Wrocław 26.10.2020

dr hab. n. med. Adam Maciejczyk
Klinika Radioterapii Katedry Onkologii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

Recenzja
rozprawy doktorskiej lekarz medycyny Zdzisławy Rugały
zatytułowanej:
„Prognostyczne znaczenie wskaźników stanu zapalnego: N/LR, L/MR, PLT/LR, PLT oraz obniżonego poziomu Hb u chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy."

na zlecenie: Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Jacek Fijuth,

W ciągu ostatnich lat stale rośnie zachorowalność na raka jelita grubego. Polska odnotowuje największą dynamikę wzrostu liczby zachorowań na ten nowotwór w Europie. Podstawową metodą leczenia raka odbytnicy jest zabieg operacyjny kojarzony z przedoperacyjną lub rzadziej pooperacyjną radioterapią czy też radiochemioterapią. W ostatnim czasie prowadzone są również badania nad deeskalacją leczenia onkologicznego, szczególnie w grupie starszych, obciążonych schorzeniami współistniejącymi, pacjentów. Jednym z przykładów takich działań jest postępowanie terapeutyczne polegające na odstąpieniu od zabiegu operacyjnego u chorych, u których po zastosowaniu samodzielnej radioterapii uzyskano całkowitą regresję zmian (tzw. strategia "watch and wait"). Metoda ta ma zastosowanie zwłaszcza w nisko położonych guzach odbytnicy, które są łatwo dostępne do badania i prowadzenia ścisłej obserwacji. Pozwala ona także zaoszczędzić zwieracz u chorych z planowanym brzuszno-kroczowym odcięciem odbytnicy. Nadal poszukiwane są jednak czynniki biologiczne, które oznaczone przed leczeniem, pomagałyby wybrać odpowiednią strategię dalszego postępowania. Markery ogólnoustrojowej reakcji zapalnej na nowotwór: N/LR, L/MR, PLT, PLT/LR, czy Hb, które są pozyskiwane z podstawowego badania krwi przed leczeniem, są dobrym przykładem tanich i łatwo dostępnych markerów biologicznych, których określenia wartości prognostycznego podjęłą się w swojej rozprawie doktorskiej lekarz medycyny Zdzisława Rugała.

Praca swoją tematyką porusza istotny problem medycyny onkologicznej, jakim jest wartość prognostyczna markerów ogólnoustrojwej reakcji zapalnej na nowotwór u chorych na zaawansowanego miejscowo raka odbytnicy.

1. **Charakterystyka i ocena formalna rozprawy.**

Rozprawa doktorska lekarz medycyny Zdzisławy Rugała zatytułowana: „Prognostyczne znaczenie wskaźników stanu zapalnego: N/LR, L/MR, PLT/LR, PLT oraz obniżonego poziomu Hb u chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy." pod względem struktury ma składowe typowe dla oryginalnych opracowań. Tekst dysertacji 86 stronicowy zawiera: Wstęp, Metodologię badania własnego, Materiał i metodę, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów, Spis tabel oraz Spis rycin oraz Piśmiennictwo zawierające 126 pozycji, Część teoretyczna i empiryczna wzbogacona jest 10 rycinami i 10 tabelami. Wstęp poprzedza spis treści.

Język recenzowanej rozprawy jest poprawny, używane pojęcia są merytoryczne i precyzyjne w ramach omawianej tematyki.

2. Charakterystyka i ocena merytoryczna rozprawy.

Tematyka rozprawy dotyczy wartości prognostycznej wskaźników stanu zapalnego: N/LR, L/MR, PLT/LR, PLT oraz obniżonego poziomu Hb u chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy. Celem drugorzędnym była ocena związku powyższych wskaźników ze stopniem zaawansowania nowotworu oraz statusem zajęcia regionalnych węzłów chłonnych miednicy mniejszej.

2.1. Trafność wyboru tematu i aktualność podjętej w dysertacji tematyki badawczej.

Doktorantka wprowadzając w tematykę dysertacji we *Wstępie* wyróżniła 7 podrozdziałów liczących łącznie 18 stron.

W podrozdziale 1.1 *Wstępu* Doktorantka omówiła epidemiologię raka odbytnicy na świecie, w Polsce i w województwie świętokrzyskim. Zwróciła uwagę na obserwowany wzrost zachorowalności oraz, stabilizację w zakresie umieralności pacjentów.

W podrozdziale 1.2 *Wstępu* Doktorantka omówiła najważniejsze czynniki rozwoju raka odbytnicy. Zwróciła uwagę na istotną rolę wieku, rodzaju diety, obecności stanu zapalnego jelit. Autorka dodatkowo przedstawiła charakterystykę zespołów chorobowych uwarunkowanych genetycznie, w których występuje zwiększone ryzyko wystąpienia raka odbytnicy.

Podrozdział 1.3 i 1.4 *Wstępu* Autorka poświęciła omówieniu diagnostyki patomorfologicznej i radiologicznej standardowo wykonywanych w tej grupie pacjentów. Doktorantka omówiła wszystkie zalecane metody diagnostyczne zwracając uwagę na istotną rolę badania NMR z użyciem cewki endorektalnej, w ocenie stopnia miejscowego zaawansowania choroby.

Podrozdział 1.5 *Wstępu* Doktorantka poświęciła ocenie metodom leczenia chorych na raka odbytnicy. Doktorantka przedstawiła podstawowy cel terapii, poszczególne etapy i stosowane metody leczenia chorych. Omówiła wskazania do zastosowania radioterapii przedoperacyjnej i pooperacyjnej oraz zasady kojarzenia tej metody leczenia z chemioterapią.

Podrozdział 1.6 zawiera opis charakteru stanu zapalnego, który towarzyszy chorobie nowotworowej. Omówiła rolę makrofagów, neutrofilów, komórekk podścieliska, fibroblastów i komórek nabłonka, które oddziałują ze sobą poprzez wiele mediatorów. Należą do nich między innymi interleukiny: 17, 23, 22, czynnik NF-kappa-B (czynnik jądrowy kappa B), mieloperoksydaza i wiele innych. Autorka podkreśliła, że zwiększone wytwarzanie cytokin i aktywacja szlaków metabolicznych, a także powstałe beztlenowe środowisko w komórce, uszkadzają DNA komórek nabłonka, co powoduje zaburzenie proliferacji, apoptozy czy autofagii.

W podrozdziale 1.7 Autorka przedstawiła złożoną patofizjologię niedokrwistości, która towarzyszy nowotworom. Zaburzenia erytropoezy mogą być spowodowane obniżonym wytwarzaniem erytropoetyny oraz zaburzoną dla niej ekspresję receptorów na komórkach prekursorowych układu czerwonokrwinkowego w szpiku. Innym procesem patofizjologicznym

odpowiedzialnym za niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych jest nieprawidłowa dystrybucja żelaza w organizmie. W powyższych procesach biorą udział cytokiny prozapalne, których stężenie zwiększa się w przebiegu choroby nowotworowej. Lekarz medycyny Zdzisława Reguła zwraca uwagę, że nawet łagodna niedokrwistość powoduje pogorszenie komfortu życia pacjenta, zmniejsza odpowiedź na leczenie oraz prowadzi do hipoksji guza nowotworowego. U osób chorych na nowotwór z łagodną niedokrwistością potwierdzono obecność hipoksji komórek guza, która w przeciwieństwie do tkanki zdrowej nie może być skompensowana zwiększoną perfuzją. Dodatkowo autorka opisuje wpływ niedokrwistości na efektywność leczenia nowotworów oraz zasady jej leczenia.

Ocena treści wprowadzenia do problematyki dysertacji wykazuje pełne przygotowanie teoretyczne Doktorantki do podejmowania klinicznych procedur badawczych dotyczących medycyny onkologicznej. Należy podkreślić trafność wyboru tematu i aktualność podjętej tematyki badawczej, wobec współczesnych wyzwań w dziedzinie onkologii oraz wiedzy dotyczącej patomechanizmu raka odbytnicy oraz towarzyszącego stanu zapalnego

2.2 Sformułowany cel pracy.

Głównym celem dysertacji jest ocena prognostycznej roli markerów hematologicznych ogólnoustrojowej reakcji zapalnej: N/LR, L/MR, PLT, PLT/LR oraz Hb u chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy. Celem drugorzędnym była ocena związku powyższych wskaźników ze stopniem zaawansowania nowotworu oraz statusem zajęcia regionalnych węzłów chłonnych miednicy mniejszej. Sformułowane cele są poprawne pod względem formalnym oraz merytorycznym i odpowiadają tytułowi pracy.

2.3 Zastosowane metody i materiał badawczy.

Rozdział Metodyka badania własnego jest merytoryczny i wyczerpujący w swoich treściach w odniesieniu do badanego problemu, grupy badanej i zastosowanych metod w pracy.

Badaniem objęto 220 pacjentów (128 mężczyzn oraz 92 kobiety), leczonych w Zakładzie Radioterapii Świętokrzyskiego Centrum Onkologii z powodu potwierdzonego histopatologicznie gruczołowego raka odbytnicy w II i III stopniu klinicznego zaawansowania wg UICC. Wszyscy pacjenci otrzymali przedoperacyjną RT w dawce całkowitej 25Gy w dawkach frakcyjnych po 5Gy każdego dnia. Zbadano także wpływ czynników stanu zapalnego: N/LR, L/MR, PLT/LR, PLT oraz Hb na rokowanie oraz ich zależność od stopnia zaawansowania klinicznego, statusu zajęcia węzłów chłonnych ocenianego po operacji. Wartości powyższych wskaźników uzyskano z wyników badania morfologii krwi wykonanego przed rozpoczęciem radioterapii.

Rozdział *Materiał i metoda* został przystępnie, wyczerpująco i merytorycznie poprawnie zredagowany. Zawiera jasno opisane kryteria włączenia i wykluczenia chorych z badania oraz opisy sposobu przeprowadzonego badania. Statystyczne procedury analizy wyników nie budzą żadnych wątpliwości.

Przedstawiona wyżej charakterystyka dysertacji odnosząca się do *Celu pracy* oraz *Materiału i metod* świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia działalności naukowo-badawczej w zakresie nauk medycznych.

2.4 Wyniki.

Wyniki swoich badań Doktorantka przedstawiła w 2 podrozdziałach, w których oceniła prognostyczne znaczenie poszczególnych czynników zapalnych oraz rolę niedokrwistości

Układ kolejnych podrozdziałów jest bardzo czytelny i wynika z kolejności prezentowania otrzymanych wyników badania, według analizowanych, pod względem prognostycznym, grup

markerów procesu zapalnego oraz ich wpływu na wyniki leczenia oraz korelacji ze stopniem zaawansowania choroby.

Uzyskany duży zasób informacji dotyczących zakreślonej tematyki badawczej, przedstawiony w rozdziale *Wyniki*, został przez Doktorantkę opracowany merytorycznie i przedstawiony w sposób przejrzysty. Całość rozdziału jest opatrzona czytelną oraz bardzo staranną formą graficzną w postaci licznych tabel i rycin.

2.5 Dyskusja.

W liczącej 17 stron *Dyskusji*, wykorzystując zebrane piśmiennictwo, Doktorantka porównała wyniki badania własnego z wynikami badań innych autorów.

Pierwszą część *Dyskusji* Doktorantka poświęciła opisowi wyników badań poświęconych roli prognostycznej markerów stanu zapalnego. Opisując dobrze znany marker stanu zapalnego, jakim jest stosunek bezwzględnej liczby neutrofili do bezwzględnej liczby limfocytów (N/LR) zwróciła uwagę na kontrowersje w sposobie jego wyznaczania. Stosunek N/LR odzwierciedla stan odporności gospodarza w formie balansu pomiędzy rozwojem i zwalczaniem nowotworu w organizmie ludzkim. Wysoki poziom neutrofili w krwioobiegu świadczy o rozwoju guza nowotworowego, ponieważ wydzielają one cytokiny prozapalne sprzyjające angiogenezie i wzrostowi raka. Z kolei limfocyty, szczególnie CD4+ i CD8+T-cell, są postrzegane jako „główna broń" w odpowiedzi immunologicznej gospodarza, poprzez indukcję apoptozy komórek guza nowotworowego. Interesujące jest, że Doktorantka uzyskała w swoich badaniach potwierdzenie wartości prognostycznej tego markera. Potwierdziła w grupie chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy (w II i III stopniu zaawansowania wg UICC), że mierzona przed leczeniem wartość stosunku bezwzględnej liczby neutrofili do bezwzględnej liczby limfocytów (N/LR) ma znaczenie rokownicze - w grupie pacjentów z wartością powyżej 3,5 stwierdzono krótsze przeżycia całkowite oraz krótszy czas wolny od progresji choroby. Pięcioletnie i ośmioletnie prawdopodobieństwo przeżycia całkowitego wyniosło w tej grupie odpowiednio 0,56 oraz 0,37 ($p=0,025$), natomiast pięcioletnie i ośmioletnie przeżycie całkowite pacjentów z N/LR<=3,5 wynosiło odpowiednio 0,69 oraz 0,54. Autorka podkreśliła, że w piśmiennictwie brak jest danych na temat prognostycznego znaczenia wzrostu N/LR w raku odbytnicy, u chorych poddanych przedoperacyjnej RT z zastosowaniem wysokich dawek frakcyjnych z następową operacją. Doktorantka słusznie w *Dyskusji* podkreśla, że rola stosunku N/LR jako markera ogólnoustrojowej reakcji zapalnej organizmu na nowotwór, może być obiecującym wskaźnikiem przeżycia oraz odpowiedniej stratyfikacji leczenia dla chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy. Jednakże ze względu na retrospektywny charakter przeprowadzonych badań należy przeprowadzić szereg prospektywnych badań oceniających prognostyczne znaczenie tego czynnika ogólnoustrojowej reakcji zapalnej organizmu dla rozwoju nowotworu.

W kolejnych etapach *Dyskusji,* przytaczając odpowiednie piśmiennictwo, Doktorantka scharakteryzowała wpływ niedokrwistości na wyniki leczenia raka odbytnicy. W przedstawionym badaniu własnym nie zauważyła związku obniżonego poziomu Hb z klinicznym stopniem zaawansowania choroby nowotworowej oraz zajęciem i statusem regionalnych węzłów chłonnych miednicy mniejszej. Przytoczyła również obecność podobnych obserwacji u innych autorów. Natomiast niezmiernie ważnym wynikiem własnego badania, nawiązującym również do wyników innych, przytaczanych publikacji, jest stwierdzenie, że obniżony poziom Hb skojarzony był z gorszym przeżyciem całkowitym i krótszym czasem do progresji choroby nowotworowej ($p<0,001$). Nie był on także zależny od stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, co eliminuje związek obniżonego poziomu Hb z częstszymi krwawieniami z większych guzów nowotworowych. Wyniki przytoczonych badań wskazują na skojarzenie większej agresywności guza nowotworowego z obniżonym poziomem Hb. Autorka wiąże tę obserwację z badaniami, w których zauważono, że niskie wysycenie komórek guza

tlenem sprzyja angiogenezie i powstawaniu zmutowanych komórek nowotworowych, zdolnych do przeżycia w środowisku z niskim stężeniem tlenu. Przyczyną krótszego przeżycia całkowitego oraz krótszego czasu bez progresji choroby u pacjentów z obniżonym poziomem Hb jest narastająca hipoksja w komórkach guza nowotworowego. Chemioradioterapia jest także mniej efektywna, ponieważ efekt cytotoksyczny promieniowania jonizującego jest uzależniony od tworzenia wolnych rodników tlenowych. Rodniki te oddziaływują na DNA, uszkadzają błony powierzchowne wewnątrz komórek nowotworowych. Brak tlenu wewnątrz tkanek hamuje populację wolnych rodników gospodarza powodując oporność na leczenie.

Zawarta w Dyskusji końcowa sugestia dotycząca konieczności kontynuowania analizy badanego problemu jest jak najbardziej słuszna.

2.6 Wnioski.

Zaprezentowane informacje w rozdziale *Wyniki* oraz ich krytyczna weryfikacja dokonana w *Dyskusji*, z posiłkowaniem się bibliografią krajową i zagraniczną pozwoliły Doktorantce sprecyzować 4 wnioski:

1. N/LR jako marker ogólnoustrojowej reakcji organizmu na rozwijający się nowotwór może być obiecującym wskaźnikiem przeżycia całkowitego oraz odpowiedniej stratyfikacji leczenia chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy. Wartość N/LR>3,5 przed leczeniem pogarsza znacznie przeżycia bez nawrotu choroby oraz przeżycia całkowite chorych na raka odbytnicy bez uogólnienia choroby nowotworowej.
2. Nie potwierdzono prognostycznego znaczenia analizowanych markerów ogólnoustrojowej reakcji zapalnej na nowotwór w organizmie: L/MR, PLT, PLT/LR dla przeżycia chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy.
3. Wystąpienie anemii przed leczeniem ma dużą wartość prognostyczną zarówno dla przeżycia, jak i wyboru odpowiedniej metody leczenia chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy. Wartość Hb<11g/dl u kobiet oraz Hb<12g/dl u mężczyzn przed rozpoczęciem leczenia znacznie pogarsza przeżycia całkowite oraz przeżycia wolne od choroby nowotworowej (p<0,001).
4. W raku odbytnicy, poziom parametrów ogólnoustrojowej reakcji zapalnej organizmu, takich jak: N/LR, L/MR, PLT, PLT/LR oraz Hb nie koreluje ze stopniem zaawansowania miejscowego raka oraz stopniem zajęcia regionalnych węzłów chłonnych miednicy mniejszej.

Wnioski są kompletne i są odzwierciedleniem uzyskanych wyników własnego badania, ponadto korespondują z celem głównym i celami szczegółowymi oraz tytułem dysertacji.

2.7 Wykorzystanie i znajomość literatury.

W dysertacji Doktorantka wykorzystała różnorodne źródła bibliograficzne dotyczące obszaru wiedzy nauk medycznych wymagające dużego nakładu pracy i zaangażowania przy opanowaniu i opracowania zagadnienia. Należy podkreślić właściwy dobór piśmiennictwa oraz jego umiejętne interpretowanie i przytaczanie. Piśmiennictwo liczy 126 pozycji, z czego 99 (78%) cytowanych pozycji pochodzi z ostatnich 10 lat.

3. Podsumowanie i wniosek końcowy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lekarz medycyny Zdzisławy Rugały zatytułowana: „Prognostyczne znaczenie wskaźników stanu zapalnego: N/LR, L/MR, PLT/LR, PLT oraz obniżonego poziomu Hb u chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy." stanowi cenne opracowanie naukowe o istotnych wartościach poznawczych i utylitarnych w obszarze nauk medycznych.

Rozprawa doktorska lekarz medycyny Zdzisławy Rugały zatytułowana: „Prognostyczne znaczenie wskaźników stanu zapalnego: N/LR, L/MR, PLT/LR, PLT oraz obniżonego poziomu Hb u chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy." spełnia wymogi określone w *art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2019, poz. 257, 447, 534, 577, 730)* na stopień doktora nauk medycznych i z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lekarz medycyny Zdzisławę Rugałę do dalszych części przewodu doktorskiego

Recenzent

dr hab. n. med. Adam Maciejczyk

Wrocław, 26 października 2020 roku