

dr hab. n. med. Agnieszka Kuchta
Zakład Chemii Klinicznej
Katedra Analityki Klinicznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a
80-210 Gdańsk

R E C E N Z J A

rozprawy doktorskiej mgr Marty Marii Napiórkowskiej-Mastalerz

pt. „Znaczenie kliniczne i prognostyczne zaawansowanych produktów utleniania białek (AOPPs) w chorobach związanych ze stresem oksydacyjnym”

Promotor pracy: dr hab. n. med. Barbara Ciastek, prof. UO

Promotor pomocniczy: dr n. med. inż. Tomasz Wybranowski

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska podejmuje ważne i aktualne zagadnienie znaczenia zaburzeń homeostazy redoks w przebiegu chorób zapalnych i nowotworowych. Przedmiotem badań są zaawansowane produkty utleniania białek (AOPPs), rozpatrywane jako stosunkowo trwałe markery oksydacyjnej modyfikacji białek oraz potencjalne wskaźniki ciężkości choroby i rokowania. Poszukiwanie łatwo dostępnych biomarkerów, które mogłyby uzupełnić klasyczne parametry laboratoryjne i kliniczne, pozostaje jednym z istotnych kierunków rozwoju współczesnej diagnostyki laboratoryjnej i medycyny spersonalizowanej.

Stres oksydacyjny oraz przewlekła lub nadmierna odpowiedź zapalna tworzą wzajemnie powiązaną sieć procesów patofizjologicznych. Aktywowane komórki układu odpornościowego, szczególnie neutrofile i monocyty, są źródłem reaktywnych form tlenu i chloru, które mogą prowadzić do modyfikacji albuminy oraz innych białek osocza. Powstające AOPPs nie tylko odzwierciedlają nasilenie uszkodzeń oksydacyjnych, lecz zgodnie z danymi eksperymentalnymi mogą również aktywować szlaki zależne od receptora dla zaawansowanych produktów glikacji (RAGE), receptora CD36 i czynnika jądrowego κB (NF- κB), podtrzymując odpowiedź zapalną i wpływając na funkcjonowanie śródbłónka. Ze względu na heterogenny charakter AOPPs oraz ograniczoną swoistość ich oznaczeń rzetelna ocena rzeczywistego znaczenia klinicznego tego biomarkera wymaga starannie zaprojektowanych badań, takich jak prace przedstawione w ocenianym cyklu.

Doktorantka podjęła próbę określenia klinicznego i prognostycznego znaczenia AOPPs w trzech odmiennych, lecz powiązanych mechanizmem oksydacyjno-zapalnym sytuacjach

klinicznych: zapaleniu płuc w przebiegu COVID-19, wczesnym raku piersi oraz pozaszpitalnym zapaleniu płuc. Takie ujęcie umożliwiło analizę AOPPs zarówno w ostrej odpowiedzi zapalnej i jej odległej dynamice, jak również w przewlekłym procesie nowotworowym oraz w ocenie ryzyka zgonu po hospitalizacji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech oryginalnych prac opublikowanych w latach 2022–2026 w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *International Journal of Molecular Sciences*, *Cancers* oraz *Scientific Reports*. Łączna wartość współczynnika oddziaływania wynosi 13,9, a sumaryczna punktacja ministerialna 420 punktów. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, co jest w pełni uzasadnione interdyscyplinarnym charakterem badań łączących diagnostykę laboratoryjną, biofizykę, pulmonologię i onkologię.

Na szczególne podkreślenie zasługuje znaczący i dobrze udokumentowany wkład mgr Marty Marii Napiórkowskiej-Mastalerz w powstanie cyklu. W pierwszej publikacji doktorantka jest drugą autorką, a jej udział oszacowano na 40%. W dwóch kolejnych pracach jest pierwszą autorką, z udziałem wynoszącym odpowiednio 70% i 60%. Jej aktywność obejmowała współtworzenie koncepcji badań, wykonanie analiz instrumentalnych, analizę statystyczną i wizualizację wyników, formułowanie wniosków, przegląd piśmiennictwa oraz przygotowanie i redakcję manuskryptów. Zakres ten wskazuje na dużą samodzielność badawczą doktorantki i nie budzi wątpliwości co do jej wiodącej roli w realizacji osiągnięcia naukowego.

Cykl publikacji został poprzedzony przejrzystym wstępem teoretycznym, w którym autorka stopniowo wprowadza czytelnika w zagadnienia homeostazy redoks, mechanizmy stresu oksydacyjnego oraz konsekwencje oksydacyjnego uszkodzenia lipidów, DNA i białek. Szczegółowo omówiono właściwości biochemiczne AOPPs, metody ich oznaczania, rolę w procesach zapalnych i nowotworowych oraz dotychczasowe dane dotyczące wartości prognostycznej. Wstęp prowadzi logicznie do sformułowania celu głównego i trzech celów szczegółowych. Bibliografia liczy 112 pozycji i obejmuje liczne aktualne publikacje. Cennym elementem rozprawy jest osobne przedstawienie ograniczeń spektrofotometrycznego oznaczania AOPPs, w tym wpływu hemolizy, bilirubiny, lipemii, rodzaju materiału biologicznego oraz braku standaryzacji międzylaboratoryjnej.

Pierwsza praca cyklu, opublikowana w 2022 roku w *International Journal of Molecular Sciences*, dotyczyła oksydacyjnej modyfikacji albuminy u pacjentów hospitalizowanych z powodu zapalenia płuc w przebiegu COVID-19. Do badania włączono 66 chorych, u których próbki pobrano przy przyjęciu do szpitala. Kolejne oznaczenia wykonano po siedmiu dniach u 44 osób, po sześciu miesiącach u 30 osób i po dwunastu miesiącach u 27 osób. Longitudinalny charakter projektu jest jego istotną zaletą, ponieważ umożliwił ocenę dynamiki zmian oksydacyjnych nie tylko w ostrej fazie zakażenia, lecz również w okresie rekonwalescencji.

Wykazano dodatnie zależności pomiędzy stężeniem AOPPs a parametrami laboratoryjnymi odzwierciedlającymi stan zapalny, uszkodzenie narządowe i zaburzenia hemostazy, w tym stężeniem białka C-reaktywnego (CRP), prokalcytoniny i D-dimerów oraz aktywnością dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i aminotransferaz. Interesująca jest również korelacja z nasileniem zmian w tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości (HRCT). Po sześciu

miesiącach stężenie AOPPs było istotnie niższe niż w ostrej fazie choroby. Wyniki te wspierają koncepcję, że nasilona oksydacyjna modyfikacja białek jest związana z aktywną fazą zakażenia i ogólnoustrojowym obciążeniem chorobą. Wartościowym uzupełnieniem badań klinicznych były eksperymenty *in vitro*, w których analizowano możliwe mechanizmy oksydacyjnego uszkodzenia albuminy.

Doktorantka prawidłowo wskazuje, że brak wartości wyjściowych sprzed zakażenia oraz zmniejszająca się liczba uczestników w kolejnych punktach obserwacji ograniczają możliwość jednoznacznej interpretacji odległych zmian. Interesującym elementem badania było uwzględnienie, obok stężenia AOPPs i albuminy, także ilorazu AOPPs/albumina, który wykazywał nieco silniejsze korelacje z niektórymi parametrami klinicznymi. W kolejnych pracach posługiwano się już wyłącznie stężeniem AOPPs. Jakie informacje wnosi każdy z tych dwóch sposobów oceny oraz jakie są ich najważniejsze zalety i ograniczenia?

Druga publikacja, opublikowana w 2024 roku w czasopiśmie *Cancers*, dotyczy potencjalnej wartości prognostycznej AOPPs u 70 pacjentek z pierwotnym, nieleczonym i nieprzerzutującym rakiem piersi w stadium IA–IIB. Próbkę pobierano przed zabiegiem operacyjnym oraz około dziewięciu miesięcy po resekcji guza, a mediana czasu obserwacji wynosiła 78 miesięcy. Długi okres obserwacji i dwukrotna ocena biomarkera są niewątpliwymi zaletami projektu.

Uzyskane wyniki wskazały na związki AOPPs z wybranymi cechami biologicznymi nowotworu, w tym podtypem molekularnym, indeksem proliferacyjnym Ki-67 oraz statusem receptorów estrogenowego i progesteronowego. Szczególnie interesujące są dodatnia korelacja stężenia AOPPs z czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF-A) przed leczeniem oraz ujemna korelacja z rozpuszczalnym receptorem VEGFR2 (sVEGFR2) po leczeniu. Obserwacje te sugerują związek oksydacyjnych modyfikacji białek z wybranymi markerami angiogenezy. Wyniki analiz krzywych ROC (receiver operating characteristic), krzywych Kaplana-Meiera i modeli Coxa wskazały ponadto, że wysokie stężenia AOPPs, szczególnie oznaczone po leczeniu, wiązały się z większym ryzykiem nawrotu oraz krótszym czasem przeżycia.

Na uwagę zasługuje ostrożność doktorantki w interpretacji wyników. Autorka podkreśla wstępny charakter obserwacji, niewielką liczbę zdarzeń klinicznych i konieczność ich potwierdzenia w większych populacjach. Powiązanie biomarkera stresu oksydacyjnego z markerami angiogenezy i odległym rokowaniem stanowi wartościowy oraz oryginalny element rozprawy, otwierający interesujący kierunek dalszych badań.

Przedstawione analizy przeżycia dostarczyły interesujących danych dotyczących potencjalnego znaczenia prognostycznego AOPPs. Z perspektywy dalszego rozwoju badań warto zwrócić uwagę na sposób wyznaczenia punktów odcięcia. Określono je na podstawie klasycznej analizy ROC w tej samej, stosunkowo niewielkiej grupie, w której następnie oceniano ich znaczenie prognostyczne. Takie podejście może sprzyjać optymistycznej ocenie właściwości klasyfikacyjnych biomarkera, dlatego uzyskane prognozy należy traktować jako eksploracyjne i wymagające niezależnej walidacji. W kolejnych analizach warto byłoby rozważyć krzywe ROC zależne od czasu, uwzględniające określony horyzont rokowania oraz obserwacje cenzorowane. Sugestie te służą dalszemu wzmocnieniu oceny prognostycznej wartości obiecujących wyników przedstawionych przez doktorantkę.

Trzecia praca, opublikowana w 2026 roku w Scientific Reports, oceniała wartość AOPPs oraz albuminy modyfikowanej niedokrwieniem (ischemia-modified albumin, IMA) w przewidywaniu 100-dniowej śmiertelności u 71 pacjentów hospitalizowanych z powodu pozaszpitalnego zapalenia płuc. Badanie miało charakter prospektywny, a próbki pobierano w ciągu 24 godzin od przyjęcia. W analizie uwzględniono również wskaźnik chorób współistniejących Charlson (Charlson Comorbidity Index, CCI), co pozwoliło zestawzić biomarkery oksydacyjne z klinicznym obciążeniem pacjentów.

Pacjenci, którzy zmarli w okresie obserwacji, charakteryzowali się wyższymi wartościami AOPPs i IMA. Spośród pojedynczych parametrów oba markery wykazały najlepszą zdolność dyskryminacyjną. Połączenie AOPPs i IMA, a następnie uzupełnienie modelu o CCI poprawiało ocenę ryzyka. Istotną zaletą pracy jest zastosowanie procedury bootstrap z 1000 powtórzeń i przedstawienie skorygowanej o optymizm wartości pola pod krzywą ROC (area under the curve, AUC) dla modelu trójskładnikowego, wynoszącej 0,831. Autorzy ocenili także kalibrację modeli w ramach walidacji wewnętrznej; skorygowane o optymizm nachylenie kalibracji dla modelu trójskładnikowego wyniosło 0,884. Świadczy to o dojrzałości metodologicznej projektu i właściwym dostrzeżeniu problemu nadmiernego dopasowania modelu w niewielkiej grupie.

Uzyskane wyniki są interesujące klinicznie, ponieważ badane parametry odzwierciedlają odmienne, choć powiązane elementy patofizjologii: oksydacyjne modyfikacje białek, zmniejszoną zdolność albuminy do wiązania kobaltu oraz obciążenie chorobami współistniejącymi. Podzielałam wskazaną przez autorów potrzebę dalszego porównania wartości modelu obejmującego AOPPs, IMA i CCI z uznanymi skalami oceny ciężkości pozaszpitalnego zapalenia płuc, takimi jak skala CURB-65 (uwzględniająca zaburzenia świadomości, stężenie mocznika, częstość oddechów, ciśnienie tętnicze i wiek co najmniej 65 lat) oraz wskaźnik ciężkości zapalenia płuc (Pneumonia Severity Index, PSI). Wartościowym kolejnym etapem byłaby zewnętrzna walidacja modelu, obejmująca potwierdzenie jego zdolności dyskryminacyjnej i kalibracji oraz ocenę dodatkowej wartości biomarkerów ponad informacje kliniczne. Stanowiłoby to naturalne rozwinięcie przeprowadzonych analiz i pozwoliłoby pełniej określić potencjalną przydatność uzyskanych wyników.

Za szczególnie wartościową uważam zawartą w rozprawie próbę wspólnej interpretacji wyników trzech publikacji. Doktorantka wskazuje, że w chorobach infekcyjnych AOPPs wiążą się z nasileniem zapalenia, uszkodzeniem narządowym i zaburzeniami hemostazy, natomiast w raku piersi z cechami biologicznymi guza, markerami angiogenezy i rokowaniem. Pozwala to rozpatrywać AOPPs jako wskaźnik szerszej osi patofizjologicznej łączącej aktywację zapalną, zaburzenie równowagi redoks, oksydacyjną modyfikację białek oraz zmiany funkcji naczyń.

Jednocześnie autorka trafnie zaznacza, że AOPPs nie są biomarkerem swoistym dla określonej jednostki chorobowej. Ich potencjalna wartość może polegać na dostarczeniu dodatkowej informacji o komponencie oksydacyjnym procesu chorobowego. Na uznanie zasługuje obszerny rozdział poświęcony ograniczeniom badań, obejmujący małe, jednośrodkowe grupy, obserwacyjny charakter analiz, heterogenność populacji, wpływ czynników zakłócających, niewielką liczbę zdarzeń w raku piersi, brak walidacji zewnętrznej oraz ograniczenia analityczne

oznaczania AOPPs. Tak krytyczne spojrzenie na własne wyniki świadczy o dojrzałości naukowej doktorantki.

Uzyskane wyniki wskazują, że AOPPs mogą być wartościowym uzupełnieniem klasycznych parametrów laboratoryjnych i klinicznych w ocenie przebiegu choroby oraz rokowania. Dodatkową zaletą jest możliwość ich oznaczania za pomocą stosunkowo prostej i dostępnej metody spektrofotometrycznej, co zwiększa potencjał aplikacyjny prowadzonych badań. Naturalnym kolejnym etapem jest zatem określenie działań, które mogłyby przybliżyć wykorzystanie AOPPs w praktyce klinicznej. Które z obecnych ograniczeń oznaczania AOPPs uważa Pani za najważniejsze wyzwanie i jaki kolejny etap badań należałoby podjąć, aby je ograniczyć?

Przedstawiona do oceny rozprawa została zredagowana w sposób staranny i przejrzysty. Cele pracy są czytelne i odpowiadają zakresowi opublikowanych badań, a wnioski zostały sformułowane z należytą ostrożnością, z podkreśleniem potencjalnego charakteru zastosowań klinicznych. Przedstawione uwagi mają charakter dyskusyjny i odnoszą się przede wszystkim do naturalnych kierunków dalszego rozwoju badań: standaryzacji oznaczeń, zewnętrznej walidacji modeli oraz ostrożności w przypisywaniu zależnościom obserwacyjnym znaczenia przyczynowego. Nie zmniejszają one wartości poznawczej rozprawy, lecz wskazują perspektywę wartościowej kontynuacji podjętej problematyki.

Podsumowując, stwierdzam, że mgr Marta Maria Napiórkowska-Mastalerz zrealizowała założone cele badawcze. Problem naukowy został poprawnie sformułowany, a zastosowane metody pozwoliły uzyskać oryginalne i wartościowe wyniki. Rozprawa wnosi istotny wkład w poznanie klinicznego i prognostycznego znaczenia oksydacyjnych modyfikacji białek oraz wskazuje możliwości dalszego rozwoju badań nad wykorzystaniem AOPPs jako biomarkera wspomagającego ocenę ryzyka. Dorobek publikacyjny, wiodący udział doktorantki w dwóch pracach oraz umiejętność krytycznej syntezy wyników potwierdzają jej przygotowanie do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnoszę zatem do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Marty Marii Napiórkowskiej-Mastalerz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę spójność i aktualność podjętej problematyki, wartość poznawczą uzyskanych wyników, wysoki poziom dorobku publikacyjnego oraz znaczący wkład doktorantki w powstanie cyklu, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

dr hab. n. med. Agnieszka Kuchta