adherują do aktywowanego śródbłonna, po czym migrują do błony wewnętrznej naczynia, gdzie różnicują się w makrofagi. Komórki te internalizują oxLDL, co prowadzi do ich

przeładowania lipidami i powstania komórek piankowatych. Komórki piankowate wydzielają cytokiny oraz chemokiny, nasilając napływ kolejnych monocytów i limfocytów T do przestrzeni podśródbłonkowej. Nagromadzenie lipidów i komórek zapalnych warunkuje formowanie się wczesnej zmiany miażdżycowej w postaci pasma tłuszczowego, które w dalszym przebiegu może ewoluować w bardziej zaawansowaną i złożoną blaszkę miażdżycową [27,28]. RFT wywierają jednocześnie wielokierunkowy wpływ na ścianę naczyniową, obejmujący oksydacyjne uszkodzenia lipidów i materiału genetycznego, nasilenie dysfunkcji śródbłonka oraz podtrzymywanie przewlekłej reakcji zapalnej, co dodatkowo sprzyja progresji zmian miażdżycowych oraz może modulować podatność blaszki na destabilizację [27]. Oprócz RFT uwalnianych z aktywowanych komórek układu odpornościowego, istotną rolę odgrywają również inne utleniacze, w tym kwas podchlorawy (HOCl), zaliczany do RFC, zdolny do modyfikacji i uszkodzania wielu cząsteczek, w tym białek, co może prowadzić do dysfunkcji tkanek [8,30].

Zaburzenia homeostazy redoks oraz wynikający z nich OS stanowią wspólny element patogenezy wielu chorób o różnym podłożu, w tym chorób zapalnych, infekcyjnych oraz nowotworowych. Coraz więcej danych wskazuje, że nadmierna produkcja RFT oraz oksydacyjne modyfikacje biomolekuł odgrywają istotną rolę zarówno w przebiegu ostrych infekcji układu oddechowego, jak i w procesach związanych z rozwojem i progresją nowotworów. Zjawiska te obserwuje się m.in. w zapaleniach płuc o różnej etiologii, w tym w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2, a także w chorobach nowotworowych, gdzie OS może wpływać na procesy zapalne, angiogenezę oraz progresję choroby. W związku z tym biomarkery odzwierciedlające nasilenie zaburzeń równowagi redoks, takie jak AOPPs, mogą stanowić potencjalne narzędzie oceny przebiegu choroby oraz rokowania pacjentów.

3. Oksydacyjne uszkodzenia biomolekuł i ich konsekwencje biologiczne

3.1. Lipidy

Oksydacyjne uszkodzenia lipidów błonowych dotyczą przede wszystkim wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, *ang. polyunsaturated fatty acids*), których wiązania podwójne stanowią główne cele RFT [10,31]. Interakcja RFT z PUFA inicjuje łańcuchowy proces peroksydacji lipidów, prowadzący do powstawania wodoronadtlenków lipidów oraz wtórnych, wysoce reaktywnych produktów karbonylowych [10,32–34].

Szczególną podatność na oksydacyjne uszkodzenia wykazują również lipidy mitochondrialne, zwłaszcza kardiolipina, fosfolipid istotny dla organizacji i funkcjonowania łańcucha oddechowego. Jej utlenienie może zaburzać fosforylację oksydacyjną i sprzyjać nasileniu wytwarzania mtRFT, wzmacniając prooksydacyjne środowisko wewnątrzkomórkowe [35].

Do najważniejszych produktów peroksydacji lipidów należą m.in. 4-hydroksynonenal (4-HNE), malonodialdehyd (MDA), akroleina oraz izoprostany [10,31–34]. Związki te stanowią istotne biomarkery odpowiedzi komórkowej na OS, ale także aktywne modulatory odpowiedzi zapalnej m.in. poprzez wpływ na szlak jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF- κ B, *ang. nuclear factor kappa B*) oraz regulację ekspresji genów. Szczególne znaczenie mają reaktywne aldehydy, takie jak 4-HNE i MDA, ponieważ mogą tworzyć addukty z białkami, modyfikować reszty aminokwasowe oraz zmieniać strukturę i funkcję enzymów, receptorów i białek cytoszkieletu [32,33].

W ten sposób peroksydacja lipidów nie ogranicza się do uszkodzenia błon komórkowych, lecz może wtórnie nasilać oksydacyjne i karbonylowe modyfikacje białek. Produkty peroksydacji lipidów mogą zaburzać aktywność enzymatyczną, wpływać na szlaki sygnałowe, nasilać odpowiedź zapalną oraz sprzyjać utrwaleniu środowiska prooksydacyjnego [5,10,34]. Wpływ uszkodzeń oksydacyjnych lipidów pośrednio przyczynia się do modyfikacji białek, co jest szczególnie istotne z perspektywy niniejszej rozprawy.

3.2. DNA

Uszkodzenia DNA stanowią jeden z kluczowych efektów biologicznych OS, ponieważ materiał genetyczny pozostaje w ciągłej ekspozycji na czynniki endogenne, takie jak błędy replikacyjne, uszkodzenia powstające na tle fizjologicznych procesów metabolicznych, jak i egzogenne, np. promieniowanie UV i jonizujące, styl życia czy nadmierne spożycie alkoholu [4,36-41].

Wzrost poziomu RFT nasila częstość i złożoność zmian w DNA, prowadząc do modyfikacji jego właściwości fizykochemicznych oraz do aktywacji odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, *ang. DNA damage response*) [4,42]. DDR obejmuje zintegrowane sieci sygnalizacyjne i efektorowe, które uruchamiają szlaki naprawy DNA lub indukują eliminację komórki poprzez apoptozę bądź inne formy śmierci komórkowej [4]. Zakres działania DDR obejmuje również aktywację szlaku NF- κ B, który prowadzi do nasilonej ekspresji cytokin

prozapalnych i zwiększonego OS [42]. Białka uczestniczące w mechanizmach naprawy uszkodzeń DNA same są podatne na modyfikacje pod wpływem OS, co może ograniczać skuteczność ich działania oraz sprzyjać utrwalaniu niestabilności genomowej [43]. Mechanizmy te tworzą tym samym sprzężenie zwrotne pomiędzy uszkodzeniem materiału genetycznego, modyfikacjami białek i dalszą produkcją RFT [44,45].

Jednakże w kontekście niniejszej rozprawy uszkodzenia DNA stanowią wyłącznie jeden z elementów szerszego obrazu oksydacyjnego uszkodzenia biomolekuł. Szczególne znaczenie mają dalsze rozważania dotyczące białek, ponieważ ich oksydacyjne modyfikacje mogą prowadzić do powstawania względnie trwałych produktów, takich jak AOPPs.

3.3. Białka

Białka, jako główne składniki większości układów biologicznych, są jednym z głównych celów reakcji z rodnikami [3]. Albumina, stanowiąca najobficiej występujące białko osocza, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu równowagi redoks organizmu. Dzięki obecności reaktywnej grupy tiolowej w pozycji Cys34 oraz zdolności do wiązania licznych ligandów albumina pełni funkcję ważnego bufora antyoksydacyjnego w krążeniu. Białka mogą ulegać odwracalnym modyfikacjom oksydacyjnym, pełniąc tym samym kluczową rolę w procesach fizjologicznych i stanowiąc mechanizmy sygnalizacji redoks, podczas gdy nieodwracalne modyfikacje mogą przyczyniać się do sytuacji patologicznych i wielu chorób [3]. Oksydacyjne uszkodzenia białek wynikają z wysokiej reaktywności zarówno łańcucha peptydowego jak i dwudziestu standardowych aminokwasów, co sprzyja generowaniu wielu typów rodników oraz różnorodnych modyfikacji chemicznych.

Utlenianie białek indukowane przez RFT oraz reakcje katalizowane przez metale redoks prowadzą przede wszystkim do trzech klas zmian: (1) fragmentacji łańcucha polipeptydowego wskutek oksydacyjnego rozszczepienia wiązań peptydowych, (2) bezpośredniej oksydacji reszt aminokwasowych oraz (3) tworzenia wiązań krzyżowych białko-białko [3]. Szczególnie podatne na utlenianie są reszty metioniny, które tworzą odwracalny produkt sulfotlenek metioniny. Wiązania krzyżowe między białkami mogą powstawać m.in. poprzez utlenianie reszt cysteinowych i tworzenie mostków dwusiarczkowych (wewnątrz- lub międzycząsteczkowych), przez reakcje lizyny z aldehydami (np. MDA) powstającymi wtórnie podczas peroksydacji lipidów, a także w wyniku sprzęgania rodników tyrozylowych po jednoelektronowym utlenieniu pierścieni aromatycznych [3,30]. Utlenione oksydacyjnie

białka wymagają szybkiego usunięcia lub degradacji przez systemy proteolityczne (m.in. proteasomy), gdyż ich akumulacja zaburza homeostazę proteostazy oraz nasila dysfunkcję komórkową [3,46].

Oksydacyjnie zmodyfikowane białka charakteryzują się szerokim zakresem potranslacyjnych modyfikacji, które w konsekwencji zmieniają ich skład, fałdowanie, ładunek netto, a także hydrofobowość/hydrofilowość. Zmiany te istotnie wpływają na pełnione przez białka funkcje jako receptory, enzymy, nośniki lub białka strukturalne [3,30]. W konsekwencji oksydacyjne modyfikacje białek są powiązane z patogenezą licznych chorób przewlekłych, w tym schorzeń neurodegeneracyjnych (np. choroby Alzheimera) oraz chorób zapalnych (np. reumatoidalnego zapalenia stawów), a także z procesem starzenia, w którym obserwuje się wzrost poziomu oksydacji białek jako rezultat zaburzonej równowagi między obciążeniem oksydacyjnym a wydolnością mechanizmów antyoksydacyjnych i degradacyjnych [3,10,46]. Szczególną grupę produktów oksydacyjnych białek stanowią AOPPs, które ze względu na swoją stabilność oraz możliwość oznaczania w materiale biologicznym znajdują zastosowanie jako biomarkery OS. Co więcej, uszkodzenia oksydacyjne białek (podobnie jak lipidów i DNA) mogą inicjować szlaki sygnałowe łączące OS z przewlekłym stanem zapalnym, przy czym długotrwała aktywacja odpowiedzi zapalnej nasila generację RFT przez komórki układu odpornościowego, tworząc dodatnie sprzężenie zwrotne między zapaleniem a OS [3,10]. Duża różnorodność oksydacyjnych modyfikacji białek oraz ich liczba wymuszają stosowanie zróżnicowanego zestawu metod analitycznych do identyfikacji i oceny takich zmian. W zależności od celu badania podejście może obejmować analizę całego proteomu, ocenę wybranych białek lub być skoncentrowane na detekcji określonych klas modyfikacji [3,47].

4. Wybrane biomarkery oksydacyjnie zmodyfikowanych białek o znaczeniu diagnostycznym

Białka podlegające modyfikacjom oksydacyjnym mogą nie tylko bezpośrednio zaburzać funkcję receptorów i enzymów, lecz także przyczyniać się do wtórnych uszkodzeń innych biocząsteczek, m.in. poprzez inaktywację enzymów uczestniczących w naprawie DNA. Ze względu na dużą obfitość białek w układach biologicznych ocena stopnia ich oksydacyjnych modyfikacji może stanowić podstawę do rozważania interwencji ukierunkowanych na ograniczenie powstawania tych zmian.

Do klasycznych markerów oksydacyjnych modyfikacji białek należą karbonyle białkowe, 3-nitrotyrozyna oraz bardziej złożone produkty modyfikacji potranslacyjnych, takie

jak zaawansowane produkty końcowe glikacji (AGEs, *ang. advanced glycation end products*), AOPPs oraz albumina modyfikowana niedokrwieniem (IMA, *ang. ischemia-modified albumin*). Jednymi z najczęściej stosowanych w literaturze wskaźników nieodwracalnej oksydacji białek są karbonyle białkowe powstające w wyniku bezpośredniego utleniania reszt aminokwasowych lub wtórnej reakcji białek z produktami peroksydacji lipidów. Ich oznaczanie dostarcza informacji o ogólnym nasileniu oksydacyjnych uszkodzeń białek, jednak nie wskazuje jednoznacznie na udział określonego szlaku oksydacyjno-zapalnego [30,48]. Z kolei 3-nitrotyrozyna odzwierciedla głównie modyfikacje związane z działaniem RFA i nitrowaniem reszt tyrozynowych, dlatego jest bardziej swoistym markerem stresu nitrozacyjnego niż ogólnego oksydacyjnego uszkodzenia białek [49]. AGEs są natomiast produktami glikacji i glikooksydacji, szczególnie istotnymi w zaburzeniach metabolicznych [50], natomiast IMA stanowi przykład względnie wczesnej i bardziej przejściowej modyfikacji albuminy w warunkach niedokrwienia [51,52].

Na tym tle AOPPs wyróżniają się właściwościami, które uzasadniają ich wybór jako biomarkera analizowanego w niniejszej rozprawie. Są względnie stabilnymi produktami oksydacyjnej modyfikacji białek osocza, zwłaszcza albuminy, powstającymi przede wszystkim pod wpływem silnych chlorowanych utleniaczy generowanych przy udziale mieloperoksydazy neutrofili. Dzięki temu ich stężenie może odzwierciedlać nie tylko samo nasilenie uszkodzenia białek, lecz także szerszą oś patofizjologiczną obecną w stanach, w których OS współistnieje ze stanem zapalnym i może wpływać na przebieg kliniczny oraz rokowanie. Ponadto AOPPs nie są wyłącznie biernymi produktami uszkodzeń oksydacyjnych, ponieważ jako cząsteczki efektorowe mogą nasilać produkcję cytokin prozapalnych i sprzyjać dalszemu wytwarzaniu RFT, uczestnicząc tym samym w dodatnim sprzężeniu zwrotnym pomiędzy OS, zapaleniem i uszkodzeniem tkanek [30,53-55]. Z tego względu AOPPs wybrano w niniejszej rozprawie nie jako ogólny marker OS, lecz jako biomarker integrujący oksydacyjne uszkodzenie białek, odpowiedź zapalną oraz potencjalne konsekwencje kliniczne modyfikacji albuminy.

4.1. Zaawansowane produkty końcowe glikacji - AGEs (*ang. advanced glycation end products*)

AGEs uważane za kluczowe czynniki rozwoju cukrzycy typu 2 [50] powstają w nieenzymatycznej reakcji cukrów redukujących (glukozy, fruktozy) z grupami aminowymi białek, lipidów i kwasów nukleinowych, w reakcji Maillarda [56,57]. Ten złożony, powolny i spontaniczny proces uszkodzenia białek jest zależny od dostępności substratów. Dlatego

w warunkach fizjologicznych AGEs powstają w ograniczonym stopniu, a ich produkcja nasila się w warunkach utrzymującej się hiperglikemii [57]. Jednocześnie utrzymujący się OS może przyspieszać glikację i glikooksydację, nasilając tworzenie AGEs poprzez wzrost puli reaktywnych związków karbonylowych i oksydacyjne modyfikacje białek [56,58].

AGEs, prowadząc do między- oraz wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych, nieodwracalnie uszkadzają integralność strukturalną i funkcjonalną białek [47,56]. Efektami tworzenia się wiązań krzyżowych są utrata aktywności przez biologicznie aktywne białka i enzymy [58], oporność białek na trawienie proteolityczne [57], ale także zmiana sygnalizacji wewnątrzkomórkowej prowadząca do szeregu zaburzeń biochemicznych i metabolicznych [59]. W odróżnieniu od AGEs, które powstają głównie w wyniku glikacji, AOPPs są produktami bezpośrednio związanymi z procesami oksydacyjnymi białek.

Dodatkowo, AGEs wiążąc się z receptorami dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE, *ang. receptor for advanced glycation end-products*), obecnymi na różnych komórkach, prowadząc do wielu efektów biologicznych, takich jak m.in. powikłania naczyniowe w przebiegu cukrzycy (neuropatia, nefropatia, retinopatia, kardiomiopatia i miażdżyca) [11,50,56]. Interakcja AGEs z receptorem RAGE wpływa na funkcjonowanie i metabolizm komórek oraz uruchamia liczne szlaki sygnałowe, co nasila aktywność czynników transkrypcyjnych (np. NF- κ B) [11] i produkcję RFT. W efekcie dochodzi do wzrostu stanu zapalnego, uszkodzeń oksydacyjnych oraz zaburzeń ruchliwości i metabolizmu komórkowego. OS może dodatkowo zwiększać tworzenie AGEs, podtrzymując błędne koło aktywacji RAGE [56].

4.2. Albumina modyfikowana niedokrwieniem – IMA (*ang. ischemia-modified albumin*)

Albumina jest najliczniej występującym białkiem w organizmie; stanowi 50–60% całej puli białek człowieka, z czego 30–40% albuminy znajduje się w krążeniu [2,60,61]. Sekwencja N-końcowa albuminy jest bardzo podatna na degradację indukowaną przez OS i modyfikacje biochemiczne. Sekwencja ta jest miejscem wiążącym różne metale przejściowe, takie jak kobalt, nikiel czy miedź [51]. W warunkach niedotlenienia oraz niedokrwienia nadmiar RFT powoduje zmiany w strukturze N-końcowego fragmentu albuminy, prowadząc do powstania IMA i skutkując jej obniżonym powinowactwem do jonów metali przejściowych [11,60,62].

Ze względu na jej szybki wzrost (ok. 10 min od wystąpienia niedokrwienia mięśnia sercowego) IMA została zatwierdzona przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków jako pomocniczy biomarker wczesnego niedokrwienia mięśnia sercowego [51,52,62].

Zmiany poziomów IMA obserwowano również w chorobach związanych z OS i niedokrwieniem, takich jak udary mózgu [60,63], cukrzyca [64], niewydolność nerek [65] czy ciężka sepsa, w której wykazano, że IMA może stanowić użyteczny marker prognostyczny 28-dniowej śmiertelności [66]. W przeciwieństwie do IMA, która stanowi przykład odwracalnej modyfikacji białka, AOPPs mają charakter bardziej trwały i są szeroko wykorzystywane jako markery przewlekłego OS.

4.3. Zaawansowane produkty utleniania białek – AOPPs (*ang. advanced oxidation protein products*)

Wśród markerów uszkodzeń oksydacyjnych białek szczególną uwagę zwracają AOPPs, które powstają głównie w wyniku reakcji utleniających katalizowanych przez mieloperoksydazę neutrofili. Stężenie AOPPs w osoczu odzwierciedla zarówno nasilenie OS, jak i aktywację procesów zapalnych [30,67]. Po raz pierwszy zostały opisane przez Witko-Sarsat i wsp. u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w 1996 roku [68]. Białkami najczęściej ulegającymi tym modyfikacjom są albumina i fibrynogen [30,67].

5. AOPPs – charakterystyka i znaczenie kliniczne

5.1. Właściwości biochemiczne

Dokładna struktura AOPPs nie jest całkowicie znana; wiadomo natomiast, że stanowią one grupę heterogennych produktów utleniania białek zawierających dityrozinę, pentozydinę i grupy karbonylowe [30,67]. Powstawanie AOPPs jest procesem nieodwracalnym, a ich eliminacja z organizmu odbywa się poprzez wątrobę i śledzionę [67,69].

Analiza elektroforetyczna umożliwiła podzielenie AOPPs na dwie grupy (AOPPs o małej i dużej masie cząsteczkowej). Warianty o małej masie cząsteczkowej zawierają monomery albuminy, natomiast grupa o dużej masie cząsteczkowej, stanowiąca większość puli AOPPs, to w większości agregaty utworzone dzięki skłonności albuminy do tworzenia agregatów poprzez mostki disiarczkowe oraz sieciowanie dityrozyny [30,67].

Jednocześnie AOPPs należy rozpatrywać nie tylko jako bierne wskaźniki oksydacyjnych uszkodzeń białek, lecz również jako cząsteczki biologicznie aktywne, zdolne do podtrzymywania i wzmacniania odpowiedzi zapalno-oksydacyjnej. Wykazano, że AOPPs mogą

oddziaływać z receptorami RAGE oraz CD36, prowadząc do aktywacji szlaków sygnałowych związanych m.in. z NF- κ B, nasileniem ekspresji cząsteczek adhezyjnych, produkcją cytokin prozapalnych oraz generowaniem RFT. W ten sposób AOPPs mogą uczestniczyć w dodatnim sprzężeniu zwrotnym pomiędzy OS a zapaleniem, przyczyniając się nie tylko do odzwierciedlania, lecz także do utrwalania procesów patologicznych [30,67,70,71].

5.2. Metody oznaczania AOPPs oraz ich ograniczenia

W licznych badaniach eksperymentalnych AOPPs oznaczano przede wszystkim metodami spektrofotometrycznymi, opartymi na reakcji utleniania jodku do jodanu, jak po raz pierwszy opisali Witko-Sarsat i wsp. [68]. Z uwagi na prostotę procedury, niski koszt oraz możliwość prowadzenia analiz w układzie wysokoprzepustowym, test ten został szeroko zaadaptowany i w kolejnych latach był wielokrotnie modyfikowany oraz optymalizowany przez różne grupy badawcze [72-74].

Badanie stężenia AOPPs w osoczu wykonuje się najczęściej w formacie mikro płytkowym z odczytem absorbancji przy 340 nm oraz z wykorzystaniem chloraminy T jako wzorca odniesienia, co umożliwia prezentację wyników w ekwiwalentach chloraminy T. Próbkę osocza nanosi się do dołków płytki 96-dołkowej, równolegle przygotowując krzywą wzorcową chloraminy T w zadanym zakresie stężeń (np. 0–100 μ M). Do mieszaniny reakcyjnej dodaje się następnie roztwór jodku potasu, po krótkiej inkubacji w temperaturze pokojowej zakwasza się układ lodowatym kwasem octowym/kwasem cytrynowym i dokonuje się odczytu absorbancji. Wyniki przedstawia się jako stężenie AOPPs wyrażone w μ M ekwiwalentów chloraminy T, niekiedy z dodatkową normalizacją do całkowitej zawartości białka (np. μ M/g białka), co ma ułatwiać porównania międzyosobnicze w warunkach zmiennego stężenia białek osocza.

Pomimo powszechności zastosowania spektrofotometryczne oznaczanie AOPPs obarczone jest istotnymi ograniczeniami analitycznymi i interpretacyjnymi. Kluczowym problemem jest wysoka nieswoistość testu, mierzony sygnał nie musi odpowiadać wyłącznie AOPPs, lecz może odzwierciedlać obecność szerokiego spektrum optycznie absorbujących składników osocza lub ogólną zdolność oksydacyjną próbki. Czynniki interferujące z metodą spektrofotometryczną oznaczania AOPPs mogą być także hemoliza czy ikteryeczność próbki. Cargnin i wsp. ocenili *in vitro* wpływ dodawania do próbek biologicznych wzrastających stężeń bilirubiny i hemoglobiny. Obie analizowane substancje dodane *in vitro* wpływały na

oznaczanie stężenia AOPPs. Dodatek hemoglobiny zaniżał wynik pomiaru AOPPs, natomiast bilirubina zawyżała wynik [75]. Podkreśla to konieczność wykluczania próbek hemolitycznych lub ikterycznych z analizy AOPPs. Dodatkową trudność stanowi heterogeny charakter AOPPs, obejmujących różne produkty oksydacyjnego sieciowania i modyfikacji białek, co utrudnia jednoznaczną identyfikację struktur chemicznych odpowiedzialnych za mierzony sygnał [3].

Istotne znaczenie mają również interferencje związane z charakterystyką matrycy osocza, które wpływają na powtarzalność oznaczeń. Podkreślano, że metody AOPPs mogą cechować się słabą powtarzalnością m.in. z powodu wytrącania lipidów i lipoprotein, co sprzyja zarówno utracie części frakcji białkowych związanych z lipoproteinami, jak i zawyżaniu odczytu na skutek rozpraszania światła w próbkach z lipemią. W odpowiedzi na te ograniczenia proponowano modyfikacje protokołu mające na celu poprawę wiarygodności pomiaru. Taylor i wsp. opisali rozwiązanie polegające na określeniu całkowitej zdolności utleniania jonów jodkowych w osoczu oraz na eliminacji wpływu wytrącania próbki, co miało zwiększyć dokładność i powtarzalność testu [74]. Z kolei Hanasand i wsp. zaproponowali podejście ukierunkowane na solubilizację lipidów przed pomiarem spektrofotometrycznym, aby zapobiegać zarówno utracie lipoprotein w wyniku precypitacji, jak i przeszacowaniu wyniku spowodowanemu rozpraszaniem światła [73].

Dodatkowym ograniczeniem jest brak pełnej standaryzacji metody pomiędzy laboratoriami. W poszczególnych badaniach stosowane są różne warianty protokołu, obejmujące odmienne rodzaje materiału biologicznego, sposoby przechowywania próbek, rozcieńczenia, zakres krzywej wzorcowej chloraminy T, rodzaje kwasów używanych do zakwaszenia mieszaniny reakcyjnej, czasy inkubacji, sposoby korekty tła oraz procedury postępowania z próbkami lipemicznymi lub zmętniałymi. Różnice te mogą wpływać na uzyskiwane wartości AOPPs i utrudniać bezpośrednie porównywanie wyników pomiędzy badaniami. Z tego względu szczegółowy opis procedury analitycznej oraz konsekwentne stosowanie tego samego protokołu w obrębie danego badania mają kluczowe znaczenie dla wiarygodności interpretacji wyników.

Wymienione ograniczenia nie wykluczają zastosowania AOPPs jako biomarkera OS, jednak wskazują, że wyniki oznaczeń spektrofotometrycznych powinny być interpretowane ostrożnie, zwłaszcza w badaniach klinicznych obejmujących próbki o zróżnicowanej zawartości białek, lipidów i innych składników osocza. W praktyce AOPPs należy traktować jako wskaźnik

nasilenia oksydacyjnych modyfikacji białek oraz ogólnej aktywności osi oksydacyjno-zapalnej, a nie jako pomiar jednej ściśle zdefiniowanej cząsteczki chemicznej.

5.3. AOPPs jako marker stresu oksydacyjnego

Ocena OS na podstawie bezpośredniego pomiaru rodników jest utrudniona ze względu na ich bardzo krótki czas półtrwania [30,67,76]. Dlatego w praktyce stosuje się biomarkery, których oznaczenie pośrednio odzwierciedla nasilenie procesów oksydacyjnych w organizmie [30,67]. Do wskaźników oksydacyjnych uszkodzeń białek zalicza się m.in. AOPPs [30,67,72,76].

AOPPs są stosunkowo trwałe, wykazują oporność na degradację proteolityczną oraz nie ulegają łatwo redukcji przez antyoksydanty, przez co akumulują się w osoczu i tkankach. Cecha ta czyni z nich użyteczny biomarker OS [30,67].

5.4. Rola AOPPs w chorobach zapalnych i nowotworowych

Przewlekły stan zapalny oraz OS odgrywają kluczową rolę w patogenezie wielu chorób przewlekłych. Podwyższone poziomy AOPPs wykryto m.in. u pacjentów z cukrzycą [70], nowotworami [77], chorobami układu sercowo-naczyniowego [30,78], miażdżycą [30,79] oraz zespołem metabolicznym [76].

Biologiczne znaczenie AOPPs wynika z ich podwójnej roli: z jednej strony są produktami oksydacyjnego uszkodzenia białek, a z drugiej mogą działać jako aktywne mediatory odpowiedzi zapalnej i dalszego nasilenia OS. AOPPs mogą przyczyniać się do inicjacji i/lub pogorszenia chorób poprzez różnorodne mechanizmy obejmujące aktywację fagocytów jednojądrzastych, indukowanie produkcji cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, czynnik martwicy nowotworów α), nasilenie wytwarzania białka chemotaktycznego monocytów oraz czynnika pochodzenia podścieliskowego α [70]. Istotnym elementem tych zjawisk jest interakcja AOPPs z komórkami odporności wrodzonej, a w szczególności z neutrofilami i monocytami/makrofagami, które stanowią podstawowe źródło utleniaczy w reakcji na bodziec zapalny. Wykazano, że komórki te mogą być aktywowane poprzez AOPPs, a dalsza ekspozycja na AOPPs indukuje w nich wybuchy tlenowe [53,70]. Dane te wspierają koncepcję, że AOPPs mogą wzmacniać dodatnie sprzężenie zwrotne pomiędzy OS a zapaleniem, nasilając jednocześnie generowanie utleniaczy i kaskadę mediatorów prozapalnych [30,53].

W przebiegu reakcji zapalnej rekrutacja fagocytów jednojądrowych sprzyja różnicowaniu komórek efektorowych, w tym zapalnych komórek dendrytycznych uczestniczących w prezentacji antygenów i modulacji odpowiedzi limfocytów T. Plastyczność

monocytów, makrofagów i komórek dendrytycznych oraz częściowe nakładanie się ich markerów i funkcji mogą sprzyjać utrwalaniu oraz rozsiewaniu odpowiedzi immunologicznej, prowadząc do uszkodzeń tkanek [26]. W kontekście nowotworów ma to szczególne znaczenie, ponieważ przewlekły stan zapalny i OS wspólnie kształtują mikrośrodowisko guza, a aktywacja odporności wrodzonej i modulacja komórek prezentujących antygen mogą wpływać na równowagę między odpowiedzią przeciwnowotworową a tolerancją immunologiczną [22,23].

Podsumowując, w kontekście chorób o podłożu zapalno-oksydacyjnym AOPPs należy rozpatrywać nie tylko jako wskaźniki oksydacyjnego uszkodzenia białek, lecz również jako cząsteczki o potencjale biologicznie czynnym, zdolne do modulowania odpowiedzi zapalnej poprzez aktywację szlaków sygnalizacyjnych związanych m.in. z receptorami RAGE oraz NF- κ B. W związku z tym AOPPs mogą odzwierciedlać nie tylko nasilenie OS, lecz także stopień uszkodzenia narządowego oraz aktywność procesu zapalnego, co czyni je potencjalnie użytecznym biomarkerem oceny przebiegu choroby oraz rokowania pacjentów.

5.5. AOPPs jako czynnik prognostyczny

AOPP są rozpatrywane nie tylko jako wskaźnik nasilonego OS, lecz także jako potencjalny czynnik prognostyczny, odzwierciedlający długotrwałą ekspozycję białek na modyfikacje oksydacyjne oraz akumulację powstających uszkodzeń w organizmie [30,67]. W tym ujęciu ich stężenie w osoczu może stanowić syntetyczną miarę obciążenia oksydacyjnego, które towarzyszy progresji wielu stanów przewlekłych i wpływa na ryzyko wystąpienia niekorzystnych zdarzeń klinicznych [67,80,81]. Dotychczasowe badania wiążą AOPPs z cięższym przebiegiem choroby, podwyższonym ryzykiem zgonu, a także gorszymi parametrami rokowniczymi [80-82].

Badanie Zhou i wsp. na grupie 1394 pacjentów poddawanych hemodializie podtrzymującej wykazało, że podwyższone stężenie AOPPs było związane z większym ryzykiem śmiertelności wśród tej grupy pacjentów [84]. Suvakov i wsp. wykazali, że produkty uboczne OS, w tym AOPPs, miały istotną wartość prognostyczną dla przeżycia całkowitego i sercowo-naczyniowego u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek [80]. AOPPs zidentyfikowano także jako obiecujący silny marker prognostyczny niekorzystnego rokowania u pacjentów z nefropatią IgA [85].

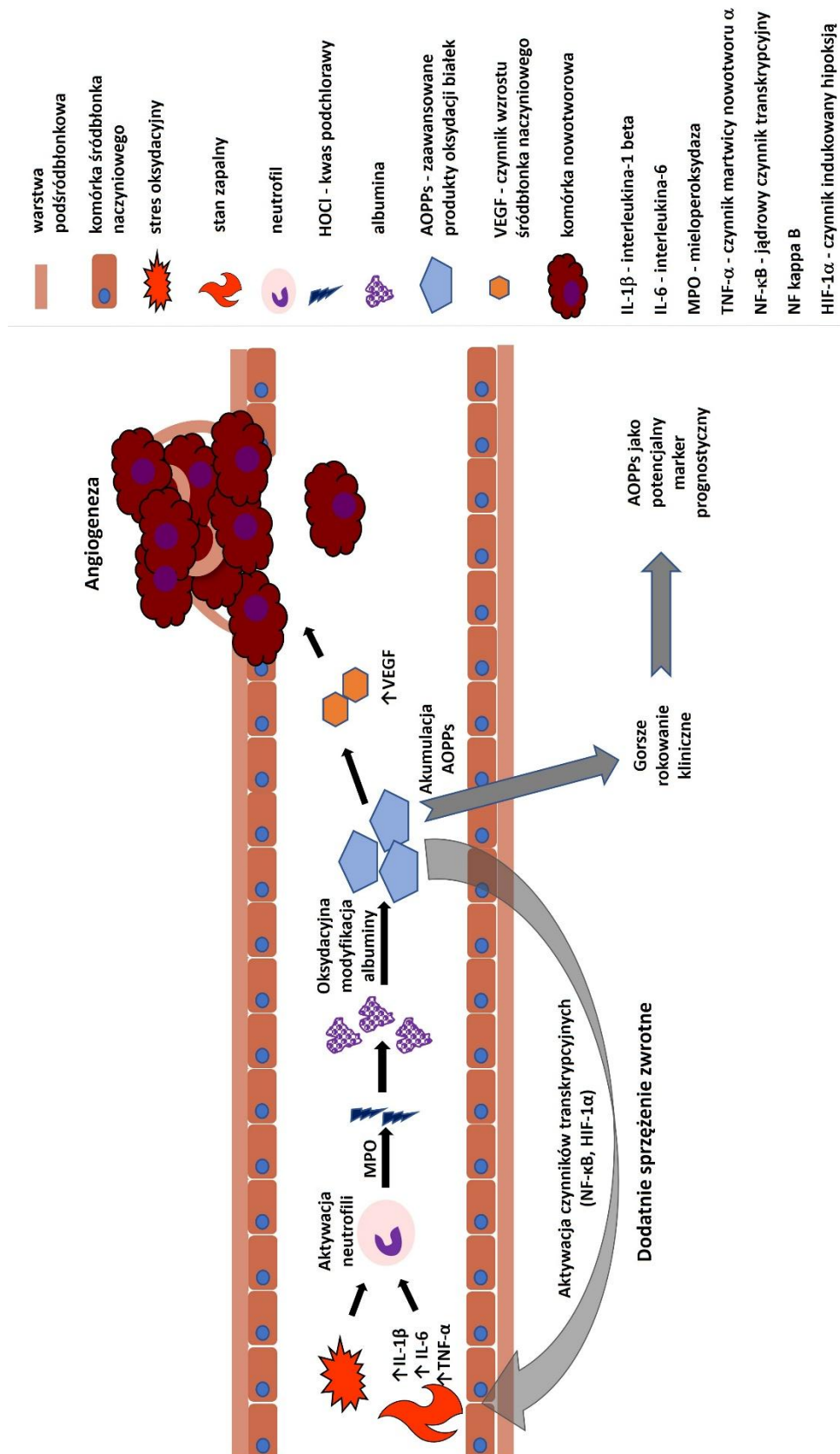
Wartość prognostyczną AOPPs obserwowano także w ostrej i przewlekłej niewydolności wątroby związanej z zakażeniem HBV, gdzie wyższe stężenia tych produktów

były związane z gorszym rokowaniem, a w analizie wieloczynnikowej stanowiły niezależny czynnik ryzyka niekorzystnego wyniku [82]. Podobne zależności wykazano u noworodków z zespołem zaburzeń oddychania, u których podwyższone stężenia AOPPs korelowały z większym nasileniem choroby, potrzebą wentylacji mechanicznej oraz wyższą śmiertelnością [83].

Co ciekawe, u pacjentów z krwotokiem śródmózgowym AOPPs zaproponowano jako część modelu prognostycznego służącego do przewidywania objętości obrzęku mózgu. Sugeruje to, że ich znaczenie prognostyczne może dotyczyć również dynamiki i ciężkości zmian narządowych [81].

Przedstawione wyniki wskazują, że AOPPs mogą stanowić istotny biomarker związany z nasileniem OS oraz rokowaniem w różnych stanach chorobowych. Jednak ich znaczenie kliniczne i prognostyczne w chorobach przebiegających z nasilonym procesem zapalno-oksydacyjnym, takich jak choroby infekcyjne czy nowotworowe, pozostaje nadal niewystarczająco poznane.

6. Graficzne podsumowanie wstępu



Rycina 1. Graficzne podsumowanie wstępu teoretycznego

VI Cel rozprawy

Biorąc pod uwagę istotną rolę OS w patogenezie wielu chorób oraz potencjalną przydatność biomarkerów odzwierciedlających zaburzenia homeostazy redoks, zasadne jest poszukiwanie wskaźników umożliwiających ocenę przebiegu choroby i rokowania pacjentów. AOPPs stanowią stosunkowo stabilne markery oksydacyjnych uszkodzeń białek, powstające głównie w wyniku reakcji związanych z aktywacją komórek zapalnych. Wykazano, że ich stężenie wzrasta w licznych stanach chorobowych przebiegających z nasilonym OS i stanem zapalnym. Pomimo rosnącej liczby doniesień znaczenie kliniczne i prognostyczne AOPPs nie zostało dotąd jednoznacznie określone. W szczególności nadal ograniczona jest wiedza na temat ich przydatności jako biomarkerów w ocenie przebiegu choroby i rokowania pacjentów. Cel główny:

Ocena znaczenia klinicznego i prognostycznego AOPPs jako biomarkerów stresu oksydacyjnego w wybranych chorobach związanych z przewlekłym stanem zapalnym i zaburzeniami homeostazy redoks oraz określenie ich potencjalnej przydatności w stratyfikacji ryzyka pacjentów.

Cele szczegółowe:

1. Określenie znaczenia klinicznego AOPPs u chorych na zapalenie płuc o etiologii COVID-19 poprzez analizę ich związku z oksydacyjną modyfikacją albuminy, nasileniem zmian w badaniach obrazowych oraz parametrami laboratoryjnymi.
2. Ocena stężenia AOPPs jako potencjalnego markera prognostycznego u pacjentek z wczesnym rakiem piersi w odniesieniu do ryzyka nawrotu choroby, przeżycia oraz wybranych markerów angiogenezy i cech biologicznych nowotworu.
3. Określenie znaczenia AOPPs jako potencjalnego biomarkera stratyfikacji ryzyka u chorych z pozaszpitalnym zapaleniem płuc w odniesieniu do 100-dniowej śmiertelności oraz ich związku z wybranymi wskaźnikami kliniczno-laboratoryjnymi.

VII Materiały i metody



GRUPA BADANA

Publikacja 1

66 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chorób Płuc, Nowotworów i Gruźlicy Kujawsko-pomorskiego Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy

Kryteria włączenia:

dodatni wynik testu na COVID-19 RT-PCR, zapalenie płuc potwierdzone w obrazie: HRCT/RTG, saturacja < 94%

Kryteria wykluczenia:

CPAP/BiPAP lub wentylacja mechaniczna
Czas obserwacji: 12 miesięcy

Publikacja 2

70 pacjentek przyjętych na Oddział Kliniczny Raka Piersi i Chirurgii Rekonstrukcyjnej, Centrum Onkologii w Bydgoszczy

Kryteria włączenia:

pierwotny, nieleczoney rak piersi, rak jednostronny, inwazyjny, nieprzerzutujący, stopień IA–IIIB

Kryteria wykluczenia:

guz > 5 cm, stopień ≥ IIIA, postać miejscowo zaawansowana/przerzutowa, leczenie neoadjuwantowe
Mediana czasu obserwacji: 78 miesięcy

Publikacja 3

71 pacjentów hospitalizowanych z pozaszpitalnym zapaleniem płuc w Klinice Chorób Płuc, Nowotworów i Gruźlicy Kujawsko-pomorskiego Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy

Kryteria włączenia:

zapalenie płuc potwierdzone w obrazie HRCT/RTG

Kryteria wykluczenia:

potrzeba wentylacji nieinwazyjnej lub mechanicznej

Czas obserwacji: 100 dni



BADANIA

Pobranie krwi (osocze EDTA) w ciągu 24 h od przyjęcia na oddział, po 7 dniach oraz po 6. i 12. miesiącu.

Wszyscy pacjenci przeszli podstawowe badania laboratoryjne.

Oznaczenie AOPPs w osoczu:

Pomiar absorbancji po reakcji osocza z jodkiem potasu w środowisku kwasu cytrynowego przy długości fali 340 nm. Wyniki wyrażano jako ekwiwalenty chloraminy T.

Pobranie krwi (surowica oraz osocze EDTA) 24 h przed zabiegiem oraz ok. 9 mies. po resekcji guza)

Oznaczenie AOPPs w surowicy:

Jak w publikacji nr 1

Oznaczenia czynników angiogenezy:

Stężenia VEGF-A, sVEGFR1 oraz sVEGFR2 zmierzono przy użyciu testów: VEGF-A, Quantikine, sVEGFR1/Fit-1, Quantikine, sVEGFR2/KDR, Quantikine, (R&D Systems, USA).

Pobranie krwi (osocze EDTA) w ciągu 24 h od przyjęcia na oddział. Wszyscy pacjenci przeszli podstawowe badania laboratoryjne.

Oznaczenie AOPPs w osoczu:

Jak w publikacji nr 1

Oznaczenie IMA w osoczu:

Pomiar absorbancji po reakcji osocza z chlorkiem kobaltu(II) i DTT przy długości fali 470 nm.

Oznaczenie aktywności enzymów przeciwutleniających:

Aktywności SOD oraz GPx zmierzono przy użyciu testów: Superoxidase Dismutase Assay Kit oraz

Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical, USA).



TESTY STATYSTYCZNE

- Test Shapiro–Wilka
- Test U Manna–Whitneya
- Korelacje Spearmana
- Krzywa ROC
- Wykresy Kaplana–Meiera, test log-rank
- Regresja logistyczna

- Test Shapiro–Wilka
- Test t-Studenta
- Test ANOVA + test post-hoc LSD
- Korelacje Spearmana
- Krzywa ROC
- Wykresy Kaplana–Meiera, test log-rank
- Regresja Coxa
- Regresja liniowa

- Test Shapiro–Wilka
- Korelacje Spearmana
- Test Wilcoxona

Rycina 2. Schemat blokowy metodyki badań prowadzących do powstania cyklu publikacji

VIII Wyniki i dyskusja

Wprowadzenie do pracy opublikowanej w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* pt. „Study of Albumin Oxidation in COVID-19 Pneumonia Patients: Possible Mechanisms and Consequences”.

Infekcja wirusem SARS-CoV-2 wiąże się z nasilonym wytwarzaniem RFT, RFA oraz RFC, które uczestniczą w mechanizmach rozwoju OS i uszkodzenia tkanek. Ich nadmiar prowadzi do powstawania oksydacyjnie zmodyfikowanych biomolekuł, których akumulacja leży u podstaw wielu mechanizmów zaangażowanych w postęp choroby COVID-19 [16,17,86]. Jako część wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na infekcje wirusowe, neutrofile wytwarzają mieloperoksydazę, katalizującą powstawanie HOCl [86]. Reakcja ta sprzyja tworzeniu AOPPs, które są dobrymi wskaźnikami uszkodzeń oksydacyjnych białek. Ponieważ w literaturze istnieje silny związek pomiędzy stanem zapalnym a OS [16,17,19,87], szczególnie interesująca wydaje się ocena znaczenia klinicznego AOPPs w populacji chorych na COVID-19.

W publikacji numer 1 zbadano stężenie AOPPs oraz podjęto próbę oceny jego znaczenia klinicznego u chorych na COVID-19 w momencie przyjęcia na oddział, siedem dni później oraz po 6 i 12 miesiącach od hospitalizacji. Do badania włączono 66 pacjentów hospitalizowanych w Kujawsko-Pomorskim Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy z powodu zapalenia płuc COVID-19, które zostało potwierdzone dodatnim wynikiem testu RT-PCR z wymazu z nosogardzieli oraz obrazowaniem radiograficznym (HRCT wykonano przy użyciu 64-rzędowego aparatu Siemens Somatom Sensation (Siemens Healthcare, Erlangen, Niemcy) o grubości warstwy $\leq 0,5$ mm) lub zdjęciem rentgenowskim klatki piersiowej. Grupa pacjentów była również badana tydzień po przyjęciu na oddział, pod warunkiem, że byli w ostrej fazie infekcji ($n = 44$), a następnie po 6 ($n = 30$) oraz 12 ($n = 27$) miesiącach od infekcji.

Przeprowadzone analizy statystyczne **w pierwszej publikacji** ujawniły, że mediany większości parametrów klinicznych typowo stosowanych do przewidywania śmiertelności i ciężkości przebiegu u pacjentów z COVID-19 były istotnie wyższe u pacjentów z COVID-19 w porównaniu z wartościami referencyjnymi. Wyniki te sugerują, że podwyższone stężenia AOPPs są związane ze stanem zapalnym w przebiegu COVID-19. **W pierwszej publikacji** oceniono również korelacje wartości AOPPs zmierzonej u pacjentów z COVID-19 po przyjęciu do szpitala z parametrami laboratoryjnymi: enzymami wątrobowymi (aminotransferazą asparaginianową (AST), aminotransferazą alaninową (ALT)), D-dimerami, LDH, CRP,

prokalcytoniną i wynikiem HRCT, uzyskując istotne statystycznie korelacje dodatnie ($p < 0,05$). Ponadto wykazano słabą, lecz istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem AOPPs a czasem od wystąpienia objawów do momentu przyjęcia do szpitala, co może sugerować stopniowe narastanie oksydacyjnych modyfikacji białek wraz z czasem trwania ostrej fazy zakażenia. 6 miesięcy po zakażeniu COVID-19 poziom AOPPs w tej samej grupie pacjentów znacząco spadł ($p < 0,001$). Istotnie niższe wartości AOPPs obserwowane po 6 miesiącach w porównaniu z okresem ostrej infekcji wskazują, że nasilenie oksydacyjnych modyfikacji białek jest ściśle związane z aktywną fazą choroby. Jednocześnie uzyskane wyniki nie potwierdzają, że w odległej obserwacji poziom AOPPs był wyższy niż przed zakażeniem, choć rola OS w patofizjologii zespołu post-COVID nadal wymaga dalszych badań.

Podsumowując, porównanie stężeń AOPPs u tych samych pacjentów zarówno w ostrej fazie zakażenia, jak i w odległej obserwacji wzmacnia przypuszczenie, że oksydacyjnie zmodyfikowana albumina pozostaje ściśle związana z patofizjologią COVID-19. Na uwagę zasługuje również stwierdzona dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem AOPPs a wynikiem HRCT, co może odzwierciedlać związek pomiędzy nasileniem oksydacyjnych modyfikacji albuminy a rozległością zmian zapalnych w mięszu płucnym. Ponieważ ciężki przebieg COVID-19 często współwystępuje z chorobami współistniejącymi, nie można wykluczyć, że wyższe stężenie AOPPs obecne przed zakażeniem może stanowić jeden z czynników predysponujących do cięższego przebiegu choroby.

Wprowadzenie do pracy opublikowanej w czasopiśmie *Cancers* pt. „A Preliminary Evaluation of Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs) as a Potential Approach to Evaluating Prognosis in Early-Stage Breast Cancer Patients and Its Implication in Tumour Angiogenesis: A 7-Year Single-Centre Study”.

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na intensywność procesów angiogennych jest OS. Nadmierna produkcja RFT odgrywa kluczową rolę w unaczynieniu tkanki nowotworowej oraz powstawaniu przerzutów. Zwiększona produkcja RFT towarzyszy również starzeniu się, paleniu tytoniu, otyłości i spożywaniu alkoholu, które należą do potencjalnych czynników ryzyka rozwoju raka piersi, co dodatkowo wskazuje na udział stresu oksydacyjnego w tym procesie [88]. Dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *ang. World Health Organization*) donoszą, że w 2022 roku u 2,3 miliona kobiet zdiagnozowano raka piersi, a liczba zgonów na świecie wyniosła 670 000. Rak piersi jest najczęstszym nowotworem u kobiet, a częstość jego wykrywania wzrasta w późniejszym wieku [89]. Dlatego szczególnie istotne wydaje się poszukiwanie nowych użytecznych biomarkerów, które mogłyby korzystnie wpłynąć na ocenę rokowania także we wczesnym stadium choroby.

W publikacji numer 2 zbadano stężenia AOPPs i podjęto próbę oceny, czy stężenia AOPPs przed i/lub po leczeniu mogą stanowić potencjalny marker prognostyczny u pacjentek z wczesnym rakiem piersi w odniesieniu do ryzyka nawrotu choroby i/lub przeżycia całkowitego. Dodatkowo oceniono związek pomiędzy AOPPs a wybranymi markerami angiogenezy i cechami biologicznymi nowotworu.

Badaniem objęto 70 pacjentek z pierwotnym, nieleczonym i nieprzerzutującym rakiem piersi w stadium IA-IIIB, przyjętych na Oddział Kliniczny Raka Piersi i Chirurgii Rekonstrukcyjnej Centrum Onkologii w Bydgoszczy. Pacjentki obserwowano od dnia rozpoznania raka piersi do daty nawrotu choroby lub zgonu albo do stycznia 2023 roku, w zależności od tego, które z tych zdarzeń wystąpiło jako pierwsze. Mediana czasu obserwacji wynosiła 78 miesięcy, a odsetek nawrotów wynosił 15,7%. U każdej pacjentki przeprowadzono wizyty kontrolne po dziewięciu miesiącach od zabiegu chirurgicznego. Krew pobierano dwukrotnie: 24 godziny przed zabiegiem chirurgicznym (wartość przed leczeniem) oraz po około dziewięciu miesiącach od resekcji guza (wartość po leczeniu).

Przeprowadzone analizy statystyczne **w drugiej publikacji** wykazały, że lokalizacja nowotworu w lewej piersi była związana z wyższym stężeniem AOPPs przed leczeniem

($p = 0,0056$). W odniesieniu do podtypów molekularnych raka piersi stwierdzono istotnie wyższe stężenia AOPPs przed leczeniem u pacjentek z podtypem luminalnym B HER2– w porównaniu z pozostałymi podtypami nowotworu ($p < 0,0001$). Dodatkowo wyższe wartości AOPPs obserwowano u pacjentek z podtypami luminalnym B HER2+ oraz nieluminalnym HER2+ w porównaniu z podtypem luminalnym A ($p = 0,0053$). Nadekspresja Ki-67 ($>20\%$) była związana z podwyższonymi poziomami AOPPs zarówno przed jak i po leczeniu. Wyższe stężenia AOPPs po leczeniu obserwowano również u pacjentek z ujemnym statusem receptorów estrogenowego i progesteronowego. **W publikacji nr 2** oceniono także zależności między stężeniami AOPPs a markerami angiogenezy. Uzyskane wyniki wskazały na dodatnią korelację pomiędzy AOPPs a VEGF-A przed leczeniem oraz ujemną korelację pomiędzy AOPPs po leczeniu a sVEGFR2 ($r = -0,3330$; $p = 0,0059$). Analiza ROC wykazała potencjalną wartość prognostyczną stężenia AOPPs przed i po leczeniu w ocenie ryzyka nawrotu choroby (odpowiednio $p = 0,0005$ oraz $p < 0,0001$) oraz przeżycia całkowitego pacjentek.

Podsumowując, przeprowadzone badanie wykazało, że stężenia AOPPs u pacjentek z wczesnym rakiem piersi są związane zarówno z przebiegiem choroby, jak i z rokowaniem odległym. Obniżenie poziomu AOPPs po leczeniu może sugerować udział guza nowotworowego oraz towarzyszącego mu stresu oksydacyjnego w generowaniu oksydacyjnych modyfikacji białek. Jednocześnie utrzymywanie się wysokich stężeń AOPPs, szczególnie po zakończeniu terapii, może wiązać się z większym ryzykiem nawrotu choroby oraz krótszym czasem przeżycia wolnego od nawrotu i całkowitego przeżycia. Uzyskane dodatnie korelacje pomiędzy AOPPs a VEGF-A oraz zależności z receptorami VEGF mogą wskazywać na potencjalny związek oksydacyjnych uszkodzeń białek z nasileniem procesów angiogennych w raku piersi. Analizy ROC, Kaplana–Meiera oraz modele regresji Coxa sugerują istotną wartość prognostyczną AOPPs, co może świadczyć o potencjalnej przydatności tego markera we wspomaganiu oceny rokowania pacjentek z wczesnym rakiem piersi.

Wprowadzenie do pracy opublikowanej w czasopiśmie *Scientific Reports* pt. „Advanced Oxidation Protein Products and Ischemia-Modified Albumin as Prognostic Biomarkers of Long-Term Mortality in Community-Acquired Pneumonia: A Prospective Observational Study”.

Pozaszpitalne zapalenie płuc jest główną przyczyną hospitalizacji związanych z zakażeniami i wciąż pozostaje istotną przyczyną śmiertelności pomimo znacznego postępu w diagnostyce i leczeniu. Na ryzyko gorszego przebiegu klinicznego i zwiększonego ryzyka śmiertelności szczególnie narażeni są pacjenci obciążeni chorobami współistniejącymi oraz deficytami odporności [90]. Mimo że większość pacjentów przeżywa hospitalizację dzięki szybkiemu wdrożeniu odpowiedniego leczenia przeciwbakteryjnego i przeciwwirusowego oraz kompleksowej opieki szpitalnej, śmiertelność po zakończeniu pobytu w szpitalu nadal stanowi istotny problem kliniczny. Centralnym elementem patogenezy pozaszpitalnego zapalenia płuc jest rozregulowana odpowiedź zapalna, zwłaszcza nadmierna produkcja RFT w przebiegu OS. Utrzymująca się aktywność oksydacyjna sprzyja uszkodzeniu płuc, rozwojowi ostrego zespołu niewydolności oddechowej oraz dysfunkcji wielonarządowej. Zasadna wydaje się zatem ocena, czy włączenie biomarkerów oksydacyjnych do stratyfikacji ryzyka i podejmowania decyzji klinicznych w pozaszpitalnym zapaleniu płuc poprawi ocenę rokowania u pacjentów, zwłaszcza w okresie po hospitalizacji.

W publikacji numer 3 oceniano, czy stężenie AOPPs i absorbancja IMA przy przyjęciu do szpitala mogą przewidywać 100-dniową śmiertelność w przebiegu pozaszpitalnego zapalenia płuc.

Badaną grupę stanowiło 71 dorosłych pacjentów hospitalizowanych z powodu pozaszpitalnego zapalenia płuc w Kujawsko-Pomorskim Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy. Zapalenie płuc zostało potwierdzone tomografią komputerową wysokiej rozdzielczości lub badaniem RTG klatki piersiowej. Z badania wykluczono pacjentów wymagających wentylacji nieinwazyjnej lub mechanicznej. Wszyscy pacjenci byli poddawani standardowej terapii tlenem oraz rutynowej diagnostyce laboratoryjnej w momencie przyjęcia. W celu oceny wpływu chorób współistniejących na rokowanie dla każdego pacjenta wyliczono indeks chorób współistniejących Charlson (CCI, *ang. Charlson Comorbidity Index*), który przypisuje ważne wartości punktowe (1-6) do 19 zdefiniowanych schorzeń. Aby ocenić odległe

konsekwencje pozaszpitalnego zapalenia płuc, losy pacjentów były obserwowane przez okres 100 dni.

Grupa pacjentów zmarłych w trakcie 100-dniowej obserwacji charakteryzowała się podwyższonym stężeniem AOPPs, jak i zwiększoną absorbancją IMA w porównaniu z grupą pacjentów, którzy przeżyli. Spośród analizowanych **w trzeciej publikacji** pojedynczych biomarkerów AOPPs oraz IMA wykazały najwyższe zdolności dyskryminacyjne w ocenie 100-dniowej śmiertelności. Co interesujące, dalsza analiza oraz zbudowanie modelu dwuskładnikowego regresji logistycznej (AOPPs i IMA) oraz modelu trójskładnikowego (AOPPs, IMA oraz CCI) znacząco poprawiły ocenę rokowania pacjentów. Przeprowadzona **w publikacji numer 3** analiza krzywych przeżycia Kaplana-Meiera ujawniła, że pacjenci ze stężeniem AOPPs $>7 \mu\text{M}$ oraz absorbancją IMA $>0,92$ charakteryzowali się istotnie krótszym czasem przeżycia w porównaniu z grupą pacjentów poniżej zdefiniowanych punktów odcięcia.

Podsumowując, podwyższone wartości biomarkerów OS u pacjentów z zapaleniem płuc o etiologii COVID-19, jak i pozaszpitalnym zapaleniem płuc sugerują, że OS jest wspólną patofizjologiczną cechą zapalenia płuc. Wskazuje to, że podwyższone stężenia AOPPs oraz IMA w przebiegu tych chorób mogą odzwierciedlać wspólną ścieżkę uszkodzeń oksydacyjnych, niezależnie od etiologii zakażenia. Ocena AOPPs przy przyjęciu do szpitala dostarcza wczesne informacje na temat homeostazy redoks i może potencjalnie pomóc w identyfikacji pacjentów o zwiększonym ryzyku odległej śmiertelności.

Wybrane modele kliniczne obejmujące COVID-19, raka piersi oraz pozaszpitalne zapalenie płuc reprezentują odmienne stany chorobowe, w których istotną rolę odgrywają zaburzenia homeostazy redoks oraz nasilony stres oksydacyjny. Uwzględnienie zarówno ostrych procesów zapalnych, jak i przewlekłego procesu nowotworowego umożliwiło analizę znaczenia AOPPs w różnych kontekstach klinicznych oraz ocenę ich potencjalnego związku z przebiegiem choroby i odpowiedzią zapalną. Poszczególne publikacje odnosiły się do różnych aspektów biologicznego i klinicznego znaczenia AOPPs, obejmując ocenę oksydacyjnych modyfikacji albuminy u pacjentów z COVID-19, analizę zależności pomiędzy AOPPs a markerami angiogenezy u pacjentek z rakiem piersi oraz ocenę znaczenia prognostycznego AOPPs i IMA u pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc.

Przedstawiony **cykl trzech prac** koncentruje się na roli AOPPs jako markerów OS oraz ich znaczeniu klinicznym w różnych stanach chorobowych: ostrych infekcjach układu oddechowego oraz w raku piersi. Pomimo różnic w badanych populacjach, uzyskane wyniki wskazują na spójny mechanizm patofizjologiczny, w którym OS, stan zapalny oraz uszkodzenia białek tworzą powiązaną sieć zależności o istotnym znaczeniu prognostycznym.

Wspólnym mianownikiem wszystkich trzech analizowanych jednostek chorobowych jest aktywacja odpowiedzi zapalnej prowadząca do nadmiernego wytwarzania reaktywnych cząsteczek. Zarówno w ostrych infekcjach układu oddechowego, jak i w nowotworzeniu, odpowiedź zapalna początkowo pełni funkcję obronną lub adaptacyjną, jednak jej utrzymywanie się lub nadmierne nasilenie prowadzi do utraty kontroli nad homeostazą redoks. W zakażeniach dróg oddechowych aktywacja neutrofili i makrofagów jest początkowo elementem prawidłowej odpowiedzi przeciwdrobnoustrojowej. Jednakże utrzymywanie się reakcji zapalnej powoduje, że chlorowane utleniacze pochodzące z aktywowanych neutrofili reagują z białkami osocza i generują AOPPs [91]. Natomiast w raku piersi nasilona produkcja cytokin prozapalnych prowadzi do rozwoju OS, który ma zdolność indukowania karcynogenezy gruczołu piersiowego poprzez aktywację szlaku AKT/PI3K/mTOR [92,93]. Z kolei przewlekły stan zapalny sprzyja angiogenezie, przebudowie mikrośrodowiska guza i jego dalszej progresji. Pomimo odmiennego kontekstu klinicznego, w obu jednostkach chorobowych dochodzi do nasilonej produkcji RFT oraz oksydacyjnych modyfikacji białek osocza, skutkujących powstawaniem AOPPs. Wyniki uzyskane w przedstawionym cyklu pozostają zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy wskazywali na istotny udział osi zapalno-oksydacyjnej

w patogenezie chorób. Channappanavar i wsp. [94] opisywali znaczenie burzy cytokinowej i immunopatologii w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2, natomiast Chernyak i wsp. [95], Cecchini i wsp. [96] oraz Laforge i wsp. [97] zwracali uwagę na rolę OS, uszkodzenia tkanek indukowanego przez neutrofile oraz zaburzeń redoks w COVID-19. Z kolei Kilic i wsp. [98] oraz Kundaktepe i wsp. [99] potwierdzają, że OS i rak piersi są ze sobą ściśle powiązane. Dane te dobrze wpisują się w obserwowany w cyklu związek AOPPs z markerami zapalenia, uszkodzenia tkanek oraz parametrami angiogenezy, sugerując, że oksydacyjne modyfikacje białek osocza mogą być konsekwencją nadmiernej i nie w pełni kontrolowanej odpowiedzi zapalno-oksydacyjnej.

Warto również podkreślić, że AOPPs mogą łączyć procesy miejscowe z ogólnoustrojową odpowiedzią organizmu. W zapaleniu płuc pierwotnym miejscem patologii jest miąższ płucny, jednak konsekwencje obejmują układ krążenia, wątrobę, nerki, hemostazę i metabolizm białek osocza. Uzyskane w publikacjach dotyczących ostrych infekcji płuc dodatnie korelacje AOPPs z wybranymi parametrami stanu zapalnego czy uszkodzeń narządowych wskazują na ich związek zarówno z nasilonym stanem zapalnym, jak i z wielonarządowym obciążeniem chorobą. Natomiast w raku piersi proces nowotworowy ma charakter miejscowy. Mimo to już na wczesnym etapie może generować on mierzalne zmiany ogólnoustrojowe, obejmujące OS, angiogenezę i systemową odpowiedź zapalną. Takie podejście wspiera koncepcję AOPPs jako biomarkera integrującego informacje o stanie zapalnym w miejscu patologii z ogólnoustrojową odpowiedzią gospodarza.

Zestawienie wyników całego cyklu pozwala także sugerować, że AOPPs mogą odzwierciedlać nie tylko ogólne nasilenie OS, lecz także zależności pomiędzy OS, zapaleniem a dysfunkcją śródbłonna naczyniowego. Śródbłonek reguluje przepuszczalność naczyń, hemostazę, odpowiedź immunologiczną oraz migrację komórek zapalnych. W przebiegu nasilonego stanu zapalnego RFT oraz zmodyfikowane oksydacyjnie białka mogą prowadzić do aktywacji śródbłonna naczyniowego, wzrostu ekspresji cząsteczek adhezyjnych, zaburzenia biodostępności tlenu azotu i zwiększenia ryzyka zakrzepowego. W chorobach infekcyjnych układu oddechowego skutkiem tych procesów może być uszkodzenie bariery pęcherzykowo-włośniczkowej, zaburzenie mikrokrążenia płucnego i nasilenie niewydolności oddechowej. Uzyskane korelacje AOPPs z D-dimerami w obu modelach infekcyjnych sugerują, że oksydacyjna modyfikacja białek może pozostawać w związku z zaburzeniami hemostazy

i funkcji naczyń, które są istotnymi elementami ciężkiego przebiegu chorób zapalnych płuc. Istotną rolę AOPPs w dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w różnych chorobach potwierdzają także inne badania [72,80,100,101].

Natomiast w raku piersi dysfunkcja śródbłonna naczyniowego dotyczy procesu angiogenezy nowotworowej oraz przebudowy mikrośrodowiska guza. Uzyskana dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem AOPPs a VEGF-A oraz ujemne zależności z rozpuszczalnymi receptorami VEGF sugerują, że oksydacyjne uszkodzenia białek mogą być powiązane z równowagą pomiędzy sygnałami proangiogennymi i antyangiogennymi. W tym kontekście AOPPs mogą pełnić funkcję biomarkera integrującego schorzenia przebiegające ze OS, nasilonym stanem zapalnym oraz zaburzeniami przebudowy naczyń. Podobny kierunek interpretacji wspierają prace dotyczące zależności pomiędzy OS, angiogenezą i progresją raka piersi. Madu i wsp. [102], Ayoub i wsp. [103] oraz Mdkhana i wsp. [104] podkreślali znaczenie angiogenezy i OS w rozwoju raka piersi. Huang i wsp. [105] wskazywali natomiast, że szlak VEGF może być regulowany przez interakcje pomiędzy angiogenezą a OS. Natomiast 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 śródbłonna za pośrednictwem receptora RAGE lub poprzez zwiększoną produkcję RFT w odpowiedzi na powstające AOPPs. Powstające w nadmiarze RFT w konsekwencji nasilają aktywność HIF-1 α oraz NF- κ B [107]. Szlaki te wzajemnie się wzmacniają, tworząc środowisko sprzyjające progresji nowotworu. Dane te wzmacniają interpretację uzyskanych w niniejszej dysertacji wyników, sugerując, że AOPPs mogą być powiązane nie tylko z ogólnoustrojowym OS, ale również z aktywnością angiogenną mikrośrodowiska guza.

Ważną cechą AOPPs, wpływającą na interpretację niniejszej rozprawy, jest ich biologiczna aktywność [108]. Zgodnie z aktualnymi danymi literaturowymi AOPPs nie są tylko biernymi cząsteczkami, ale mogą również oddziaływać z receptorami takimi jak RAGE czy CD36, które aktywują szlaki zależne od NF- κ B, nasilając tym samym przewlekły stan zapalny. Stymulacja ta nasila produkcję cytokin prozapalnych oraz prowadzi do dalszej wzmożonej produkcji RFT [53-55,106,109]. W takim ujęciu AOPPs mogą uczestniczyć w dodatnim sprzężeniu zwrotnym pomiędzy OS a zapaleniem. Prowadzi to do błędnego koła: stan zapalny nasila produkcję RFT i powstawanie AOPPs, natomiast wtórnie AOPPs mogą podtrzymywać

zapalenie poprzez aktywację komórek śródbłonna, monocytów, neutrofili i komórek mikrośrodowiska tkankowego. Mechanizm ten dobrze wpisuje się w obserwacje uzyskane w przedstawionym cyklu: w infekcjach układu oddechowego AOPPs wiązały się z parametrami zapalenia i uszkodzenia narządowego, natomiast w raku piersi z procesami angiogenezy i rokowaniem.

Dodatkowo, AOPPs wykazywały związek z klinicznie ważnymi punktami końcowymi w różnych modelach chorobowych: śmiertelnością 100-dniową w pozaszpitalnym zapaleniu płuc, ciężkością i dynamiką ostrej infekcji w COVID-19 oraz przeżyciem całkowitym i czasem wolnym od nawrotu w raku piersi. W pozaszpitalnym zapaleniu płuc AOPPs wykazywały dobrą zdolność dyskryminacyjną 100-dniowej śmiertelności. Natomiast zastosowanie modelu regresji logistycznej łączącego AOPPs, IMA oraz CCI poprawiało jeszcze ocenę rokowania pacjentów. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z obserwacjami Xu i wsp. podkreślającymi znaczenie OS w patogenezie i progresji pozaszpitalnego zapalenia płuc [16]. 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]. Pomimo doniesień o znaczeniu AOPPs w śmiertelności w kilku jednostkach chorobowych, brakuje literatury dotyczącej ich wartości prognostycznej w chorobach nowotworowych, co dodatkowo podkreśla znaczenie uzyskanych wyników w raku piersi. Warto również zauważyć, że w niniejszej rozprawie w każdej z analizowanych jednostek chorobowych AOPPs nie były oceniane jako izolowany marker OS, ale w odniesieniu do pełnej charakterystyki klinicznej pacjentów, co czyni je potencjalnie wartościowymi markerami wspomagającymi ocenę ryzyka, szczególnie w połączeniu z klasycznymi parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi.

Jednakże interpretując uzyskane wyniki, należy zachować ostrożność. Stężenia AOPP mogą wzrastać w wielu stanach chorobowych związanych ze stanem zapalnym, takich jak choroby nerek, sercowo-naczyniowe czy cukrzyca. Ich wartość kliniczna nie polega zatem na identyfikacji konkretnej jednostki chorobowej, ale na ocenie nasilenia wspólnego procesu biologicznego, jakim jest oksydacyjne uszkodzenie białek w warunkach stanu zapalnego. Z tego powodu AOPPs powinny być interpretowane łącznie z parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi odzwierciedlającymi nasilenie stanu zapalnego, uszkodzenia narządowe czy markerami angiogenezy.

Podsumowując, wyniki przedstawione w obrębie całego cyklu prac wskazują, że AOPPs mogą pełnić rolę dostępnego, stosunkowo prostego i biologicznie uzasadnionego biomarkera zaburzeń homeostazy redoks w chorobach przebiegających z nasilonym stanem zapalnym i OS. AOPPs nie są jednak jedynie biernym markerem oksydacyjnych modyfikacji białek, lecz mogą odzwierciedlać szerszą oś patofizjologiczną łączącą reakcję zapalną, aktywację neutrofilów, oksydacyjną modyfikację albuminy i dysfunkcję śródbłonnka naczyniowego z niekorzystnym rokowaniem. W raku piersi oś ta sprzyja angiogenezie nowotworowej, przebudowie mikrośrodowiska guza oraz dalszej progresji choroby. Natomiast w chorobach infekcyjnych płuc prowadzić może do zaburzeń krzepnięcia, nasilenia niewydolności oddechowej oraz powikłań wielonarządowych. Mimo istotnych klinicznie różnic pomiędzy analizowanymi jednostkami chorobowymi, niniejsza dysertacja ujawnia wspólne procesy patofizjologiczne napędzane przez przewlekłą lub nadmierną aktywację odpowiedzi zapalno-oksydacyjnej. Potencjalne włączenie AOPPs do modeli oceny ryzyka może w przyszłości wspierać identyfikację pacjentów wymagających intensywniejszego monitorowania, bardziej agresywnego leczenia lub dłuższej obserwacji. Konieczne są jednak dalsze badania, obejmujące większe i niezależne kohorty, standaryzację metod oznaczania oraz ocenę wartości AOPPs względem uznanych parametrów laboratoryjnych, aby określić ich rzeczywistą wartość w praktyce klinicznej.

IX Wnioski

Integracja badań przeprowadzonych w ramach niniejszej dysertacji pozwala na sformułowanie następujących wniosków:

1. Uzyskane wyniki wskazują, że AOPPs mogą stanowić użyteczny biomarker odzwierciedlający nasilenie stresu oksydacyjnego w chorobach związanych z przewlekłym stanem zapalnym oraz w raku piersi.
2. Zależności pomiędzy stężeniem AOPPs a markerami stanu zapalnego, uszkodzenia narządowego oraz dysfunkcji śródbłónka naczyniowego sugerują, że AOPPs mogą być związane nie tylko z obecnością stresu oksydacyjnego, ale również z procesami patofizjologicznymi wpływającymi na przebieg choroby.
3. Uzyskane wyniki wskazują, że podwyższone stężenia AOPPs mogą wiązać się z większym ryzykiem niekorzystnych zdarzeń klinicznych, co sugeruje potencjalną wartość prognostyczną tego biomarkera.
4. Obserwowane u pacjentek z rakiem piersi zależności pomiędzy AOPPs a markerami angiogenezy mogą wskazywać na potencjalny udział oksydacyjnych modyfikacji białek w procesach związanych z angiogenezą i przebudową mikrośrodowiska guza.
5. Przeprowadzone badania sugerują, że AOPPs mogą stanowić biomarker integrujący informacje dotyczące nasilenia stresu oksydacyjnego, aktywacji zapalnej oraz dysfunkcji śródbłónka naczyniowego w różnych stanach chorobowych, jednak potwierdzenie ich przydatności klinicznej wymaga dalszych badań oraz standaryzacji metod oznaczania.

X Podsumowanie i ograniczenia badania

Przedstawione wyniki, analizowane łącznie w ramach cyklu trzech badań, wskazują na spójny i powtarzalny związek pomiędzy nasileniem OS a przebiegiem klinicznym różnych chorób, zarówno o charakterze zapalnym, jak i w raku piersi. We wszystkich analizowanych modelach klinicznych wyższe stężenia AOPPs były związane z nasileniem procesów patologicznych, w tym odpowiedzi zapalnej, cechami uszkodzenia narządowego oraz niekorzystnym rokowaniem pacjentów. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że zależności te obserwowano w odmiennych jednostkach chorobowych, od ostrych infekcji układu oddechowego po chorobę nowotworową. Sugeruje to, że AOPPs mogą odzwierciedlać bardziej uniwersalne mechanizmy związane z zaburzeniem równowagi redoks. W tym ujęciu zaawansowane produkty utleniania białek nie stanowią jedynie wskaźnika towarzyszących procesów patologicznych, lecz mogą być elementem szerszej osi patofizjologicznej obejmującej OS, stan zapalny oraz progresję choroby.

Zestawienie wyników wszystkich trzech badań pozwala również zauważyć, że AOPPs wykazują potencjalną wartość prognostyczną w różnych kontekstach klinicznych, zarówno w odniesieniu do ryzyka śmiertelności, jak i przebiegu choroby nowotworowej. Obserwacje te wskazują na możliwość ich wykorzystania jako biomarkerów wspierających ocenę ryzyka klinicznego, choć wymagają dalszej walidacji w większych populacjach.

Zestawienie uzyskanych wyników wpisuje się w rosnące zainteresowanie rolą OS w patogenezie chorób oraz podkreśla znaczenie biomarkerów odzwierciedlających uszkodzenia oksydacyjne białek. Przedstawiona analiza sugeruje, że AOPPs mogą stanowić element wspólny dla różnych procesów chorobowych, łącząc mechanizmy zapalne, zaburzenia funkcji śródbłonna naczyniowego oraz zmiany w mikrośrodowisku tkankowym, co nadaje im potencjalne znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne.

Znaczenie uzyskanych wyników wykracza poza aspekt poznawczy, ponieważ może wskazywać na możliwą przydatność AOPPs w praktyce klinicznej. Oznaczanie AOPPs mogłoby potencjalnie pełnić funkcję biomarkera wspierającego identyfikację chorych obciążonych zwiększonym ryzykiem niekorzystnego przebiegu klinicznego. W praktyce klinicznej AOPPs mogłyby potencjalnie uzupełniać klasyczne parametry zapalne, biochemiczne i kliniczne, dostarczając dodatkowych informacji o komponencie oksydacyjnym procesu chorobowego.

Takie zastosowanie mogłoby być szczególnie istotne w chorobach, w których OS oraz przewlekły stan zapalny odgrywają istotną rolę patofizjologiczną.

Mimo istotnych i spójnych wyników uzyskanych w przedstawionym cyklu prac, należy uwzględnić kilka ograniczeń, które mogą mieć znaczenie przy interpretacji rezultatów. Przede wszystkim wszystkie analizowane badania przeprowadzono na stosunkowo niewielkich grupach pacjentów, co może ograniczać moc statystyczną analiz oraz możliwość bezpośredniego uogólnienia wyników na szerszą populację. Dodatkowo badania miały charakter jednośrodkowy, co może wiązać się z wpływem lokalnych uwarunkowań klinicznych i organizacyjnych. Kolejnym aspektem jest obserwacyjny charakter analiz, który nie pozwala na jednoznaczne określenie zależności przyczynowo-skutkowych. W związku z tym uzyskane wyniki należy interpretować przede wszystkim w kontekście zależności i współwystępowania badanych zjawisk, bez możliwości jednoznacznego wnioskowania o ich charakterze przyczynowym.

Istotnym elementem wymagającym uwzględnienia jest także zróżnicowanie badanych populacji. W poszczególnych pracach analizowano odmienne jednostki chorobowe oraz pacjentów o zróżnicowanym profilu klinicznym, co może ograniczać możliwość bezpośrednich porównań ilościowych między badaniami. Jednocześnie jednak powtarzalność obserwowanych zależności pomimo tych różnic może wskazywać na ich bardziej ogólny charakter i wzmacniać interpretację wyników w kontekście roli AOPPs jako wskaźnika zaburzeń równowagi redoks. Należy również uwzględnić, że nie wszystkie potencjalne czynniki zakłócające, takie jak styl życia, dieta, stosowane leczenie czy choroby współistniejące, mogły być w pełni kontrolowane, co może wpływać na poziom OS oraz stężenie AOPPs.

W badaniu dotyczącym raka piersi dodatkowym ograniczeniem jest relatywnie niewielka liczba zdarzeń klinicznych (nawrotów i zgonów), co może wpływać na stabilność modeli prognostycznych. W przypadku badań dotyczących infekcji układu oddechowego (COVID-19 oraz pozaszpitalne zapalenie płuc) należy natomiast uwzględnić dynamiczny charakter choroby oraz fakt, że oznaczenia biomarkerów wykonywano w określonych punktach czasowych, co nie w pełni odzwierciedla zmienność procesów redoks w czasie.

Należy również uwzględnić pewne ograniczenia metodologiczne związane z oznaczaniem AOPPs. Pomimo szerokiego zastosowania metod spektrofotometrycznych stosowane podejście nie pozwala na precyzyjne różnicowanie poszczególnych struktur

chemicznych wchodzących w skład tej heterogennej grupy związków. W związku z tym uzyskane wyniki należy interpretować jako odzwierciedlenie ogólnego poziomu oksydacyjnych modyfikacji białek, co może w pewnym stopniu ograniczać szczegółową interpretację ich znaczenia biologicznego. Uzyskane modele prognostyczne nie zostały zwalidowane w niezależnych kohortach zewnętrznych, co ogranicza możliwość ich bezpośredniego zastosowania w praktyce klinicznej.

Jednocześnie należy podkreślić, że wdrożenie oznaczania AOPPs do rutynowej diagnostyki obciążone jest obecnie istotnymi ograniczeniami. Do najważniejszych z nich należą brak standaryzacji metod oznaczania pomiędzy laboratoriami, niejednorodność protokołów laboratoryjnych oraz brak powszechnie akceptowanych wartości referencyjnych i punktów odcięcia dla poszczególnych jednostek chorobowych, co znacząco wpływa na ograniczoną porównywalność wyników między ośrodkami. Dodatkowym problemem jest heterogeny charakter AOPPs jako grupy związków, przez co ich oznaczenie odzwierciedla raczej ogólny poziom oksydacyjnych modyfikacji białek, a nie obecność jednej ściśle zdefiniowanej cząsteczki chemicznej. Na znaczenie kliniczne pojedynczego pomiaru mogą wpływać również liczne czynniki zakłócające, takie jak wiek, choroby współistniejące, styl życia, dieta czy stosowane leczenie. W związku z tym przed potencjalnym zastosowaniem AOPPs w rutynowej praktyce klinicznej konieczne są dalsze badania walidacyjne, obejmujące większe, niezależne i wieloośrodkowe kohorty pacjentów, wraz z opracowaniem jednolitego protokołu laboratoryjnego oznaczania oraz zakresu referencyjnego biomarkera. Dopiero spełnienie tych warunków pozwoli ocenić, czy ocena AOPPs może zostać włączona do rutynowych algorytmów diagnostycznych lub prognostycznych.

XI Piśmiennictwo

1. Zhang H, Gong W, Wu S, Perrett S. Hsp70 in redox homeostasis. *Cells*. 2022;11(5):829. doi:10.3390/cells11050829.
2. Moman RN, Gupta N, Singh C, et al. Physiology, albumin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 Jan. Updated 2026 Jan 31. Dostępne z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/>
3. Kehm R, Baldensperger T, Raupbach J, Höhn A. Protein oxidation - formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biol*. 2021;42:101901. doi:10.1016/j.redox.2021.101901.
4. Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4642. doi:10.3390/ijms22094642.
5. Selvaraj NR, Nandan D, Nair BG, Nair VA, Venugopal P, Aradhya R. Oxidative stress and redox imbalance: common mechanisms in cancer stem cells and neurodegenerative diseases. *Cells*. 2025;14(7):511. doi:10.3390/cells14070511.
6. Wigner P, Grębowski R, Bijak M, Saluk-Bijak J, Szemraj J. The interplay between oxidative stress, inflammation and angiogenesis in bladder cancer development. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4483. doi:10.3390/ijms22094483.
7. Tomaziu-Todosia Anton E, Anton GI, Scripcariu IS, Dumitraşcu I, Scripcariu DV, Balmus IM, Ionescu C, Visternicu M, Socolov DG. Oxidative stress, inflammation, and antioxidant strategies in cervical cancer-a narrative review. *Int J Mol Sci*. 2025;26(10):4961. doi:10.3390/ijms26104961.
8. Chatterjee S. Oxidative stress, inflammation, and disease. In: Dziubla T, Butterfield DA, editors. *Oxidative Stress and Biomaterials*. Academic Press; 2016. p. 35-58. doi:10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4.
9. Lennicke C, Cochemé HM. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell*. 2021;81(18):3691-3707. doi:10.1016/j.molcel.2021.08.018.

10. Jomova K, Alomar SY, Valko R, Liska J, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases. *Chem Biol Interact.* 2025;413:111489. doi:10.1016/j.cbi.2025.111489.
11. Kosmopoulos M, Drekolias D, Zavras PD, Piperi C, Papavassiliou AG. Impact of advanced glycation end products (AGEs) signaling in coronary artery disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(3):611-619. doi:10.1016/j.bbadis.2019.01.006.
12. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem.* 2019;294(51):19683-19708. doi:10.1074/jbc.REV119.006217.
13. Čižmarová B, Tomečková V, Hubková B, Hurajtová A, Ohlasová J, Birková A. Salivary redox homeostasis in human health and disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17):10076. doi:10.3390/ijms231710076.
14. Franco C, Canzoniero LMT. Zinc homeostasis and redox alterations in obesity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024;14:1273177. doi:10.3389/fendo.2023.1273177.
15. Tretter V, Hochreiter B, Zach ML, Krenn K, Klein KU. Understanding cellular redox homeostasis: a challenge for precision medicine. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1):106. doi:10.3390/ijms23010106.
16. Xu W, Zhao T, Xiao H. The implication of oxidative stress and AMPK-Nrf2 antioxidative signaling in pneumonia pathogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:400. doi:10.3389/fendo.2020.00400.
17. Wieczfinska J, Kleniewska P, Pawliczak R. Oxidative stress-related mechanisms in SARS-CoV-2 infections. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:5589089. doi:10.1155/2022/5589089.
18. Martin-Loeches I, Reyes LF, Rodriguez A. Severe community-acquired pneumonia (sCAP): advances in management and future directions. *Thorax.* 2025;80(8):565-575. doi:10.1136/thorax-2024-222296.
19. Tratenšek A, Locatelli I, Grabnar I, Drobne D, Vovk T. Oxidative stress-related biomarkers as promising indicators of inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Redox Biol.* 2024;77:103380. doi:10.1016/j.redox.2024.103380.

20. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5698931. doi:10.1155/2016/5698931.
21. Iqbal MJ, Kabeer A, Abbas Z, Siddiqui HA, Calina D, Sharifi-Rad J, Cho WC. Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):7. doi:10.1186/s12964-023-01398-5.
22. Liang X, Weng J, You Z, Wang Y, Wen J, Xia Z, Huang S, Luo P, Cheng Q. Oxidative stress in cancer: from tumor and microenvironment remodeling to therapeutic frontiers. *Mol Cancer*. 2025;24(1):219. doi:10.1186/s12943-025-02375-x.
23. Wang M, Xiao Y, Miao J, Zhang X, Liu M, Zhu L, Liu H, Shen X, Wang J, Xie B, Wang D. Oxidative stress and inflammation: drivers of tumorigenesis and therapeutic opportunities. *Antioxidants (Basel)*. 2025;14(6):735. doi:10.3390/antiox14060735.
24. Yu Y, Wu Y, Zhang Y, Lu M, Su X. Oxidative stress in the tumor microenvironment in gastric cancer and its potential role in immunotherapy. *FEBS Open Bio*. 2023;13(7):1238-1252. doi:10.1002/2211-5463.13630.
25. Hahm JY, Park J, Jang ES, Chi SW. 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Exp Mol Med*. 2022;54(10):1626-1642. doi:10.1038/s12276-022-00822-z.
26. Xie Z, Fang Y, Zhang X, Fang Y, Li R, Guo Y, Yang Y, Yang S, Song L. The emerging role of dendritic cells in the tumor microenvironment: from antigen presentation to targeted immunotherapy. *Cell Death Dis*. 2025;16(1):900. doi:10.1038/s41419-025-08180-0.
27. Batty M, Bennett MR, Yu E. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Cells*. 2022;11(23):3843. doi:10.3390/cells11233843.
28. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting early atherosclerosis: a focus on oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8563845. doi:10.1155/2019/8563845.
29. Violi F, Pignatelli P, Valeriani E. Oxidative stress and atherosclerosis: basic and clinical open issues. *Kardiol Pol*. 2024;82(7-8):689-691. doi:10.33963/v.phj.100994.

30. Grysczyńska B, Formanowicz D, Budzyń M, Wanic-Kossowska M, Pawliczak E, Formanowicz P, Majewski W, Strzyżewski KW, Kasprzak MP, Iskra M. Advanced oxidation protein products and carbonylated proteins as biomarkers of oxidative stress in selected atherosclerosis-mediated diseases. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4975264. doi:10.1155/2017/4975264.
31. Wang Y, Fu X, Li H. Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2025;16:1520835. doi:10.3389/fendo.2025.1520835.
32. Caliri AW, Tommasi S, Besaratinia A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2021;787:108365. doi:10.1016/j.mrrev.2021.108365.
33. Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A, Cetrangolo GP, Giordano G, Cucci MA, Graf M, Gentile F. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants (Basel).* 2018;7(8):102. doi:10.3390/antiox7080102.
34. Pozo Giráldez A, Bravo Gómez A, Calmarza P, Sienes Bailo P, Dayaldasani Khialani A, Montolio Breva S, Sainz-Pastor N, Fort Gallifa I. Oxidative stress and its role in vascular damage and atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2026;27(2):1075. doi:10.3390/ijms27021075.
35. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin alterations in myocardial ischemia-reperfusion injury: implications for pharmacological cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315(5):H1341-H1352. doi:10.1152/ajpheart.00028.2018.
36. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58(5):235-263. doi:10.1002/em.22087.
37. Vechtomova YL, Telegina TA, Buglak AA, Kritsky MS. UV radiation in DNA damage and repair involving DNA-photolyases and cryptochromes. *Biomedicines.* 2021;9(11):1564. doi:10.3390/biomedicines9111564.
38. van de Kamp G, Heemskerk T, Kanaar R, Essers J. DNA double strand break repair pathways in response to different types of ionizing radiation. *Front Genet.* 2021;12:738230. doi:10.3389/fgene.2021.738230.

39. Sakanyan V. Reactive molecules in cigarette smoke: rethinking cancer therapy. *BioTech (Basel)*. 2025;14(3):52. doi:10.3390/biotech14030052.
40. Rumgay H, Murphy N, Ferrari P, Soerjomataram I. Alcohol and cancer: epidemiology and biological mechanisms. *Nutrients*. 2021;13(9):3173. doi:10.3390/nu13093173.
41. Kobets T, Smith BPC, Williams GM. Food-borne chemical carcinogens and the evidence for human cancer risk. *Foods*. 2022;11(18):2828. doi:10.3390/foods11182828.
42. Krych S, Gniewek J, Kolbowicz M, Adamczyk M, Hrapkiewicz T, Kowalczyk P. Oxidative stress-induced DNA damage response pathways in aortic disease: implications for inflammation and vascular degeneration. *Int J Mol Sci*. 2026;27(4):1855. doi:10.3390/ijms27041855.
43. Jorgensen A, Baago IB, Rygner Z, Jorgensen MB, Andersen PK, Kessing LV, Poulsen HE. Association of oxidative stress-induced nucleic acid damage with psychiatric disorders in adults: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2022;79(9):920-931. doi:10.1001/jamapsychiatry.2022.2066.
44. Alnajjar KS, Sweasy JB. A new perspective on oxidation of DNA repair proteins and cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2019;76:60-69. doi:10.1016/j.dnarep.2019.02.006.
45. Nagini S, Thiyagarajan P, Rao KS. Interplay between reactive oxygen species and key players in the DNA damage response signaling network. In: Chakraborti S, Ray BK, Roychoudhury S, editors. *Handbook of oxidative stress in cancer: mechanistic aspects*. Singapore: Springer; 2022. doi:10.1007/978-981-15-9411-3_63.
46. Van Houten B, Santa-Gonzalez GA, Camargo M. DNA repair after oxidative stress: current challenges. *Curr Opin Toxicol*. 2018;7:9-16. doi:10.1016/j.cotox.2017.10.009.
47. Ulfig A, Jakob U. Cellular oxidants and the proteostasis network: balance between activation and destruction. *Trends Biochem Sci*. 2024;49(9):761-774. doi:10.1016/j.tibs.2024.07.001.
48. Martínez-Orgado J, Martínez-Vega M, Silva L, Romero A, de Hoz-Rivera M, Villa M, Del Pozo A. Protein carbonylation as a biomarker of oxidative stress and a therapeutic target in neonatal brain damage. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(10):1839. doi:10.3390/antiox12101839.

49. Bandoowala M, Sengupta P. 3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *Int J Neurosci*. 2020;130(10):1047-1062. doi:10.1080/00207454.2020.1713776.
50. Indyk D, Bronowicka-Szydełko A, Gamian A, Kuzan A. Advanced glycation end products and their receptors in serum of patients with type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2021;11(1):13264. doi:10.1038/s41598-021-92630-0.
51. Ralapanawa U, Sivakanesan R, Tennakoon S, Karunathilake P. Ischemia-modified albumin: is it a promising marker in acute coronary syndrome? *BMC Cardiovasc Disord*. 2024;24(1):436. doi:10.1186/s12872-024-04108-2.
52. Xiang J, He L, Pen T, Wei S. Ischemia modified albumin can act as an independent predictor of inhospital mortality in patients with acute aortic dissection. *Sci Rep*. 2023;13(1):343. doi:10.1038/s41598-023-27659-4.
53. Arimura N, Watanabe H, Kato H, Imafuku T, Nakano T, Sueyoshi M, Chikamatsu M, Tokumaru K, Nagasaki T, Maeda H, Tanaka M, Matsushita K, Maruyama T. Advanced oxidation protein products contribute to chronic-kidney-disease-induced adipose inflammation through macrophage activation. *Toxins (Basel)*. 2023;15(3):179. doi:10.3390/toxins15030179.
54. Liu J, Wen S, Lin Y, Yang X, Liu Z, Quan S, Song Y. Advanced oxidation protein products change biological behaviors of rat endometrial epithelial cells by activating ERK/P38 signaling pathways. *Biol Open*. 2020 Jun 1;9(5):bio048876. doi: 10.1242/bio.048876.
55. Guo ZJ, Niu HX, Hou FF, Zhang L, Fu N, Nagai R, Lu X, Chen BH, Shan YX, Tian JW, Nagaraj RH, Xie D, Zhang X. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Oct;10(10):1699-712. doi: 10.1089/ars.2007.1999.
56. Asadipooya K, Uy EM. Advanced glycation end products (AGEs), receptor for AGEs, diabetes, and bone: review of the literature. *J Endocr Soc*. 2019;3(10):1799-1818. doi:10.1210/js.2019-00160.
57. Khalid M, Petroianu G, Adem A. Advanced glycation end products and diabetes mellitus: mechanisms and perspectives. *Biomolecules*. 2022;12(4):542. doi:10.3390/biom12040542.

58. Reddy VP, Aryal P, Darkwah EK. Advanced glycation end products in health and disease. *Microorganisms*. 2022;10(9):1848. doi:10.3390/microorganisms10091848.
59. Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziółkiewicz M. Advanced glycation end-products (AGEs): formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. *Cells*. 2022;11(8):1312. doi:10.3390/cells11081312.
60. Shevtsova A, Gordiienko I, Tkachenko V, Ushakova G. Ischemia-modified albumin: origins and clinical implications. *Dis Markers*. 2021;2021:9945424. doi:10.1155/2021/9945424.
61. Resano-Barrio P, Alfaro E, Solano-Pérez E, Coso C, Cubillos-Zapata C, Díaz-García E, Romero-Peralta S, Izquierdo-Alonso JL, Barbé F, García-Río F, Sánchez-de-la-Torre M, Mediano O, on behalf of the Spanish Sleep Network. Analysis of the ischemia-modified albumin as a potential biomarker for cardiovascular damage in obstructive sleep apnea patients with acute coronary syndrome. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10):9019. doi:10.3390/ijms24109019.
62. Jawade P, Khillare KM, Mangudkar S, Palange A, Dhadwad J, Deshmukh M. A comparative study of ischemia-modified albumin: a promising biomarker for early detection of acute coronary syndrome (ACS). *Cureus*. 2023;15(8):e44357. doi:10.7759/cureus.44357.
63. Elshony HS, Okda MA, El-Kabany RA. Ischemia-modified albumin and fibulin-5 as diagnostic and prognostic markers for acute cerebrovascular disease. *Egypt J Neurol Psychiatr Neurosurg*. 2021;57(1):12. doi:10.1186/s41983-020-00264-2.
64. Bilgi M, Keser A, Katlandur H, Sahin E, Kalkan AO, Yildiz M, Kiyici A, Keles M. Evaluation of the relationship between microalbuminuria and urine ischemia-modified albumin levels in patients with diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal*. 2017;31(3):e22058. doi:10.1002/jcla.22058.
65. Szulimowska J, Zalewska A, Taranta-Janusz K, Trocka D, Żendzian-Piotrowska M, Tomasiuk R, Maciejczyk M. Association of ischemia-modified albumin (IMA) in saliva, serum, and urine with diagnosis of chronic kidney disease (CKD) in children: a case-control study. *Med Sci Monit*. 2023;29:e942230. doi:10.12659/MSM.942230.
66. Yin M, Liu X, Chen X, Li C, Qin W, Han H, Guo H, Yang H, Cao D, Du Z, Wu D, Wang H. Ischemia-modified albumin is a predictor of short-term mortality in patients with severe sepsis. *J Crit Care*. 2017;37:7-12. doi:10.1016/j.jcrc.2016.08.005.

67. Ou H, Huang Z, Mo Z, Xiao J. The characteristics and roles of advanced oxidation protein products in atherosclerosis. *Cardiovasc Toxicol.* 2017;17(1):1-12. doi:10.1007/s12012-016-9377-8.
68. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13. doi:10.1038/ki.1996.186.
69. Anjo SI, He Z, Hussain Z, Farooq A, McIntyre A, Laughton CA, Carvalho AN, Finelli MJ. Protein oxidative modifications in neurodegenerative diseases: from advances in detection and modelling to their use as disease biomarkers. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(6):681. doi:10.3390/antiox13060681.
70. Hashemi N, Karimpour Reyhan S, Qahremani R, Seifouri K, Tavakoli M, Seyedi SA, Ghaemi F, Abbaszadeh M, Esteghamati A, Nakhjavani M, Mirmiranpour H, Rabizadeh S. Vitamin D in type 2 diabetes and its correlation with heat shock protein 70, ferric reducing ability of plasma, advanced oxidation protein products and advanced glycation end products. *Endocrinol Diabetes Metab.* 2024;7(4):e508. doi:10.1002/edm2.508.
71. Klobučar I, Hofmann L, Habisch H, Lechleitner M, Klobučar L, Trbušić M, Pregartner G, Berghold A, Madl T, Frank S, Degoricija V. Advanced oxidation protein products are strongly associated with the serum levels and lipid contents of lipoprotein subclasses in healthy volunteers and patients with metabolic syndrome. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(3):339. doi:10.3390/antiox13030339.
72. Conti G, Caccamo D, Siligato R, Gembillo G, Satta E, Pazzano D, Carucci N, Carella A, Campo GD, Salvo A, Santoro D. Association of higher advanced oxidation protein products (AOPPs) levels in patients with diabetic and hypertensive nephropathy. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(10):675. doi:10.3390/medicina55100675.
73. Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta.* 2012;413(9-10):901-6. doi:10.1016/j.cca.2012.01.038.
74. Taylor EL, Armstrong KR, Perrett D, Hattersley AT, Winyard PG. Optimisation of an advanced oxidation protein products assay: its application to studies of oxidative stress

- in diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:496271. doi:10.1155/2015/496271.
75. Cargnin LP, Hausen BS, Tatsch E, Sangoi MB, Moresco RN. Evaluation of the in vitro interference of hemoglobin, lipids, and bilirubin on the measurement of plasma advanced oxidation protein products. *Clin Lab*. 2016;62(8):1585-1589. doi:10.7754/Clin.Lab.2016.160117.
 76. Mokhtari-Ardekani A, Fayyazishishavan E, Akhavanfar R, Abbasalizad-Farhangi M. Circulating advanced oxidation protein products (AOPPs) increases the risk of metabolic syndrome among adults: a systematic review and meta-analysis. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2023;43(6):847-855. doi:10.1007/s13410-023-01178-4.
 77. Zahorodnii A, Jelska A, Głuszyńska P, Razak Hady H. Cancer-related malnutrition and oxidative stress in colorectal cancer surgery: a narrative review of pathophysiology and postoperative outcomes. *Antioxidants (Basel)*. 2025;14(11):1289. doi:10.3390/antiox14111289.
 78. Sikora J, Wybranowski T, Karczmarska-Wódzka A, Sobczak P, Kruszewski S, Włodarczyk Z. Exploring the interplay of uric acid and advanced oxidation protein products following myocardial infarction. *Appl Sci*. 2024;14(5):1983. doi:10.3390/app14051983.
 79. Bagyura Z, Takács A, Kiss L, Dósa E, Vadas R, Nguyen TD, Dinya E, Soós P, Szelid Z, Láng O, Pállinger É, Kőhidai L, Merkely B. Level of advanced oxidation protein products is associated with subclinical atherosclerosis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22(1):5. doi:10.1186/s12872-021-02451-2.
 80. Suvakov S, Jerotic D, Damjanovic T, Milic N, Pekmezovic T, Djukic T, Jelic-Ivanovic Z, Savic Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, McClements L, Dimkovic N, Garovic VD, Albright RC, Simic T. Markers of oxidative stress and endothelial dysfunction predict haemodialysis patients survival. *Am J Nephrol*. 2019;50(2):115-125. doi:10.1159/000501300.
 81. Rendeovski V, Aleksovski B, Mihajlovska Rendevska A, Hadzi-Petrushev N, Manusheva N, Shuntov B, Gjorgoski I. Inflammatory and oxidative stress markers in intracerebral hemorrhage: relevance as prognostic markers for quantification of the edema volume. *Brain Pathol*. 2023;33(2):e13106. doi:10.1111/bpa.13106.

82. Cai J, Han T, Nie C, Jia X, Liu Y, Zhu Z, Gao Y. Biomarkers of oxidation stress, inflammation, necrosis and apoptosis are associated with hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016;40(1):41-50. doi:10.1016/j.clinre.2015.06.009.
83. Elkabany ZA, El-Farrash RA, Shinkar DM, Ismail EA, Nada AS, Farag AS, Elsayed MA, Salama DH, Macken EL, Gaballah SA. Oxidative stress markers in neonatal respiratory distress syndrome: advanced oxidation protein products and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in relation to disease severity. *Pediatr Res.* 2020;87(1):74-80. doi:10.1038/s41390-019-0464-y.
84. Zhou C, Zhang Y, Chen J, Mei C, Xiong F, Shi W, Zhou W, Liu X, Sun S, Tian J, Ye Z, Wu Q, Qin X, Jiang J, Hou FF; CCSD (China Collaborative Study on Dialysis) Group. Association between serum advanced oxidation protein products and mortality risk in maintenance hemodialysis patients. *J Transl Med.* 2021;19(1):284. doi:10.1186/s12967-021-02960-w.
85. Apeland T, Ushakova A, Mansoor MA, Furriol J, Jonsson G, Marti HP. Association of redox and inflammation-related biomarkers with prognosis in IgA nephropathy: a prospective observational study. *Free Radic Biol Med.* 2022;188:62-70. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.224.
86. Kosanovic T, Sagic D, Djukic V, Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Bukumiric Z, Lalosevic M, Djordjevic M, Coric V, Simic T. Time course of redox biomarkers in COVID-19 pneumonia: relation with inflammatory, multiorgan impairment biomarkers and CT findings. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(7):1126. doi:10.3390/antiox10071126.
87. Ducastel M, Chenevier-Gobeaux C, Ballaa Y, Meritet JF, Brack M, Chapuis N, Pene F, Carlier N, Szwebel TA, Roche N, Terrier B, Borderie D. Oxidative stress and inflammatory biomarkers for the prediction of severity and ICU admission in unselected patients hospitalized with COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7462. doi:10.3390/ijms22147462.
88. Gurer-Orhan H, Ince E, Konyar D, Saso L, Suzen S. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Curr Med Chem.* 2018;25(33):4084-4101. doi: 10.2174/0929867324666170711114336.

89. World Health Organization. Breast cancer [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2026 Apr 16 [cytowany 13 maja 2026]. Dostępne z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
90. Tsoumani E, Carter JA, Salomonsson S, Stephens JM, Bencina G. Clinical, economic, and humanistic burden of community acquired pneumonia in Europe: a systematic literature review. *Expert Rev Vaccines*. 2023;22(1):876-884. doi:10.1080/14760584.2023.2261785.
91. Binder V, Ljubojevic S, Haybaeck J, Holzer M, El-Gamal D, Schicho R, Pieske B, Heinemann A, Marsche G. The myeloperoxidase product hypochlorous acid generates irreversible high-density lipoprotein receptor inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(5):1020-7. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301235.
92. Sateesh R, Rao Bitla AR, Budugu SR, Mutheeswariah Y, Narendra H, Phaneendra BV, Lakshmi AY. Oxidative stress in relation to obesity in breast cancer. *Indian J Cancer*. 2019;56(1):41-44. doi:10.4103/ijc.IJC_247_18.
93. Bel'skaya LV, Dyachenko EI. Oxidative stress in breast cancer: a biochemical map of reactive oxygen species production. *Curr Issues Mol Biol*. 2024;46(5):4646-4687. doi:10.3390/cimb46050282.
94. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2017 Jul;39(5):529-539. doi: 10.1007/s00281-017-0629-x.
95. Chernyak BV, Popova EN, Prihodko AS, Grebenchikov OA, Zinovkina LA, Zinovkin RA. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochemistry (Mosc)*. 2020 Dec;85(12):1543-1553. doi: 10.1134/S0006297920120068.
96. Cecchini R, Cecchini AL. SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. *Med Hypotheses*. 2020 Oct;143:110102. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110102.
97. Laforge M, Elbim C, Frère C, Hémadi M, Massaad C, Nuss P, Benoliel JJ, Becker C. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020 Sep;20(9):515-516. doi: 10.1038/s41577-020-0407-1.
98. Kilic N, Yavuz Taslipinar M, Guney Y, Tekin E, Onuk E. An investigation into the serum thioredoxin, superoxide dismutase, malondialdehyde, and advanced oxidation protein

- products in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(13):4139-43. doi:10.1245/s10434-014-3859-3.
99. Kundaktepe BP, Sozer V, Durmus S, Kocael PC, Kundaktepe FO, Papila C, Gelisgen R, Uzun H. The evaluation of oxidative stress parameters in breast and colon cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(11):e25104. doi:10.1097/MD.00000000000025104.
 100. Haberka M, Bańska-Kisiel K, Bergler-Czop B, Biedroń M, Brzezińska-Wcisło L, Okopień B, Gąsior Z. Mild to moderate psoriasis is associated with oxidative stress, subclinical atherosclerosis, and endothelial dysfunction. *Pol Arch Intern Med*. 2018;128(7-8):434-439. doi:10.20452/pamw.4301.
 101. Assani MZ, Novac MB, Dijmărescu AL, Stroe-Ionescu AŞ, Boldeanu MV, Siloşi I, Boldeanu L. Intersecting pathways of inflammation, oxidative stress, and atherogenesis in the evaluation of CKD: emerging biomarkers PCSK9, EPHX2, AOPPs, and TBARSs. *Life (Basel)*. 2025;15(8):1287. doi:10.3390/life15081287.
 102. Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer*. 2020 May 18;11(15):4474-4494. doi: 10.7150/jca.44313.
 103. Ayoub NM, Jaradat SK, Al-Shami KM, Alkhalifa AE. Targeting Angiogenesis in Breast Cancer: Current Evidence and Future Perspectives of Novel Anti-Angiogenic Approaches. *Front Pharmacol*. 2022 Feb 25;13:838133. doi: 10.3389/fphar.2022.838133.
 104. Mdkhana B, Goel S, Saleh MA, Siddiqui R, Khan NA, Elmoselhi AB. Role of oxidative stress in angiogenesis and the therapeutic potential of antioxidants in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022 Jul;26(13):4677-4692. doi: 10.26355/eurev_202207_29192.
 105. Huang YJ, Nan GX. Oxidative stress-induced angiogenesis. *J Clin Neurosci*. 2019 May;63:13-16. doi: 10.1016/j.jocn.2019.02.019.
 106. Xian LW, Li TP, Wei YE, Wu SP, Ma L. [Relation of advanced oxidation protein products with VEGF and TGF-β1 in colon cancer cells exposed to intermittent hypoxia]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011;31(4):619-23. Chinese.
 107. Song S, Xiao X, Guo D, Mo L, Bu C, Ye W, Den Q, Liu S, Yang X. Protective effects of paeoniflorin against AOPP-induced oxidative injury in HUVECs by blocking the ROS-HIF-1α/VEGF pathway. *Phytomedicine*. 2017;34:115-126. doi:10.1016/j.phymed.2017.08.010.

108. Zheng S, Zhong ZM, Qin S, Chen GX, Wu Q, Zeng JH, Ye WB, Li W, Yuan K, Yao L, Chen JT. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response in fibroblast-like synoviocytes through NADPH oxidase-dependent activation of NF- κ B. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(4):972-985. doi:10.1159/000354500.
109. Tu C, Wang SC, Dai MX, Lai SQ, Huang ZW, Yu YP, Chen YB, Zeng JH, Wang L, Zhong ZM. Accumulation of advanced oxidative protein products exacerbate satellite glial cells activation and neuropathic pain. *Mol Med*. 2025;31(1):25. doi:10.1186/s10020-025-01076-x.
110. Muravlyova L, Molotov-Luchanskiy V, Bakirova R, Klyuyev D, Demidchik L, Lee V. Characteristic of the Oxidative Stress in Blood of Patients in Dependence of Community-Acquired Pneumonia Severity. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016;4(1):122-7. doi: 10.3889/oamjms.2016.040.
111. Molotov-Luchanskiy V, Muravleva L, Bakirova R, Klyuyev D, Demidchik L, Kolesnikova Y. Biomarkers for oxidative stress in patients with community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*. 2015;46:OA3247. doi:10.1183/13993003.congress-2015.OA3247.
112. Bolatkale M, Duger M, Ülfer G, Can Ç, Acara AC, Yiğitbaşı T, Seyhan EC, Bulut M. A novel biochemical marker for community-acquired pneumonia: Ischemia-modified albumin. *Am J Emerg Med*. 2017;35(8):1121-1125. doi: 10.1016/j.ajem.2017.03.018.

XII Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej

załącznik nr 3b do Uchwały RD 64/2024 z dnia 26.06.2024r

Opis merytoryczny udziału w publikacji wieloautorskiej celem podjęcia właściwej uchwały dotyczącej potwierdzenia spełnienia wymagań, o których mowa w art. 186 ust. 1 pkt 3 lit. a i b Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018, w przypadku publikacji wieloautorskich

Marta Napiórkowska-Mastalerz
Imię i nazwisko kandydata

Bydgoszcz, 27.05.2026

Dotyczy publikacji:

Dane publikacji: Tomasz Wybranowski, Marta Napiórkowska, Maciej Bosek, Jerzy Pyskir, Blanka Ziolkowska, Michał Cyrankiewicz, Małgorzata Pyskir, Marta Pilaczyńska-Cemel, Milena Rogańska, Stefan Kruszewski i Grzegorz Przybylski, 2022, „Study of albumin oxidation in COVID-19 pneumonia patients: possible mechanisms and consequences”, *International Journal of Molecular Sciences*, tom 23, strony 1-16.

Dane bibliometryczne IF: 5,6; Liczba cytowań: 20; Punkty MNiSW: 140

Mój merytoryczny udział ww. publikacji jest następujący:

- współtworzenie koncepcji pracy,
- przeprowadzenie analiz instrumentalnych,
- przegląd piśmiennictwa,
- przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu,
- udział w redakcji i opracowaniu końcowej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy wynosi: 40%

Barbara Ciosty

.....
(pieczęć imienna i podpis promotora)

Marta Napiórkowska-Mastalerz

.....
(kandydat)

Opis merytoryczny udziału w publikacji wieloautorskiej celem podjęcia właściwej uchwały dotyczącej potwierdzenia spełnienia wymagań, o których mowa w art. 186 ust. 1 pkt 3 lit. a i b Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018, w przypadku publikacji wieloautorskich

Marta Napiórkowska-Mastalerz
Imię i nazwisko kandydata

Bydgoszcz, 27.05.2026

Dotyczy publikacji:

Dane publikacji: Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Maciej Bosek, Stefan Kruszewski, Piotr Rhone, Barbara Ruskowska-Ciastek, 2024, „A preliminary evaluation of advanced oxidation protein products (AOPPs) as a potential approach to evaluating prognosis in early-stage breast cancer patients and its implication in tumour angiogenesis: a 7-year single-centre study”, *Cancers*, tom 16, strony 1-27

Dane bibliometryczne IF: 4,4; Liczba cytowań: 4; Punkty MNiSW: 140

Mój merytoryczny udział ww. publikacji jest następujący:

- współtworzenie koncepcji pracy,
- przeprowadzenie analiz instrumentalnych,
- przeprowadzenie analizy statystycznej i dokonanie wizualizacji wyników,
- formułowanie wniosków,
- przegląd piśmiennictwa,
- przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu,
- redakcja i opracowanie końcowej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy wynosi: 70%

Barbara Ciastek

.....
(pieczęć imienna i podpis promotora)

Marta Napiórkowska-Mastalerz

.....
(kandydat)

Opis merytoryczny udziału w publikacji wieloautorskiej celem podjęcia właściwej uchwały dotyczącej potwierdzenia spełnienia wymagań, o których mowa w art. 186 ust. 1 pkt 3 lit. a i b Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018, w przypadku publikacji wieloautorskich

Marta Napiórkowska-Mastalerz
Imię i nazwisko kandydata

Bydgoszcz, 27.05.2026

Dotyczy publikacji:

Dane publikacji: Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Joanna Sikora, Patrycja Wszelaki, Jerzy Pyskir, Wiktoria Michalska, Marta Pilaczyńska-Cemel, Stefan Kruszcowski, Barbara Ciastek, 2026, „Advanced oxidation protein products and ischemia-modified albumin as prognostic biomarkers of long-term mortality in community-acquired pneumonia : a prospective observational study”, *Scientific Reports*, tom 16, strony 1-9.

Dane bibliometryczne IF: 3,9; Liczba cytowań: 0; Punkty MNiSW: 140

Mój merytoryczny udział ww. publikacji jest następujący:

- współtworzenie koncepcji pracy,
- przeprowadzenie analiz instrumentalnych,
- przeprowadzenie analizy statystycznej i dokonanie wizualizacji wyników,
- formułowanie wniosków,
- przegląd piśmiennictwa,
- przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu,
- redakcja i opracowanie końcowej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy wynosi: 60%

Barbara Ciastek

.....

(pieczęć imienna i podpis promotora)

Marta Napiórkowska-Mastalerz

.....

(kandydat)

XIII Oświadczenia współautorów

Publikacja nr 1:

Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora
na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, dnia 28.05.2026

Dr Tomasz Wybranowski
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

Katedra Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Tomasz Wybranowski, Marta Napiórkowska, Maciej Bosek, Jerzy Pyskir, Blanka Ziomkowska, Michał Cyrankiewicz, Małgorzata Pyskir, Marta Pilaczyńska-Cemel, Milena Rogańska, Stefan Kruszewski i Grzegorz Przybylski, 2022, „Study of albumin oxidation in COVID-19 pneumonia patients: possible mechanisms and consequences”, *International Journal of Molecular Sciences*, tom 23, strony 1-16 mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy oraz metodologii, analizie formalnej, przeprowadzeniu analiz instrumentalnych, przeglądzie piśmiennictwa, współprzygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz udziale w jego redakcji i opracowaniu wersji końcowej.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 40%.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 28.05.2026

Dr Maciej Bosek
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

Katedra Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Tomasz Wybranowski, Marta Napiórkowska, Maciej Bosek, Jerzy Pyskir, Blanka Ziolkowska, Michał Cyrankiewicz, Małgorzata Pyskir, Marta Pilaczyńska-Cemel, Milena Rogańska, Stefan Kruszewski i Grzegorz Przybylski, 2022, „Study of albumin oxidation in COVID-19 pneumonia patients: possible mechanisms and consequences”, *International Journal of Molecular Sciences*, tom 23, strony 1-16 mój udział polegał na analizie statystycznej i formalnej, recenzji i redakcji tekstu oraz wizualizacji danych.
Mój udział w powstaniu pracy wynosi 4%.


.....
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 28.05.2026

Mgr Jerzy Pyskir
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

Katedra Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Tomasz Wybranowski, Marta Napiórkowska, Maciej Bosek, Jerzy Pyskir, Blanka Ziolkowska, Michał Cyrankiewicz, Małgorzata Pyskir, Marta Pilaczyńska-Cemel, Milena Rogańska, Stefan Kruszewski i Grzegorz Przybylski, 2022, „Study of albumin oxidation in COVID-19 pneumonia patients: possible mechanisms and consequences”, *International Journal of Molecular Sciences*, tom 23, strony 1-16 mój udział polegał na współpracowaniu metodologii, recenzji i redakcji tekstu oraz administrowanie projektem..

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 2%.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 28.05.2026

Dr Blanka Ziolkowska
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

Katedra Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Tomasz Wybranowski, Marta Napiórkowska, Maciej Bosek, Jerzy Pyskir, Blanka Ziolkowska, Michał Cyrankiewicz, Małgorzata Pyskir, Marta Pilaczyńska-Cemel, Milena Rogańska, Stefan Kruszewski i Grzegorz Przybylski, 2022, „Study of albumin oxidation in COVID-19 pneumonia patients: possible mechanisms and consequences”, *International Journal of Molecular Sciences*, tom 23, strony 1-16 mój udział polegał na prowadzeniu badań oraz recenzji i redakcji tekstu].

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 2%.


.....
(podpis)

Publikacja nr 2:

Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora
na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, dnia 28.05.2026

Dr Tomasz Wybranowski
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

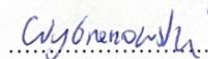
Katedra Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Maciej Bosek, Stefan Kruszewski, Piotr Rhone, Barbara Ruszkowska-Ciastek, 2024, „A preliminary evaluation of advanced oxidation protein products (AOPPs) as a potential approach to evaluating prognosis in early-stage breast cancer patients and its implication in tumour angiogenesis: a 7-year single-centre study”, *Cancers*, tom 16, strony 1-27 mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji i metodologii badania.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 28.05.2026

Dr Maciej Bosek
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

Katedra Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Maciej Bosek, Stefan Kruszewski, Piotr Rhone, Barbara Ruskowska-Ciastek, 2024, „A preliminary evaluation of advanced oxidation protein products (AOPPs) as a potential approach to evaluating prognosis in early-stage breast cancer patients and its implication in tumour angiogenesis: a 7-year single-centre study”, *Cancers*, tom 16, strony 1-27 mój udział polegał na współudziale w opracowaniu analizy statystycznej.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


.....
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 28.05.2026

Prof. dr hab. Stefan Kruszewski
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

Katedra Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Maciej Bosek, Stefan Kruszewski, Piotr Rhone, Barbara Ruszkowska-Ciastek, 2024, „A preliminary evaluation of advanced oxidation protein products (AOPPs) as a potential approach to evaluating prognosis in early-stage breast cancer patients and its implication in tumour angiogenesis: a 7-year single-centre study”, *Cancers*, tom 16, strony 1-27 mój udział polegał na nadzorowaniu projektu. Mój udział w powstaniu pracy wynosi 3%.


.....
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 27.05.2026

Dr hab. Barbara Ciastek, prof. UO
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

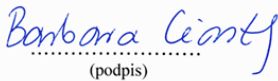
Instytut Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Opolski
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Maciej Bosek, Stefan Kruszewski, Piotr Rhone, Barbara Ruskowska-Ciastek, 2024, „A preliminary evaluation of advanced oxidation protein products (AOPPs) as a potential approach to evaluating prognosis in early-stage breast cancer patients and its implication in tumour angiogenesis: a 7-year single-centre study”, *Cancers*, tom 16, strony 1-27 mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji i metodologii badania, prowadzeniu badań, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, recenzji i redakcji tekstu oraz administrowaniu projektem.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.


(podpis)

Publikacja nr 3:

Załącznik nr 5 do uchwały Nr 38 Senatu UMK z dnia 26 września 2023 r.
w sprawie postępowania o nadanie stopnia doktora
na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu

Bydgoszcz, dnia 28.05.2026

Dr Tomasz Wybranowski
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

Katedra Biofizyki, Wydział Farmaceutyczny
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Joanna Sikora, Patrycja Wszelaki, Jerzy Pyskir, Wiktoria Michalska, Marta Pilaczyńska-Cemel, Stefan Kruszewski, Barbara Ciastek, 2026, „Advanced oxidation protein products and ischemia-modified albumin as prognostic biomarkers of long-term mortality in community-acquired pneumonia : a prospective observational study”, *Scientific Reports*, tom 16, strony 1-9 mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przeprowadzeniu analiz instrumentalnych, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz jego redakcji i opracowaniu wersji końcowej.
Mój udział w powstaniu pracy wynosi 10%.

...*Wybranowski*...
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 20.05.2026

Dr hab. Joanna Sikora, prof. UMK
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

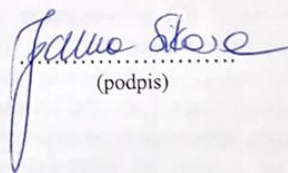
Katedra Transplantologii i Chirurgii Ogólnej, Wydział Lekarski
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Joanna Sikora, Patrycja Wszelaki, Jerzy Pyskir, Wiktoria Michalska, Marta Pilaczyńska-Cemel, Stefan Kruszewski, Barbara Ciastek, 2026, „Advanced oxidation protein products and ischemia-modified albumin as prognostic biomarkers of long-term mortality in community-acquired pneumonia : a prospective observational study”, *Scientific Reports*, tom 16, strony 1-9 mój udział polegał na współudziale w opracowaniu metodologii badania.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 20.05.2026

Mgr Patrycja Wszelaki
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

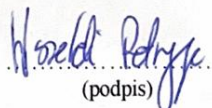
Katedra Transplantologii i Chirurgii Ogólnej, Wydział Lekarski
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Joanna Sikora, Patrycja Wszelaki, Jerzy Pyskir, Wiktoria Michalska, Marta Pilaczyńska-Cemel, Stefan Kruszewski, Barbara Ciastek, 2026, „Advanced oxidation protein products and ischemia-modified albumin as prognostic biomarkers of long-term mortality in community-acquired pneumonia : a prospective observational study”, *Scientific Reports*, tom 16, strony 1-9 mój udział polegał na współudziale w opracowaniu metodologii badania.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 27.05.2026

Dr hab. Barbara Ciastek, prof. UO
(tytuł, stopień, imię i nazwisko kandydata/współautora)

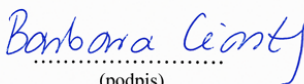
Instytut Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Opolski
(jednostka zatrudniająca kandydat/współautora)

**Rada Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Marta Napiórkowska-Mastalerz, Tomasz Wybranowski, Joanna Sikora, Patrycja Wszelaki, Jerzy Pyskir, Wiktoria Michalska, Marta Pilaczyńska-Cemel, Stefan Kruszewski, Barbara Ciastek, 2026, „Advanced oxidation protein products and ischemia-modified albumin as prognostic biomarkers of long-term mortality in community-acquired pneumonia : a prospective observational study”, *Scientific Reports*, tom 16, strony 1-9 mój udział polegał na przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, recenzji i redakcji tekstu oraz nadzorze nad projektem.

Mój udział w powstaniu pracy wynosi 5%.


(podpis)

XIV Spis rycin

Rycina 1. Graficzne podsumowanie wstępu teoretycznego	34
Rycina 2. Schemat blokowy metodyki badań prowadzących do powstania cyklu publikacji ...	36

XV Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej – kopie

1. Publikacja nr 1:

Wybranowski T., Napiórkowska M., Bosek M., Pyskir J., Ziomkowska B., Cyrankiewicz M., Pyskir M., Pilaczyńska-Cemel M., Rogańska M., Kruszewski S., Przybylski G. Study of Albumin Oxidation in COVID-19 Pneumonia Patients: Possible Mechanisms and Consequences. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(17):10103. doi:10.3390/ijms231710103.

2. Publikacja nr 2:

Napiórkowska-Mastalerz M., Wybranowski T., Bosek M., Kruszewski S., Rhone P., Ruszkowska-Ciastek B. A Preliminary Evaluation of Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs) as a Potential Approach to Evaluating Prognosis in Early-Stage Breast Cancer Patients and Its Implication in Tumour Angiogenesis: A 7-Year Single-Centre Study. Cancers. 2024;16(5):1068. doi:10.3390/cancers16051068.

3. Publikacja nr 3:

Napiórkowska-Mastalerz M., Wybranowski T., Sikora J., Wszelaki P., Pyskir J., Michalska W., Pilaczyńska-Cemel M., Kruszewski S., Ciastek B. Advanced Oxidation Protein Products and Ischemia-Modified Albumin as Prognostic Biomarkers of Long-Term Mortality in Community-Acquired Pneumonia: A Prospective Observational Study. Scientific Reports. 2026;16:7809. doi:10.1038/s41598-026-36643-7.



Article

Study of Albumin Oxidation in COVID-19 Pneumonia Patients: Possible Mechanisms and Consequences

Tomasz Wybranowski ^{1,*}, Marta Napiórkowska ¹, Maciej Bosek ¹, Jerzy Pyskir ¹, Blanka Ziolkowska ¹, Michał Cyrankiewicz ¹, Małgorzata Pyskir ², Marta Pilaczyńska-Cemel ³, Milena Rogańska ³, Stefan Kruszewski ¹ and Grzegorz Przybylski ³

¹ Department of Biophysics, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-067 Bydgoszcz, Poland

² Department of Rehabilitation, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-094 Bydgoszcz, Poland

³ Department of Lung Diseases, Neoplasms and Tuberculosis, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-326 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: tomaszwybranowski@cm.umk.pl



Citation: Wybranowski, T.; Napiórkowska, M.; Bosek, M.; Pyskir, J.; Ziolkowska, B.; Cyrankiewicz, M.; Pyskir, M.; Pilaczyńska-Cemel, M.; Rogańska, M.; Kruszewski, S.; et al. Study of Albumin Oxidation in COVID-19 Pneumonia Patients: Possible Mechanisms and Consequences. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10103. <https://doi.org/10.3390/ijms231710103>

Academic Editors: Nikolay V. Goncharov, Richard O. Jenkins and Daria Belinskaia

Received: 31 July 2022

Accepted: 2 September 2022

Published: 3 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Oxidative stress induced by neutrophils and hypoxia in COVID-19 pneumonia leads to albumin modification. This may result in elevated levels of advanced oxidation protein products (AOPPs) and advanced lipoxidation end-products (ALEs) that trigger oxidative bursts of neutrophils and thus participate in cytokine storms, accelerating endothelial lung cell injury, leading to respiratory distress. In this study, sixty-six hospitalized COVID-19 patients with respiratory symptoms were studied. AOPPs-HSA was produced in vitro by treating human serum albumin (HSA) with chloramine T. The interaction of malondialdehyde with HSA was studied using time-resolved fluorescence spectroscopy. The findings revealed a significantly elevated level of AOPPs in COVID-19 pneumonia patients on admission to the hospital and one week later as long as they were in the acute phase of infection when compared with values recorded for the same patients 6- and 12-months post-infection. Significant negative correlations of albumin and positive correlations of AOPPs with, e.g., procalcitonin, D-dimers, lactate dehydrogenase, aspartate transaminase, and radiological scores of computed tomography (HRCT), were observed. The AOPPs/albumin ratio was found to be strongly correlated with D-dimers. We suggest that oxidized albumin could be involved in COVID-19 pathophysiology. Some possible clinical consequences of the modification of albumin are also discussed.

Keywords: COVID-19; oxidative stress; albumin; advanced oxidation protein products; advanced lipoxidation end-products; chloramine T; malondialdehyde

1. Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was proclaimed a critical global pandemic by the World Health Organization (WHO) in March 2020. Increasingly, recent evidence indicates the presence of higher levels of inflammatory cytokines in COVID-19 patients with critical and severe disease than in moderately ill patients and healthy individuals. This “cytokine storm” can also indicate a poor prognosis and may increase the mortality rate of COVID-19 patients [1–4]. The entry of SARS-CoV-2 into cells may result in the development of a cytokine storm in the host body, characterized by a high plasma level of pro-inflammatory cytokines, including interleukin (IL)-6, IL-2, IL-7, IL-10, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1A (MIP-1A), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alfa), and interferon-gamma inducible protein (IP10) [5,6]. A bronchoalveolar lavage taken from patients with severe COVID-19-related pneumonia showed a high level of chemokines being secreted from macrophages [7]. Post-mortem analysis of lung tissue of patients

with severe COVID-19-related pneumonia also found an excessive amount of immune cell infiltration [8]. Respiratory viral infections are, in general, associated with proinflammatory cytokine production, inflammation, cell apoptosis, and other pathophysiological processes, which lead to high levels of oxidative stress [9]. Indeed, some studies have revealed that SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress [10–12]. Furthermore, COVID-19 patients with severe pulmonary involvement showed a higher level of endogenous oxidative markers than patients with mild disease [13]. There is a strong link between inflammatory state, activated neutrophils, oxidative stress, oxidized albumin, and decreased albumin concentration [10]. It is still premature to confirm whether or not lung involvement or signs of ongoing heart inflammation occur as a temporary response to COVID-19 infection and will spontaneously be resolved over time and whether COVID-19 affects other inflammation-related complications or basic diseases, such as intestinal diseases [14–17]. Oxidative stress may also play an important role in the development of symptoms from Long COVID [18].

Albumin serves as a major anti-inflammatory agent in our bodies [19,20], and one of its properties that has been less discussed in the literature is its anti-oxidative and anti-thrombotic activity [21,22]. It may also exhibit antiviral properties, as recent studies have revealed that albumin specifically binds the SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit [23]. Human serum albumin (HSA) comprises the largest thiol pool in plasma and thus determines the plasma redox status [24,25]. It was determined that oxidized albumin is the direct mediator of triggering inflammation, leading to neutrophil activation and thus probably increasing oxidative stress [26–29]. The pro-inflammatory properties of in vivo-oxidized albumin initiating vascular injury were also examined [27]. Furthermore, recently, more researchers have claimed that oxidized albumin is more than an oxidative stress biomarker and can be an aggravating factor for various diseases [30]. Recently, there has been a paradigm shift regarding our knowledge of albumin and its role in organisms. New observations have revealed that the form of albumin is also of great importance in the pathogenesis of diseases [31]. It has also been observed that oxidized albumin promotes inflammation by the modulation of platelets [32,33].

Several researchers suggested at the beginning of the COVID-19 pandemic that oxidized albumin may be “an opportunity for diagnoses or treatment of COVID-19” and “a positive predictor of mortality” [30]. Thus far, there have been few reports on the oxidation of albumin in COVID-19 infection [34,35]. A very good association of decreased thiol concentrations and increased amounts of advanced oxidation protein products (AOPPs) with COVID-19 severity, intensive care unit admission criteria, and mortality has been revealed [36]. Furthermore, the majority of investigations have only focused on the effects of hypoalbuminemia on mortality and prognosis of COVID-19 severity [37]. It has been observed that decreased albumin concentration may be a risk factor for mortality [37–40] and may be related to inflammation in several diseases [41–43]. A negative relationship between serum albumin and C-reactive protein (CRP), which is an acute-phase reactant produced in response to inflammation state and pro-inflammatory IL-6 or TNF-alpha, is often identified in patients hospitalized for many reasons [44–47]. However, the mechanism of hypoalbuminemia in COVID-19 has not yet been fully explained [38,48]. It should be noted that hypoalbuminemia may not only be associated with abnormal liver function and diminished albumin synthesis in inflammation but may also be a consequence of a high clearance of damaged and oxidized albumin [31,49]. One pharmacokinetic analysis showed that albumin oxidized by chloramine T left the circulation very quickly after intravenous injection and accumulated mainly in the liver, kidneys, and spleen [50].

AOPPs have been found to be a marker of the intensity of inflammation, used to predict the course of the disease, determined to act as a mediator of the activation of monocytes, and hypothesized to stimulate a respiratory burst of neutrophils [51–54]. AOPPs have also been reported to be strongly correlated with levels of neopterin, which is produced by macrophages upon stimulation with interferon- γ [51].

We hypothesized that oxidized albumin could be involved in the pathophysiology of COVID-19 infection. The aim of the study was to assess AOPPs levels in COVID-19 pneumonia patients on admission to the hospital and their correlations with inflammatory biomarkers, radiological scores of computed tomography (HRCT), multiorgan impairment biomarkers, and other surrogate markers of severity or mortality in COVID-19. Additionally, the level of AOPPs on admission was compared with values recorded for the same patients one week later, as long as they were in the acute phase of infection and 6 and 12 months post-infection. To demonstrate the mechanism of formation of AOPPs *in vivo*, in our study, HSA was incubated with increasing concentrations of chloramine T. The structure of AOPPs is similar to that obtained by artificial HSA oxidation by chloramine T [50,51,55]. The chlorine compounds produced by neutrophils in inflammation are directly associated with albumin oxidative modifications and the creation of AOPPs [29,55].

Another important modification of HSA that may alter albumin function and influence the severity of symptoms in patients with COVID-19-related pneumonia is related to the creation of MDA-HSA adducts, known as advanced lipoxidation end-products (ALEs). In our study, ALEs were produced *in vitro* by incubating HSA with malondialdehyde (MDA). Malondialdehyde (MDA) is generated during secondary lipid oxidation. ALEs-HSA can induce monocyte activation and vascular complications due to its pro-inflammatory effect [56,57]. Advanced glycation end products (AGEs) as well as ALEs and AOPPs can bind to a specific receptor called RAGE, which causes the upregulation of inflammatory pathways [57–60]. This phenomenon has barely been examined so far. ALEs-HSA may also be involved in increasing the production of autoantibodies in some autoimmune disorders, such as systemic lupus erythematosus and arthritis [61,62]. It is well known that aldehydes are capable of binding to proteins and forming fluorescent compounds with a maximum emission wavelength of 440–480 nm [63,64]. Time-resolved fluorescence spectroscopy has been used to study the interaction between MDA and HSA (ALEs-HSA formation). This time-resolved measurement can reveal fluorescence intensity decay in terms of lifetimes. The fluorescence lifetime is sensitive to the local environment of the fluorophore and may vary, for example, due to conformational changes in molecules and during molecular interactions with other molecules [65]. To the best of our knowledge, there are no reports of the use of time-resolved spectroscopy in the study of the autofluorescence of MDA-modified proteins.

2. Results

2.1. Clinical Study

Our results revealed that the values of most clinical parameters typically used in predicting the mortality and severity in COVID-19 patients were significantly higher in patients with COVID-19-related pneumonia compared to reference values. As shown in Table 1, the level of albumin was found to be negatively correlated with the clinical biomarkers procalcitonin (PCT), D-dimers, lactate dehydrogenase (LDH), troponin, and aspartate transaminase (AST). The results indicate that there was also a strong negative association between albumin and the radiological score of computed tomography (HRCT). The AOPPs measured in COVID-19 patients upon hospital admission were found to be positively correlated with liver enzymes (AST, alanine transaminase (ALT)), D-dimers, LDH, CRP, PCT, and HRCT score.

During the week of hospitalization, the AOPPs levels increase significantly ($p < 0.001$) (Figure 1, Table 2). Six months after COVID-19 infection, the AOPPs levels in the same patient group decreased significantly ($p < 0.001$). A slight increase, though not statistically significant, was observed at the next 6-month follow-up ($p = 0.055$).

Table 1. Demographic, clinical, and laboratory parameters and their correlation with albumin, AOPPs, and the ratio of AOPPs/albumin of studied patients with COVID-19 pneumonia on admission. Red-colored values indicate statistical significance ($p < 0.05$). WBC, White blood cells count; RBC, Red blood cells count; Hgb, Hemoglobin; PLT, Platelets count; CRP, C-reactive protein; LDH, Lactate dehydrogenase; CPK, Creatinine phosphokinase; AST, Aspartate transaminase; ALT, Alanine transaminase; IL-6, Interleukin-6; HRCT, High-resolution computed tomography; AOPPs, Advanced oxidation protein products.

Parameters (Units)	Median	Interquartile Rang	Reference Values	Albumin		AOPPs		AOPPs/Albumin	
				r	p	r	p	r	p
Age (years)	64.5	51–72		−0.260	0.035	−0.021	0.868	0.068	0.585
Symptoms (days)	7	5–10		−0.142	0.256	0.318	0.009	0.295	0.016
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	6.8	5.1–9.6	4.0–10.0	−0.214	0.084	−0.035	0.778	0.055	0.661
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	4.8	3.6–7.5	2.5–5.0	−0.192	0.125	0.005	0.969	0.075	0.553
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.9	0.7–1.2	1.5–3.5	−0.031	0.805	−0.115	0.363	−0.072	0.571
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	4.45	4.2–4.8	4.5–5.5	0.194	0.118	−0.162	0.195	−0.201	0.106
Hgb (g/dL)	13.7	12.7–14.5	14.0–18.0	0.113	0.365	−0.172	0.168	−0.181	0.146
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	211	172–292	130–350	−0.163	0.192	−0.012	0.923	0.048	0.702
CRP (mg/L)	84	42–138	<5.0	−0.235	0.058	0.323	0.008	0.357	0.003
Procalcitonin (ng/mL)	0.08	0.05–0.15	<0.05	−0.480	<0.001	0.309	0.012	0.388	0.001
LDH (U/L)	645	543–885	225–450	−0.437	<0.001	0.362	0.003	0.459	<0.001
D-Dimers (ng/mL)	941	735–1574	<500	−0.477	<0.001	0.453	<0.001	0.534	<0.001
Troponin (ng/L)	10.6	6.2–21	<19.0	−0.268	0.030	0.238	0.054	0.309	0.012
Creatinine (mg/dL)	0.97	0.87–1.14	0.8–1.3	−0.067	0.591	0.162	0.195	0.177	0.155
CPK (U/L)	142	76–231	25–200	0.008	0.952	0.147	0.238	0.120	0.336
AST (U/L)	53	36–70	<37	−0.307	0.012	0.362	0.003	0.417	<0.001
ALT (U/L)	43	30–66	<40	−0.193	0.120	0.245	0.047	0.282	0.022
IL-6 (pg/mL)	13.1	4.8–36	<7.0	−0.009	0.942	−0.171	0.177	−0.166	0.189
HRCT score	0.25	0.14–0.41		−0.423	<0.001	0.348	0.004	0.433	<0.001
Albumin (g/L)	34	31–37	39–51	1.000	-	−0.323	0.008	−0.593	<0.001
AOPPs (μM)	13.5	11.4–16.3		−0.323	0.008	1.000	-	0.932	<0.001
AOPPs/Albumin ($\mu\text{M/g}$)	0.39	0.33–0.50		−0.593	<0.001	0.932	<0.001	1.000	-

Table 2. The level of significance (p -values) between the study group. A—COVID-19 patients on admission to hospital; 1W—COVID-19 patients one week upon admission; 6M—COVID-19 patients after 6 months from infection; 12M—COVID-19 patients after 12 months from infection. Red-colored values indicate statistical significance ($p < 0.05$). For data comparison, we used AOPPs measurements from the same patients but recorded at different times.

	A	1W	6M	12M
A		<0.001	<0.001	0.016
1W	<0.001		<0.001	0.004
6M	<0.001	<0.001		0.055
12M	0.016	0.004	0.055	

2.2. In Vitro Study

To investigate the impact of oxidative stress and carbonyl stress on the properties of HSA, several experiments were performed. In our study, AOPPs-HSA were produced in vitro by treating HSA with oxidants (chloramine T).

It can be seen in Figure 2 that the addition of chloramine T to HSA resulted in the formation of AOPPs. In this figure, one can also observe the exponential nature of the relationship between the level of AOPPs and the concentration of chloramine T.

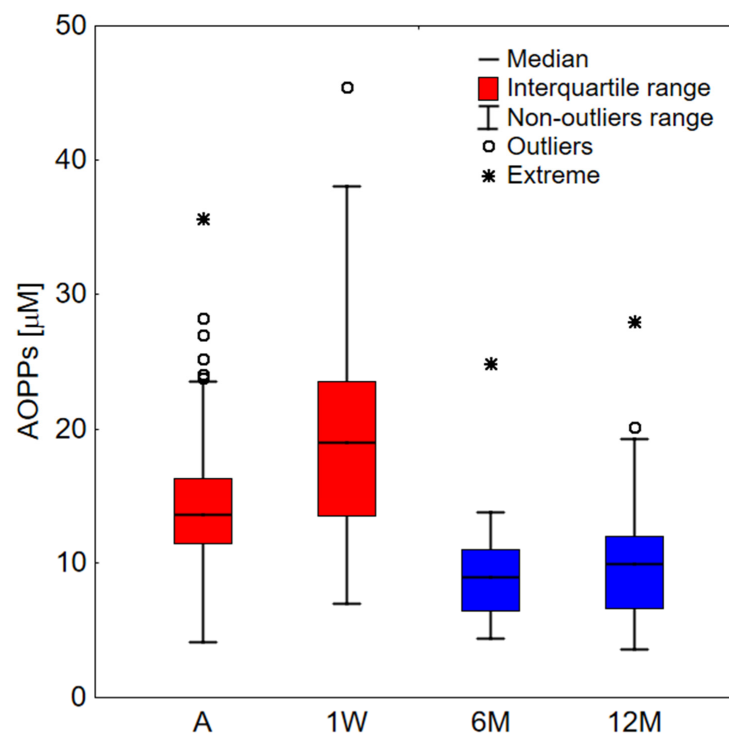


Figure 1. AOPPs values for a study group. A—COVID-19 patients on admission to hospital ($n = 66$); 1W—COVID-19 patients one week upon admission ($n = 44$); 6M—COVID-19 patients after 6 months from infection ($n = 30$); 12M—COVID-19 patients after 12 months from infection ($n = 27$). Data far away by more than 1.5 and 3 interquartile range from this range were considered outliers and extreme, respectively.

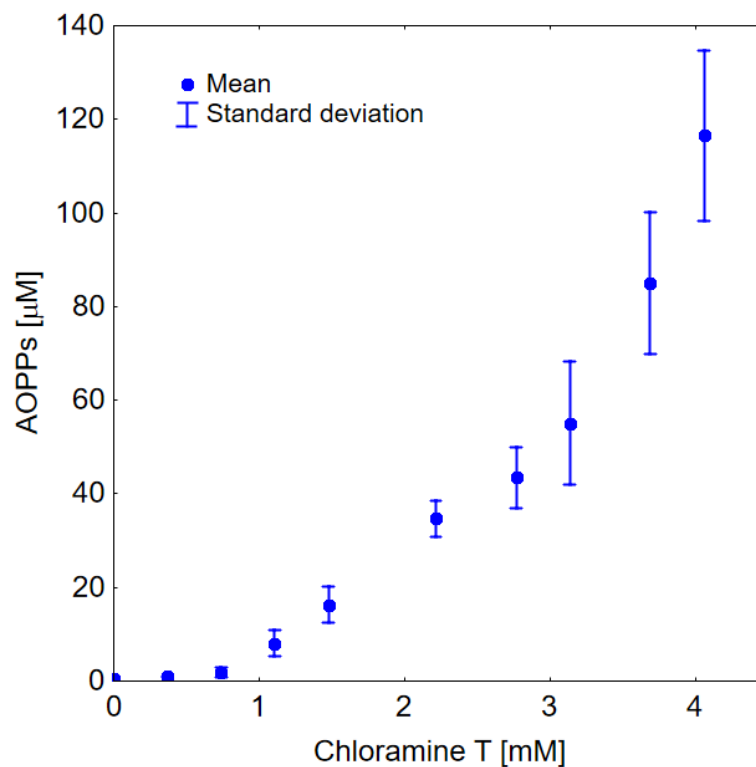


Figure 2. The formation of AOPPs dependence on chloramine T concentration added to HSA (100 μM). The measurements were repeated 3 times.

Figure 3a shows the normalized fluorescence decay curves of ALEs-HSA at 450 nm for different lengths of incubation after the addition of MDA to HSA, which was carried out at 37 °C. The decay curves were fitted to a three-exponential fluorescence model ($\chi^2 = 1$). The estimated mean fluorescence lifetime is presented in Figure 3b. The changes were observed over 15 h of incubation before equilibrium was established.

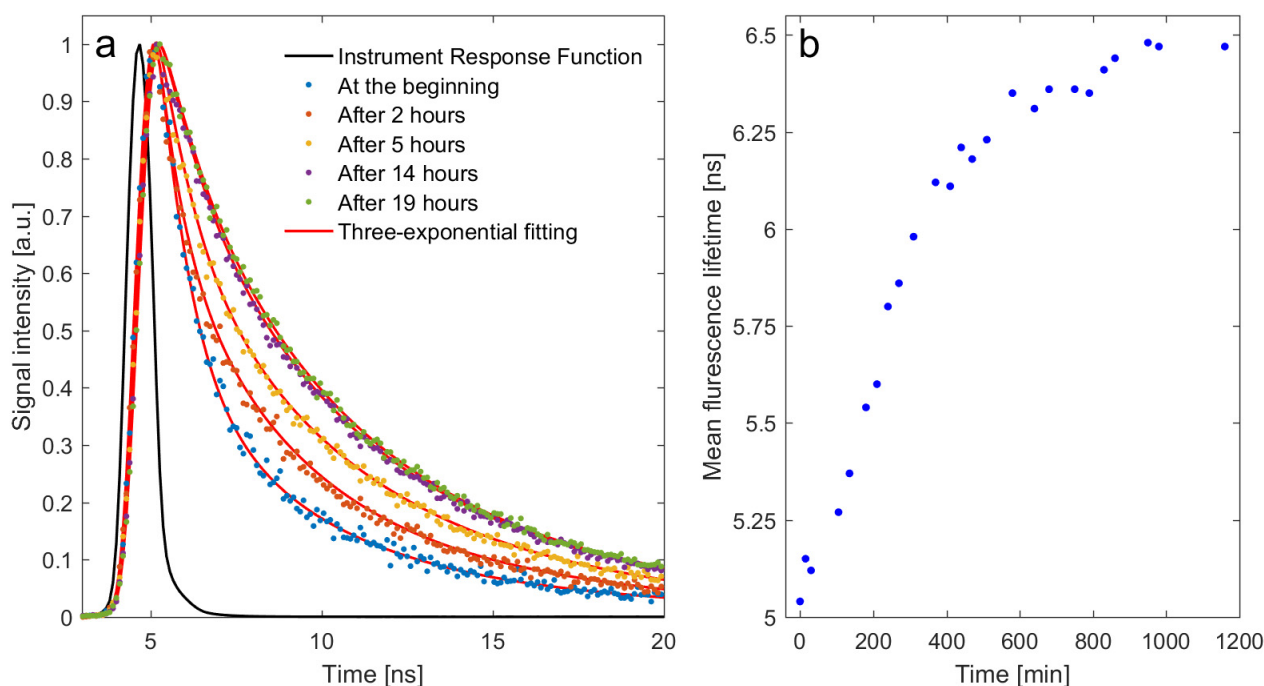


Figure 3. (a) The normalized fluorescence decay curves of ALEs-HSA at 450 nm at different times of incubation after the addition of MDA to HSA. (b) Mean fluorescence lifetime dependence on time of incubation HSA with MDA.

3. Discussion

On the basis of the results presented in Figure 1 and Table 1, it can be unequivocally concluded that elevated levels of AOPPs are associated with inflammation during the course of COVID-19-related pneumonia. Six and twelve months after infection, significantly decreased levels of AOPPs were observed when compared to the COVID-19 patients during the acute infection phase. It can be ruled out that the AOPPs levels long after the diagnosis were lower than prior to the infection due to long-term chronic symptoms following COVID-19. The role of oxidative stress in the pathophysiology of Long COVID has not been yet elucidated, and further research is needed. The level of AOPPs is raised in many diseases, including renal failure, diabetes, and atherosclerosis, but also increases with age [66–68]. Very often, a severe course of COVID-19 is associated with comorbidities [69,70]. Therefore, an elevated AOPPs level prior to infection may also be a risk factor for severe COVID-19. Interestingly, the level of AOPPs in this study showed an increasing dependence on time from the onset of symptoms prior to the admission of patients to their arrival in the hospital department ($r = 0.318$). It is suggested that activated neutrophils in conditions of infection and inflammation are the main cause of the enhanced production of free radicals (e.g., hypochlorous acid (HOCl)) and increased oxidative stress observed in critically ill COVID-19 patients. The accumulation of reactive oxygen species (ROS) within neutrophils is considered a key process in the initiation of neutrophil extracellular traps (NETs), which are able to entrap a wide variety of pathogens and prevent their dissemination into the blood circulation [71]. In one study, sera from patients with COVID-19 triggered the release of NETs from control neutrophils in vitro. Another interesting finding was that the oxidation of albumin also activated the release of NETs from control neutrophils [72]. In a previous study, neutrophil activation and the

formation of NETs were reported as major risk factors for acute lung injury [73]. Early CT findings from COVID-19 patients may correspond to viscous secretions seeping through the pulmonary alveoli due to hyperinflammation in the lung and the overproduction of NETs [74]. Interestingly, we found a weak but significant positive correlation between the level of AOPPs and HRCT scores ($r = 0.348$).

The results of our *in vitro* studies shown in Figure 2 indicate that chloramine T produces AOPPs-HSA in an exponential dose-dependent manner. The shape of this curve may explain the rapid course of the “cytokine storm” observed in COVID-19 patients. This experiment provides insight into the mechanism underlying severe COVID-19 pathology. HSA modified by chlorine compounds is considered a pro-inflammatory mediator due to its induction of a neutrophil respiratory burst [29]. Chlorine-induced albumin damage appears to play a key role in exacerbating respiratory problems in COVID-19 patients. It should also be emphasized that the contribution of individual AOPP products is probably not the same for different concentrations of chloramine T, and that dityrosine crosslinks are formed only at high concentrations of chloramine T in relation to HSA.

We hypothesize that the production of ALEs-HSA may also contribute to the aggravation of inflammation in COVID-19, as some pro-inflammatory effects of ALEs have been identified [56–60,75]. ROS are produced in cells more rapidly due to their viral entry into the cytoplasm of the host epithelial cells. ROS production might be activated either by viral components or by cytokines [12]. Oxidative stress in cells leads to lipid peroxidation, which in turn produces aldehyde products. In some studies, higher lipid peroxidation levels and increases in the concentration of aldehydes were found to be associated with an increased severity of disease in COVID-19 patients [76]. Furthermore, protein adducts of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal (HNE) were found to be present at higher volumes in the plasma of COVID-19 patients who did not survive [77]. Albumin has the ability to conjugate with aldehydes to form Schiff bases or Michael adducts by generating covalent adducts [78]. Aldehydes can react with protein and the sulfhydryl group of cysteine, thiols, and amine groups in both oxidative (lipoxidation) and non-oxidative reactions [78–81]. Furthermore, the addition of toxic lipid peroxidation by-product (e.g., MDA) to proteins results in an increase in carbonyl contents [82]. To better understand the formation of ALEs-HSA, time-resolved fluorescence spectroscopy was used in our study. MDA modifies HSA and generates fluorescent products exhibiting a specific fluorescence emission wavelength between 400 and 550 nm when the sample is excited at 360 nm. The results shown in Figure 2 reveal that the stable ALEs-HSA were not formed immediately after the addition of MDA to the HSA solution but instead after about 15 h of incubation. These results suggest that the interaction between MDA and HSA involves more than the simple formation of covalent MDA-HSA adducts and is likely to occur in several steps, giving rise to more complex ALEs-HSA. It is likely that many products with unknown molecular structures are created.

The degree of inflammation caused by virus entry into cells is linked to the overproduction of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1), which is a key regulator of the virus life cycle. The PARP-1-mediated synthesis of ADP-ribose chains reduces the level of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) [83,84]. The alteration of NAD⁺ may impair the detoxification of aldehydes by dehydrogenases, as NAD⁺ is a redox cofactor for these enzymes. This can lead to an increase in the modification of albumin by aldehydes in infected cells. It should be noted that the NAD⁺ level also declines with age due to inflammatory responses related to senescent cells, which produce a permanent alarm signal [85–87]. Many comorbidities are also associated with chronic inflammation, which causes a reduction in the level of NAD⁺ [88]. Some researchers directly suggest that NAD⁺ deficiency may be a major mortality risk factor in COVID-19 patients [83,84,89]. As NAD⁺ is considered to be a regulator of immune responses during viral infections, its use as a drug in the treatment of COVID-19 has been proposed [83,90].

Shortness of breath progressing to hypoxic respiratory failure is a common clinical manifestation observed in patients with pneumonia. A fall in oxygen saturation (hypox-

emia) and higher respiratory rate (tachypnea) are associated with increased mortality risk in COVID-19 patients [91,92]. Hypoxia can occur even without dyspnea, and this phenomenon is called silent hypoxia [93,94]. Hypoxic cells produce larger amounts of aldehydes and ROS, leading to an even greater molecular modification of albumin [95]. Interestingly, some studies have revealed connections between AOPPs and hypoxia. Higher amounts of AOPPs have also been found in hypoxic newborn infants than in controls [96].

In the case of damage to the liver and other organs involved in the removal of modified albumin, high amounts of AOPPs-HSA and ALEs-HSA may not be cleared from the bloodstream as quickly as they would be in a healthy person. Liver function test abnormalities are very common in COVID-19-related pneumonia patients [92,97,98]. This may be related to liver injury by the virus itself, inflammatory responses, hepatic ischemia, hepatic hypoxia, or even tissue damage and muscle breakdown. In particular, an elevated activity of LDH reflects tissue destruction and is regarded as a prognostic marker of outcomes in COVID-19 patients [92,99]. Regarding our biochemical parameters, LDH levels were also found to be markedly above normal, indicating tissue injury. A significant correlation of the liver enzyme AST with LDH ($r = 0.395$) was found. AST was also found to be moderately negatively associated with albumin ($r = -0.307$) and positively associated with AOPPs ($r = 0.362$). In conditions of both inflammation and liver damage, the synthesis of albumin may also be disturbed, as albumin is produced exclusively by liver cells.

It should also be noted that high-molecular-weight AOPPs can influence the aggregation of red blood cells (RBCs) and the formation of blood clots. High-molecular-weight AOPPs are formed due to the tendency of albumin to form aggregates via disulfide bridges and/or dityrosine cross-linking [52]. An in vitro study showed that chlorine active species induce the formation of high-molecular-weight proteins [55]. The modification of HSA with MDA can also result in the aggregation of albumin [64]. It has been found that an increase in dextran molecular mass causes an increase in RBCs aggregation, and this may also be true for conglomerates of oxidized albumin such as AOPPs and ALEs [100]. Furthermore, in one study an increase in the aggregation of RBCs and platelets was found to be associated with the degree of albumin oxidation [101]. There is a strong link between the aggregation of RBCs and thrombosis [102–104]. Thrombotic events are frequently observed in COVID-19 patients and are associated with increasing disease severity, as well as contributing significantly to death [105,106]. It has been found that AOPPs can also directly contribute to coagulation abnormalities by activating platelets via a CD36-mediated signaling pathway [32,33]. Many studies have revealed that serum albumin is inversely associated with artery and venous thrombosis events [107]. It has been hypothesized that albumin has anticoagulant and antiplatelet activities, probably due to its antioxidant effect [107]. Albumin increases fibrinolysis and inhibits erythrocyte aggregation. In addition, albumin neutralizes fibrinogen binding to endothelial cells, thus antagonizing several prothrombotic effects of fibrinogen [108]. Additionally, endothelial dysfunction and blood viscosity are increased in patients with hypoalbuminemia [109]. During inflammatory states, the coagulation cascade favors thrombus formation due to the decreased synthesis and increased catabolism of albumin. Hypoalbuminemia and hypercoagulability also coexist in patients with severe COVID-19 [103]. Our results revealed that D-dimers were moderate negatively correlated with albumin concentration ($r = -0.477$), positively associated with AOPPs level ($r = 0.453$), and positively associated with the AOPPs/albumin ratio ($r = 0.534$) in COVID-19-related pneumonia patients. D-dimers are products of the degradation or breakdown of fibrin, which are formed during blood clotting processes. This study provides the first evidence that oxidized albumin may be involved in hypercoagulability in patients infected with SARS-CoV-2.

The therapeutic effect of the drug is determined by its unbound fraction. In one of our studies, it was found that the oxidation of HSA by chloramine T reduced the binding activity of HSA [110]. Similar conclusions can be drawn from the studies of other researchers [111,112]. Some studies have also reported a reduction in the binding ability of HSA due to aldehyde modification [113]. Moreover, we observed that the free fraction of

drugs increased in healthy patients depending on the amount of AOPPs present. Therefore, the pharmacokinetics of drugs used in the treatment of COVID-19 patients should be investigated. This study highlights the issues of drug treatment during COVID-19 infection, as medications may cause toxic effects. These issues seem to be very important for drugs that are closely bound to HSA and that have a narrow therapeutic index. Some observed abnormalities in the levels of liver enzymes may be directly associated with drug-induced liver injury. Because the SARS-CoV-2 spike protein binds to albumin, this affinity may be influenced by oxidative stress, aldehyde modification, or the glycation of albumin. Indeed, it was recently observed that glycation reduced the binding ability of albumin [25]. These findings should be extended to the testing of virus binding to AOPPs or ALEs.

Infusions of human albumin solution can reduce the more severe or life-threatening events that take place in COVID-19 patients [38,114]. However, there is no consensus as to whether simply administering albumin to patients with hypoalbuminemia reduces their morbidity and mortality [48,115–117]. Hypoalbuminemia itself is not always considered a cause of the underlying pathology [48]. On the other hand, some studies have revealed that therapy with intravenous albumin may improve organ function, respiratory status, and ventilation-perfusion matching in critically ill patients with hypoalbuminemia or patients with acute respiratory distress syndrome [118,119]. One study revealed that albumin supplementation is able to reduce hypercoagulability in SARS-CoV-2, which was confirmed by the observation of a marked reduction in D-dimers [108]. Clinical trials and extensive studies on infusions of serum albumin in COVID-19 patients are urgently needed.

As albumin is taken up by endocytosis in infected cells in greater volumes in conditions of inflammation, the use of conjugate serum albumin with antiviral drugs to effectively target the extracellular and intracellular viral components is highly recommended in the treatment of patients infected with SARS-CoV-2.

The co-existence of hypoalbuminemia and oxidative stress in many diseases may lead to the hypothesis that oxidative modifications of albumin decrease its detection and influence albumin quantification. In our patient group, albumin was found to be weakly but significantly negatively correlated with AOPPs ($r = -0.323$). Some *in vitro* studies have shown the decreased detection of oxidized albumin by commonly used clinical assays [26,27,30,120]. This may explain the close association observed between a lower concentration of albumin and increased disease severity and mortality in patients with COVID-19 in many studies. This “apparent” hypoalbuminemia should be clarified and checked. Aldehydes and endogenous substances formed during COVID-19 infection by binding to albumin can also compete for binding sites with bromocresol green or purple, which are commonly used in the detection of albumin concentration. The effect of aldehyde interactions on albumin detection is currently unknown.

The strength of our study was to compare AOPPs levels for the same COVID-19 patients during and long after passing the acute stage of infection. Such a comparison allowed us to formulate the suggestion that oxidized albumin is closely linked to the pathophysiology of COVID-19 infection as the demographic characteristics and comorbid conditions remain similar. This study also has some limitations. The blood samples were taken from a single-center donation. Critically ill patients demanding invasive mechanical ventilation were excluded from this study. The sample size of examined patients was decreased in the following blood collections. Some patients recovered during the first week after being admitted and left the hospital before the second blood sampling. After 6- and 12-months post infection, some patients died, were hospitalized due to comorbidities, or were unwilling to continue participating in the study.

4. Materials and Methods

4.1. Clinical Study

In this study, we included patients hospitalized in the Department of Lung Diseases, Neoplasms, and Tuberculosis of the Regional Center of Pulmonology in Bydgoszcz, Poland, from April to December 2021. Patients who had been hospitalized with COVID-19 pneumo-

nia that had been confirmed by a positive reverse-transcription polymerase-chain-reaction (RT-PCR) test result from a nasopharyngeal swab according to the World Health Organization (WHO) criteria [121] and radiographic imaging (HRCTs were performed using a 64-slice Siemens Somatom Sensation (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) system with a slice thickness ≤ 0.5 mm) or chest X-ray were eligible for enrolment. Patients had a blood oxygen saturation below 94% while breathing ambient air but were excluded if they were receiving continuous positive airway pressure, bilevel positive airway pressure, or mechanical ventilation. There were 13 women and 53 men among the subjects, and the mean age of all patients was 62.3 years. Most of the patients had a history of comorbidities. The most common were cardiovascular diseases (in 51% of patients), type 2 diabetes (in 21%), previous lung diseases (in 9%), and cancer (in 6%). All patients had undergone basic laboratory tests assessing the advancement of inflammation, the function of their liver and kidneys, and the parameters of their coagulation system. The mean percentage of lung involvement as assessed by the application of CT pneumonia analysis was 28%. The study group of COVID-19 patients was also tested one week after their admission to the hospital, as long as they were in the acute phase of infection. The group consisted of 11 women and 33 men, and the mean age of the patients was 62.7 years. The study group of COVID-19 patients was invited back for us to take another round of blood samples after 6 months. A total group of 30 people applied—5 women and 25 men—and the mean age of all patients was 60.6 years. After another 6 months, the AOPPs tests for 27 patients (3 women and 24 men, mean age 60.3 years) were repeated.

4.2. Sample Preparation

A 4 mL blood sample was taken for examination from each subject included in the study. For each COVID-19 patient, the sample was drawn on the same day or the next upon admission to the hospital department. All samples were processed within 2 h of collection. Blood samples were added to standard sterile polystyrene tubes containing EDTA and then centrifuged at 3500 rpm at 4 °C for 5 min to obtain plasma. The plasma fraction was collected and stored at -80 °C until measurement. Multiple freeze–thaw cycles were avoided. Measurements were taken within 1 h of defrosting the sample.

4.3. In Vitro Study

Chloramine T hydrate, sodium thiosulfate, malondialdehyde tetrabutylammonium salt (MDA), and HSA were received from Sigma-Aldrich. ALEs-HSA were obtained by the in vitro incubation of HSA (100 μ M) with MDA (10 mM) at 37 °C. Solutions were suspended in PBS at pH = 7.4. AOPPs-HSA were produced in vitro by treating purified HSA (100 μ M) with chloramine T at different concentrations from 0.37 to 4 mM in a volume of 1 mL. Chloramine T hydrate was added immediately after dissolution. The time of incubation was 60 min. Then, sodium thiosulfate (20 μ L) at a concentration 4 times higher than that of chloramine T was added to eliminate the residue of unreacted chloramine T hydrate molecules. The experiments with chloramine T were repeated 3 times.

4.4. AOPPs Measurements

The level of AOPPs was determined by measuring the absorbance at 340 nm, according to the modified method described for the first time by Witko-Sarsat [51]. Briefly, the reactant mixture used for the AOPPs assay contained 1.875 mL of 0.2 M citric acid and 25 μ L of 1.16 M potassium iodide. Then, 1.9 mL of this mixture was added to 100 μ L of the test sample (plasma, HSA, modified has, or PBS-blank), and the absorbance was recorded immediately. In contrast with the original method, citric acid was used instead of acetic acid. This modified method is characterized by a greater stability over time [122]. The results were expressed as chloramine T equivalents.

4.5. Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy Measurements

A time-resolved spectrofluorometer Life Spec II (Edinburgh Instruments Ltd., Livingston, United Kingdom) with a sub-nanosecond pulsed EPLED[®] diode emitting light at a wavelength of 360 nm was used to measure the fluorescence lifetime of the plasma. Plasma samples were not diluted. The exposure time of the samples was 5 min. Fluorescence measurements of the plasma were conducted at wavelengths of 450 nm. The measurements were carried out with the use of quartz 3.5 × 10 mm cuvettes. The fluorescence lifetimes were obtained by the deconvolution analysis of the data using the multiexponential model of fluorescence decay, and the instrument response function was taken into account. Then, the mean fluorescence lifetime value was calculated as the weighted average of fluorescence lifetimes obtained from the three-exponential model of fluorescence decay. As averaging weights, the contributions of individual components (areas under decay curves) to the total fluorescence were calculated. The appropriate number of exponents was determined on the basis of Chi-square (χ^2) statistical analysis and the visual assessment of residual plots.

4.6. Statistical Analysis

The preliminary step of the statistical analysis was the Shapiro–Wilk test of the normality of the distribution of the measured parameters. Due to the non-normality of the part-analyzed variables, the dependencies were determined by Spearman's rank correlation coefficients (*r* values). The differences between the measurements of AOPPs recorded at different times (on admission, one week later, 6- and 12-months post infection) in the COVID-19 group were compared with the Wilcoxon signed-rank test and were considered significant at *p* < 0.05.

5. Conclusions

Serum albumin measurement may serve as a predictor of disease severity in patients with COVID-19. Our findings enhance the knowledge of the role of oxidized albumin in SARS-CoV-2 infection. The correlations observed between the level of albumin or AOPPs with inflammatory parameters or surrogate markers of COVID-19 severity as well as with lung HRCT score confirm the involvement of oxidative stress in COVID-19. Our in vitro study with chloramine T-induced albumin oxidation provides further insight into the mechanisms of the “cytokine storm” observed in COVID-19-related pneumonia. The modifications of albumin by ROS and aldehyde in the bloodstream and tissue cells outside the vascular bed caused by COVID-19 infection may have significant clinical implications and should be further explored at the earliest possible opportunity. The detection of “apparent” hypoalbuminemia should also be clarified.

Author Contributions: Conceptualization, T.W. and M.N.; software, M.B. and M.C.; methodology T.W., J.P., G.P. and M.C.; formal analysis, T.W., M.B. and M.C.; investigation, T.W., B.Z., M.N., M.P.-C. and M.R.; resources T.W., M.N., M.R. and M.P.-C.; writing—original draft preparation, T.W., M.N., G.P. and M.P.-C.; writing—review and editing, T.W., J.P., M.P., M.B., G.P., M.P.-C., M.N., B.Z. and S.K.; visualization T.W., M.B. and M.C.; supervision, G.P. and S.K.; project administration, S.K. and J.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Poland (KB 343/2021).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497–506. [\[CrossRef\]](#)
- Han, H.; Ma, Q.; Li, C.; Liu, R.; Zhao, L.; Wang, W.; Zhang, P.; Liu, X.; Gao, G.; Liu, F.; et al. Profiling Serum Cytokines in COVID-19 Patients Reveals IL-6 and IL-10 Are Disease Severity Predictors. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 1123–1130. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chen, L.; Liu, H.G.; Liu, W.; Liu, J.; Liu, K.; Shang, J.; Deng, Y.; Wei, S. Analysis of Clinical Features of 29 Patients with 2019 Novel Coronavirus Pneumonia. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* **2020**, *43*, e005. [\[CrossRef\]](#)
- Xu, Z.; Shi, L.; Wang, Y.; Zhang, J.; Huang, L.; Zhang, C.; Liu, S.; Zhao, P.; Liu, H.; Zhu, L.; et al. Pathological Findings of COVID-19 Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Lancet Respir. Med.* **2020**, *8*, 420–422. [\[CrossRef\]](#)
- Channappanavar, R.; Perlman, S. Pathogenic Human Coronavirus Infections: Causes and Consequences of Cytokine Storm and Immunopathology. *Semin. Immunopathol.* **2017**, *39*, 529–539. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, Z.; Yang, B.; Li, Q.; Wen, L.; Zhang, R. Clinical Features of 69 Cases With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 769–777. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, G.; Wu, D.; Guo, W.; Cao, Y.; Huang, D.; Wang, H.; Wang, T.; Zhang, X.; Chen, H.; Yu, H.; et al. Clinical and Immunological Features of Severe and Moderate Coronavirus Disease 2019. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 2620–2629. [\[CrossRef\]](#)
- Michot, J.M.; Albiges, L.; Chaput, N.; Saada, V.; Pommeret, F.; Griscelli, F.; Balleyguier, C.; Besse, B.; Marabelle, A.; Netzer, F.; et al. Tocilizumab, an Anti-IL-6 Receptor Antibody, to Treat COVID-19-Related Respiratory Failure: A Case Report. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 961–964. [\[CrossRef\]](#)
- Chernyak, B.V.; Popova, E.N.; Prikhodko, A.S.; Grebenchikov, O.A.; Zinovkina, L.A.; Zinovkin, R.A. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochemistry* **2020**, *85*, 1543–1553. [\[CrossRef\]](#)
- Cecchini, R.; Cecchini, A.L. SARS-CoV-2 Infection Pathogenesis Is Related to Oxidative Stress as a Response to Aggression. *Med. Hypotheses* **2020**, *143*, 110102. [\[CrossRef\]](#)
- Laforge, M.; Elbim, C.; Frère, C.; Hémadi, M.; Massaad, C.; Nuss, P.; Benoliel, J.J.; Becker, C. Tissue Damage from Neutrophil-Induced Oxidative Stress in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 515–516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wieczfinska, J.; Kleniewska, P.; Pawliczak, R. Oxidative Stress-Related Mechanisms in SARS-CoV-2 Infections. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, *2022*, 5589089. [\[CrossRef\]](#)
- Yildiz, H.; Alp, H.H.; Ekin, S.; Arisoy, A.; Gunbatar, H.; Asker, S.; Cilingir, B.M.; Sunnetcioglu, A.; Celikel, M.; Esen, N.; et al. Analysis of Endogenous Oxidative Damage Markers and Association with Pulmonary Involvement Severity in Patients with SARS-CoV-2 Pneumonia. *Infect. Dis.* **2021**, *51*, 429–434. [\[CrossRef\]](#)
- Yu, M.; Liu, Y.; Xu, D.; Zhang, R.; Lan, L.; Xu, H. Prediction of the Development of Pulmonary Fibrosis Using Serial Thin-Section CT and Clinical Features in Patients Discharged after Treatment for COVID-19 Pneumonia. *Korean J. Radiol.* **2020**, *21*, 746–755. [\[CrossRef\]](#)
- Sun, X.; Xue, Z.; Yasin, A.; He, Y.; Chai, Y.; Li, J.; Zhang, K. Colorectal Cancer and Adjacent Normal Mucosa Differ in Apoptotic and Inflammatory Protein Expression. *Eng. Regen.* **2021**, *2*, 279–287. [\[CrossRef\]](#)
- Xie, Y.; Xu, E.; Bowe, B.; Al-Aly, Z. Long-Term Cardiovascular Outcomes of COVID-19. *Nat. Med.* **2022**, *28*, 583–590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ayoubkhani, D.; Khunti, K.; Nafilyan, V.; Maddox, T.; Humberstone, B.; Diamond, I.; Banerjee, A. Post-Covid Syndrome in Individuals Admitted to Hospital with COVID-19: Retrospective Cohort Study. *BMJ* **2021**, *372*, n693. [\[CrossRef\]](#)
- Vollbracht, C.; Kraft, K. Oxidative Stress and Hyper-Inflammation as Major Drivers of Severe COVID-19 and Long COVID: Implications for the Benefit of High-Dose Intravenous Vitamin C. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 899198. [\[CrossRef\]](#)
- Artigas, A.; Wernerman, J.; Arroyo, V.; Vincent, J.L.; Levy, M. Role of Albumin in Diseases Associated with Severe Systemic Inflammation: Pathophysiologic and Clinical Evidence in Sepsis and in Decompensated Cirrhosis. *J. Crit. Care* **2016**, *33*, 62–70. [\[CrossRef\]](#)
- Rozga, J.; Piatek, T.; Małkowski, P. Human Albumin: Old, New, and Emerging Applications. *Ann. Transplant.* **2013**, *18*, 205–217. [\[CrossRef\]](#)
- Sun, L.; Yin, H.; Liu, M.; Xu, G.; Zhou, X.; Ge, P.; Yang, H.; Mao, Y. Impaired Albumin Function: A Novel Potential Indicator for Liver Function Damage? *Ann. Med.* **2019**, *51*, 333–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Baratta, F.; Bartimoccia, S.; Carnevale, R.; Stefanini, L.; Angelico, F.; del Ben, M. Oxidative Stress Mediated Platelet Activation in Patients with Congenital Analbuminemia: Effect of Albumin Infusion. *J. Thromb. Haemost.* **2021**, *19*, 3090–3094. [\[CrossRef\]](#)
- Iles, J.; Zmuidinaite, R.; Sadee, C.; Gardiner, A.; Lacey, J.; Harding, S.; Ule, J.; Roblett, D.; Heeney, J.; Baxendale, H.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Binding of Glycated Serum Albumin-Its Potential Role in the Pathogenesis of the COVID-19 Clinical Syndromes and Bias towards Individuals with Pre-Diabetes/Type 2 Diabetes and Metabolic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4126. [\[CrossRef\]](#)
- Roche, M.; Rondeau, P.; Singh, N.R.; Tarnus, E.; Bourdon, E. The Antioxidant Properties of Serum Albumin. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 1783–1787. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sitar, M.; Aydin, S.; Cakatay, U. Human Serum Albumin and Its Relation with Oxidative Stress. *Clin. Lab.* **2013**, *59*, 945–952. [\[CrossRef\]](#)

26. Michelis, R.; Kristal, B.; Zeitun, T.; Shapiro, G.; Fridman, Y.; Geron, R.; Sela, S. Albumin Oxidation Leads to Neutrophil Activation in Vitro and Inaccurate Measurement of Serum Albumin in Patients with Diabetic Nephropathy. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *60*, 49–55. [\[CrossRef\]](#)
27. Magzal, F.; Sela, S.; Szuchman-Sapir, A.; Tamir, S.; Michelis, R.; Kristal, B. In-Vivo Oxidized Albumin- a pro-Inflammatory Agent in Hypoalbuminemia. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177799. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Das, S.; Maras, J.S.; Hussain, M.S.; Sharma, S.; David, P.; Sukriti, S.; Shasthry, S.M.; Maiwall, R.; Trehanpati, N.; Singh, T.P.; et al. Hyperoxidized Albumin Modulates Neutrophils to Induce Oxidative Stress and Inflammation in Severe Alcoholic Hepatitis. *Hepatology* **2017**, *65*, 631–646. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Ulfig, A.; Leichert, L.I. The Effects of Neutrophil-Generated Hypochlorous Acid and Other Hypohalous Acids on Host and Pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 385–414. [\[CrossRef\]](#)
30. Tabata, F.; Wada, Y.; Kawakami, S.; Miyaji, K. Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker. *Antioxidants* **2021**, *10*, 503. [\[CrossRef\]](#)
31. Carvalho, J.R.; Machado, M.V. New Insights about Albumin and Liver Disease. *Ann. Hepatol.* **2018**, *17*, 547–560. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Bhat, A.; Das, S.; Yadav, G.; Chaudhary, S.; Vyas, A.; Islam, M.; Gupta, A.C.; Bajpai, M.; Maiwall, R.; Maras, J.S.; et al. Hyperoxidized Albumin Modulates Platelets and Promotes Inflammation Through CD36 Receptor in Severe Alcoholic Hepatitis. *Hepatol. Commun.* **2020**, *4*, 50–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Pasterk, L.; Lemesch, S.; Leber, B.; Trieb, M.; Curcic, S.; Stadlbauer, V.; Schuligoi, R.; Schicho, R.; Heinemann, A.; Marsche, G. Oxidized Plasma Albumin Promotes Platelet-Endothelial Crosstalk and Endothelial Tissue Factor Expression. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Rahmani-Kukia, N.; Abbasi, A.; Pakravan, N.; Hassan, Z.M. Measurement of Oxidized Albumin: An Opportunity for Diagnoses or Treatment of COVID-19. *Bioorg. Chem.* **2020**, *105*, 104429. [\[CrossRef\]](#)
35. Badawy, M.A.; Yasseen, B.A.; El-Messierly, R.M.; Abdel-Rahman, E.A.; Elkhodiry, A.A.; Kamel, A.G.; El-Sayed, H.; Shedra, A.M.; Hamdy, R.; Zidan, M.; et al. Neutrophil-Mediated Oxidative Stress and Albumin Structural Damage Predict COVID-19-Associated Mortality. *Elife* **2021**, *10*, e69417. [\[CrossRef\]](#)
36. Ducastel, M.; Chenevier-Gobeaux, C.; Ballaa, Y.; Meritet, J.F.; Brack, M.; Chapuis, N.; Pene, F.; Carlier, N.; Szwebel, T.A.; Roche, N.; et al. Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers for the Prediction of Severity and ICU Admission in Unselected Patients Hospitalized with COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7462. [\[CrossRef\]](#)
37. Chen, C.; Zhang, Y.; Zhao, X.; Tao, M.; Yan, W.; Fu, Y. Hypoalbuminemia—An Indicator of the Severity and Prognosis of COVID-19 Patients: A Multicentre Retrospective Analysis. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 3699–3710. [\[CrossRef\]](#)
38. Rabbani, G.; Ahn, S.N. Review: Roles of Human Serum Albumin in Prediction, Diagnoses and Treatment of COVID-19. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *193*, 948–955. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Kaikita, K.; Tsujita, K. Hypoalbuminemia and Inflammation as Prognostic Markers in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Circ. J.* **2017**, *81*, 1268–1269. [\[CrossRef\]](#)
40. Acharya, R.; Poudel, D.; Bowers, R.; Patel, A.; Schultz, E.; Bourgeois, M.; Paswan, R.; Stockholm, S.; Batten, M.; Kafle, S.; et al. Low Serum Albumin Predicts Severe Outcomes in COVID-19 Infection: A Single-Center Retrospective Case-Control Study. *J. Clin. Med. Res.* **2021**, *13*, 258–267. [\[CrossRef\]](#)
41. Park, J.E.; Jung, S.; Kim, A. MERS Transmission and Risk Factors: A Systematic Review. *BMC Public Health* **2018**, *18*, 574. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Mirsaedi, M.; Omar, H.R.; Sweiss, N. Hypoalbuminemia Is Related to Inflammation Rather than Malnutrition in Sarcoidosis. *Eur. J. Intern. Med.* **2018**, *53*, e14–e16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Alves, F.C.; Sun, J.; Qureshi, A.R.; Dai, L.; Snaedal, S.; Bárány, P.; Heimbürger, O.; Lindholm, B.; Stenvinkel, P. The Higher Mortality Associated with Low Serum Albumin Is Dependent on Systemic Inflammation in End-Stage Kidney Disease. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190410. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Sheinenzon, A.; Shehadeh, M.; Michelis, R.; Shaoul, E.; Ronen, O. Serum Albumin Levels and Inflammation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *184*, 857–862. [\[CrossRef\]](#)
45. Hang, J.; Xue, P.; Yang, H.; Li, S.; Chen, D.; Zhu, L.; Huang, W.; Ren, S.; Zhu, Y.; Wang, L. Pretreatment C-Reactive Protein to Albumin Ratio for Predicting Overall Survival in Advanced Pancreatic Cancer Patients. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2993. [\[CrossRef\]](#)
46. Manani, S.M.; Virzi, G.M.; Clementi, A.; Brocca, A.; de Cal, M.; Tantillo, I.; Ferrando, L.; Crepaldi, C.; Ronco, C. Pro-Inflammatory Cytokines: A Possible Relationship with Dialytic Adequacy and Serum Albumin in Peritoneal Dialysis Patients. *Clin. Kidney J.* **2016**, *9*, 153–157. [\[CrossRef\]](#)
47. Bologa, R.M.; Levine, D.M.; Parker, T.S.; Cheigh, J.S.; Serur, D.; Stenzel, K.H.; Rubin, A.L. Interleukin-6 Predicts Hypoalbuminemia, Hypocholesterolemia, and Mortality in Hemodialysis Patients. *Am. J. Kidney Dis.* **1998**, *32*, 107–114. [\[CrossRef\]](#)
48. Kaysen, G.A.; Publishing, B.; Don, B.R.; Kaysen, G. POOR NUTRITIONAL STATUS AND INFLAMMATION: Serum Albumin: Relationship to Inflammation and Nutrition. *Semin. Dial.* **2004**, *17*, 432–437. [\[CrossRef\]](#)
49. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. The Antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *280*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)

50. Iwao, Y.; Anraku, M.; Hiraike, M.; Kawai, K.; Nakajou, K.; Kai, T.; Suenaga, A.; Otagiri, M. The Structural and Pharmacokinetic Properties of Oxidized Human Serum Albumin, Advanced Oxidation Protein Products (AOPP). *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2006**, *21*, 140–146. [\[CrossRef\]](#)
51. Witko-Sarsat, V.; Friedlander, M.; Capeillere-Blandin, C.; Nguyen-Khoa, T.; Nguyen, A.T.; Zingraff, J.; Jungers, P.; Descamps-Latscha, B. Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Uremia. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 1304–1313. [\[CrossRef\]](#)
52. Ou, H.; Huang, Z.; Mo, Z.; Xiao, J. The Characteristics and Roles of Advanced Oxidation Protein Products in Atherosclerosis. *Cardiovasc. Toxicol.* **2017**, *17*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Piwowar, A. Advanced Oxidation Protein Products. Part I. Mechanism of the Formation, Characteristics and Property. *Pol. Merkur. Lekarski* **2010**, *28*, 166–169. [\[PubMed\]](#)
54. Garibaldi, S.; Barisione, C.; Marengo, B.; Ameri, P.; Brunelli, C.; Balbi, M.; Ghigliotti, G. Advanced Oxidation Protein Products-Modified Albumin Induces Differentiation of RAW264.7 Macrophages into Dendritic-like Cells Which Is Modulated by Cell Surface Thiols. *Toxins* **2017**, *9*, 27. [\[CrossRef\]](#)
55. Colombo, G.; Clerici, M.; Altomare, A.; Rusconi, F.; Giustarini, D.; Portinaro, N.; Garavaglia, M.L.; Rossi, R.; Dalle-Donne, I.; Milzani, A. Thiol Oxidation and Di-Tyrosine Formation in Human Plasma Proteins Induced by Inflammatory Concentrations of Hypochlorous Acid. *J. Proteomics* **2017**, *152*, 22–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Shanmugam, N.; Figarola, J.L.; Li, Y.; Swiderski, P.M.; Rahbar, S.; Natarajan, R. Proinflammatory Effects of Advanced Lipoxidation End Products in Monocytes. *Diabetes* **2008**, *57*, 879–888. [\[CrossRef\]](#)
57. Mol, M.; Degani, G.; Coppa, C.; Baron, G.; Popolo, L.; Carini, M.; Aldini, G.; Vistoli, G.; Altomare, A. Advanced Lipoxidation End Products (ALEs) as RAGE Binders: Mass Spectrometric and Computational Studies to Explain the Reasons Why. *Redox Biol.* **2019**, *23*, 101083. [\[CrossRef\]](#)
58. Vistoli, G.; de Maddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G. Advanced Glycoxidation and Lipoxidation End Products (AGEs and ALEs): An Overview of Their Mechanisms of Formation. *Free Radic. Res.* **2013**, *47*, 3–27. [\[CrossRef\]](#)
59. Guarneri, F.; Custurone, P.; Papaiani, V.; Gangemi, S. Involvement of RAGE and Oxidative Stress in Inflammatory and Infectious Skin Diseases. *Antioxidants* **2021**, *10*, 82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Bierhaus, A.; Nawroth, P.P. Multiple Levels of Regulation Determine the Role of the Receptor for AGE (RAGE) as Common Soil in Inflammation, Immune Responses and Diabetes Mellitus and Its Complications. *Diabetologia* **2009**, *52*, 2251–2263. [\[CrossRef\]](#)
61. Khatoon, F.; Moinuddin; Alam, K.; Ali, A. Physicochemical and Immunological Studies on 4-Hydroxynonenal Modified HSA: Implications of Protein Damage by Lipid Peroxidation Products in the Etiopathogenesis of SLE. *Hum. Immunol.* **2012**, *73*, 1132–1139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Khan, F.; Moinuddin; Mir, A.R.; Islam, S.; Abidi, M.; Husain, M.A.; Khan, R.H. Unsaturated Aldehyde, 4-Hydroxynonenal (HNE) Alters the Structural Integrity of HSA with Consequences in the Immuno-Pathology of Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *112*, 306–314. [\[CrossRef\]](#)
63. Prasad, A.; Rossi, C.; Manoharan, R.R.; Sedlářová, M.; Cangeloni, L.; Rath, D.; Tamasi, G.; Pospíšil, P.; Consumi, M. Bioactive Compounds and Their Impact on Protein Modification in Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7424. [\[CrossRef\]](#)
64. Qiang, M.; Xu, Y.; Lu, Y.; He, Y.; Han, C.; Liu, Y.; He, R. Autofluorescence of MDA-Modified Proteins as an in Vitro and in Vivo Probe in Oxidative Stress Analysis. *Protein Cell* **2014**, *5*, 484–487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Berezin, M.Y.; Achilefu, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641–2684. [\[CrossRef\]](#)
66. Piwowar, A. Biochemical and Clinical Aspects of Advanced Oxidation Protein Products in Kidney Diseases and Metabolic Disturbances. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2014**, *68*, 179–190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Komosinska-Vassev, K.; Olczyk, P.; Winsz-Szczotka, K.; Kuznik-Trocha, K.; Klimek, K.; Olczyk, K. Age- and Gender-Related Alteration in Plasma Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) and Glycosaminoglycan (GAG) Concentrations in Physiological Ageing. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2012**, *50*, 557–563. [\[CrossRef\]](#)
68. Maciejczyk, M.; Zalewska, A.; Ładny, J.R. Salivary Antioxidant Barrier, Redox Status, and Oxidative Damage to Proteins and Lipids in Healthy Children, Adults, and the Elderly. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 4393460. [\[CrossRef\]](#)
69. Zhou, Y.; Chi, J.; Lv, W.; Wang, Y. Obesity and Diabetes as High-Risk Factors for Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2021**, *37*, e3377. [\[CrossRef\]](#)
70. Motaib, I.; Zbiri, S.; Elamari, S.; Haoudar, A.; Chadli, A.; el Kettani, C. Cardiovascular Risk Factors and the Severity of COVID-19 Disease. *Cureus* **2021**, *13*, e15486. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Mozzini, C.; Girelli, D. The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Covid-19: Only an Hypothesis or a Potential New Field of Research? *Thromb. Res.* **2020**, *191*, 26–27. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Inoue, M.; Nakashima, R.; Enomoto, M.; Koike, Y.; Zhao, X.; Yip, K.; Huang, S.H.; Waldron, J.N.; Ikura, M.; Liu, F.F.; et al. Plasma Redox Imbalance Caused by Albumin Oxidation Promotes Lung-Predominant NETosis and Pulmonary Cancer Metastasis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5116. [\[CrossRef\]](#)
73. Szturmowicz, M.; Demkow, U. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Severe SARS-CoV-2 Lung Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8854. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Borges, L.; Pithon-Curi, T.C.; Curi, R.; Hatanaka, E. COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators Inflamm.* **2020**, *2020*, 8829674. [\[CrossRef\]](#)

75. Stig, B.; Hajdú, N. Endproducts and Receptors of Advanced Glycation and Lipoxidation (AGE, ALE, RAGE) and Chronic Diseases from the Perspective of Food and Nutrition. *Orv. Hetil.* **2008**, *149*, 771–778. [\[CrossRef\]](#)
76. Martín-Fernández, M.; Aller, R.; Heredia-Rodríguez, M.; Gómez-Sánchez, E.; Martínez-Paz, P.; Gonzalo-Benito, H.; Sánchez-de Prada, L.; Gorgojo, Ó.; Carnicero-Frutos, I.; Tamayo, E.; et al. Lipid Peroxidation as a Hallmark of Severity in COVID-19 Patients. *Redox Biol.* **2021**, *48*, 102181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Žarković, N.; Orehovec, B.; Milković, L.; Baršić, B.; Tatzber, F.; Wonisch, W.; Tarle, M.; Kmet, M.; Mataić, A.; Jakovčević, A.; et al. Preliminary Findings on the Association of the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal with the Lethal Outcome of Aggressive COVID-19. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1341. [\[CrossRef\]](#)
78. Domingues, R.M.; Domingues, P.; Melo, T.; Pérez-Sala, D.; Reis, A.; Spickett, C.M. Lipoxidation Adducts with Peptides and Proteins: Deleterious Modifications or Signaling Mechanisms? *J. Proteomics* **2013**, *92*, 110–131. [\[CrossRef\]](#)
79. Snell, J.A.; Jandova, J.; Wondrak, G.T. Hypochlorous Acid: From Innate Immune Factor and Environmental Toxicant to Chemo-preventive Agent Targeting Solar UV-Induced Skin Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 887220. [\[CrossRef\]](#)
80. Rodríguez-García, A.; García-Vicente, R.; Morales, M.L.; Ortiz-Ruiz, A.; Martínez-López, J.; Linares, M. Protein Carbonylation and Lipid Peroxidation in Hematological Malignancies. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1212. [\[CrossRef\]](#)
81. Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11*, 81–128. [\[CrossRef\]](#)
82. Burcham, P.C.; Kuhan, Y.T. Introduction of Carbonyl Groups into Proteins by the Lipid Peroxidation Product, Malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 996–1001. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Zheng, M.; Schultz, M.B.; Sinclair, D.A. NAD⁺ in COVID-19 and Viral Infections. *Trends Immunol.* **2022**, *43*, 283–295. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Omran, H.M.; Almaliki, M.S. Influence of NAD⁺ as an Ageing-Related Immunomodulator on COVID 19 Infection: A Hypothesis. *J. Infect. Public Health* **2020**, *13*, 1196–1201. [\[CrossRef\]](#)
85. McReynolds, M.R.; Chellappa, K.; Baur, J.A. Age-Related NAD⁺ Decline. *Exp. Gerontol.* **2020**, *134*, 110888. [\[CrossRef\]](#)
86. Fang, E.F.; Lautrup, S.; Hou, Y.; Demarest, T.G.; Croteau, D.L.; Mattson, M.P.; Bohr, V.A. NAD⁺ in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications. *Trends Mol. Med.* **2017**, *23*, 899–916. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Nacarelli, T.; Zhang, R. NAD⁺ Metabolism Controls Inflammation during Senescence. *Mol. Cell. Oncol.* **2019**, *6*, 1605819. [\[CrossRef\]](#)
88. Zapata-Pérez, R.; Wanders, R.J.A.; Karnebeek, C.D.M.; Houtkooper, R.H. NAD⁺ + Homeostasis in Human Health and Disease. *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13*, e13943. [\[CrossRef\]](#)
89. Miller, R.; Wentzel, A.R.; Richards, G.A. COVID-19: NAD⁺ Deficiency May Predispose the Aged, Obese and Type2 Diabetics to Mortality through Its Effect on SIRT1 Activity. *Med. Hypotheses* **2020**, *144*, 110044. [\[CrossRef\]](#)
90. Jiang, Y.; Deng, Y.; Pang, H.; Ma, T.; Ye, Q.; Chen, Q.; Chen, H.; Hu, Z.; Qin, C.F.; Xu, Z. Treatment of SARS-CoV-2-Induced Pneumonia with NAD⁺ and NMN in Two Mouse Models. *Cell Discov.* **2022**, *8*, 38. [\[CrossRef\]](#)
91. Chatterjee, N.A.; Jensen, P.N.; Harris, A.W.; Nguyen, D.D.; Huang, H.D.; Cheng, R.K.; Savla, J.J.; Larsen, T.R.; Gomez, J.M.D.; Du-Fay-de-Lavallaz, J.M.; et al. Admission Respiratory Status Predicts Mortality in COVID-19. *Influenza Other Respir. Viruses* **2021**, *15*, 569–572. [\[CrossRef\]](#)
92. Izcovich, A.; Ragusa, M.A.; Tortosa, F.; Marzio, M.A.L.; Agnoletti, C.; Bengolea, A.; Ceirano, A.; Espinosa, F.; Saavedra, E.; Sanguine, V.; et al. Prognostic Factors for Severity and Mortality in Patients Infected with COVID-19: A Systematic Review. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0241955. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Akoumianaki, E.; Vaporidi, K.; Bolaki, M.; Georgopoulos, D. Happy or Silent Hypoxia in COVID-19—A Misnomer Born in the Pandemic Era. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 745634. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Zhao, Y.; Wang, B.; Zhang, J.; He, D.; Zhang, Q.; Pan, C.; Yuan, Q.; Shi, Y.; Tang, H.; Xu, F.; et al. ALDH2 (Aldehyde Dehydrogenase 2) Protects against Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 2303–2319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Schmidt, H.; Grune, T.; Müller, R.; Siems, W.G.; Wauer, R.R. Increased Levels of Lipid Peroxidation Products Malondialdehyde and 4-Hydroxynonenal after Perinatal Hypoxia. *Pediatr. Res.* **1996**, *40*, 15–20. [\[CrossRef\]](#)
96. Buonocore, G.; Perrone, S.; Longini, M.; Terzuoli, L.; Bracci, R. Total Hydroperoxide and Advanced Oxidation Protein Products in Preterm Hypoxic Babies. *Pediatr. Res.* **2000**, *47*, 221–224. [\[CrossRef\]](#)
97. Abdelrahman, M.M.; Abdel-Baset, A.A.; Younis, M.A.; Mahmoud, M.G.; Shafik, N.S. Liver Function Test Abnormalities in COVID-19 Patients and Factors Affecting Them—A Retrospective Study. *Clinic. Exp. Hepatol.* **2021**, *7*, 297–304. [\[CrossRef\]](#)
98. Ceci, F.M.; Fiore, M.; Gavaruzzi, F.; Angeloni, A.; Lucarelli, M.; Scagnolari, C.; Bonci, E.; Gabanella, F.; di Certo, M.G.; Barbato, C.; et al. Early Routine Biomarkers of SARS-CoV-2 Morbidity and Mortality: Outcomes from an Emergency Section. *Diagnostics* **2022**, *12*, 176. [\[CrossRef\]](#)
99. Łykowska-Szuber, L.; Wołodźko, K.; Rychter, A.M.; Krela-Kaźmierczak, I.; Dobrowolska, A.; Szymczak-Tomczak, A. Liver Injury in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)—A Narrative Review. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5048. [\[CrossRef\]](#)
100. Neu, B.; Wenby, R.; Meiselman, H.J. Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell Aggregation. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3059–3065. [\[CrossRef\]](#)
101. Levin, G.Y.; Egorihina, M.N. The Role of Oxidized Albumin in Blood Cell Aggregation Disturbance in Burn Disease. *Int. J. Burn. Trauma* **2013**, *3*, 115–121.

102. Litvinov, R.I.; Weisel, J.W. Role of Red Blood Cells in Haemostasis and Thrombosis. *ISBT Sci. Ser.* **2017**, *12*, 176–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Gillespie, A.H.; Doctor, A. Red Blood Cell Contribution to Hemostasis. *Front. Pediatrics* **2021**, *9*, 629824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Byrnes, J.R.; Wolberg, A.S. Red Blood Cells in Thrombosis. *Blood* **2017**, *130*, 1795–1799. [[CrossRef](#)]
105. Heinrich, F.; Roedl, K.; Jarczak, D.; Goebels, H.L.; Heinemann, A.; Schäfer, U.; Ludwig, F.; Bachmann, M.; Bein, B.; Weber, C.F.; et al. New Insights in the Occurrence of Venous Thromboembolism in Critically Ill Patients with COVID-19—A Large Postmortem and Clinical Analysis. *Viruses* **2022**, *14*, 811. [[CrossRef](#)]
106. Jenner, W.J.; Gorog, D.A. Incidence of Thrombotic Complications in COVID-19: On Behalf of ICODE: The International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium. *J. Thromb. Thrombolysis* **2021**, *52*, 999–1006. [[CrossRef](#)]
107. Basili, S.; Carnevale, R.; Nocella, C.; Bartimoccia, S.; Raparelli, V.; Talerico, G.; Stefanini, L.; Romiti, G.F.; Perticone, F.; Corazza, G.R.; et al. Serum Albumin Is Inversely Associated with Portal Vein Thrombosis in Cirrhosis. *Hepatol. Commun.* **2019**, *3*, 504–512. [[CrossRef](#)]
108. Violi, F.; Ceccarelli, G.; Loffredo, L.; Alessandri, F.; Cipollone, F.; D’Ardes, D.; D’Ettore, G.; Pignatelli, P.; Venditti, M.; Mastroianni, C.M.; et al. Albumin Supplementation Dampens Hypercoagulability in COVID-19: A Preliminary Report. *Thromb. Haemost.* **2021**, *121*, 102–105. [[CrossRef](#)]
109. Zhai, M.; Cao, S.; Lu, J.; Xu, H.; Xia, M.; Li, Z. The Relationship between the Fibrinogen to Albumin Ratio and Early Outcomes in Patients with Acute Pontine Infarction. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2022**, *28*, 10760296211067260. [[CrossRef](#)]
110. Wybranowski, T.; Ziolkowska, B.; Cyrankiewicz, M.; Kruszewski, S. The Impact of Oxidative Stress on Binding of Drugs with Plasma Proteins Studied by Fluorescence Anisotropy Methods. *Gen. Physiol. Biophys.* **2018**, *37*, 647–655. [[CrossRef](#)]
111. Oetl, K.; Birner-Gruenberger, R.; Spindelboeck, W.; Stueger, H.P.; Dorn, L.; Stadlbauer, V.; Putz-Bankuti, C.; Krisper, P.; Graziadei, I.; Vogel, W.; et al. Oxidative Albumin Damage in Chronic Liver Failure: Relation to Albumin Binding Capacity, Liver Dysfunction and Survival. *J. Hepatol.* **2013**, *59*, 978–983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Anraku, M.; Kragh-Hansen, U.; Kawai, K.; Maruyama, T.; Yamasaki, Y.; Takakura, Y.; Otagiri, M. Validation of the Chloramine-T Induced Oxidation of Human Serum Albumin as a Model for Oxidative Damage in Vivo. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 684–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Mera, K.; Takeo, K.; Izumi, M.; Maruyama, T.; Nagai, R.; Otagiri, M. Effect of Reactive-Aldehydes on the Modification and Dysfunction of Human Serum Albumin. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1614–1625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Ramadori, G. Albumin Infusion in Critically Ill COVID-19 Patients: Hemodilution and Anticoagulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7126. [[CrossRef](#)]
115. Boldt, J. The Good, the Bad, and the Ugly: Should We Completely Banish Human Albumin from Our Intensive Care Units? *Anesth. Analg.* **2000**, *91*, 887–895. [[CrossRef](#)]
116. Ma, Y.; Yan, T.; Xu, F.; Ding, J.; Yang, B.; Ma, Q.; Wu, Z.; Lyu, J.; Wang, Z. Infusion of Human Albumin on Acute Pancreatitis Therapy: New Tricks for Old Dog? *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 842108. [[CrossRef](#)]
117. Melia, D.; Post, B. Human Albumin Solutions in Intensive Care: A Review. *J. Intensive Care Soc.* **2021**, *22*, 248–254. [[CrossRef](#)]
118. Dubois, M.J.; Orellana-Jimenez, C.; Melot, C.; de Backer, D.; Berre, J.; Leeman, M.; Brimioulle, S.; Appoloni, O.; Creteur, J.; Vincent, J.L. Albumin Administration Improves Organ Function in Critically Ill Hypoalbuminemic Patients: A Prospective, Randomized, Controlled, Pilot Study. *Crit. Care Med.* **2006**, *34*, 2536–2540. [[CrossRef](#)]
119. Uhlig, C.; Silva, P.L.; Deckert, S.; Schmitt, J.; de Abreu, M.G. Albumin versus Crystalloid Solutions in Patients with the Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit. Care* **2014**, *18*, R10. [[CrossRef](#)]
120. Michelis, R.; Kristal, B.; Snitkovsky, T.; Sela, S. Oxidative Modifications Impair Albumin Quantification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *401*, 137–142. [[CrossRef](#)]
121. World Health Organization. *Clinical Management of Severe Acute Respiratory Infection (SARI) When COVID-19 Disease Is Suspected: Interim Guidance (2020)*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2020. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331446> (accessed on 7 July 2022).
122. Hanasand, M.; Omdal, R.; Norheim, K.B.; Gøransson, L.G.; Brede, C.; Jonsson, G. Improved Detection of Advanced Oxidation Protein Products in Plasma. *Clin. Chim. Acta* **2012**, *413*, 901–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

A Preliminary Evaluation of Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs) as a Potential Approach to Evaluating Prognosis in Early-Stage Breast Cancer Patients and Its Implication in Tumour Angiogenesis: A 7-Year Single-Centre Study

Marta Napiórkowska-Mastalerz ^{1,*} , Tomasz Wybranowski ¹ , Maciej Bosek ¹ , Stefan Kruszewski ¹ , Piotr Rhone ² and Barbara Ruskowska-Ciastek ^{3,*} 

¹ Department of Biophysics, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum, 85-067 Bydgoszcz, Poland; tomaszwybranowski@cm.umk.pl (T.W.); mbosek@cm.umk.pl (M.B.); skrusz@cm.umk.pl (S.K.)

² Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre Prof. F. Łukaszczyk Memorial Hospital, 85-796 Bydgoszcz, Poland; rhonep@co.bydgoszcz.pl

³ Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum, 85-094 Bydgoszcz, Poland

* Correspondence: m.napiorkowska@cm.umk.pl (M.N.-M.); bruskowska@cm.umk.pl or ruszkowska.basia@gmail.com (B.R.-C.)



Citation: Napiórkowska-Mastalerz, M.; Wybranowski, T.; Bosek, M.; Kruszewski, S.; Rhone, P.; Ruskowska-Ciastek, B. A Preliminary Evaluation of Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs) as a Potential Approach to Evaluating Prognosis in Early-Stage Breast Cancer Patients and Its Implication in Tumour Angiogenesis: A 7-Year Single-Centre Study. *Cancers* **2024**, *16*, 1068. <https://doi.org/10.3390/cancers16051068>

Academic Editors: Hiroko Yamashita and Hiroyuki Takei

Received: 23 January 2024

Revised: 28 February 2024

Accepted: 4 March 2024

Published: 6 March 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Breast cancer is the main cause of cancer-related deaths among women globally. It clearly shows it is essential to find a useful marker, which could have a beneficial influence on the prediction of cancer-related events and give more information about the possible outcomes in the early stage of the disease. This is the first study that presents advanced oxidation protein products as a potentially valuable biomarker for monitoring the course of breast cancer treatment and as a predictor of recurrence and cancer-related mortality. The study shows also the relationship between oxidative protein damage in breast cancer patients and excessive angiogenic processes.

Abstract: Breast cancer (BrC) is a highly prevalent tumour among women. The high incidence and mortality rate of BrC prompts researchers to search for new markers that will provide information on the possible impact of the therapy on the risk of cancer-related events. This study aimed to investigate whether the level of advanced oxidation protein products (AOPPs) may have a potential impact on disease-free (DFS) and overall survival (OS) in BrC patients with early-stage cancer. Additionally, we tried to assess the relationship between AOPPs and angiogenic parameters. In this study, the pre- and post-treatment AOPP levels were examined in the serum of 70 newly diagnosed BrC women. The receiver operating characteristic curve identified pre- and post-treatment AOPPs to be above 9.37 μ M and 10.39 μ M, respectively, as the best cut-off values to predict the risk of cancer relapse. Additionally, Kaplan–Meier survival analysis indicated that pre- and post-treatment AOPPs above 9.37 μ M and 10.39 μ M were associated with significantly poorer OS. The uni- and multivariate Cox regression analysis highlighted that lower levels of pre- and post-treatment AOPPs were associated with a longer duration without relapse or cancer-related death. A positive correlation between concentrations of pre-treatment AOPPs and vascular endothelial growth factor A, and negative correlations with levels of soluble forms of vascular endothelial growth factor receptor type 1 and 2, were found. In conclusion, AOPPs appear to have an important role in predicting cancer-related events and may potentially serve as a simple prognostic marker in clinical practice.

Keywords: early-stage breast cancer; AOPP; adjuvant treatment; overall survival; disease-free survival

1. Introduction

Breast cancer (BrC) is considered the most commonly diagnosed cancer worldwide, representing 11.7% of total cases, and the leading cause of cancer-associated death among women. The global report shows that in 2020 there were an estimated almost 2.3 million new cases of female breast cancer, with about 685,000 cancer-related deaths [1,2]. The 5-year relative survival from diagnosis is 90.6%; however, this is strongly associated with the cancer stage at diagnosis [3]. The risk of progression in the early stage of breast cancer is estimated to be 20–30% [4]. To discover a biomarker that could be useful in predicting such events, there is a need to understand the underlying mechanisms of tumour development. Breast cancer cells, like typical tissue, need a sufficient supply of oxygen and constant nourishment for growth. Hypoxia induced by a growing tumour triggers various types of responses, mediated among others by hypoxia-inducible factors (HIFs). Subsequently, HIFs regulate the expression of numerous types of genes, which are responsible for stimulating specific physiological processes, including metabolism, angiogenesis, and cell division [5].

Angiogenesis is a process which leads to the creation of new blood vessels from pre-existing ones. Under physiological conditions, angiogenesis plays a crucial role in wound healing and normal growth. However, tumour growth and metastasis are also strongly dependent on angiogenesis. The interplay between pro- and anti-angiogenic factors is of considerable importance in the tight regulation of angiogenesis. It is believed that some specific tumour cells produce both pro- and anti-angiogenic proteins that stimulate and inhibit angiogenesis, respectively. Some researchers have assumed that tumour cells alter the balance between pro- and anti-angiogenic factors, which leads to the activation of the angiogenic switch [5–7]. Continuous pro-angiogenic stimulation in the tumour environment leads to the formation of immature, poorly organized, and malformed vessels, which express enhanced permeability. All these processes are related to unequal blood flow and persisting hypoxia, and may induce the progression of the tumour [8]. There are found several pro-angiogenic factors engaged in stimulating vascular growth. The main regulator of angiogenesis and tumour growth is regarded as the vascular endothelial growth factor (VEGF) family, inclusive of seven isoforms VEGF-A/B/C/D/E and placental growth factor (PlGF) 1 and 2. In blood, there are three forms of soluble receptors secreted by endothelial cells (sVEGFR1, sVEGFR2, sVEGFR3) [9]. A soluble form of VEGFR1 binds to VEGF-A, which expresses the highest biological activity among the VEGF family in breast cancer patients. A soluble form of VEGFR1 naturally inhibits endothelial cell proliferation induced by VEGF [9,10]. VEGF also forms non-signalling ligands with sVEGFR2, thus slowing their migration and proliferation and, therefore, the formation of new blood vessels in malignant tumours [11,12].

One of the most essential factors influencing the intensity of the angiogenic processes is oxidative stress, defined as the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defences. Excessive ROS production plays a key role in the vascularization of cancerous tissue and metastasis. Increased ROS production with ageing, smoking, obesity, and alcohol consumption, which are possible risk factors for developing breast cancer, also supporting their involvement in this process [13]. Chronic inflammation induced by oxidative stress leads to oxidative damage to DNA, proteins, and lipids, which in turn contributes to the dysregulation of oncogenes and tumour suppressor genes, e.g., p53, BRCA2, and finally to the initiation and progression of the tumour [7,14]. The level of oxidative stress can alternatively be examined by the amount of damage acted on proteins by measuring the concentration of advanced oxidation protein products (AOPPs). AOPPs are usually formed from albumins and methionine- or tyrosine-rich polypeptides as a consequence of ROS attacks [15]. The elevated levels of AOPPs found by some researchers were related to ageing, diabetes, atherosclerosis, and metabolic syndrome [16–19]. Moreover, the involvement of oxidative stress on proteins has been also found in COVID-19 pneumonia patients [20]. Zhou et al. have also suggested that an increased concentration of AOPPs may serve as a predictor of mortality in haemodialysis patients [21]. There are some investigations describing associations between AOPPs and angiogenic biomarkers. One

study revealed the relationship between elevated levels of AOPPs and higher expressions and secretions of VEGF and sVEGFR1 in trophoblast cell lines. This finding shows the interplay between increased AOPP concentrations and endothelial and placental angiogenesis dysfunction [19]. Liu et al. have also indicated a strong link between the stimulation of AOPPs and triggering of the proliferation and migration of rat endometrial epithelial cells along with restraining apoptosis by activation of the ERK and P38 pathways [22]. Furthermore, Le-Wu et al. have revealed that elevated levels of AOPPs in colon cancer cells were closely associated with an increased expression of VEGF exposed to intermittent hypoxia [23]. Additionally, AOPPs may also directly stimulate angiogenesis by promoting oxidative stress and inflammation [24,25]. A study by Guo et al. even suggests that AOPPs can activate vascular endothelial cells through a specific signalling pathway mediated by a receptor for advanced glycation end products (RAGE) [26].

It has been demonstrated that oxidative stress can enhance angiogenesis [7,27]. However, mechanistic insights into the underlying molecular mechanisms that connect AOPPs and VEGF have not been yet fully presented. Several hypotheses can be proposed to elucidate the potential interactions of these two markers. The development of tumours is a complex process in which angiogenesis plays a crucial role, enabling tumours to grow and metastasize through the formation of new blood vessels. As the tumour progresses, tumour cells are subjected to various forms of stress, including hypoxia, which can lead to their death through necrosis or apoptosis, consequently releasing DNA into the extracellular environment, known as circulating cell-free DNA (cfDNA) [28–32]. In breast cancer, it has also been shown that an increase in circulating tumour DNA (ctDNA) (the fraction of cfDNA that originates from tumour cells) can be a good indicator and may be used to monitor disease progression and response to treatment in patients with advanced breast cancer [33]. However, beyond its role as a diagnostic and prognostic marker, cfDNA can also contribute to pathological inflammation and disease progression, acting through various immunological and molecular mechanisms. Circulating tumour DNA can be adeptly recognized by the immune system as a damage-associated molecular pattern (DAMP) [34–38]. This recognition triggers a series of immune responses, including the activation of neutrophils and the release of neutrophil extracellular traps (NETs) [39–41]. A significant enzyme in this context is myeloperoxidase (MPO), a heme-containing enzyme abundantly found in the azurophilic granules of neutrophils [42]. MPO is crucial for the oxidative burst, a process generating ROS [43,44]. This oxidative stress is intimately linked to the formation of AOPP, primarily through the action of hypochlorous acid (HOCl), produced by MPO [45,46]. Our *in vitro* studies using human serum albumin (HSA) demonstrated that chloramine T, a source of active chlorine substituting unstable HOCl, induces the formation of AOPPs-HSA in a dose-dependent exponential manner [20].

The integration of AOPPs in the angiogenesis process and their interaction with RAGE adds another layer of complexity to the already complicated picture of tumour development and progression [24,47]. The binding of AOPPs to RAGE receptors can lead to the activation of transcription factors such as NF- κ B, which regulate the expression of genes involved in the inflammatory response and initiate signalling cascades leading to the expression and secretion of various cytokines, including IL-6 and TNF α . Such an increase in inflammatory activity can promote further tumour development, creating an environment conducive to angiogenesis. In the same study, the blockade of RAGE signals significantly suppressed aggressive behaviour and inflammatory response. Additionally, on cell lines, it was shown that AOPPs additionally induce the expression of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and MMP-13 [25]. MMPs are involved in the degradation of extracellular matrix components, which not only facilitates the migration and invasion of tumour cells but can also modulate the release and activation of growth factors associated with the extracellular matrix. MMPs can participate in releasing matrix-bound forms of VEGF, increasing its bioavailability and promoting angiogenesis. By degrading extracellular matrix components, MMPs can facilitate the release of VEGF deposited in the matrix, enabling its interaction with receptors on endothelial cells, and stimulating angiogenesis [48]. This evidence firmly

establishes a direct correlation between VEGF and AOPPs, suggesting that the angiogenic processes driven by VEGF are closely linked to oxidative stress and inflammation mediated by AOPPs. Such a connection underscores the complexity of tumour microenvironment interactions and highlights potential therapeutic targets for disrupting the pathological feedback loops that fuel cancer progression. However, the role of AOPPs in cancer-related angiogenesis is still not well understood, and further research is needed to clarify this relationship.

This is the first study showing the impact of AOPP concentration in the serum of early-stage breast cancer patients on disease-free and overall survival before and after treatment. Thus, the aim of this study was to examine the usefulness of AOPPs as a prognostic marker of the likely course of the disease in a group of women with breast cancer, using ROC curve analysis, Kaplan–Meier curves, and Cox regression analysis. Additionally, we sought to assess the influence of the adjuvant treatment on the blood serum concentration of AOPPs in breast cancer patients and to demonstrate a relationship between AOPPs and selected angiogenic biomarkers. Furthermore, we explored associations between AOPP levels and clinical and molecular characteristics of BrC.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Samples and Clinical Data

This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Torun, Collegium Medicum in Bydgoszcz (approval no. KB/547/2015). All included patients gave written informed consent before their enrolment. The study group consisted of 70 previously non-treated women with newly diagnosed breast cancer (BrC). Subjects were enrolled between November 2015 and January 2018 by an oncologist and treated in the Clinical Ward of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Oncology Centre in Bydgoszcz, Poland. Inclusion and exclusion criteria are presented in Figure 1.

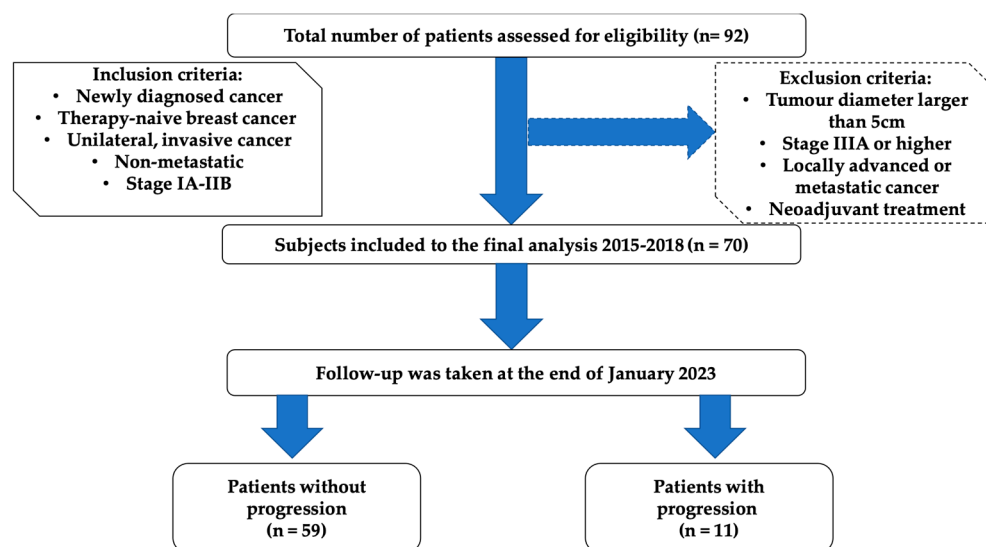


Figure 1. Flowchart describing enrolment of breast cancer participants.

The traditional clinical and histological factors and molecular determinants were examined in all the women included in the study. The participants underwent breast-conserving surgery (BCS) (58 cases; 82.9%) or mastectomy (12 cases; 17.1%), respectively, and received adjuvant chemotherapy, radiotherapy, brachytherapy, immunotherapy, and endocrine therapy if needed. The patient's TNM stage of cancer was characterised according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC; 7th edition). The WHO classification was used to establish histological subtypes of cancer, whereas the Elston–Ellis system was used to classify histological grade. All participants were subjected to thorough evaluation in the

form of complete demographic and medical history, and collected data are displayed in Table 1.

Table 1. Baseline characteristics of women with breast cancer.

Demographic and Clinical Data	Overall (n = 70)	Patients without Progression (n = 59)	Patients with Progression (n = 11)
	n (%)		
Age (according to median)			
<54 years	32 (45.7%)	26 (44.1%)	6 (54.5%)
≥54 years	38 (54.3%)	33 (55.9%)	5 (45.5%)
Menopausal status			
Pre-menopausal	25 (35.7%)	19 (32.2%)	6 (54.5%)
Post-menopausal	45 (64.3%)	40 (67.8%)	5 (45.5%)
BMI (kg/m ²)			
Normal (18.5 ≤ 24.99)	34 (48.6%)	26 (44.1%)	8 (72.7%)
Overweight (25 ≤ 29.99)	22 (31.4%)	21 (35.6%)	1 (9.1%)
Obese (>30)	14 (20%)	12 (20.3%)	2 (18.2%)
Parity status			
0	6 (8.6%)	3 (5.1%)	3 (27.3%)
1–2	49 (70%)	44 (74.6%)	5 (45.5%)
3 and more	15 (21.4%)	12 (20.3%)	3 (27.3%)
Localization of tumour			
Right breast	35 (50%)	29 (49.2%)	6 (54.5%)
Left breast	35 (50%)	30 (50.8%)	5 (45.5%)
Diameter of the tumour			
T1 < 2 cm	45 (64.3%)	45 (76.3%)	0 (0%)
2 cm < T2 < 5 cm	25 (35.7%)	14 (23.7%)	11 (100%)
Lymph node status			
N0	51 (72.9%)	45 (76.3%)	6 (54.5%)
N1	19 (27.1%)	14 (23.7%)	5 (45.5%)
Histological type			
IDC	59 (72.9%)	49 (83.1%)	10 (90.9%)
ILC	11 (27.1%)	10 (16.9%)	1 (9.1%)
Grade according to Elston-Ellis			
1 + 2	53 (75.7%)	45 (76.3%)	8 (72.7%)
3	17 (24.3%)	14 (23.7%)	3 (27.3%)
Molecular type			
Luminal A (HR+/HER2−/Ki-67 < 20%)	41 (58.6%)	38 (64.4%)	3 (27.3%)
Luminal B (HR+/HER2−/Ki-67 ≥ 20%)	14 (20%)	9 (15.3%)	5 (45.5%)
Luminal B HER2+ (HR+ HER2+)	7 (10%)	6 (8.6%)	1 (9.1%)
Triple negative (HR-/HER2-)	8 (11.4%)	6 (8.6%)	2 (18.2%)
Staging			
I	31 (44.3%)	30 (50.8%)	1 (9.1%)
II	39 (55.7%)	29 (49.2%)	10 (90.9%)
Progesterone receptor (PR)			
Negative	16 (22.9%)	13 (22%)	3 (27.3%)
Positive	54 (77.1%)	46 (78%)	8 (72.7%)
Oestrogen receptor (ER)			
Negative	11 (27.1%)	9 (15.3%)	2 (18.2%)
Positive	59 (72.9%)	50 (84.7%)	9 (81.8%)
E-cadherin			
Negative	5 (7.1%)	5 (8.5%)	0 (0%)
Positive	65 (92.9%)	54 (91.5%)	11 (100%)

Table 1. Cont.

Demographic and Clinical Data	Overall (n = 70)	Patients without Progression (n = 59)	Patients with Progression (n = 11)
	n (%)		
Ki-67			5 (45.5%)
<20%	43 (61.4%)	38 (64.6%)	6 (54.5%)
≥20%	27 (38.6%)	21 (35.6%)	
Comorbidities			
Heart attack	3 (4.3%)	3 (5.1%)	0 (0%)
Hypertension	17 (24.3%)	16 (27.1%)	1 (9.1%)
Diabetes	1 (1.4%)	1 (1.7%)	0 (0%)

Abbreviations: BMI: body mass index; N0: no evidence of spread to lymph nodes; N1: spread to axillary lymph nodes; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; HR+: hormone receptor positive; HR-: hormone receptor negative; HER2-: human epidermal growth factor receptor 2 negative; HER2+: human epidermal growth factor receptor 2 positive; Ki-67: marker of proliferation Ki-67.

2.2. Adjuvant Therapy

Adjuvant treatment was administered according to standard guidelines established by the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines for Practice. Radiotherapy was applied mainly for patients who underwent BCS within 1–2 weeks after the adjuvant chemotherapy completion. The study group received a median dose of 42.5 gray (Gy) in 17–20 fractions over 4–6 weeks to the chest wall by using X photons with energies of 6/15 MeV. Using a direct electron field, a sequential boost of 10/12.5 Gy was administered to the initial tumour bed in 17 patients (24.3%) in four/five fractions. In thirty-six subjects (51.4%), additional brachytherapy in a dose of 10 Gy was applied. Thirty-five subjects (50.0%) received adjuvant chemotherapy. Twenty-five (35.7%) patients had anthracycline-containing drugs administered and non-anthracycline-containing drugs were used in ten patients (14.3%). In fifty-eight subjects (82.9%), endocrine therapy was applied according to menopausal status; 35 (50.0%) used tamoxifen (Egis Pharmaceuticals, Budapest, Hungary), 13 of patients (18.6%) received aromatase inhibitors (AIs) (Arimidex (anastrozole), AstraZeneca, Cambridge, United Kingdom), and in 8 patients (11.4%) the combination of tamoxifen and AIs was given, but 2 patients (2.9%) underwent another endocrine scheme, in an adjuvant setting. In twelve subjects (17.1%), endocrine therapy was not administered due to a small tumour diameter or a triple-negative (ER−/PR−/HER2−/Ki67—all values) subtype of BrC.

2.3. Patients Follow-Up

The patients were followed up from the day of the diagnosis of BrC until the date of recurrence of breast cancer or death or until January 2023, whichever came first. Kaplan–Meier curves were created to present overall and disease-free survival. The median follow-up was 78 months (IQR = 70–84 months), with a 15.7% recurrence rate. The follow-up visits after nine months from surgical procedures were performed for each patient.

2.4. Blood Collection

The blood collection occurred two times, 24 h before the surgical procedure (pre-treatment value) and a maximum of three months after the last cytotoxic infusion and generally nine months (interquartile range, IQR = 6.0–10.0) after tumour resection (post-treatment value) to avoid the direct effects of chemotherapy or surgical wound healing on the analysed parameters. The blood from each patient was collected into serum-separating tubes to determine the AOPP concentration. After collection, the samples were mixed and centrifuged at 3000 × g at 4 °C for 15 min, divided into small tubes, and stored at −80 °C until assayed. The blood was also drawn into EDTA-containing tubes for measurements of VEGF-A and soluble forms of VEGF receptor types 1 and 2. The blood samples were

immediately mixed and centrifuged at $3000\times g$ at 4°C for 20 min. The collected plasma was aliquoted in small portions and stored at -80°C until each measurement.

2.5. Measurements of AOPP

The AOPP level in serum was determined, according to the modified method reported by Witko-Sarsat, by absorbance measurements at 340 nm [49]. The AOPP detection was modified, in agreement with Hanasand's improved method, by using citric acid instead of acetic acid, which improves the stability of the sample over time [50]. The first step of the procedure was preparing a reactant mixture containing 1.875 mL of 0.2 M citric acid and 25 μL of 1.16 M potassium iodide. Afterwards, the mixture in the volume of 1.9 mL was mixed with 100 μL of serum. The absorbance was measured immediately after preparation. The results were expressed in μM as chloramine T equivalents.

2.6. Measurements of Angiogenic Factors

The concentrations of angiogenic parameters were determined according to the procedure described in the previous study [51]. The subjects were divided into groups with low or high values of angiogenic biomarkers by using a cut-off based on the calculated median for the study group.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using Statistica version 13.3 (StatSoft®, Cracow, Poland). The normality of the distribution was checked by using the Shapiro–Wilk test. The unpaired Student's *t*-test was used to compare two groups of continuous data with normal distribution. The univariate ANOVA analysis, followed by a post hoc LSD (least significant difference) test, was applied to compare more than two groups of continuous data. Comparisons of means for two dependent variables were performed by paired Student's *t*-test. AOPP data are presented as mean and standard deviation. Spearman's rank correlation analysis was used to determine dependencies between investigated parameters. The receiver operating characteristic (ROC) was used to utilise the area under a curve (AUC) to estimate the best predictor of cancer relapse. Youden's method was applied to define the optimal cut-off values. The disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) analysis were expressed using the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test. DFS and OS were calculated as times from randomization until breast cancer recurrence or death, respectively. The uni- and multivariate Cox proportional hazard analysis was conducted to estimate cohort-specific hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs) for the association between AOPP levels and other clinical variables with disease-free and overall survival time to identify a possible predictor that has a significant influence on these times. AOPP concentration was also included in multiple linear regression models with adjustments for BMI, age, parity, menopausal status, smoking status, tumour stage, tumour diameter, histological type, and nodal involvement. Additionally, to emphasize the strength of AOPPs as a prognostic marker of disease recurrence (Figure S1) and cancer-related death (Figure S2), we compared the diagnostic accuracy of AOPPs with Ki-67 and the tumour diameter using the ROC curves. The statistical data were considered significant with $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of Undergone Procedures, Clinical, and Molecular Characteristics on AOPP Concentration

The studied group, enrolled between November 2015 and June 2017, consisted of 70 women with resected breast cancer (BrC) in the early stage (IA–IIB). The median age of subjects at the diagnosis was 54 years (interquartile range (IQR) 49–59 years). The median body mass index value was 24.99 kg/m^2 (IQR $22.48\text{--}29.04\text{ kg/m}^2$). The median size of the tumours was 1.55 cm (IQR 1.2–2.2 cm). All patients with cancer progression ($n = 11$) had a tumour diameter of above 2 cm. Forty-five patients (64.3%) were in post-menopausal status. The predominant histopathological subtype of breast tumour was

invasive ductal carcinoma (IDC) at 84.3% of all studied patients, and 90.9% of the group had progression of the disease. Of the 70 women treated with adjuvant chemotherapy, 25 received anthracycline-containing drugs and 10 non-anthracycline therapy. None of the patients received neoadjuvant treatment.

The pre- and post-treatment AOPP concentrations were assessed according to undergone therapy procedures (Table 2). Interestingly, non-anthracycline therapy seemed to be associated with significantly elevated post-treatment AOPP concentration in comparison to patients who did not receive chemotherapy ($p = 0.0086$). Moreover, patients treated with non-anthracycline chemotherapy seem to have elevated concentrations of AOPPs during therapy, with the p -value close to statistical significance ($p = 0.0996$). The opposite observation in the AOPP level, also with closeness to statistical significance, was made for the group of patients not treated with any additional chemotherapy ($p = 0.0778$). However, tamoxifen administration seemed to decrease the post-treatment AOPP concentration in comparison to no adjuvant endocrine therapy ($p = 0.0407$). AOPP levels were found to increase during treatment among patients who were not treated with endocrine therapy ($p = 0.0254$).

Table 2. Levels of AOPPs in breast cancer patients before and after treatment.

Feature/ Number of Patients (%)	Pre-Treatment AOPP Concentration [μ M] $n = 70$	Post-Treatment AOPP Concentration [μ M] $n = 67$ #	Pre-Treatment vs. Post-Treatment AOPPs $n = 67$ # p -Value
Surgery	$p = 0.5737$	$p = 0.8831$	
BCS + Radiotherapy $n = 58/55$ (82.9%/82.1%)	8.69 (1.17)	8.40 (2.44)	0.3260
Mastectomy $n = 12/12$ (17.1%/17.9%)	8.89 (0.78)	8.52 (2.72)	0.6745
Chemotherapy	$p = 0.3471$	$p = 0.0283$	
Anthracycline $n = 25/24$ (35.7%/35.8%)	8.84 (1.07)	8.59 (2.29)	0.6074
Non-anthracycline $n = 10/9$ (14.3%/13.4%)	9.06 (0.86)	10.24 * (1.25)	<u>0.0996</u>
No $n = 35/34$ (50%/50.7%)	8.54 (1.19)	7.82 (2.63)	<u>0.0778</u>
Endocrine therapy	$p = 0.9639$	$p = 0.3461$	
Tamoxifen $n = 35/34$ (50%/50.7%)	8.70 (1.06)	8.08 ** (2.94)	0.1910
Inhibitor aromatase $n = 13/13$ (18.6%/19.4%)	8.68 (1.35)	8.17 (2.09)	0.2273
Tamoxifen and inhibitor aromatase $n = 8/8$ (11.4%/11.9%)	9.00 (1.10)	8.36 (1.66)	0.1577
Other type $n = 2/2$ (2.9%/3%)	8.54 (0.95)	8.50 (0.45)	0.9745
No $n = 12/10$ (17.1%/14.9%)	8.70 (1.16)	9.93 (1.46)	0.0254
Brachytherapy	$p = 0.6461$	$p = 0.5656$	
Yes $n = 36/36$ (51.4%/53.7%)	8.67 (1.23)	8.58 (2.44)	0.8275
No $n = 34/31$ (48.6%/46.3%)	8.79 (0.97)	8.23 (2.53)	0.1815

Abbreviations: AOPP: advanced oxidation protein products; BCS: breast-conserving surgery. Data are expressed as a mean and standard deviation (SD). Significant differences are denoted in bold. The underlined p -values represent closeness to statistical significance. * $p < 0.0086$ vs. No chemotherapy; ** $p < 0.0407$ vs. No endocrine therapy; # The post-treatment AOPP measurements included 67 subjects due to a lack of biological samples from three women.

In Table 3, we present the pre- and post-treatment concentrations of AOPPs regarding some typical clinical features of breast tumour patients. The localisation of the malignancy in the left breast seems to be related to higher pre-treatment AOPP concentrations ($p = 0.0056$). However, there are no differences between the levels of AOPPs before and after the treatment according to the localisation of cancer ($p > 0.05$). In agreement with molecular subtypes of breast cancer, we found a significantly higher pre-treatment concentration of AOPPs in patients with luminal B HER2- than in those with other types ($p < 0.0001$). Interestingly, a significantly higher level of AOPPs was found in the group with luminal B HER2+ and non-luminal HER2+ than in the luminal A patients ($p = 0.0053$). After the treatment, a significantly lower concentration of AOPPs was shown in the luminal A breast cancer group than with other types ($p < 0.0001$). Our analysis shows that the level of AOPPs decreased during the treatment in the luminal A group of patients; however, it increased in the group with triple-negative cancer with $p = 0.0102$ and $p = 0.0190$, respectively.

Table 3. AOPP levels in respect to clinical and pathological characteristics in breast cancer subjects.

Feature	Number of Patients (%)	Pre-Treatment AOPP Concentration [μM] $n = 70$	Post-Treatment AOPP Concentration [μM] $n = 67$ #	Pre-Treatment vs. Post-Treatment AOPPs $n = 67$ # p -Value
Tumour localisation		$p = 0.0056$	$p = 0.5014$	
Left breast	35/33 (50%/49.3%)	9.09 (1.09)	8.63 (2.19)	0.1685
Right breast	35/34 (50%/50.7%)	8.36 (1.02)	8.22 (2.74)	0.7493
Molecular subtypes		$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	
Luminal A	41/40 (58.6%/59.7%)	8.23 (0.79)	7.27 *** (2.18)	0.0102
Luminal B HER2-	14/14 (20%/20.9%)	10.05 * (0.86)	10.20 (2.29)	0.7808
Luminal B HER2+ and Non-Luminal HER2+	7/7 (10%/10.4%)	9.24 ** (1.03)	9.75 (0.98)	0.4711
Triple negative	8/6 (11.4%/9%)	8.50 (1.01)	10.32 (1.39)	0.0190
Tumour diameter		$p = 0.0288$	$p = 0.0006$	
T1 2 cm	45/43 (64.3%/64.2%)	8.51 (1.03)	7.68 (2.06)	0.0174
2 cm < T2 < 5 cm	25/24 (35.7%/35.8%)	9.11 (1.16)	9.76 (2.61)	0.1671
Nodal status		$p = 0.8878$	$p = 0.5610$	
N0	51/48 (72.9%/71.6%)	8.74 (1.13)	8.53 (2.33)	0.5414
N1	19/19 (27.1%/28.4%)	8.69 (1.09)	8.14 (2.84)	0.3264
Stage of disease		$p = 0.1465$	$p = 0.2139$	
IA	31/29 (44.3%/43.3%)	8.51 (1.11)	7.99 (1.91)	0.2416
IIA + IIB	39/38 (55.7%/56.7%)	8.90 (1.09)	8.75 (2.80)	0.6761

Table 3. Cont.

Feature	Number of Patients (%)	Pre-Treatment AOPP Concentration [μM] <i>n</i> = 70	Post-Treatment AOPP Concentration [μM] <i>n</i> = 67 #	Pre-Treatment vs. Post-Treatment AOPPs <i>n</i> = 67 # <i>p</i> -Value
Elston and Ellis grade		<i>p</i> = 0.2782	<i>p</i> = 0.0890	
G1 + G2	53/51 (75.7%/76.1%)	8.64 (1.20)	8.13 (2.50)	0.1016
G3	17/16 (24.3%/23.9%)	8.98 (0.72)	9.34 (2.17)	0.4938
Histological type		<i>p</i> = 0.0115	<i>p</i> = 0.1471	
IDC	59/56 (84.3%/83.6%)	8.87 (1.12)	8.62 (2.45)	0.4067
ILC	11/11 (15.7%/16.4%)	7.96 (0.65)	7.43 (2.46)	0.4581

Abbreviations: AOPP: advanced oxidation protein products; HER2-: human epidermal growth factor receptor 2 negative; HER2+: human epidermal growth factor receptor 2 positive; N0: no evidence of spread to lymph nodes; N1: spread to axillary lymph nodes; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma. Data are expressed as a mean and standard deviation (SD). Significant differences are denoted by bold. The underlined *p*-values represent closeness to statistical significance; * *p* < 0.0001 vs. Luminal A, *p* = 0.0001 vs. Triple negative; *p* = 0.0427 vs. Luminal B HER2+ and Non-Luminal HER2+; ** *p* = 0.0053 vs. Luminal A; *** *p* < 0.0001 vs. Luminal B HER2-; *p* = 0.0006 vs. Luminal B HER2+ and Non-Luminal HER2; *p* = 0.008 vs. Triple negative. # The post-treatment AOPP measurements included 67 subjects due to a lack of biological samples from three women.

The conducted study also reveals that the tumour diameter slightly affects pre- (*p* = 0.0288) and strongly post-treatment (*p* = 0.0006) AOPP concentrations. Importantly, a tumour diameter < 2 cm is strongly related to a decreasing concentration of AOPPs during therapy (*p* = 0.0174). Nodal involvement and stage of disease seem to not have any impact on the level of measured oxidation protein products (*p* > 0.05). A tendency toward statistical significance was found for the group of women with grades 1 and 2 and related to the lower concentration of post-treatment AOPPs than in the group of patients with grade 3 according to the Elston and Ellis scale (*p* = 0.0890). The group of women with the IDC type of tumour demonstrated significantly higher values of pre-treatment AOPPs than the group with the invasive lobular carcinoma (ILC) type (*p* = 0.0115).

To better understand the relationship between molecular biomarkers and the level of oxidative damage, the pre- and post-treatment concentrations of AOPPs were tested according to immunohistochemical markers of breast cancer (Table 4). It should be highlighted that overexpression of Ki-67 was related to elevated pre- and post-treatment levels of AOPPs (*p* = 0.0001 and *p* = 0.0041, respectively).

The status of the oestrogen receptor (ER) seems to have significant importance in the post-treatment concentration of AOPPs (*p* = 0.02) and be related to its increased value in the ER-negative group of breast cancer patients. A similar observation was also made for the expression of progesterone receptor (PR) (*p* = 0.0187). Additionally, the higher values of AOPPs after treatment in the ER-negative group of patients are also of considerable importance (*p* = 0.0360). The same relation is also shown by the group of PR-negative patients with a tendency to statistical significance (*p* = 0.0995). It is worth mentioning that both ER-positive and PR-positive groups are related to decreasing AOPP concentrations after therapy, with a tendency to statistical significance (*p* = 0.0617, *p* = 0.0739, respectively).

The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and the status of E-cadherin seem to have no impact on the concentrations of AOPPs before and after undergoing procedures (*p* > 0.05).

Table 4. The AOPP concentrations according to molecular characteristics in breast cancer cases.

Feature	Number of Patients (%)	Pre-Treatment AOPP Concentration [μM] <i>n</i> = 70	Post-Treatment AOPP Concentration [μM] <i>n</i> = 67 [#]	Pre-Treatment vs. Post-Treatment AOPPs <i>n</i> = 67 [#] <i>p</i> -Value
Expression of Ki-67		<i>p</i> = 0.0001	<i>p</i> = 0.0041	
<20%	43/42 (61.4%/62.7%)	8.35 (0.89)	7.79 (2.64)	0.1748
≥20%	27/25 (38.6%/37.3%)	9.36 (1.17)	9.56 (1.63)	0.7258
Expression of HER2		<i>p</i> = 0.2022	<i>p</i> = 0.1688	
Positive	7/6 (10%/9%)	9.24 (1.03)	9.75 (0.98)	0.1918
Negative	63/61 (90%/91%)	8.67 (1.11)	8.29 (2.54)	0.4711
Hormone receptor status				
ER+	59/58 (84.3%/86.6%)	<i>p</i> = 0.6436 8.70 (1.12)	<i>p</i> = 0.0200 8.15 (2.50)	<u>0.0617</u>
ER-	11/9 (15.7%/13.4%)	8.87 (1.06)	10.19 (1.29)	0.0360
PR+	54/53 (77.1%/79.1%)	<i>p</i> = 0.2128 8.64 (1.15)	<i>p</i> = 0.0187 8.06 (2.59)	<u>0.0739</u>
PR-	16/14 (22.9%/20.9%)	9.03 (0.91)	9.79 (1.29)	<u>0.0995</u>
E-cadherin status		<i>p</i> = 0.0862	<i>p</i> = 0.2403	
Positive	65/62 (92.9%/92.5%)	8.79 (1.11)	8.52 (2.44)	0.3643
Negative	5/5 (7.1%/7.5%)	7.91 (0.74)	7.17 (2.80)	0.5055

Abbreviations: AOPP: advanced oxidation protein products; Ki-67, proliferation marker; HER, human epidermal growth factor receptor 2; ER, oestrogen receptor; PR, progesterone receptor. Data are expressed as a mean and standard deviation (SD). Significant differences are denoted by bold. An underlined *p*-value represents closeness to statistical significance. [#] The post-treatment AOPP measurements included 67 subjects due to a lack of biological samples from three women.

3.2. The Dependence between AOPP Levels and Angiogenic Biomarkers

To assess the relationship between the level of the pre-treatment AOPPs on angiogenic biomarkers, breast cancer patients were divided into three subgroups according to pre-treatment AOPP levels below the 25th percentile (low), between the 25th and 75th percentile (moderate), and above the 75th percentile (high) (Table 5). This analysis showed that the concentration of pre-treatment VEGF-A significantly elevated with the increase in pre-treatment AOPP level (*p* = 0.0051). The concentration of pre-treatment sVEGFR1 was found to be the lowest for the group with pre-treatment AOPPs above 9.45 μM, with closeness to statistical significance (*p* = 0.0685).

Table 5. Pre-treatment levels of angiogenic biomarkers according to pre-treatment AOPP concentrations.

Parameter [units]	AOPP Low ($<7.87 \mu\text{M}$) $n = 12$	AOPP Moderate ($7.87\text{--}9.45 \mu\text{M}$) $n = 41$	AOPP High ($>9.45 \mu\text{M}$) $n = 17$	<i>p</i> -Value
VEGF-A concentration [pg/mL]	36.78	64.87	74.12	0.0051
sVEGFR1 concentration [pg/mL]	80.82	30.29	24.45	<u>0.0685</u>
sVEGFR2 concentration [pg/mL]	8468.45	9778.25	9182.05	0.8836

Abbreviations: AOPP: advanced oxidation protein products; VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2. Significant differences are denoted by bold *p*-values. An underlined *p*-value represents closeness to statistical significance.

In the next step, Spearman's correlation analysis was performed to find associations between AOPP levels and concentrations of angiogenic biomarkers. The results illustrated in Table 6 indicate the positive correlation between pre-treatment AOPPs and the concentration of VEGF-A, which is a key mediator of angiogenesis ($r = 0.2415$, $p = 0.0440$). The pre-treatment sVEGFR1 concentration shows a tendency toward statistically significant negative relation with the post-treatment level of AOPPs ($r = -0.2317$, $p = 0.0592$). A statistically significant association between post-treatment AOPP levels and the concentration of sVEGFR2 was also found. Post-treatment AOPP concentration increases were related to a decrease in the value of sVEGFR2 after treatment ($r = -0.3330$, $p = 0.0059$). Post-treatment AOPP concentration also positively correlates with the level of AOPPs before treatment ($r = 0.4103$, $p = 0.0006$).

Table 6. Spearman's correlation analysis between AOPPs and angiogenic factors.

Parameters [Concentration]	AOPP			
	Pre-Treatment		Post-Treatment	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Pre-treatment AOPPs [μM]	---	---	0.4103	0.0006
Post-treatment AOPPs [μM]	0.4103	0.0006	---	---
Pre-treatment VEGF-A [pg/mL]	0.2415	0.0440	−0.0668	0.5914
Post-treatment VEGF-A [pg/mL]	0.1253	0.3013	0.1574	0.2033
Pre-treatment sVEGFR1 [pg/mL]	−0.1061	0.3822	−0.2317	<u>0.0592</u>
Post-treatment sVEGFR1 [pg/mL]	−0.0498	0.6822	−0.1085	0.3821
Pre-treatment sVEGFR2 [pg/mL]	−0.0369	0.7615	0.0128	0.9184
Post-treatment sVEGFR2 [pg/mL]	−0.1770	0.1426	−0.3330	0.0059

Abbreviations: AOPP: advanced oxidation protein products; VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2; *r*: Spearman's correlation coefficient; significant differences are denoted by bold *p*-values. An underlined *p*-value represents closeness to statistical significance.

3.3. The Receiver Operating Characteristic (ROC) for Identifying Markers of Disease Progression

The next step of the analysis was constructing the ROC curves to identify the most accurate parameter in predicting cancer relapse and obtain the optimal cut-off values for the examined markers before as well as after treatment. The results received from the performed analysis are shown in Tables 7 and 8.

Table 7. Results of predictive accuracy for pre-treatment AOPPs, VEGF-A, sVEGFR1, and sVEGFR2.

ROC Data	Pre-Treatment AOPP Concentration	Pre-Treatment VEGF-A Concentration	Pre-Treatment sVEGFR1 Concentration	Pre-Treatment sVEGFR2 Concentration
AUC	0.773	0.597	0.606	0.532
Youden index	0.51	0.28	0.35	0.18
Cut-off point	9.37	74.12	37.81	4626.99
Sensitivity (%)	78	81.8	90.9	18.2
Specificity (%)	72.7	45.8	44.1	100.0
Positive predictive Value (%)	38.1	22.0	23.3	100.0
Negative predictive Value (%)	93.9	93.1	96.3	86.8
Accuracy (%)	77.1	51.4	51.4	87.1
<i>p</i> -Value	0.0005	0.3453	0.1945	0.7555

Abbreviations: AOPP: advanced oxidation protein products; VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2; AUC: area under the curve. Significant differences are denoted by bold *p*-values.

Table 8. Results of predictive accuracy for post-treatment AOPPs, VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2.

ROC Data	Post-Treatment AOPP Concentration	Post-Treatment VEGF-A Concentration	Post-Treatment sVEGFR1 Concentration	Post-Treatment sVEGFR2 Concentration
AUC	0.86	0.532	0.578	0.596
Youden index	0.71	0.24	0.34	0.25
Cut-off point	10.39	39.92	386.5	7230.0
Sensitivity (%)	81.8	36.4	100.0	63.6
Specificity (%)	89.3	88.1	33.9	61.0
Positive predictive Value (%)	60.0	36.4	22.0	23.3
Negative predictive Value (%)	96.2	88.1	100.0	90.0
Accuracy (%)	88.1	80.0	44.3	61.4
<i>p</i> -Value	<0.0001	0.7817	0.3178	0.2455

Abbreviations: AOPP: advanced oxidation protein products; VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2; AUC: area under the curve. Significant differences are denoted by bold *p*-values.

The borderline of the diagnostic usefulness of the test was set according to the area under the ROC curve (AUC) ≥ 0.5 and $p < 0.05$. The conducted study of pre-treatment concentrations revealed that the highest level of predictiveness was found for AOPPs (AUC = 0.773, $p = 0.0005$). The ROC curve identified a serum AOPP concentration of 9.37 μM , with 78% sensitivity and 72.7% specificity, as the best cut-off value to predict the risk of cancer relapse. For this analysis, the other pre-treatment examined parameters showed no predictive value in our study group.

Interestingly, based on the ROC data for post-treatment concentrations of investigated markers, the AOPP value was also found to be the best marker for the prediction of cancer recurrence. The optimal cut-off value was 10.39 μM . The AUC was 0.86, p -value < 0.0001 , with a sensitivity of 81.8%, and a specificity of 89.3%.

Finally, Figure 2 demonstrates a graph with nine ROC curves for the Ki-67 expression, pre- and post-treatment concentrations of AOPP, VEGF-A, sVEGFR1, and sVEGFR2. The most accurate indicator for disease recurrence presents an area of 0.86 under the curve, which was reached for post-treatment AOPPs ($p < 0.0001$).

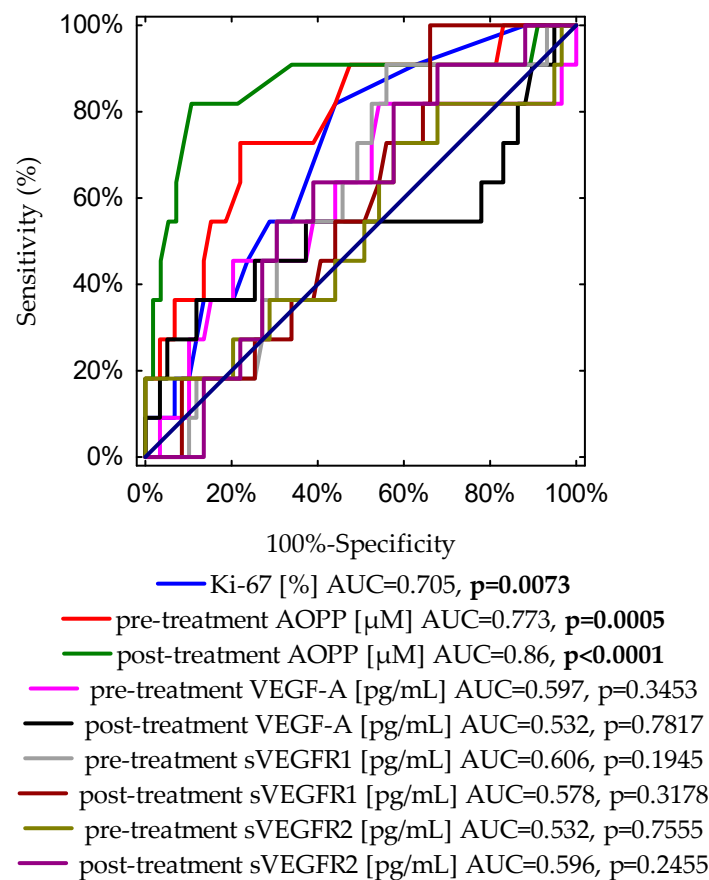


Figure 2. A graph showing nine ROC curves for the Ki-67 expression, pre- and post-treatment concentrations of AOPPs, VEGF-A, sVEGFR1 and sVEGFR2 with different values of area under the curve (AUC) and p -values for predicting disease-free survival.

In addition, to compare the diagnostic accuracies of pre- and post-treatment AOPP concentrations, and typical prognostic biomarkers of disease recurrence, such as Ki-67 expression and tumour diameter, we conducted an additional ROC curve analysis (Figure S1). Importantly, the highest level of discrimination was found for the post-treatment AOPP concentration (AUC = 0.86, $p < 0.0001$). The receiver operating characteristic curve identified a post-treatment AOPP level of 10.39 μM , with 89.3% specificity and 81.8% sensitivity, as the best cut-off value to discriminate between relapse and non-relapse disease subjects. According to the ROC curve, cut-off points determined for other analysed parameters were as follows: for Ki-67 expression, the cut-off value was 15% with 55.9% specificity and 81.8% sensitivity (AUC = 0.705, $p = 0.0073$); the cut-off value for pre-treatment AOPP concentration was 9.37 μM with 78% specificity and 72.7% sensitivity (AUC = 0.773, $p = 0.0005$); for the tumour diameter, the cut-off point was 1.8 cm with 62.7% specificity and 81.8% sensitivity (AUC = 0.769, $p = 0.0001$).

3.4. Survival Analysis Regarding Pre- and Post-Treatment AOPP Concentrations

Subsequently, the cut-off points received from the ROC curve and the calculated medians for pre- and post-treatment AOPP concentrations were used to create Kaplan–Meier curves (Table 9). The study subjects were divided into two groups: below and above the cut-off points. The overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) were calculated for each group.

Table 9. Calculated medians and ROC cut-off point values of AOPPs before and after treatment.

	Pre-Treatment AOPP Concentration (μM)	Post-Treatment AOPP Concentration (μM)
Medians	8.74	8.50
ROC cut-off points	9.37	10.39

For this analysis, almost all the determined cut-off values showed predictive value in our cohort (Figure 3A–H). Patients with a pre-treatment concentration of AOPPs above 9.37 μM had significantly worse OS than patients with AOPPs < 9.37 μM with $p = 0.0093$ (Figure 3C). However, the Kaplan–Meier curve determined according to the median of the pre-treatment level of AOPPs showed only closeness to statistical significance in the probability of OS ($p = 0.0626$) (Figure 3A). This observation discriminates against the use of the median as the ideal cut-off point and favours the use of the ROC cut-off point, which is much better at separating low-risk and high-risk patients for overall survival and cancer recurrence.

It is important to underline that the post-treatment AOPP concentration above 8.50 μM was related to poorer OS than the AOPP level below 8.50 μM with $p = 0.0106$ (Figure 3E). The same observation was made for the post-treatment AOPP concentration (Figure 3G), with the cut-off point obtained from the ROC curve ($p < 0.0001$).

Figure 3B,D presents the probability of disease-free survival for pre-treatment AOPP concentration according to the median or ROC cut-off point. The pre-treatment AOPP levels above 8.74 μM (Figure 3B) and above 9.37 μM (Figure 3D) were found and associated with a significantly increased probability of cancer relapse ($p = 0.0185$ and $p = 0.0007$, respectively).

Markedly, breast cancer patients with a post-treatment level of AOPPs above 8.50 μM were characterised as having lower DFS than the group with a concentration below 8.50 μM (Figure 3F) ($p = 0.0028$). A similar outcome was obtained for the post-treatment AOPP concentration (Figure 3H), with the cut-off point determined from the ROC curve ($p < 0.0001$).

Furthermore, the univariate Cox proportional hazards models of the disease-free survival and overall survival group (Table 10) were investigated to determine the risk score associated with biomarkers and to evaluate whether they could be independent prognostic factors for DFS or OS. The univariate analysis revealed that patients with AOPP levels below 8.74 μM before treatment have a significantly lower risk of shorter DFS compared to those with higher concentration (HR = 0.19, 95% CI 0.04–0.89, $p = 0.0346$). Moreover, a similar observation was also made for the post-treatment AOPP level; its decreased concentration was found to have a positive effect on the length of time without relapse of disease (HR = 0.08, 95% CI 0.01–0.66, $p = 0.0185$). The other investigated parameters showed no prognostic value on DFS in our cohort ($p > 0.05$).

Based on the results in Table 10, only the post-treatment AOPP concentration seems to have any impact on OS prediction. Its higher level, found in the univariate analysis, seems to be associated with poorer OS prognosis (HR = 0.11, 95% CI 0.01–0.86, $p = 0.0358$).

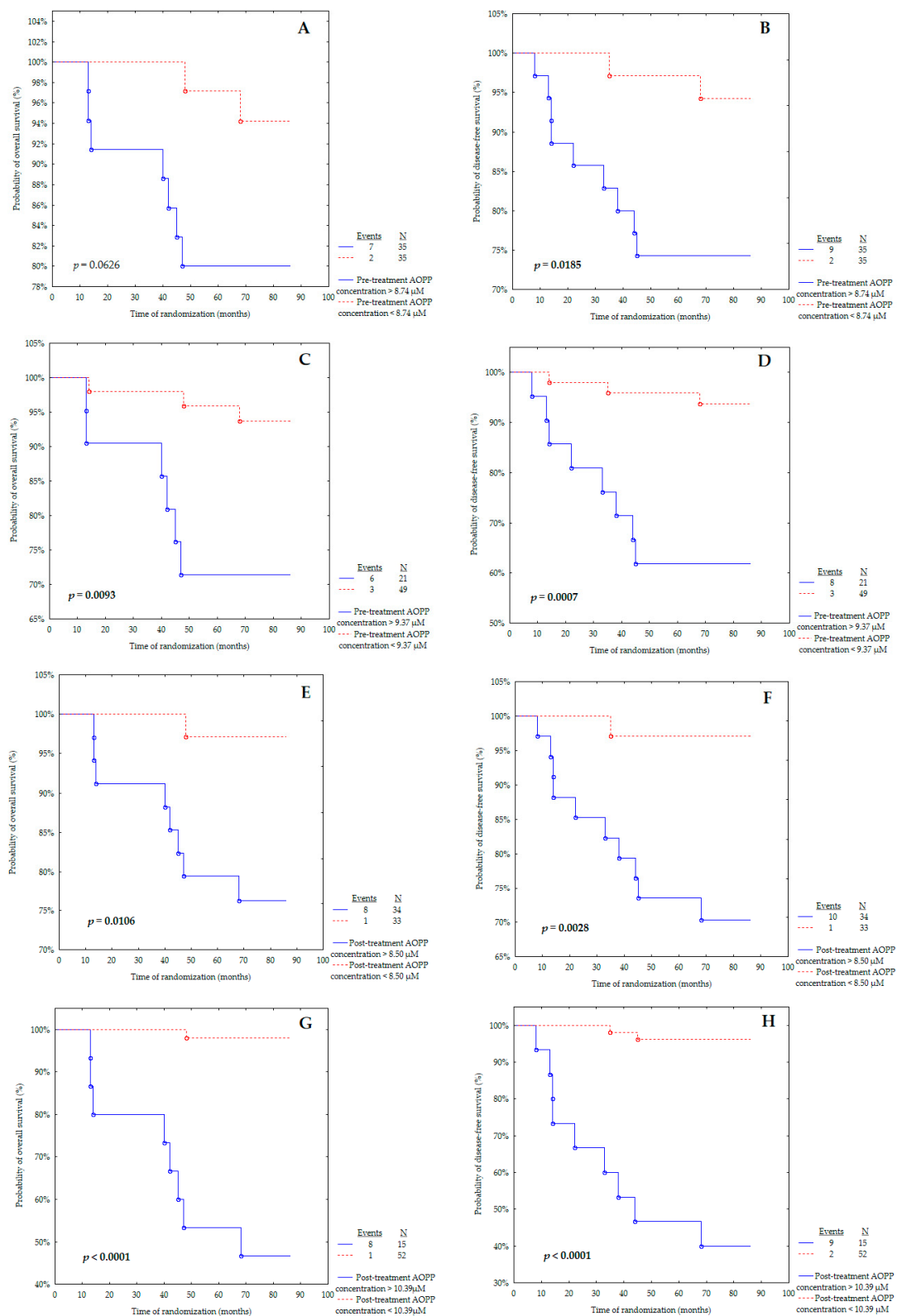


Figure 3. Kaplan–Meier curves for the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) analysis regarding (A,B) pre-treatment AOPP concentrations according to median; (C,D) pre-treatment AOPP concentrations according to ROC cut-off; (E,F) post-treatment AOPP concentrations according to median; (G,H) post-treatment AOPP concentrations according to ROC cut-off. Significant differences are marked by bold p -values.

Table 10. Univariate analysis (Cox regression) of pre- and post-treatment levels of variables in relation to disease-free survival (DFS) and overall survival (OS).

Variables	Univariate					
	DFS			OS		
	HR	95% CI	<i>p</i> -Value	HR	95% CI	<i>p</i> -Value
Pre-treatment AOPP concentration Low vs. High	0.19	(0.04–0.89)	0.0346	0.25	(0.05–1.21)	0.0847
Post-treatment AOPP concentration Low vs. High	0.08	(0.01–0.66)	0.0185	0.11	(0.01–0.86)	0.0358
Pre-treatment VEGF-A concentration Low vs. High	1.89	(0.55–6.46)	0.3101	3.85	(0.80–18.56)	0.0924
Post-treatment VEGF-A concentration Low vs. High	1.21	(0.37–3.96)	0.7552	1.28	(0.34–4.78)	0.7122
Pre-treatment sVEGFR1 concentration Low vs. High	1.89	(0.55–6.46)	0.3102	3.86	(0.80–18.60)	0.0921
Post-treatment sVEGFR1 concentration Low vs. High	1.26	(0.38–4.13)	0.7015	0.83	(0.22–3.11)	0.7873
Pre-treatment sVEGFR2 concentration Low vs. High	0.85	(0.26–2.79)	0.7905	1.29	(0.35–4.80)	0.7057
Post-treatment sVEGFR2 concentration Low vs. High	1.87	(0.55–6.39)	0.3181	3.76	(0.78–18.09)	0.0988

Abbreviations: DFS: disease-free survival; OS: overall survival; HR: hazard ratio; CI: Confidence interval; AOPP: advanced oxidation protein products; VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2. Significant differences are marked by bold *p*-values.

Furthermore, the multivariate Cox-proportional hazards models of the DFS and OS group, adjusted for age at the diagnosis, stage of the disease, nodal involvement, and expressions of ER, PR, HER2, and Ki-67 were investigated to determine the risk score associated with biomarkers and to evaluate whether they could be independent prognostic factors for DFS or OS (Table 11). The conducted analysis clearly shows that there is a strong link between the pre- and post-treatment levels of AOPPs and the risk of breast cancer relapse ($p < 0.05$). This study revealed that lower concentrations of AOPPs before and after treatment were positive predictors of long-term DFS (HR = 0.16, 95% CI 0.03–0.82, $p = 0.0275$; HR = 0.08, 95% CI 0.01–0.66, $p = 0.0189$, respectively). Data from the OS analysis indicate that an elevated post-treatment AOPP level, adjusted for the seven covariates (HR = 0.09, 95% CI 0.01–0.81, $p = 0.0317$), was associated with higher hazards of death. The investigation highlighted that pre- and post-treatment concentrations of AOPPs are independent prognostic factors for OS and DFS in breast cancer patients.

Table 11. Multivariate analysis (Cox regression) of pre- and post-treatment levels of variables in relation to disease-free survival (DFS) and overall survival (OS).

Variables	Multivariate					
	DFS			OS		
	HR	95% CI	<i>p</i> -Value	HR	95% CI	<i>p</i> -Value
Pre-treatment AOPP concentration Low vs. High	0.16	(0.03–0.82)	0.028	0.2	(0.04–1.10)	<u>0.065</u>
Post-treatment AOPP concentration Low vs. High	0.08	(0.01–0.66)	0.019	0.09	(0.01–0.81)	0.031

Table 11. Cont.

Variables	Multivariate					
	DFS			OS		
	HR	95% CI	<i>p</i> -Value	HR	95% CI	<i>p</i> -Value
Pre-treatment VEGF-A concentration Low vs. High	1.45	(0.39–5.31)	0.578	2.81	(0.54–14.70)	0.22
Post-treatment VEGF-A concentration Low vs. High	0.48	(0.07–3.26)	0.45	0.63	(0.07–5.37)	0.67
Pre-treatment sVEGFR1 concentration Low vs. High	1.51	(0.41–5.59)	0.537	2.89	(0.56–15.04)	0.207
Post-treatment sVEGFR1 concentration Low vs. High	0.91	(0.25–3.38)	0.893	0.66	(0.16–2.77)	0.568
Pre-treatment sVEGFR2 concentration Low vs. High	0.38	(0.08–1.90)	0.239	0.6	(0.11–3.42)	0.568
Post-treatment sVEGFR2 concentration Low vs. High	2.74	(0.73–10.18)	0.133	7.35	(1.16–46.77)	0.035

Abbreviations: disease-free survival; OS: overall survival; HR: hazard ratio; CI: Confidence interval; AOPP: advanced oxidation protein products; VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2. Significant differences are marked by bold *p*-values. An underlined *p*-value represents closeness to statistical significance.

Additionally, we also evaluated the ROC curves to assess the diagnostic accuracies of the investigated variables for the prediction of overall survival in BrC subjects (Figure 4). This analysis indicates that in patients with BrC, next to Ki-67 expression, the cut-off value of 10.39 μ M of AOPPs may predict the occurrence of death with 87.9% specificity and 88.9% sensitivity.

Moreover, we evaluated the ROC curve to assess the diagnostic accuracies of pre- and post-treatment AOPPs and frequently examined variables for the prediction of the BrC death incidence, such as Ki-67 expression and tumour diameter (Figure S2). It is noteworthy that the post-treatment AOPP cut-off value of 10.39 μ M was found to be the best prognostic marker for the prediction of cancer-related death. Based on the ROC curve, cut-off points were provided for other determinants as follows: for Ki-67 expression, the cut-off value was 15% with 54.1% specificity and 77.8% sensitivity (AUC = 0.702, p = 0.0220); the cut-off value for pre-treatment AOPP concentration was 9.37 μ M with 75.4% specificity and 66.7% sensitivity (AUC = 0.726, p = 0.0128); for the tumour diameter, the cut-off point was 2.1 cm with 70.5% specificity and 77.8% sensitivity (AUC = 0.773, p = 0.0005).

Table 12 shows the results of linear regression models for the occurrence of breast cancer relapse according to concentrations of the examined predictors. The recurrence of breast tumour was positively associated with pre-treatment AOPP concentration. Models 1, 2, 3, and 4, adjusted for included independent factors, show that elevated levels of pre-treatment AOPPs are strongly associated with cancer recurrence (p = 0.0018, p = 0.0007, p < 0.0001, and p = 0.0196, respectively). Additionally, regarding the concentration of AOPP after therapy is undergone, a similar observation was made. There was a significant linear positive relationship between post-treatment AOPP levels and the risk of disease relapse according to all models (p < 0.05).

Interestingly, after adjusting for covariates in Model 3, the negative effect of the soluble form of pre-treatment VEGF receptor type 1 was shown, i.e., its increase is related to extended DFS (p = 0.0198). Apart from this, Model 4, adjusted for age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumour stage, tumour diameters, histological type, and nodal involvement, had a tendency toward statistical significance in a similar manner (p = 0.0593).

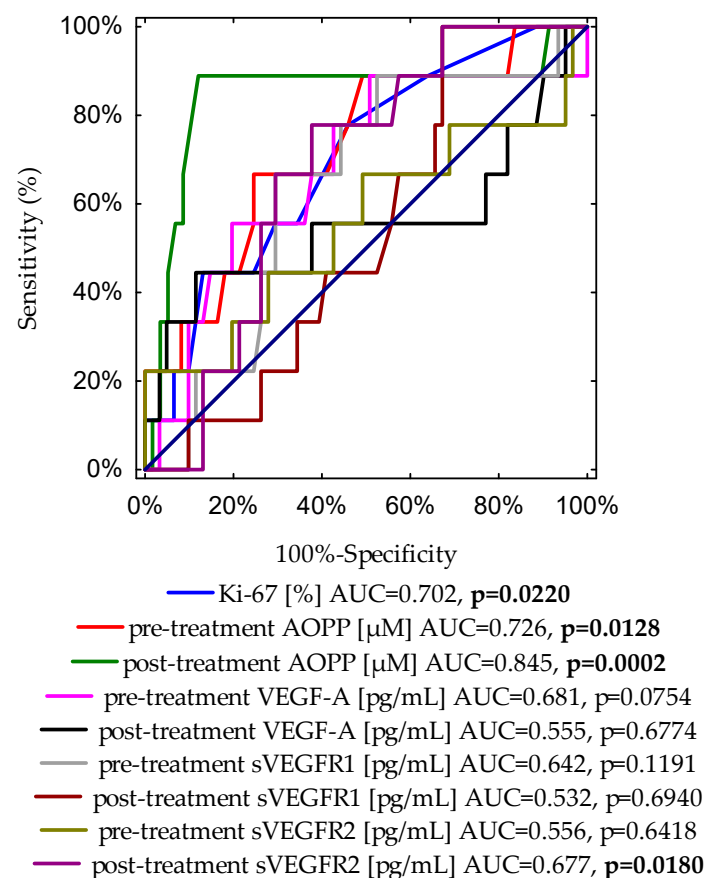


Figure 4. A graph showing nine ROC curves for Ki-67 expression, and pre- and post-treatment concentrations of AOPP, VEGF-A, sVEGFR1, and sVEGFR2 with different values of area under the curve (AUC) and p -values for predicting overall survival.

Table 12. Linear regression models for disease-free survival predictors in breast cancer patients.

		Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
Pre-treatment AOPP concentration	Beta	0.3695	0.4041	0.4912	0.3663
	p -value	0.0018	0.0007	<0.0001	0.0196
Post-treatment AOPP concentration	Beta	0.4737	0.4880	0.5805	0.4490
	p -value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0015
Pre-treatment VEGF-A concentration	Beta	0.0482	0.0934	0.0990	0.1416
	p -value	0.7090	0.4809	0.4640	0.2820
Post-treatment VEGF-A concentration	Beta	−0.0002	0.0498	0.0563	0.0422
	p -value	0.9986	0.7076	0.6744	0.7304
Pre-treatment sVEGFR1 concentration	Beta	−0.2009	−0.2184	−0.2862	−0.2234
	p -value	0.1029	0.0774	0.0198	<u>0.0593</u>
Post-treatment sVEGFR1 concentration	Beta	−0.1003	−0.1328	−0.1839	−0.1222
	p -value	0.4106	0.2872	0.1413	0.3127
Pre-treatment sVEGFR2 concentration	Beta	0.0267	0.0037	0.0547	0.1032
	p -value	0.8426	0.9783	0.6890	0.4371
Post-treatment sVEGFR2 concentration	Beta	−0.0978	−0.1279	−0.1177	−0.0570
	p -value	0.4269	0.3059	0.3465	0.6405

Model 1 adjusted for age; Model 2 adjusted for age, BMI, parity, menopausal status; Model 3 adjusted for age, BMI, parity, menopausal status, and smoking status; Model 4 adjusted for age, BMI, parity, menopausal status, smoking status, tumour stage, tumour diameters, histological type, nodal involvement. Abbreviations: AOPP: advanced oxidation protein products; VEGF-A: vascular endothelial growth factor A; sVEGFR1: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 1; sVEGFR2: soluble form of vascular endothelial growth factor receptor type 2. Significant differences are denoted by bold p -values; an underlined p -value represents closeness to statistical significance.

4. Discussion

Breast cancer, along with lung cancer, is the main cause of cancer-related deaths among women globally [1]. In the United States alone in 2023, it is estimated that about 297,790 women will be diagnosed with invasive breast cancer and about 43,700 women will die from breast cancer [52]. This clearly shows that it should be of great interest to find a useful marker, which could have a beneficial influence on the prediction of cancer-related events and give more information about the possible outcome of the patients in the early stage of the disease. The current study presents advanced AOPPs as a valuable biomarker for monitoring the course of BrC treatment and a predictor of cancer-related events.

AOPPs are dityrosine-containing and cross-linking protein products made as an effect of the reaction of albumin with chlorinated oxidants due to oxidative stress [53]. Significantly increased values of AOPPs in cancer patients compared to healthy subjects were found by some researchers [15,54–59]. The current study shows a positive correlation between pre-treatment AOPPs and VEGF-A, which could be evidence of a relationship between oxidative protein damage in breast cancer and excessive angiogenic process. The role of VEGF in pathological angiogenesis in malignant tumours is essential [60]. Interestingly, the current study shows that lower pre-treatment levels of sVEGFR1 and lower post-treatment levels of sVEGFR2 were related to elevated levels of post-treatment AOPPs. Elevated concentrations of AOPPs are associated with the intensification of neoplastic angiogenesis by increasing VEGF-A levels and reducing levels of sVEGFR1, which is a natural VEGF-A inhibitor. The interplay between the amount of oxidative damage enacted on proteins and angiogenic factors in cancerous disease is not fully understood, although it is suggested by Huang et al. that the VEGF signalling pathway is mainly controlled by the interactions between angiogenesis and oxidative stress [61]. Several studies have shown that the increased concentration of AOPP in diseases is associated with endothelial dysfunctions [17,62]. AOPPs serve mainly as an oxidative stress marker; however, some studies insinuate its role in the production of ROS, vascular inflammation, and an even pathogenic role in prostate cancer [22,57]. Huang et al. have observed the effect of AOPPs on the overexpression of VEGF and the elevated expression and secretion of sVEGFR1 in trophoblast cell lines. The authors have also suggested that AOPPs increase both the expression and secretion of VEGF in trophoblasts; however, they implicate that the increased secretion of sVEGFR1 overwhelms VEGF levels and leads to a reduction in VEGF's biological effect. The authors indicate that AOPPs play a key role in mediating trophoblasts' angiogenic regulation and signalling pathways [19]. However, Abd El-Khalik et al. have found a negative correlation between AOPPs and VEGF and a positive correlation between AOPPs and sVEGFR1 in patients with diabetic foot ulcers. The authors suggest that chronic inflammation in patients with diabetic foot ulcers, supported by the increased level of TNF- α , is associated with an enhanced production of sVEGFR1 and consequently a reduction in VEGF level [53].

Following this, we evaluated pre- and post-treatment AOPP concentrations according to treatment undergone as well as clinical, pathological, and molecular characteristics. Generally, in our cohort, the concentrations of AOPPs were decreased after the treatment procedures, which is in line with findings by Salehi et al. The authors indicated that the plasma AOPP levels decreased significantly in the colorectal cancer group 24 h after surgery. The authors suggest that the main culprit of the higher AOPP levels before surgery was the tumour [56]. On the contrary, Chiang et al. have observed a significantly higher concentration of plasma AOPPs four weeks after the resection of colorectal cancer compared to the level before surgery [63]. However, it is not known whether the findings by Chiang et al. can be associated with the persistent inflammatory status after resection of the tumour and/or with no information about the administration of additional therapy, which could potentially influence the oxidative status. Interestingly, an increase in AOPP levels after therapy was found in our group of patients not treated with adjuvant endocrine therapy. On the other hand, the administration of tamoxifen seemed to have the opposite effect on post-treatment AOPP concentrations, which were significantly decreased

compared to the group not treated with endocrine therapy. This observation agrees with Ek et al.'s finding that tamoxifen administration is a part of antioxidant defence and can beneficially prevent oxidative stress-related diseases in post-menopausal women [64]. Additionally, in our cohort, patients who received non-anthracycline-containing drugs had significantly higher levels of post-treatment AOPPs compared to the group who did not receive chemotherapy. Silva et al. have reported that the administration of tamoxifen or chemotherapy or combined treatment to breast cancer patients is related to changes in the level of AOPPs before and after therapeutic procedures. The authors found that the AOPP levels after treatment were significantly elevated in the group of subjects treated only with chemotherapy compared to those who received only tamoxifen or chemotherapy, followed by tamoxifen, and had a tendency to increase during the treatment. It is insisted by the authors that chemotherapy alone has a deleterious effect on the balance between the oxidant and antioxidant systems [65]. It is also suggested that some of the clinical and pathological features of breast cancer subjects may reflect the high risk of poor outcomes. In our study, AOPP levels decreased significantly after treatment procedures; however, in patients with triple-negative breast cancer (ER-/PR-/HER2-), AOPP levels increased after the therapy. It should be noted that the triple-negative type of cancer is associated with a more aggressive clinical course, early metastasis and poor outcome [66]. An opposite observation was made for the group with luminal A, as AOPP levels were significantly lower after therapy, which is in line with the good prognosis and longer OS reported by some researchers [67,68]. It is well known that a left-sided tumour is considered to be more aggressive than a right-sided one and is associated with poorer outcomes [69]. The results of our study show that patients with a localization of the tumour on the left side had a significantly higher level of pre-treatment AOPPs; however, the localization of the tumour did not significantly affect the patients' future conditions. Additionally, the results of our study show that the patients with a tumour size above 2 cm (T2 stage according to TNM classification) had significantly higher values of pre- and post-treatment AOPP concentrations than patients with a diameter <2 cm (Table 3), and larger tumour size is assumed to be a high-risk clinical feature of developing of recurrence [70]. Surprisingly, Salehi et al. did not find any significant associations between AOPP levels and both tumour diameter and TNM stage in colorectal cancer patients [56]. Due to the limited literature data, further research is needed to reach a consensus on this. In addition, the group of patients with a Ki-67 index above 20% had significantly elevated levels of pre- and post-treatment AOPPs, which indicate a higher risk of breast cancer relapse in our cohort. Nelson et al. have linked the expression of Ki-67 above 20% to a higher incidence of cancer recurrence, which is in agreement with our findings [70].

According to our linear regression results, it can be noted, regardless of the model used, that higher pre- and post-treatment AOPP concentrations are positively correlated with a higher risk of cancer recurrence. Zhou et al. have assessed the levels of AOPPs in acute myeloid leukaemia patients and observed their tendency to increase during the progression of cancer. The authors conclude that there is a strong association between persisting oxidative damage and a higher risk of acute myeloid leukaemia relapse, which suggests that oxidative stress might be a key factor in cancer progression [71]. In contrast, plasma AOPPs were found by Delrieu et al. to be a favourable factor in metastatic breast cancer patients undergoing 6 months of physical activity intervention. Patients with cancer progression or who died during 6-month follow-up had significantly lower concentrations of AOPPs. However, a reduction in AOPP concentration may have been associated with the elevated antioxidant efficiency induced by regular physical activity in this group [72]. It should be emphasized that our ROC analysis demonstrates that pre- and post-treatment AOPP levels in serum have a high diagnostic value in differentiating the groups of early-stage women with or without breast cancer recurrence in our cohort, with sensitivities at 78%, 81.8% and specificities at 72.7%, 89.3%, respectively. Figure 2 and Figure S1 clearly emphasize the strength of post-treatment AOPP concentration (AUC = 0.86, $p < 0.0001$) as a marker for estimating the likely course of the disease. Due to the higher sensitivity

(81.8%) and specificity (89.3%) of AOPP concentration after treatment and the easy-to-perform and economical measurement procedure, AOPP concentration may compete with Ki-67 expression (sensitivity 81.8%, specificity 55.9%; AUC = 0.705, $p = 0.0073$) as a prognostic marker for the development of cancer recurrence. Our findings indicate the relevant usefulness of AOPP measurements in the differentiation between relapse and non-relapse breast cancer patients. Kundaktepe et al. showed no predictive value of AOPPs in separating breast cancer patients with or without metastases. However, this study included BrC patients with distant metastases at the time of the diagnosis [54]. In the study by Mahmoud et al., increased AOPP levels were found in acute lymphoblastic leukaemia patients compared to the controls, and their tendency to increase after the administration of chemotherapy was observed; however, the Kaplan–Meier analysis showed no association between AOPP concentrations and the risk of cancer relapse. This finding might probably be related to the small number of patients included in this study [73]. Several studies have discussed the possible use of AOPPs as a marker for the prediction of various types of disease or outcomes in patients. Kaneda et al. have reported that the higher concentrations of AOPPs observed in the plasma of coronary artery disease patients were related to an increased incidence rate and severity in these patients [74]. According to the results of Bagyura et al., AOPPs seem to have possible predictive value as an early marker of atherosclerosis in men. It is implicated that AOPPs, through various mechanisms, lead to endothelial dysfunction and eventually to the development of atherosclerosis [17]. In addition, the results of the logistic regression conducted by Koike et al. suggest that AOPPs may serve as a predictive factor in suspicious digital rectal examinations [57]. No previous studies have shown the prognostic value of higher AOPP concentrations on breast cancer relapse in the early stage. Perhaps serum AOPPs should be taken into consideration by clinicians as a sensitive marker in the monitoring of breast cancer recurrence.

The results of our univariate Cox regression analysis suggest that the lower levels of pre- and post-treatment AOPPs may serve as a prognostic factor of better and prolonged OS. This is also supported by the results of the multivariate Cox regression when adjusted for age at the diagnosis, stage of the disease, nodal involvement, and expression of ER, PR, HER2, and Ki-67. Both the pre- and post-treatment lower levels of AOPPs were positive predictors of long-term overall survival in our cohort. Our results indicate that pre- and post-treatment concentrations of AOPPs above the cut-off points (9.37 μM and 10.39 μM , respectively) were associated with a shorter OS time in our study group. The high sensitivity (88.9%) and specificity (87.9%) of AOPP concentrations after treatment compared with the sensitivity (77.8%) and specificity (54.1%) of Ki-67 expressions suggest that AOPPs may constitute an additional, useful, and easy-to-perform prognostic marker of unfavourable overall survival. Based on a series of statistical analyses (ROC curves, Kaplan–Meier method, uni- and multivariate Cox regression), our study suggests that in patients with BrC, AOPPs may compete with Ki-67 as a prognostic marker of cancer-related death. This is the first study showing that higher AOPP levels in early-stage breast cancer patients are related to poorer OS. Furthermore, several researchers have linked higher levels of AOPPs to increased mortality in various states. The multivariate Cox analysis conducted by Cai et al., which was performed for a group of patients with diagnosed hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure, revealed that AOPPs can serve as an independent prognostic factor of early mortality [75]. In addition, Zhou et al. assessed the levels of AOPPs in patients who were undergoing maintenance haemodialysis. The authors observed that higher levels of AOPPs are associated with an elevated risk of all-cause mortality in their cohort. The authors concluded that AOPP concentrations may serve as a relevant risk marker for the early detection of mortality in maintenance haemodialysis patients [21]. Moreover, Suvakov et al. have investigated AOPP levels in patients with end-stage renal disease and found that higher plasma AOPP levels were related to higher cardiovascular-specific mortality. Due to the role of AOPPs in endothelial dysfunction, the authors suggest including oxidative biomarkers in diagnostic panels for better monitoring of end-stage renal patients and to improve the choice of appropriate

therapeutic patterns [62]. The study conducted by Elkabany et al. shows that a higher level of AOPPs is associated with the severity of respiratory distress syndrome in neonates. The ROC curve analysis conducted by the authors also suggests that the cut-off value of AOPPs can be useful in predicting the severity and high risk of mortality in neonatal respiratory distress syndrome [76]. It should be highlighted that the ability to estimate the prognosis of patients with BrC depending on the pre- and post-treatment concentrations of AOPPs may be beneficial for assessing a patient's future condition and life quality.

The findings should be interpreted with caution due to the following limitations of this study. The results were from a relatively small number of patients in a single centre. A total of 22 patients who underwent BCS or mastectomy were excluded due to their ineligibility for further prognostic analysis (Figure 1). The study was performed in a daily clinical routine, the sample size was dependent on receiving the patients' consent for participation, and very restrictive inclusion and exclusion criteria also influenced the limited number of patients in the project. In addition, we recruited patients of Polish descent only, so our results may not apply to other ethnic groups. We recruited patients at an early stage of BrC without metastases, so we cannot determine what the prognostic value would be for larger and more advanced tumours. A larger sample size of patients will be advantageous to the validation of long-term effects. Another limitation was the lack of a control group, and further research with a group of healthy subjects should be conducted.

Nevertheless, AOPP concentrations may serve as potential prognostic candidates because the method of measuring their concentration is inexpensive and easy to perform. Additionally, further research may provide new possibilities for the prevention and treatment of neoplastic diseases based on reducing their concentration or preventing the formation of AOPPs.

5. Conclusions

Our results suggest that both pre-treatment AOPP levels above 9.37 μM (sensitivity: 78%, specificity: 72.7%) and post-treatment concentrations of AOPPs above 10.39 μM (sensitivity: 81.8%, specificity: 89.3%) may promote the probability of recurrence in BrC patients. Additionally, Kaplan–Meier survival analysis shows that pre- and post-treatment AOPP concentrations above 9.37 μM and 10.39 μM , respectively, may increase the likelihood of cancer-related death in the BrC cohort. An absence of administration of endocrine drugs seems to increase the level of AOPPs after treatment procedures. In addition, a positive relation between AOPPs and VEGF-A was found, and a negative relationship between AOPPs and sVEGFR1 and sVEGFR2 was revealed, which clearly supports the involvement of AOPPs in neoplastic angiogenesis. Based on numerous types of statistical analyses, it seems that AOPPs are a better prognostic biomarker than VEGF-A, although the current study confirmed the strong relationship between AOPPs and angiogenic parameters. It would seem that the findings of our study are promising and relevant for further research in a larger patient population with invasive breast cancer.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers16051068/s1>, Figure S1: A graph showing four ROC curves for the Ki-67 expression, pre- and post-treatment concentrations of AOPP, and tumour diameter for evaluating the most accurate indicator for disease recurrence with different values of area under the curve (AUC) and *p*-values; Figure S2: A graph showing four ROC curves for the Ki-67 expression, pre- and post-treatment concentrations of AOPP, and tumour diameter for evaluating the most accurate indicator for predicting cancer-related death with different values of area under the curve (AUC) and *p*-values.

Author Contributions: B.R.-C., T.W. and M.N.-M.: Conceptualization; T.W. and B.R.-C.: methodology; M.N.-M. and M.B.: software; M.N.-M. and B.R.-C.: validation; M.N.-M.: formal analysis; M.N.-M. and B.R.-C.: investigation; B.R.-C. and P.R.: resources; B.R.-C. and P.R.: data curation; M.N.-M. and B.R.-C.: writing—original draft; M.N.-M. and B.R.-C.: writing—review and editing; M.N.-M. and B.R.-C.: visualization; B.R.-C. and S.K.: supervision; B.R.-C. and P.R.: project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Torun, Collegium Medicum in Bydgoszcz (approval no. KB/547/2015, date of approval: 16 June 2015).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef]
2. Jafari, S.H.; Saadatpour, Z.; Salmaninejad, A.; Momeni, F.; Mokhtari, M.; Nahand, J.S.; Rahmati, M.; Mirzaei, H.; Kianmehr, M. Breast Cancer Diagnosis: Imaging Techniques and Biochemical Markers. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 5200–5213. [CrossRef]
3. National Cancer Institute Female Breast Cancer: Cancer Stat Facts. Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> (accessed on 18 March 2023).
4. Wang, R.; Zhu, Y.; Liu, X.; Liao, X.; He, J.; Niu, L. The Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Patients with Different Metastatic Sites in Stage IV Breast Cancer. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 1091. [CrossRef]
5. Madu, C.O.; Wang, S.; Madu, C.O.; Lu, Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J. Cancer* **2020**, *11*, 4474–4494. [CrossRef]
6. Ayoub, N.M.; Jaradat, S.K.; Al-Shami, K.M.; Alkhalifa, A.E. Targeting Angiogenesis in Breast Cancer: Current Evidence and Future Perspectives of Novel Anti-Angiogenic Approaches. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 838133. [CrossRef]
7. Mdkhana, B.; Goel, S.; Saleh, M.A.; Siddiqui, R.; Khan, N.A.; Elmoselhi, A.B. Role of Oxidative Stress in Angiogenesis and the Therapeutic Potential of Antioxidants in Breast Cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2022**, *26*, 4677–4692.
8. Lugano, R.; Ramachandran, M.; Dimberg, A. Tumor Angiogenesis: Causes, Consequences, Challenges and Opportunities. *Cell Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 1745–1770. [CrossRef]
9. Yang, F.; Jin, C.; Jiang, Y.J.; Li, J.; Di, Y.; Fu, D.L. Potential Role of Soluble VEGFR-1 in Antiangiogenesis Therapy for Cancer. *Expert Rev. Anticancer. Ther.* **2011**, *11*, 541–549. [CrossRef]
10. Bando, H.; Weich, H.A.; Brokelmann, M.; Horiguchi, S.; Funata, N.; Ogawa, T.; Toi, M. Association between Intratumoral Free and Total VEGF, Soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and Prognosis in Breast Cancer. *Br. J. Cancer* **2005**, *92*, 553–561. [CrossRef]
11. Cao, J.; Yang, R.; Smith, T.E.; Evans, S.; McCollum, G.W.; Pomerantz, S.C.; Petley, T.; Harris, I.R.; Penn, J.S. Human Umbilical Tissue-Derived Cells Secrete Soluble VEGFR1 and Inhibit Choroidal Neovascularization. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2019**, *14*, 37–46. [CrossRef]
12. Thielemann, A.; Baszczuk, A.; Kopczyński, Z.; Kopczyński, P.; Grodecka-Gazdecka, S. Clinical Usefulness of Assessing VEGF and Soluble Receptors SVEGFR-1 and SVEGFR-2 in Women with Breast Cancer. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2013**, *20*, 293–297.
13. Gurer-Orhan, H.; Ince, E.; Konyar, D.; Saso, L.; Suzen, S. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4084–4101. [CrossRef]
14. Schetter, A.J.; Heegaard, N.H.H.; Harris, C.C. Inflammation and Cancer: Interweaving MicroRNA, Free Radical, Cytokine and P53 Pathways. *Carcinogenesis* **2009**, *31*, 37–49. [CrossRef]
15. Sawicka, E.; Kratz, E.M.; Szymańska, B.; Guzik, A.; Wesołowski, A.; Kowal, P.; Pawlik-Sobecka, L.; Piwowar, A. Preliminary Study on Selected Markers of Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in Patients with Bladder Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 821–831. [CrossRef] [PubMed]
16. Komosinska-Vassev, K.; Olczyk, P.; Winsz-Szczotka, K.; Kuznik-Trocha, K.; Klimek, K.; Olczyk, K. Age- and Gender-Related Alteration in Plasma Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) and Glycosaminoglycan (GAG) Concentrations in Physiological Ageing. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2012**, *50*, 557–563. [CrossRef]
17. Bagyura, Z.; Takács, A.; Kiss, L.; Dósa, E.; Vadas, R.; Nguyen, T.D.; Dinya, E.; Soós, P.; Szelid, Z.; Láng, O.; et al. Level of Advanced Oxidation Protein Products Is Associated with Subclinical Atherosclerosis. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2022**, *22*, 5. [CrossRef]
18. Baskol, G.; Gumus, K.; Oner, A.; Arda, H.; Karakucuk, S. The Role of Advanced Oxidation Protein Products and Total Thiols in Diabetic Retinopathy. *Eur. J. Ophthalmol.* **2018**, *18*, 792–798. [CrossRef] [PubMed]
19. Huang, Q.T.; Wang, S.S.; Zhang, M.; Huang, L.P.; Tian, J.W.; Yu, Y.H.; Wang, Z.J.; Zhong, M. Advanced Oxidation Protein Products Enhances Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 Expression in Trophoblasts: A Possible Link between Oxidative Stress and Preeclampsia. *Placenta* **2013**, *34*, 949–952. [CrossRef]
20. Wybranowski, T.; Napiórkowska, M.; Bosek, M.; Pyskir, J.; Ziolkowska, B.; Cyrankiewicz, M.; Pyskir, M.; Pilaczyńska-Cemel, M.; Rogańska, M.; Kruszewski, S.; et al. Study of Albumin Oxidation in COVID-19 Pneumonia Patients: Possible Mechanisms and Consequences. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10103. [CrossRef] [PubMed]

21. Zhou, C.; Zhang, Y.; Chen, J.; Mei, C.; Xiong, F.; Shi, W.; Zhou, W.; Liu, X.; Sun, S.; Tian, J.; et al. Association between Serum Advanced Oxidation Protein Products and Mortality Risk in Maintenance Hemodialysis Patients. *J. Transl. Med.* **2021**, *19*, 284. [\[CrossRef\]](#)
22. Liu, J.; Wen, S.; Lin, Y.; Yang, X.; Liu, Z.; Quan, S.; Song, Y. Advanced Oxidation Protein Products Change Biological Behaviors of Rat Endometrial Epithelial Cells by Activating ERK/P38 Signaling Pathways. *Biol. Open* **2020**, *9*, bio048876. [\[CrossRef\]](#)
23. Xian, L.-W.; Li, T.-P.; Wei, Y.-E.; Wu, S.-P.; Ma, L. Relation of Advanced Oxidation Protein Products with VEGF and TGF- β 1 in Colon Cancer Cells Exposed to Intermittent Hypoxia. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2011**, *31*, 619–623. [\[PubMed\]](#)
24. Zhou, L.L.; Cao, W.; Xie, C.; Tian, J.; Zhou, Z.; Zhou, Q.; Zhu, P.; Li, A.; Liu, Y.; Miyata, T.; et al. The Receptor of Advanced Glycation End Products Plays a Central Role in Advanced Oxidation Protein Products-Induced Podocyte Apoptosis. *Kidney Int.* **2012**, *82*, 759–770. [\[CrossRef\]](#)
25. Lou, A.; Wang, L.; Lai, W.; Zhu, D.; Wu, W.; Wang, Z.; Cai, Z.; Yang, M.; Yang, M. Advanced Oxidation Protein Products Induce Inflammatory Responses and Invasive Behaviour in Fibroblast-like Synoviocytes via the RAGE-NF- κ B Pathway. *Bone Joint Res.* **2021**, *10*, 259–268. [\[CrossRef\]](#)
26. Guo, Z.J.; Niu, H.X.; Hou, F.F.; Zhang, L.; Fu, N.; Nagai, R.; Lu, X.; Chen, B.H.; Shan, Y.X.; Tian, J.W.; et al. Advanced Oxidation Protein Products Activate Vascular Endothelial Cells via a RAGE-Mediated Signaling Pathway. *Antioxid. Redox Signal* **2008**, *10*, 1699–1712. [\[CrossRef\]](#)
27. Kim, Y.-W.; Byzova, T.V. Oxidative Stress in Angiogenesis and Vascular Disease. *Blood* **2014**, *123*, 625–631. [\[CrossRef\]](#)
28. Huang, Q.; Ji, M.; Li, F.; Li, Y.; Zhou, X.; Hsueh, C.; Zhou, L. Diagnostic and Prognostic Value of Plasma Cell-Free DNA Combined with VEGF-C in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Mol. Cell Probes* **2023**, *67*, 101895. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Dao, J.; Conway, P.J.; Subramani, B.; Meyyappan, D.; Russell, S.; Mahadevan, D. Using CfDNA and CtDNA as Oncologic Markers: A Path to Clinical Validation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13219. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Cheng, F.; Su, L.; Qian, C. Circulating Tumor DNA: A Promising Biomarker in the Liquid Biopsy of Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 48832. [\[CrossRef\]](#)
31. Thierry, A.R.; El Messaoudi, S.; Gahan, P.B.; Anker, P.; Stroun, M. Origins, Structures, and Functions of Circulating DNA in Oncology. *Cancer Metastasis Rev.* **2016**, *35*, 347. [\[CrossRef\]](#)
32. Tumburu, L.; Ghosh-Choudhary, S.; Seifuddin, F.T.; Barbu, E.A.; Yang, S.; Ahmad, M.M.; Wilkins, L.H.W.; Tunc, I.; Sivakumar, I.; Nichols, J.S.; et al. Circulating Mitochondrial DNA Is a Proinflammatory DAMP in Sickle Cell Disease. *Blood* **2021**, *137*, 3116. [\[CrossRef\]](#)
33. Dawson, S.-J.; Tsui, D.W.Y.; Murtaza, M.; Biggs, H.; Rueda, O.M.; Chin, S.-F.; Dunning, M.J.; Gale, D.; Forshe, T.; Mahler-Araujo, B.; et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 1199–1209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Qin, C.; Gu, J.; Liu, R.; Xu, F.; Qian, H.; He, Q.; Meng, W. Release of Mitochondrial DNA Correlates with Peak Inflammatory Cytokines in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Anatol. J. Cardiol.* **2017**, *17*, 224–228.
35. Alekseeva, L.; Mironova, N. Role of Cell-Free DNA and Deoxyribonucleases in Tumor Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12246. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Korabecna, M.; Zinkova, A.; Brynychova, I.; Chylikova, B.; Prikryl, P.; Sedova, L.; Neuzil, P.; Seda, O. Cell-Free DNA in Plasma as an Essential Immune System Regulator. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17478. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Krychtiuk, K.A.; Wurm, R.; Ruhittel, S.; Lenz, M.; Huber, K.; Wojta, J.; Heinz, G.; Hülsmann, M.; Speidl, W.S. Release of Mitochondrial DNA Is Associated with Mortality in Severe Acute Heart Failure. *Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care* **2020**, *9*, 419–428. [\[CrossRef\]](#)
38. Gaál Kovalčíková, A.; Janovičová, L.; Hodosy, J.; Bábíčková, J.; Vavrinčová-Yaghi, D.; Vavrinec, P.; Boor, P.; Podracká, L.; Šebeková, K.; Celec, P.; et al. Extracellular DNA Concentrations in Various Aetiologies of Acute Kidney Injury. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 16812. [\[CrossRef\]](#)
39. Barbalata, T.; Scarlatescu, A.I.; Sanda, G.M.; Toma, L.; Stancu, C.S.; Dorobantu, M.; Micheu, M.M.; Sima, A.V.; Niculescu, L.S. Mitochondrial DNA Together with MiR-142-3p in Plasma Can Predict Unfavorable Outcomes in Patients after Acute Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9947. [\[CrossRef\]](#)
40. Wang, L.; Zhang, Q.; Yuan, K.; Yuan, J. MtDNA in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Dis. Markers* **2021**, *2021*, 7157109. [\[CrossRef\]](#)
41. Demkow, U. Molecular Mechanisms of Neutrophil Extracellular Trap (NETs) Degradation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4896. [\[CrossRef\]](#)
42. Papayannopoulos, V. Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *18*, 134–147. [\[CrossRef\]](#)
43. Arnhold, J. The Dual Role of Myeloperoxidase in Immune Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8057. [\[CrossRef\]](#)
44. Rizo-Téllez, S.A.; Sekheri, M.; Filep, J.G. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2302. [\[CrossRef\]](#)
45. Descamps-Latscha, B.; Witko-Sarsat, V. Importance of Oxidatively Modified Proteins in Chronic Renal Failure. *Kidney Int. Suppl.* **2001**, *78*, S108–S113. [\[CrossRef\]](#)
46. Capeillère-Blandin, C.; Gausson, V.; Descamps-Latscha, B.; Witko-Sarsat, V. Biochemical and Spectrophotometric Significance of Advanced Oxidized Protein Products. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2004**, *1689*, 91–102. [\[CrossRef\]](#)

47. Yue, Q.; Song, Y.; Liu, Z.; Zhang, L.; Yang, L.; Li, J. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): A Pivotal Hub in Immune Diseases. *Molecules* **2022**, *27*, 4922. [CrossRef] [PubMed]
48. Fink, K.; Boratyński, J. The Role of Metalloproteinases in Modification of Extracellular Matrix in Invasive Tumor Growth, Metastasis and Angiogenesis. *Adv. Hyg. Exp. Med.* **2012**, *66*, 609–628. [CrossRef] [PubMed]
49. Witko-Sarsat, V.; Friedlander, M.; Capeillere-Blandin, C.; Nguyen-Khoa, T.; Nguyen, A.T.; Zingraff, J.; Jungers, P.; Descamps-Latscha, B. Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Uremia. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 1304–1313. [CrossRef]
50. Hanasand, M.; Omdal, R.; Norheim, K.B.; Gøransson, L.G.; Brede, C.; Jonsson, G. Improved Detection of Advanced Oxidation Protein Products in Plasma. *Clin. Chim. Acta* **2012**, *413*, 901–906. [CrossRef]
51. Zarychta, E.; Rhone, P.; Bielawski, K.; Rosc, D.; Szot, K.; Zdunska, M.; Ruszkowska-Ciastek, B. Elevated Plasma Levels of Tissue Factor as a Valuable Diagnostic Biomarker with Relevant Efficacy for Prediction of Breast Cancer Morbidity. *J. Physiol. Pharmacol.* **2018**, *69*, 921–931.
52. American Cancer Society. About Breast Cancer. Available online: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8577.00.pdf> (accessed on 30 April 2023).
53. Abd El-Khalik, S.R.; Hafez, Y.M.; Elkholy, R.A. The Role of Circulating Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 in Patients with Diabetic Foot Ulcer: A Possible Mechanism of Pathogenesis via a Novel Link between Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis. *Microvasc. Res.* **2020**, *130*, 103987. [CrossRef]
54. Kundaktepe, B.P.; Sozer, V.; Durmus, S.; Kocael, P.C.; Kundaktepe, F.O.; Papila, C.; Gelisgen, R.; Uzun, H. The Evaluation of Oxidative Stress Parameters in Breast and Colon Cancer. *Medicine* **2021**, *100*, e25104. [CrossRef]
55. Kilic, N.; Yavuz Taslipinar, M.; Guney, Y.; Tekin, E.; Onuk, E. An Investigation into the Serum Thioredoxin, Superoxide Dismutase, Malondialdehyde, and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2014**, *21*, 4139–4143. [CrossRef]
56. Salehi, S.S.; Mirmiranpour, H.; Rabizadeh, S.; Esteghamati, A.; Tomasello, G.; Alibakhshi, A.; Najafi, N.; Rajab, A.; Nakhjavani, M. Improvement in Redox Homeostasis after Cytorreductive Surgery in Colorectal Adenocarcinoma. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 8864905. [CrossRef]
57. Koike, A.; Robles, B.E.F.; da Silva Bonacini, A.G.; de Alcantara, C.C.; Reiche, E.M.V.; Dichi, I.; Maes, M.; Cecchini, R.; Simão, A.N.C. Thiol Groups as a Biomarker for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9093. [CrossRef]
58. Otsmane, A.; Kacimi, G.; Adane, S.; Cherbal, F.; Aouichat Bouguerra, S. Clinico-Epidemiological Profile and Redox Imbalance of Lung Cancer Patients in Algeria. *J. Med. Life* **2018**, *11*, 210–217. [CrossRef]
59. Kosova, F.; Çetin, B.; Akinci, M.; Aslan, S.; Ari, Z.; Sepici, A.; Altan, N.; Çetin, A. Advanced Oxidation Protein Products, Ferrous Oxidation in Xylenol Orange, and Malondialdehyde Levels in Thyroid Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2007**, *14*, 2616–2620. [CrossRef] [PubMed]
60. Brogowska, K.K.; Zajkowska, M.; Mroczo, B. Vascular Endothelial Growth Factor Ligands and Receptors in Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 2412. [CrossRef] [PubMed]
61. Huang, Y.J.; Nan, G.X. Oxidative Stress-Induced Angiogenesis. *J. Clin. Neurosci.* **2019**, *63*, 13–16. [CrossRef] [PubMed]
62. Suvakov, S.; Jerotic, D.; Damjanovic, T.; Milic, N.; Pekmezovic, T.; Djukic, T.; Jelic-Ivanovic, Z.; Savic Radojevic, A.; Pljesa-Ercegovac, M.; Matic, M.; et al. Markers of Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction Predict Haemodialysis Patients Survival. *Am. J. Nephrol.* **2019**, *50*, 115–125. [CrossRef] [PubMed]
63. Chiang, F.F.; Chao, T.H.; Huang, S.C.; Cheng, C.H.; Tseng, Y.Y.; Huang, Y.C. Cysteine Regulates Oxidative Stress and Glutathione-Related Antioxidative Capacity before and after Colorectal Tumor Resection. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9581. [CrossRef] [PubMed]
64. Ek, R.O.; Yildiz, Y.; Cecen, S.; Yenisey, C.; Kavak, T. Effects of Tamoxifen on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Model in Ovariectomized Rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, *308*, 227–235. [CrossRef] [PubMed]
65. Silva, F.B.; Romero, W.G.; Carvalho, A.L.R.D.A.; Souza, G.A.A.; Claudio, E.R.G.; Abreu, G.R. Effects of Treatment with Chemotherapy and/or Tamoxifen on the Biomarkers of Cardiac Injury and Oxidative Stress in Women with Breast Cancer. *Medicine* **2017**, *96*, e8723. [CrossRef] [PubMed]
66. Baranova, A.; Krasnoselskyi, M.; Starikov, V.; Kartashov, S.; Zhulkevych, I.; Vlasenko, V.; Oleshko, K.; Bilodid, O.; Sadchikova, M.; Vinnyk, Y. Triple-Negative Breast Cancer: Current Treatment Strategies and Factors of Negative Prognosis. *J. Med. Life* **2022**, *2022*, 153–161. [CrossRef] [PubMed]
67. Li, Y.; Ma, L. Efficacy of Chemotherapy for Lymph Node-Positive Luminal A Subtype Breast Cancer Patients: An Updated Meta-Analysis. *World J. Surg. Oncol.* **2020**, *18*, 316. [CrossRef]
68. Hennigs, A.; Riedel, F.; Gondos, A.; Sinn, P.; Schirmacher, P.; Marmé, F.; Jäger, D.; Kauczor, H.U.; Stieber, A.; Lindel, K.; et al. Prognosis of Breast Cancer Molecular Subtypes in Routine Clinical Care: A Large Prospective Cohort Study. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 734. [CrossRef]
69. Abdou, Y.; Gupta, M.; Asaoka, M.; Attwood, K.; Mateusz, O.; Gandhi, S.; Takabe, K. Left Sided Breast Cancer Is Associated with Aggressive Biology and Worse Outcomes than Right Sided Breast Cancer. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 13377. [CrossRef]
70. Nelson, D.R.; Brown, J.; Morikawa, A.; Method, M. Breast Cancer-Specific Mortality in Early Breast Cancer as Defined by High-Risk Clinical and Pathologic Characteristics. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0264637. [CrossRef]

71. Zhou, F.L.; Zhang, W.G.; Wei, Y.C.; Meng, S.; Bai, G.G.; Wang, B.Y.; Yang, H.Y.; Tian, W.; Meng, X.; Zhang, H.; et al. Involvement of Oxidative Stress in the Relapse of Acute Myeloid Leukemia. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 15010–15015. [[CrossRef](#)]
72. Delrieu, L.; Touillaud, M.; Pérol, O.; Morelle, M.; Martin, A.; Friedenreich, C.M.; Mury, P.; Dufresne, A.; Bachelot, T.; Heudel, P.E.; et al. Impact of Physical Activity on Oxidative Stress Markers in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 6694594. [[CrossRef](#)]
73. Ben Mahmoud, L.; Mdhaffar, M.; Ghozzi, H.; Ammar, M.; Hakim, A.; Atheymen, R.; Sahnoun, Z.; Elloumi, M.; Zeghal, K. Oxidative Stress in Tunisian Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Involvement in Leukemic Relapse. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2017**, *39*, e124–e130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kaneda, H.; Taguchi, J.; Ogasawara, K.; Aizawa, T.; Ohno, M. Increased Level of Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis* **2002**, *162*, 221–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Cai, J.; Han, T.; Nie, C.; Jia, X.; Liu, Y.; Zhu, Z.; Gao, Y. Biomarkers of Oxidation Stress, Inflammation, Necrosis and Apoptosis Are Associated with Hepatitis B-Related Acute-on-Chronic Liver Failure. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2016**, *40*, 41–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Elkabany, Z.A.; El-Farrash, R.A.; Shinkar, D.M.; Ismail, E.A.; Nada, A.S.; Farag, A.S.; Elsayed, M.A.; Salama, D.H.; Macken, E.L.; Gaballah, S.A. Oxidative Stress Markers in Neonatal Respiratory Distress Syndrome: Advanced Oxidation Protein Products and 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine in Relation to Disease Severity. *Pediatr. Res.* **2020**, *87*, 74–80. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



OPEN

Advanced oxidation protein products and ischemia-modified albumin as prognostic biomarkers of long-term mortality in community-acquired pneumonia: a prospective observational study

Marta Napiórkowska-Mastalerz^{1✉}, Tomasz Wybranowski¹, Joanna Sikora², Patrycja Wszelaki², Jerzy Pyskir¹, Wiktoria Michalska¹, Marta Pilaczyńska-Cemel³, Stefan Kruszewski¹ & Barbara Ciastek⁴

Oxidative stress is increasingly recognized as a contributor to the pathophysiology and outcomes of community-acquired pneumonia (CAP). This study examined whether plasma levels of advanced oxidation protein products (AOPPs) and ischemia-modified albumin (IMA) measured at hospital admission are associated with 100-day mortality. A cohort of 71 hospitalized CAP patients was analyzed. Plasma AOPPs and IMA were measured within 24 h of admission and evaluated in relation to clinical data, the Charlson Comorbidity Index (CCI), and routine laboratory parameters. Statistical analyses included receiver operating characteristic (ROC) curve evaluation, Kaplan–Meier survival estimates, and Spearman correlations. AOPPs correlated positively with D-dimer, while IMA showed positive associations with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and high-sensitivity cardiac troponin I, and inversely with serum albumin, indicating links between oxidative stress, inflammation, and cardiovascular dysfunction. Higher admission levels of AOPPs and IMA were independently associated with increased 100-day mortality. In ROC analysis, AOPPs demonstrated good discriminatory ability for 100-day mortality (area under the curve [AUC] = 0.75, $p < 0.0001$), and a combined multivariable model including AOPPs, IMA, and CCI further improved performance (AUC = 0.851, $p < 0.0001$). These findings suggest that oxidative stress biomarkers measured at admission may serve as accessible indicators of long-term mortality risk in CAP.

Keywords Community-acquired pneumonia, Oxidative stress, Advanced oxidation protein products, Ischemia-modified albumin, Long-term mortality

Community-acquired pneumonia (CAP) remains the leading cause of infection-related hospital admissions and is defined as a pulmonary infection acquired outside the hospital setting or diagnosed within 48 h of admission in previously non-hospitalized patients. Its incidence ranges from 1 to 25 cases per 1,000 inhabitants annually¹. Among bacterial pathogens, *Streptococcus pneumoniae* accounts for the majority of pneumonia-related deaths, followed by *Haemophilus influenzae*. Viral agents, such as SARS-CoV-2, are also common contributors. Nevertheless, in nearly half of all cases, the etiologic agent remains unidentified, largely due to sampling challenges, prior antibiotic exposure, or limited access to molecular diagnostics². Despite advances

¹Department of Biophysics, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Bydgoszcz 85-067, Poland. ²Research and Education Unit for Experimental Biotechnology, Department of Transplantology and General Surgery, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Bydgoszcz 85-094, Poland. ³Department of Lung Diseases, Neoplasms and Tuberculosis, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Bydgoszcz 85-326, Poland. ⁴Institute of Health Sciences, University of Opole, Katowicka 68, Opole 45-060, Poland. ✉email: m.napiorkowska@cm.umk.pl

in diagnostics, therapy, and prevention, CAP remains a major cause of mortality in developed countries³, especially among older and immunocompromised individuals⁴. Severe CAP carries up to 36% mortality despite appropriate antibiotics⁵, while mild to moderate cases resolve within two weeks; however, full recovery may take up to six months⁶. Among patients with comorbidities, long-term deterioration often reflects underlying chronic conditions rather than the acute infection⁷. These findings underscore the importance of prognostic biomarkers for accurate risk stratification and timely escalation of care.

Given the substantial clinical and public health burden of CAP, elucidating its pathophysiology remains essential. A key feature of CAP is a dysregulated inflammatory response, characterized by excessive production of reactive oxygen species (ROS) and the development of oxidative stress (OS). OS reflects an imbalance between ROS generation and endogenous antioxidant defenses. In CAP, ROS serve a dual role: at physiological levels, they contribute to antimicrobial defense, whereas excessive ROS generation leads to oxidative tissue injury, endothelial dysfunction, and cytokine overproduction⁸, ultimately contributing to pulmonary damage, acute respiratory distress syndrome, and multi-organ dysfunction. Although modulation of redox homeostasis and inflammatory signaling may mitigate tissue injury, the precise molecular mechanisms underlying these processes remain incompletely characterized^{9,10}.

Systemic OS can be assessed using circulating biomarkers that reflect protein oxidation, such as advanced oxidation protein products (AOPPs) and ischemia-modified albumin (IMA). AOPPs, generated via the myeloperoxidase–hydrogen peroxide–halide system, have been linked to various inflammatory and metabolic disorders^{11–13} and proposed as prognostic biomarkers in malignancies, including breast cancer¹⁴, as well as in end-stage renal disease¹⁵; however, data regarding their role in CAP remain limited. IMA, a structurally modified form of albumin produced under ischemic and oxidative conditions, is influenced by both demographic and clinical factors¹⁶ and typically increases in states of heightened OS¹⁷. Initially characterized in acute coronary syndromes¹⁶, IMA has subsequently been associated with infectious and inflammatory conditions, including sepsis and pneumonia^{18,19}, where elevated levels may reflect tissue injury and inflammatory burden, thereby underscoring its potential prognostic relevance. In parallel, endogenous enzymatic antioxidants, particularly superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), play a crucial role in maintaining redox homeostasis by limiting ROS-mediated damage during lower respiratory tract infections^{20,21}.

Although OS has been implicated in the pathogenesis and progression of CAP^{8–10}, few studies have examined oxidative biomarkers as predictors of outcome. Evidence on AOPPs and IMA in this context is particularly limited^{11–19}, and their long-term prognostic value remains unknown. Most prior research addressed short-term outcomes or focused on sepsis rather than isolated CAP. To date, no study has evaluated whether admission levels of AOPPs and IMA predict 100-day mortality in CAP. By addressing this gap, the present study provides the first evidence that redox imbalance assessed at admission may identify patients at risk of delayed mortality. This work therefore advances current understanding of oxidative mechanisms in CAP and highlights the potential prognostic significance of integrating redox biomarkers into clinical risk stratification and decision-making.

Materials and methods

Study design

This prospective observational pilot study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Poland (KB/343/2021). Written informed consent was obtained from all participants. The study included 71 adults hospitalized with community-acquired pneumonia (CAP) at the Regional Center of Pulmonology in Bydgoszcz, Poland, between March 2023 and February 2024. CAP was diagnosed based on high-resolution computed tomography or chest radiography. Patients requiring noninvasive or mechanical ventilation were excluded from the study. All patients received standard oxygen therapy and routine laboratory testing on admission.

Measurements of AOPPs

The serum AOPP level was measured using a modified method by Witko-Sarsat, which utilizes absorbance at 340 nm²². Detection was further refined according to Hanasand's improvements, where citric acid replaced acetic acid to enhance sample stability over time²³. Briefly, the reactive mixture was prepared by combining 1.875 mL of 0.2 M citric acid (Avantor, cat. no. PA-06-538210118) with 25 µL of 1.16 M potassium iodide (Avantor, cat. no. PA-06-743160117). Then, 1.9 mL of this solution was mixed with 100 µL of plasma, and absorbance at 340 nm was measured immediately using a JASCO V-550 UV-Vis spectrophotometer (Japan). Results were expressed in molar units as chloramine T equivalents.

Measurements of IMA

Measurement of IMA was conducted using the colorimetric method developed by Bar-Or et al.²⁴. A total of 100 µL of plasma was mixed with 50 µL of 0.2% cobalt(II) chloride (Sigma-Aldrich, cat. no. 232696) and incubated for 10 min to allow for cobalt–albumin binding. Then, 50 µL of 1.5 mg/mL dithiothreitol (Roche, cat. no. 10197777001) was added to react with unbound cobalt. After 2 min, 2 mL of 0.9% NaCl (Avantor, cat. no. PA-06-794121116) was added to stop the reaction, and absorbance was measured at 470 nm using a JASCO V-550 UV-Vis spectrophotometer (Japan).

Measurements of SOD

SOD activity was assayed in plasma using a commercial Superoxidase Dismutase Assay Kit (CaymanChemical, USA). Briefly, samples were thawed, diluted, and analyzed in duplicate with standard curve calibration. Absorbance was read at 450 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). The SOD standard value was plotted as a

function of final SOD activity (U/ml), and SOD activity (U/mL) was calculated from the regression equation derived from the standard curve.

Measurements of GPx

GPx activity was measured using a commercial Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical, USA) following the manufacturer’s instructions. Plasma samples were thawed, diluted, and analyzed in triplicate with background and control wells included. Absorbance was measured at 340 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific), and enzyme activity was calculated according to the kit protocol.

Quality control

All assays were performed in duplicate, and intra-assay coefficients of variation were below 5%, indicating high analytical precision and reproducibility.

Routine laboratory measurements

Standard biochemical and hematological parameters, including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), C-reactive protein (CRP), D-dimers, high-sensitivity cardiac troponin I (hs-cTnI), N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), lactate dehydrogenase (LDH), and albumin, were obtained from hospital records at admission. All analyses were performed using validated, automated methods in the accredited reference laboratory of the Regional Center of Pulmonology in Bydgoszcz, following standard operating procedures and internal quality control protocols. Hematological indices such as white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet count (PLT), Red Cell Distribution Width-Standard Deviation (RDW-SD), and Red Cell Distribution Width-Coefficient of Variation (RDW-CV) were analyzed using the same standardized procedures.

Statistical analysis

Statistical analyses and visualizations were performed using Statistica software, version 13.3 (StatSoft®, Kraków, Poland). Data distribution was assessed with the Shapiro–Wilk test. As most variables deviated from normality, intergroup comparisons were conducted using the nonparametric Mann–Whitney U test. Associations between OS biomarkers and clinical or laboratory parameters were evaluated using Spearman’s rank correlation coefficients. Mortality risk was analyzed by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, with predictive accuracy expressed as the area under the curve (AUC). Optimal cut-off values for AOPPs and IMA were determined using the Youden index, maximizing the sum of sensitivity and specificity for predicting 100-day mortality. These thresholds (AOPPs > 7 µM and IMA > 0.92) were subsequently used to stratify patients in Kaplan–Meier survival analyses followed by the log-rank test. The prognostic value of biomarkers was further examined using multivariable logistic regression analysis and ROC curves constructed for the combined models. To assess the internal validity and potential overfitting of the prognostic models, bootstrap resampling with 1000 iterations was performed. In each bootstrap sample, the logistic regression models including AOPPs and IMA, and AOPPs, IMA, and CCI were refitted, and the area under the ROC curve was recalculated. The optimism-corrected AUC was obtained as the apparent AUC minus the bootstrap-estimated optimism. These analyses were considered exploratory internal validation rather than proof of external generalizability. Internal validation analyses were performed in R version 4.5.2 using the RStudio Desktop environment version 2025.09.2–418 (Posit, Boston, MA, USA). A two-sided p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Baseline characteristics of the study population

The study population comprised 71 patients hospitalized with CAP. The median age was 70 years (interquartile range [IQR], 62–76 years), and all patients were followed for a period of 100 days. Comorbidities were evaluated using the Charlson Comorbidity Index (CCI)²⁵, which assigns weighted scores (1–6) to 19 predefined conditions. Data on cardiovascular, renal, hepatic, metabolic, and malignant diseases were extracted from medical records, with CCI scoring based on the most severe manifestation within each category (Table 1).

Common comorbidities	Number of patients (%)
Cardiovascular disease	35 (49.30%)
Neurological disease	10 (14.08%)
Respiratory disease	16 (22.54%)
Rheumatic disease	5 (7.04%)
Gastrointestinal disease	4 (5.63%)
Metabolic disease	12 (16.90%)
Renal disease	2 (2.82%)
Cancer	22 (30.99%)

Table 1. Comorbidities in patients hospitalized for community-acquired pneumonia (n = 71).

Associations between oxidative stress biomarkers and clinical parameters

Significant correlations were observed between oxidative stress biomarkers and selected laboratory parameters (Table 2). Although ALT and AST activities remained within reference ranges, both showed significant positive correlations with GPx activity (ALT: $r=0.3786$, $p<0.01$; AST: $r=0.4006$, $p<0.001$). D-dimer concentrations showed a significant positive correlation with AOPPs ($r=0.2676$, $p<0.05$). In addition, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) levels correlated significantly with IMA ($r=0.3353$, $p<0.01$). Hematological parameters showed significant associations with oxidative stress biomarkers. RBC, HGB, and hematocrit were inversely correlated with IMA (all $p<0.05$). In addition, RDW-SD and RDW-CV correlated positively with IMA and inversely with SOD and GPx activity. Serum albumin concentration was reduced (median: 3.14 g/dL) and showed a significant inverse correlation with IMA ($r=-0.3941$, $p<0.001$). In addition, LDH activity correlated positively with GPx activity ($r=0.4052$, $p<0.001$).

Association of oxidative stress biomarkers with 100-day mortality

Figure 1 shows the differences in plasma levels of AOPPs (Fig. 1A) and IMA (Fig. 1B) between survivors and non-survivors with CAP. Both biomarkers were significantly higher in patients who died within 100 days of hospital admission ($p<0.05$).

Discriminatory performance of oxidative stress biomarkers for 100-day mortality

The discriminatory performance of oxidative stress biomarkers for 100-day mortality in CAP was evaluated using ROC analysis (Fig. 2). Among individual markers, AOPPs and IMA demonstrated the highest discriminatory ability (AUC=0.750 and 0.740, respectively; Table 3). The combined model incorporating both biomarkers showed improved performance (AUC=0.803). Further inclusion of the Charlson Comorbidity Index (CCI)

Parameters (Units)	Median	Interquartile range	Reference Values	Correlation with			
				AOPPs	IMA	SOD	GPx
Age (years)	70.00	62.00–76.00		-0.0220	0.2287	-0.0560	-0.0545
ALT (U/L)	23.95	17.40–50.10	< 40.00	0.0880	0.0849	0.0835	0.3786**
AST (U/L)	27.50	21.20–40.20	< 37.00	0.0087	-0.0208	-0.0244	0.4006***
CRP (mg/L)	55.93	20.46–133.04	< 5.00	-0.1084	0.2245	0.1323	-0.0784
D-Dimers (ng/mL)	1342.46	922.72–2970.00	< 500.00	0.2676*	0.1242	-0.1675	-0.0178
hsTNI (ng/L)	4.70	0.08–16.30	< 19.00	0.1955	0.2814*	-0.1211	0.0174
NT-proBNP (pg/mL)	767.00	224.00–2118.00	< 125.00	0.2098	0.3353**	-0.1402	-0.1303
LDH (U/L)	396.00	297.00–535.00	225.00–450.00	0.3024*	-0.0067	-0.0457	0.4052***
Albumin (g/dL)	3.14	2.80–3.53	3.90–5.10	-0.1119	-0.3941***	-0.1567	0.0099
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	9.72	7.42–12.30	4.00–10.00	0.2010	0.1136	0.0036	-0.1959
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	3.91	3.43–4.36	4.50–5.50	-0.0441	-0.4095***	0.0024	0.2651*
HGB (g/dL)	11.80	9.90–13.20	14.00–18.00	-0.0395	-0.3242**	0.0989	0.2423*
HCT (%)	35.70	30.50–39.90	40.00–54.00	-0.0484	-0.3830**	0.0402	0.2360*
MCV (fL)	90.50	87.30–93.50	84.00–94.00	0.0006	0.0599	0.0519	-0.1690
MCH (pg)	30.20	28.90–30.90	27.00–34.00	0.0140	0.1022	0.1983	0.0369
MCHC (g/dL)	32.90	32.20–34.10	31.00–37.00	0.0161	0.1434	0.2187	0.2502*
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	295.00	210.00–393.00	130.00–350.00	-0.0028	0.0806	0.0126	-0.1342
RDW-SD (fL)	45.90	42.80–50.30	35.10–43.90	0.1875	0.3338**	-0.3147**	-0.2407*
RDW-CV (%)	13.60	12.80–15.60	11.60–14.40	0.1882	0.2862*	-0.3259**	-0.1900
CCI (points)	5.00	2.00–6.00		0.1297	0.2965*	-0.1986	-0.0219
AOPPs (μM)	6.59	5.42–8.70		–	0.2864*	0.0627	0.0927
IMA	0.99	0.74–1.18		0.2864*	–	0.0622	-0.0734
SOD (U/mL)	0.89	0.28–1.45		0.0627	0.0622	–	0.1141
GPx (U/mL)	1.62	1.35–1.95		0.0927	-0.0734	0.1141	–

Table 2. Demographic, clinical, and laboratory characteristics, as well as their correlations with oxidative stress biomarkers (AOPPs, IMA, SOD, and GPx), in patients with community-acquired pneumonia. Abbreviations: ALT: Alanine Aminotransferase; AST: Aspartate Aminotransferase; CRP: C-Reactive Protein; hsTNI: High-sensitivity troponin I; NT-proBNP: N-terminal pro b-type Natriuretic Peptide; LDH: Lactate Dehydrogenase; WBC: White Blood Cell Count; RBC: Red Blood Cell Count; HGB: Hemoglobin; HCT: Hematocrit; MCV: Mean Corpuscular Volume; MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; PLT: Platelet Count; RDW-SD: Red Cell Distribution Width-Standard Deviation; RDW-CV: Red Cell Distribution Width-Coefficient of Variation; CCI: Charlson Comorbidity Index; AOPPs: Advanced Oxidation Protein Products; IMA: ischemia-modified albumin; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase. Correlation coefficients and significance between parameters were calculated according to Spearman's method: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

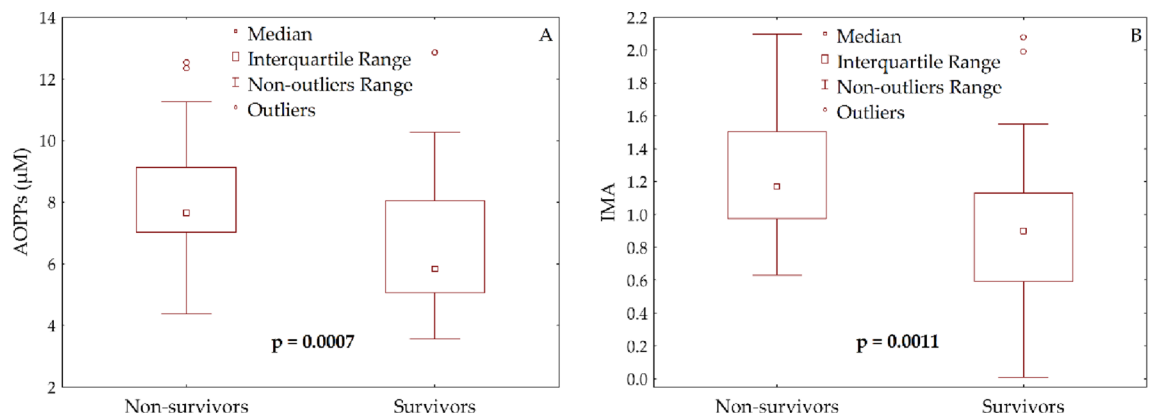


Fig. 1. Box plots showing plasma levels of AOPPs (A) and IMA (B) in survivors and non-survivors with CAP. The boxes represent the interquartile range with the median line shown, and whiskers indicate non-outlier ranges. Data points exceeding 1.5-fold the interquartile range are classified as outlier values. Statistically significant differences between groups ($p < 0.05$) are indicated.

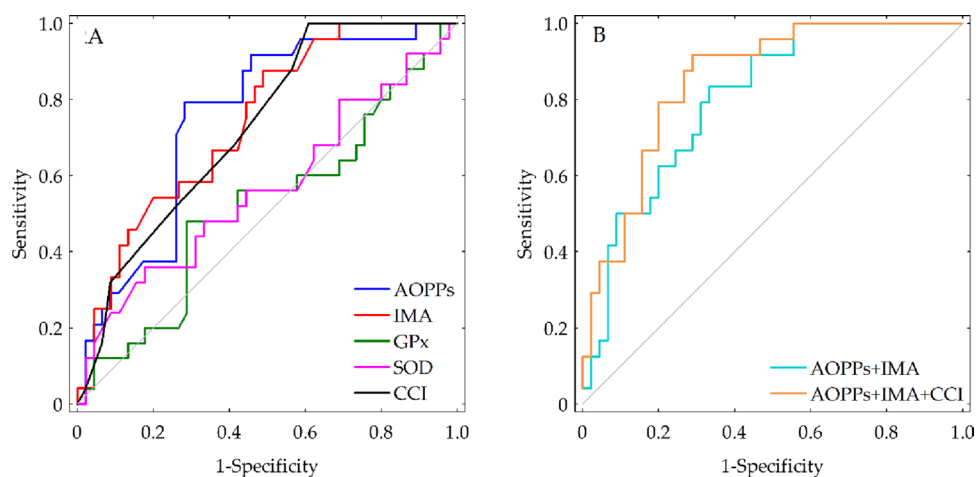


Fig. 2. Graphs showing Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for the levels of AOPPs, IMA, GPx, SOD, and CCI (A) and for logistic regression models AOPPs+IMA and AOPPs+IMA+CCI (B) for predicting long-term mortality.

Parameter/Model (Units)	Cut-off	AUC	CI	Sensitivity %	Specificity %	p-value
AOPPs (μM)	7.00	0.750	0.633–0.867	79.20	71.70	<0.0001
IMA	0.92	0.740	0.623–0.857	87.50	51.10	0.0001
SOD (U/mL)	0.218	0.565	0.419–0.712	36.00	82.20	0.3820
GPx (U/mL)	1.737	0.516	0.371–0.662	48.00	71.10	0.8248
CCI (points)	3.00	0.725	0.609–0.842	100.00	39.10	0.0001
AOPPs+IMA	0.2668	0.803	0.700–0.905	83.30	66.70	<0.0001
AOPPs+IMA+CCI	0.2594	0.851	0.762–0.940	91.70	71.10	<0.0001

Table 3. Results of the prognostic accuracy of the studied biomarkers. Abbreviations: AOPPs: Advanced Oxidation Protein Products; IMA: ischemia-modified albumin; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; CCI: Charlson Comorbidity Index; AUC: Area under the curve; CI: Confidence Interval. Statistically significant differences between groups are indicated by bold p-values.

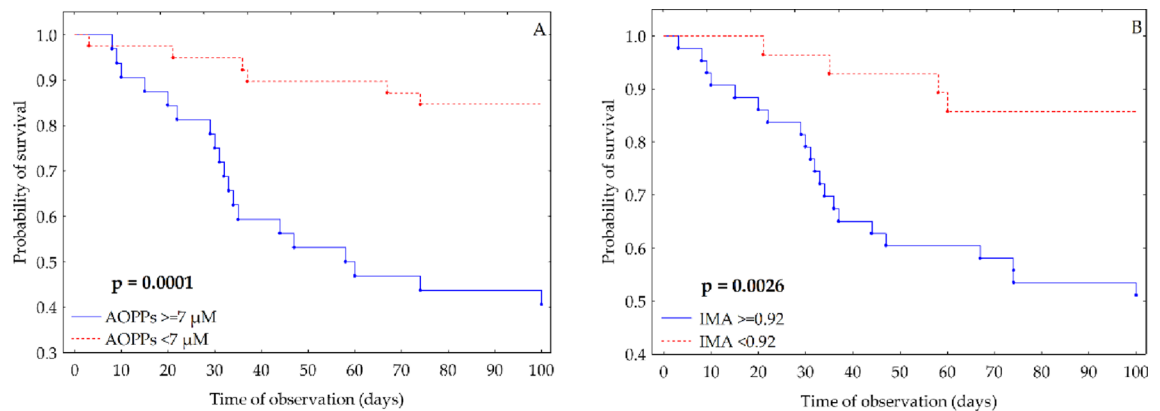


Fig. 3. Kaplan–Meier survival curves for the levels of AOPPs (A) and IMA (B) in the study group, based on cut-off points determined by ROC analysis. Significant differences between groups are indicated by bold p-values (Log-rank test).

resulted in additional improvement in model performance (AUC = 0.851; sensitivity, 91.7%; specificity, 71.1%; $p < 0.0001$). In bootstrap internal validation with 1000 resamples, the apparent and optimism-corrected AUC values were similar. For the model including AOPPs and IMA, the apparent AUC was 0.803 with an estimated optimism of 0.014, yielding an optimism-corrected AUC of 0.789. For the model including AOPPs, IMA, and CCI, the apparent AUC was 0.851 with an estimated optimism of 0.020 and an optimism-corrected AUC of 0.831. Optimism-corrected calibration slopes were approximately 1 for the single-predictor models; the slope was 0.914 for AOPPs + IMA and 0.884 for AOPPs + IMA + CCI. These findings suggest only modest overfitting; however, the estimates should still be interpreted with caution, given the limited number of events and the absence of external validation.

In contrast, enzymatic antioxidants SOD and GPx demonstrated limited discriminatory ability for 100-day mortality, with AUC values of 0.565 and 0.516, respectively, and non-significant p-values (Table 3).

Kaplan–Meier survival analysis according to AOPPs and IMA cut-off values

Figure 3 presents Kaplan–Meier survival curves illustrating 100-day survival stratified by ROC-derived cut-off values for AOPPs and IMA. Differences between strata were assessed using the log-rank test. Patients with AOPPs levels $> 7 \mu\text{M}$ or IMA absorbance > 0.92 showed significantly shorter survival compared with those below these thresholds ($p = 0.0001$ and $p = 0.0026$, respectively).

Discussion

In this prospective observational study, we investigated the association between oxidative stress biomarkers and long-term mortality in patients hospitalized with community-acquired pneumonia, as well as their relationships with routinely assessed clinical and laboratory parameters. The main finding is that higher admission levels of AOPPs and IMA were associated with increased 100-day mortality. In addition, these biomarkers showed significant associations with markers of hepatic injury, coagulation, cardiac stress, and hematological alterations, supporting their relevance to the severity of systemic disease. AOPPs and IMA also demonstrated moderate discriminatory performance for mortality, which improved when combined with comorbidity burden, indicating their potential relevance for risk stratification. Importantly, these findings should be interpreted as associations rather than evidence of causality, while still providing clinically relevant and hypothesis-generating insight into the role of oxidative stress in the long-term outcomes of CAP^{9,10,18}.

Associations of oxidative stress biomarkers with routine clinical and laboratory parameters

In our study, IMA showed significant positive correlations with NT-proBNP and high-sensitivity troponin I (hsTnI). While natriuretic peptides are well-established markers of disease severity and short-term prognosis in CAP²⁶, previous studies evaluating IMA in CAP did not include parallel assessment of cardiac biomarkers¹⁸. Associations between IMA and natriuretic peptides have been reported primarily in cardiovascular populations¹⁶. Our findings, therefore, extend existing observations and suggest that systemic oxidative stress during pneumonia may be linked to secondary myocardial strain. However, these relationships should be interpreted as associations rather than indicators of direct cardiac injury mechanisms.

Oxidative stress biomarkers were also associated with markers of coagulation and endothelial perturbation. In particular, AOPPs correlated positively with D-dimer concentrations, consistent with prior reports linking oxidative stress to hemostatic activation in severe infection. These findings support the concept that protein oxidation markers may reflect the broader systemic response to inflammation and vascular dysfunction in CAP²⁴.

In contrast, enzymatic antioxidants demonstrated a different pattern of associations. SOD and GPx showed limited discriminatory ability for mortality and appeared to be more closely related to routine laboratory parameters. GPx activity correlated positively with liver enzymes (ALT, AST) and LDH, as well as with red blood cell indices, suggesting a potential adaptive antioxidant response in the context of systemic inflammation

and cellular injury. Similar associations between GPx activity and hepatic enzymes have been reported in other inflammatory conditions²⁰. SOD activity, however, showed fewer systemic associations, which may reflect its intracellular localization and context-dependent regulation^{21,27}.

Albumin-related parameters further highlight the systemic nature of oxidative stress in CAP. The inverse relationship between serum albumin and IMA underscores albumin's role as both a major extracellular antioxidant and a target of oxidative modification¹⁸. Associations between IMA and hematological indices, including red blood cell count, hemoglobin, and RDW, suggest that oxidative albumin modification may integrate redox imbalance with inflammation-related hematological alterations. These findings are consistent with previous observations linking oxidative stress to anemia and erythrocyte heterogeneity in inflammatory states.

Prognostic relevance of AOPPs and IMA

AOPPs and IMA have been increasingly recognized as markers reflecting oxidative stress in respiratory infections, including community-acquired pneumonia (CAP)^{9,28}; however, evidence supporting their clinical relevance remains limited. In our cohort, patients who died within 100 days of hospital admission had significantly higher plasma levels of AOPPs and IMA compared with survivors. Previous studies have reported elevated AOPPs in CAP patients relative to healthy controls^{29,30}, while Bolatkale et al. demonstrated the diagnostic utility of IMA in CAP in the emergency department, without assessing its relationship with patient survival¹⁸. Our findings, therefore, extend existing observations by linking admission levels of these biomarkers with long-term outcomes following CAP.

In addition, survival analyses demonstrated that patients stratified by ROC-derived cut-off values of AOPPs and IMA exhibited significantly different 100-day survival probabilities, further supporting an association between higher oxidative stress burden at admission and adverse long-term outcomes. Importantly, AOPPs and IMA demonstrated moderate discriminatory performance for 100-day mortality, which improved when combined with comorbidity burden. These results suggest that oxidative stress biomarkers may provide complementary information to routine clinical assessment rather than serving as standalone prognostic indicators. Given the observational nature of the study and the limited number of events, the present results should be viewed as exploratory and require confirmation in larger cohorts. Taken together, these associations support the relevance of systemic oxidative stress in the post-acute course of CAP. While the underlying mechanisms cannot be inferred from the present study, our results highlight the value of further investigating AOPPs and IMA in larger, multicenter cohorts with longitudinal follow-up and direct comparison to established severity scores.

Limitations of the study

Despite the promising findings, several limitations should be acknowledged. First, the relatively small sample size, limited number of events, and single-center design may restrict the generalizability of the results. Second, although selected clinical variables were included, several potentially important confounding factors, such as comorbidities, nutritional status, renal function, inflammatory burden, and medication use, were not fully adjusted for and may independently influence oxidative stress biomarkers and clinical outcomes. Third, biomarker measurements were obtained at a single time point on admission; thus, longitudinal changes in oxidative stress during the disease course and recovery could not be assessed. Fourth, the prognostic performance of AOPPs and IMA was not compared with established CAP severity scores, such as CURB-65 or the Pneumonia Severity Index, which limits conclusions regarding their incremental value in clinical risk stratification. Fifth, the clinical applicability of these biomarkers remains constrained by the limited standardization of assays and their absence from routine diagnostic workflows. Finally, as this was an observational study, causal inferences cannot be drawn. Future studies should validate these findings in larger, multicenter cohorts, incorporate longitudinal biomarker assessment, and directly compare oxidative stress markers with established severity scores to better define their potential role in prognostic evaluation of CAP.

Conclusion

This study indicates that oxidative stress-related biomarkers, including AOPPs and IMA, are associated with systemic redox imbalance in patients hospitalized with CAP. Higher admission levels of these biomarkers were associated with increased 100-day mortality, suggesting their relevance to longer-term outcomes beyond the acute phase of infection. The combined assessment of AOPPs, IMA, and comorbidity burden showed improved discriminatory performance, indicating that oxidative stress markers may provide complementary information for risk stratification. Given the observational design and methodological limitations, these findings should be considered hypothesis-generating and warrant validation in larger, multicenter studies with longitudinal follow-up before clinical implementation.

Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 21 November 2025; Accepted: 14 January 2026

Published online: 09 February 2026

References

- Martin-Loeches, I. et al. ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of severe community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med.* **49**, 615–632 (2023).
- Shoar, S. & Musher, D. M. Etiology of community-acquired pneumonia in adults: a systematic review. *Pneumonia* **12**, 11 (2020).
- Mongardon, N. et al. Epidemiology and outcome of severe Pneumococcal pneumonia admitted to intensive care unit: a multicenter study. *Crit. Care.* **16**, R155 (2012).
- Tsoumani, E., Carter, J. A., Salomonsson, S., Stephens, J. M. & Bencina, G. Clinical, economic, and humanistic burden of community acquired pneumonia in europe: a systematic literature review. *Expert Rev. Vaccines.* **22**, 876–884 (2023).
- Ferrer, M. et al. Severe community-acquired pneumonia: characteristics and prognostic factors in ventilated and non-ventilated patients. *PLoS One.* **13**, e0191721 (2018).
- Moussaoui, R. et al. Long-term symptom recovery and health-related quality of life in patients with mild-to-moderate-severe community-acquired pneumonia. *Chest* **130**, 1165–1172 (2006).
- Carlos, P. et al. CURB-65 and Long-Term mortality of Community-Acquired pneumonia: A retrospective study on hospitalized patients. *Cureus* **15**, e36052 (2023).
- Agita, A. & Thaha Alsagaff, M. Inflammation, Immunity, and hypertension. *Acta Med. Indones.* **49**, 158–165 (2017).
- Xu, W., Zhao, T. & Xiao, H. The implication of oxidative stress and AMPK-Nrf2 antioxidative signaling in pneumonia pathogenesis. *Front. Endocrinol.* **11**, 400 (2020).
- Makram Youssef, F., Elmokadem, E. M., Eskander, A., Samy, H. & Ateyya, H. Antioxidants as adjuvant therapy in the treatment of community-acquired pneumonia. *Future J. Pharm. Sci.* **10**, 1–19 (2024).
- Ou, H., Huang, Z., Mo, Z. & Xiao, J. The characteristics and roles of advanced oxidation protein products in atherosclerosis. *Cardiovasc. Toxicol.* **17**, 1–12 (2017).
- Conti, G. et al. Association of higher advanced oxidation protein products (AOPPs) levels in patients with diabetic and hypertensive nephropathy. *Medicina* **55**, 675 (2019).
- Anjo, S. I. et al. Protein oxidative modifications in neurodegenerative diseases: from advances in detection and modelling to their use as disease biomarkers. *Antioxidants* **13**, 681 (2024).
- Napiórkowska-Mastalerz, M. et al. A preliminary evaluation of advanced oxidation protein products (AOPPs) as a potential approach to evaluating prognosis in Early-Stage breast cancer patients and its implication in tumour angiogenesis: A 7-Year Single-Centre study. *Cancers (Basel)*. **16**, 1068 (2024).
- Zhou, C. et al. Association between serum advanced oxidation protein products and mortality risk in maintenance Hemodialysis patients. *J. Transl. Med.* **19**, 1–8 (2021).
- Senadeera, N. N., Ranaweera, C. B., Perera, I. C. & Kottahachchi, D. U. Biochemical insights and clinical applications of Ischemia-Modified albumin in ischemic conditions. *J. Vasc Dis.* **3**, 245–266 (2024).
- Roy, D. et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart* **92**, 113–114 (2006).
- Bolatkale, M. et al. A novel biochemical marker for community-acquired pneumonia: Ischemia-modified albumin. *Am. J. Emerg. Med.* **35**, 1121–1125 (2017).
- Tanriverdi, M. et al. Could ischemia-modified albumin levels predict the severity of disease in SARS-CoV-2 infection? *J. Infect. Dev. Ctries.* **17**, 1055–1062 (2023).
- Ismail, N. A. et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in children with chronic hepatitis. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **3**, 972–977 (2012).
- Chu, J. et al. Superoxide dismutase alterations in COVID-19: implications for disease severity and mortality prediction in the context of Omicron variant infection. *Front. Immunol.* **15**, 1362102 (2024).
- Witko-Sarsat, V. et al. Descamps Latscha, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* **49**, 1304–1313 (1996).
- Hanasand, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin. Chim. Acta.* **413**, 901–906 (2012).
- Bar-Or, D., Lau, E. & Winkler, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia - A preliminary report. *J. Emerg. Med.* **19**, 311–315 (2000).
- Charlson, M., Szatrowski, T. P., Peterson, J. & Gold, J. Validation of a combined comorbidity index. *J. Clin. Epidemiol.* **47**, 1245–1251 (1994).
- Jeong, K. Y. et al. Prognostic value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in hospitalised patients with community-acquired pneumonia. *Emerg. Med. J.* **28**, 122–127 (2011).
- Yatmaz, S. et al. Glutathione Peroxidase-1 reduces influenza A Virus-Induced lung inflammation. *Am. J. Respir Cell. Mol. Biol.* **48**, 17–26 (2013).
- Bezerra, F. S. et al. Oxidative stress and inflammation in acute and chronic lung injuries. *Antioxidants* **12**, 548 (2023).
- Muravlyova, L. et al. Characteristic of the oxidative stress in blood of patients in dependence of Community-Acquired pneumonia severity. *Maced J. Med. Sci.* **4**, 122–127 (2016).
- Molotov-Luchanskiy, V. et al. Biomarkers for oxidative stress in patients with community-acquired pneumonia. *Eur. Respir J.* **46**, OA3247 (2015).

Author contributions

M.N.-M. and T.W.: Conceptualization; T.W., M.N.-M., P.W., J.S., W.M.: methodology; M.N.-M.: data analysis; M.N.-M. and T.W.: investigation; M.P.-C. and J.P.: resources; M.N.-M., T.W., and B.C.: writing—original draft; M.N.-M., B.C., and T.W.: writing—review and editing; M.N.-M.: visualization; B.C. and S.K.: supervision; M.N.-M. and T.W.: project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Ethical statement

This study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Poland (KB 343/2021).

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.N.-M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2026