



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# **Modelarea statistică a factorilor prognostici în cancerul colorectal**

---

Doctorand: **Andra Buzilă (căs. Ciocan)**

---

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Sorana D. Bolboacă**

---

Cluj - Napoca 2022

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Cancerul colorectal	5
1.1. Introducere	5
1.2. Epidemiologie	6
1.3. Etiologie și factori de risc.	7
1.4. Fiziopatologie.	10
1.5. Tablou clinic, diagnostic și stadializare	11
1.6. Tratament	14
2. Factori prognostici - biomarkeri serici	19
2.1. Raporturile serice ale markerilor inflamatori: NLR, dNLR, PLR, LMR, AGR, PNI, SII	19
2.2. Chitotriozidaza	21
2.3. Neopterina	22
3. Metode statistice în evaluarea factorilor prognostici ai cancerului colorectal	25
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	27
4. Studiul 1. Raporturile markerilor inflamatori ca factori prognostici în cancerul colorectal	29
4.1. Introducere	29
4.2. Obiective	30
4.3. Material și metodă	30
4.4. Rezultate	32
4.5. Discuții	35
4.6. Concluzii	38
5. Studiul 2. Curba caracteristică de funcționare a receptorului ca metodă în validarea încrucișată a performanțelor pentru predicție	39
5.1. Introducere	39
5.2. Obiective	42
5.3. Material și metodă	42
5.4. Rezultate	44
5.5. Discuții	57
5.6. Concluzii	61
6. Studiul 3. Utilitatea prognostică a raporturilor markerilor inflamatori preoperatori ca modele de clasificare pentru pacienții cu cancer colorectal	63
6.1. Introducere	63
6.2. Obiective	64
6.3. Material și metodă	64
6.4. Rezultate	68
6.5. Discuții	74
6.6. Concluzii.	77
7. Studiul 4. Evaluarea neopterinei și a chitotriozidazei ca potențiali markeri serici ai cancerului colorectal.	79
7.1. Introducere	79
7.2. Obiective	80
7.3. Material și metodă	80
7.4. Rezultate	82
7.5. Discuții	91
7.6. Concluzii	94
8. Concluzii generale	95

**Cuvinte cheie:** cancerul colorectal, markeri inflamatori, chitotriozidaza, neopterină

## INTRODUCERE

Cancerul colorectal (CCR) reprezintă dezvoltarea anarhică a unor celule tumorale de la nivelul mucoasei ce tapetează colonul sau rectul. Semnele și simptomele pot include rectoragii, modificări de tranzit, scădere în greutate și astenie sau fatigabilitate.

În ciuda importanței caracteristicilor moleculare și biologice în definirea prognosticului pacienților cu cancer, multiple studii din literatură sugerează contribuția răspunsului inflamator condus de comportamentul tumorilor și ca răspuns la tratamentele aplicate. De-a lungul timpului, rolul esențial al răspunsului inflamator sistemic în progresia cancerului a fost bine recunoscut și justificat.

Debutul și dezvoltarea cancerului colorectal este indusă de o combinație de factori genetici și de mediu, a căror studiu este esențial pentru stabilirea de noi strategii de screening – una dintre cele mai importante linii de acțiune în vederea scăderii incidenței patologiei neoplazice. În ultimul deceniu, cercetarea genetică a stabilit premisele identificării genelor și variantelor patogene asociate cu o susceptibilitate ridicată de cancer colorectal. În plus, studiul modelelor de transmitere a acestor gene a condus la identificarea unor sindroame ereditare de cancer colorectal, care pot fi acum diagnosticate, precum și la programe speciale de gestionare a riscurilor și consiliere genetică, care pot fi aplicate pacienților și rudelor acestora. Cu toate acestea, asocierea familială a cancerului de colon apare și în afara sindroamelor cunoscute, prin urmare, sunt efectuate diferite studii epidemiologice cu scopul de a identifica polimorfismele care stau la baza susceptibilității cancerului colorectal la diferite populații. Rezultatele obținute în aceste studii pot pune bazele unei noi generații de teste de screening.

Studiile prezentei cercetări au avut ca scop evaluarea factorilor care influențează evoluția acestei patologii și identificarea unor markeri capabili să semnaleze sau să cuantifice afectarea organică provocată de acest tip de cancer. În această privință, cercetarea de față a permis identificarea caracteristicilor subiectului afectat de patologia colorectală.

Un biomarker ideal pentru cancer ar trebui să fie caracterizat prin specificitate și sensibilitate ridicată, fiabilitate, ușurință de măsurare și, cel mai important, capacitatea de a detecta boala în stadiu incipient. În ultimele două decenii, au fost studiați mai mulți biomarkeri moleculari, iar rezultatele obținute sunt încurajatoare, cu toate acestea, mai multe dezavantaje afectează fiabilitatea concluziilor.

Rezultatele obținute în cadrul studiilor întreprinse au fost publicate în reviste de specialitate din străinătate, unele dintre rezultate fiind, de asemenea, trimise spre publicare.

Studiul este unic în România prin înglobarea tuturor aspectelor ce țin de pacienții cu cancer colorectal și prin încercarea de a decela factorii de risc și de prognostic ce produc această afecțiune. De asemenea este primul studiu la nivel mondial ce studiază chitotriozidaza și neopterină ca markeri ai inflamației în cadrul cancerului colorectal având rezultate promițătoare.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea de contribuții personale cuprinde patru studii.

Cercetarea a fost realizat în conformitate cu principiile Declarației de la Helsinki și a fost aprobat de către Comisia de Etică al Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca (Nr. 492/ 21.11.2019) și de Comisia de etică a Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor” Cluj-Napoca (Nr. 17517/ 20.12.2019).

Din contribuțiile personale au fost publicate trei articole ISI: un articol în *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, unul în *Mathematics*, respectiv unul în revista *Diagnostics*.

## Studiul I. Rapoartele markerilor inflamatori ca factori prognostici în cancerul colorectal

**Scop:** Scopul studiului nostru a fost de analizat patru rapoarte ale markerilor inflamatori serici și anume raportul neutrofilelor la limfocite, raportul derivat al neutrofilelor la limfocite, raportul trombocitelor la limfocite și indicele inflamator sistemic ca factori prognostici ai decesului la pacienții cu cancer colorectal.

**Material și metodă.** S-a realizat un studiu retrospectiv pe subiecții internați în Clinica Chirurgie III, din cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor” din Cluj-Napoca, internați cu diagnosticul pozitiv de cancer colonic sau rectal în perioada ianuarie 2014 – septembrie 2019. Au fost evaluate dosarele medicale ale acestor pacienți și au fost colectate datele demografice, elementele de diagnostic clinic, rezultatele histopatologice ale biopsiilor și analizele de laborator. Au fost incluși în studiu pacienții internați cu diagnosticul de cancer de colon sau rectal, care au beneficiat de tratament chirurgical pe parcursul spitalizării. Criteriile de excludere au constat în date clinice sau paraclinice incomplete, lipsa diagnosticului pozitiv preoperator sau absența intervenției chirurgicale pe perioada internării. Datele culese din fișele medicale ale pacienților au constat în date demografice (gen, vârstă, înălțime, greutate etc.), diagnostice secundare (diabet zaharat tip 2, cardiopatie ischemică, diverticuloză colonică, sindrom de intestin iritabil, hepatită virală sau ciroză hepatică), simptomele de debut (hematochezie sau rectoragii, diaree alternantă cu constipație, scădere ponderală, inapetență, durere sau sensibilitate abdominală, masă tumorală palpabilă), factori de risc pentru boala investigată (fumat, consum zilnic de alcool, boli inflamatorii intestinale, polipoză colonică), analize sanguine de laborator (valoarea hemoglobinei, a trombocitelor, a leucocitelor și formulei leucocitare cu limfocite și neutrofile, a proteinelor totale, a albuminei serice ș.a.), tratamentul neoadjuvant – acolo unde s-a impus (în special la cazurile de cancer rectal), tipul intervenției chirurgicale (hemicolecomie dreaptă sau stângă, rezecție anterioară sau amputație de rect etc.) și statusul la externare. Patru rapoarte serice au fost calculate pe baza rezultatelor biologice și au fost luate în considerare ca factori prognostici.

**Rezultate.** Un total de 1688 de subiecții, cu vârste cuprinse între 17 și 98 ani, au fost incluși în studiu. Pacienții care au decedat au fost mai în vârstă, aveau multiple comorbidități (ex. cardiopatie ischemică sau ciroză hepatică), erau cunoscuți în antecedente cu polipoză colonică și au necesitat intervenție chirurgicală de urgență. Subiecții care au supraviețuit în timpul spitalizării au avut tumori de mici dimensiuni, și-au reluat precoce alimentația și tranzitul, în timp ce pacienții care au decedat au prezentat semnificativ mai multe complicații postoperatorii. Pacienții care au decedat au prezentat un nivel seric semnificativ mai scăzut de proteine totale, o valoare mai mare a neutrofilelor și implicit a NLR comparativ cu cei care au supraviețuit. Bărbații au avut o valoare mai mare a leucocitelor (mediana = 7,7 pentru bărbați versus 7,38 pentru femei; testul Mann-Whitney: stat = 2,6, valoarea P = 0,0092) și a neutrofilelor (mediana = 5,28 pentru bărbați versus 4,29 pentru femei; testul Mann-Whitney: stat = 2,83, valoarea P = 0,0047), cum era expectat, dar semnificativ mai scăzută valoarea limfocitelor (mediana = 1,48 pentru bărbați versus 1,58 pentru femei; testul Mann-Whitney: stat = -2,22, valoarea P = 0,0263). Bărbații au demonstrat, de asemenea, valori mai crescute în ceea ce privește NLR (mediana (Q1 – Q3): 3,51 (2,5 - 5,3) față de femei 3,26 (2,26 - 4,7); testul Mann-Whitney: stat = 3,55, valoarea P = 0,0004. Valori semnificativ mai mari la bărbați comparativ la femei au fost întâlnite și la PLR (mediana (Q1 – Q3): 163,2 (112,4 - 244,9) pentru bărbați versus 151,3 (104,7 - 232,3) pentru femei; testul Mann-Whitney: stat = 2,38, valoarea P = 0,0171 și în ceea ce privește SII (mediana (Q1 – Q3): 817,6 (558 - 1443,8) pentru bărbați versus 723,2 (487,9 - 1236,2) pentru femei; testul Mann-Whitney: stat = 3,58, valoarea P = 0,0003. Un procent semnificativ dintre pacienții care au decedat au prezentat valori crescute ale leucocitelor (decedați:supraviețuitori = 50%:22,6%,  $\chi^2 = 21,2$ , valoarea P =  $4,18 \times 10^{-6}$ ), neutrofilelor (decedați:supraviețuitori = 48,1%:19,6%;  $\chi^2 = 25$ , valoarea P =  $5,61 \times 10^{-7}$ ), trombocitelor (decedați:supraviețuitori = 36,5%:18,4%;  $\chi^2 = 10,8$ , valoarea P = 0,0010) și a proteinelor totale serice (decedați:supraviețuitori = 39,1%:21,1%;  $\chi^2 = 9,2$ , valoarea P = 0,0025), aflate înafara intervalului normal. Raportul NLR, existența complicațiilor postoperatorii și comorbiditățile (cardiopatia ischemică și ciroza hepatică) s-au dovedit a fi factori prognostici pentru deces, independenți de vârstă și gen.

**Concluzii.** În concluzie, studiul de față a identificat predictorii semnificativi ai decesului, independenți de vârstă și gen, pentru pacienții diagnosticați cu cancer colorectal, și anume NLR-ul, prezența complicațiilor

---

postoperatorii, cardiomiopatie ischemică și ciroză hepatică. Pacienții cu NLR crescut se află într-un stadiu avansat de boală și, în consecință, au o supraviețuire redusă. Detectarea precoce a cancerului colorectal poate duce la o scădere semnificativă a ratei mortalității, iar cercetările viitoare ar trebui să se axeze pe descoperirea unor markeri biologici accesibili pentru a detecta acest tip de cancer.

## **Studiul II. Performanțele markerilor inflamatori în clasificarea pacienților cu și fără metastaze: analiza ROC și efectele randomizării asupra performanțelor modelelor de clasificare**

**Scop:** Având în vedere testele de ultimă generație, scopul nostru a avut o conotație dublă:

1. să evaluăm performanța modelelor ROC în contextul randomizării restrictive și nerestrictive a trei rapoarte în clasificarea pacienților cu cancer colorectal cu și fără metastaze
2. să demonstrăm impactul randomizării restrictive și nerestrictive asupra performanțelor modelelor de clasificare.

**Material și metodă.** Baza de date a fost construită prin culegerea retrospectivă a: valorilor absolute ale leucocitelor, neutrofilelor, trombocitelor și a clasificării TNM a tumorilor (T – extinderea în profunzime a tumorii primare, N – extensia limfoganglionară, M- prezența și localizarea metastazelor la distanță), la momentul internării, preoperator, la pacienții admiși în studiu, internați în Clinica Chirurgie III cu diagnosticul de cancer colonic sau rectal în perioada ianuarie 2014 – septembrie 2019. Prezența metastazelor la distanță la acești subiecți a fost considerată variabila de interes în acest studiu. Prezența metastazelor a fost documentată prin explorări imagistice de tipul computer tomografiei toraco-abdomino-pelvine (CT TAP) cu substanță de contrast intravenoasă, IRM-ului abdomino-pelvin sau a ultrasonografiei cu substanță de contrast (în special pentru certificarea metastazelor hepatice). Datele brute ale pacienților cu diagnosticul de cancer de colon sau rectal au fost evaluate, iar fișele (fizice sau preluate din sistemul informatic al clinicii) cu date incomplete sau neconcludente au fost excluse din studiu. Valorile absolute au fost folosite ca date intrare pentru calcularea următoarelor rapoarte, utilizate ca predictorii ai metastazelor în studiul de față: NLR, dNLR și PLR.

**Rezultate.** Atunci când s-a folosit tot eșantionul, au fost identificați corecți subiecții cu metastaze de toate cele trei rapoarte evaluate, cu un AUC semnificativ statistic cu 0,5. Indicii de performanță ale modelelor de control au demonstrat abilități moderate de clasificare a rapoartelor investigate, NLR fiind cel mai performant biomarker pentru identificarea metastazelor. Cel puțin un set aleatoriu nerestrictiv dispune aceeași valoare prag a indicelui Youden pentru fiecare dintre rapoartele evaluate ca modele predictive (*URun01* pentru NLR și dNLR; *URun02* pentru dNLR; *URun05* pentru PLR). Alorile obținute sunt mai mici decât cele raportate în *Tabelul VII* (modelul complet) pentru NLR (8/13, 61,5%). Modificări în semnificația statistică a AUC sunt identificate doar în cazul raportului PLR pentru seturi aleatorii nerestrictive cu 16% din subiecții aflați în grupul de dezvoltare. În ceea ce privește validarea încrucișată, cu 70% a datelor distribuite în grupul de învățare și 30% în grupul de validare, modelele de clasificare demonstrează performanțe similare a AUC pentru NLR și dNLR, iar pentru PLR, AUC se situează în preajma valorii de 0,5 a AUC. Se identifică variații similare ale valorilor adevărat pozitive, adevărat negative, fals pozitive și fals negative obținute din evaluarea seturilor aleatorii restrictive atât la nivelul grupurilor de învățare, cât și a celor de validare. Valorile menționate anterior variază, de exemplu, în cazul valorilor adevărat pozitive la o diferență între limita maximă și minimă de 3,4% observată pentru PLR și 46,2% observată pentru AGR. Analiza ROC de validare încrucișată aplicată pe eșantioane aleatorii restrictive a identificat NLR și dNLR drept markerii cu cea mai mare putere de predicție a metastazelor conform celui mai mare scor F1. Cu toate acestea, performanțe bune ale modelelor se obțin atunci când întregul set este evaluat pentru NLR și dNLR, însă în ceea ce privește PLR, se obțin performanțe mai bune în validarea încrucișată. Toate aceste aspecte concretizează instabilitatea modelului de clasificare. Reprezentarea vizuală a ariilor de sub curbă pentru fiecare scenariu asociat modelului complet pentru NLR, dNLR și PLR a arătat o variabilitate mai mare în cazul seturilor aleatorii nerestrictive.

**Concluzii.** Rapoartele investigate ale markerilor inflamatori au dovedit utilitate clinică moderată în predicția metastazelor la pacienții cu cancer colorectal. Modelele complete au demonstrat eficiență în screening, dar valorile predictiv pozitive și negative nu susțin fiabilitatea aplicării lor în practica clinică curentă. Modelele de clasificare identificate în grupurile de învățare, indiferent de metoda de obținere a seturilor (aleatoriu nerestrictiv sau restrictiv), au prezentat caracteristici și performanțe similare modelelor

complete. Rezultatele noastre au arătat că o simplă împărțire aleatorie a observațiilor, ponderând sau nu pacienții cu și fără metastaze, într-o analiză ROC asigură performanțe similare modelelor complete, atunci când cel puțin 70% din populația disponibilă este inclusă în evaluare. Mai mult, dimensiunea eșantionului grupului de învățare în cazul analizei clasificării ROC a rapoartelor inflamatorii investigate, considerate ca predictor ai metastazelor la pacienții cu cancer colorectal, nu a produs eroare asupra caracteristicilor modelelor și nici asupra performanțelor acestora.

### **Studiul III. Utilitatea rapoartelor markerilor inflamatori preoperatori ca modele de clasificare pentru pacienții cu cancer colorectal**

**Scop.** Evaluarea abilităților a șapte rapoarte, ca instrumente de clasificare pentru șapte caracteristici la pacienții cu cancer colorectal. Valorile prag identificate în cadrul obiectivului principal au fost ulterior utilizate pentru a construi modele multivariate, în vederea prezicerii unui caracteristici specifice.

**Material și metodă.** Un studiu retrospectiv de cohortă a fost realizat în cadrul Clinicii Chirurgie III, a Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor”, Cluj-Napoca, România. Subiecții admiși cu diagnosticul de cancer colorectal în perioada ianuarie 2014 - septembrie 2019 au fost eligibili pentru studiu. Fișele medicale ale pacienților internați în această perioadă au fost revizuite, iar informațiile necesare culese au fost transcrise în baza de date. Principalul criteriu a fost dat de diagnosticul principal, care s-a stabilit a fi cel de cancer colonic sau rectal. Datele demografice (vârstă, gen, mediu de proveniență), datele clinice (tratament (neo)adjuvant, complicații), testele de laborator (hemoglobina, proteinele serice totale, albumina serică, globulinele serice, numărul absolut de leucocite, neutrofile, trombocite, monocite) și rezultatele histopatologice au fost analizate pentru acești pacienți. Pacienții ale căror fișe medicale erau incomplete, lipseau date legate de patologia colorectală sau nu erau supuși unei intervenții chirurgicale în timpul spitalizării au fost excluși din studiu.

**Rezultate.** Au fost analizați în total 1688 pacienți cu cancer colorectal, cu vârste cuprinse între 19 și 95 de ani. Majoritatea subiecților incluși în studiu au fost bărbați (978/1688, așadar 57,9%). Rata deceselor a fost egală cu 3,1% (52/1688). Două din cele șapte rapoarte evaluate au demonstrat performanțe satisfăcătoare în analiza ROC, ca factori de prognostic pentru deces, și anume NLR și dNLR. Ambele rapoarte au avut specificitate rezonabilă (61,8% [59,4 - 64,2] pentru NLR și 73,3% [71,1 - 75,4] pentru dNLR), cu o valoare predictivă negativă ridicată (NLR: 98 [97,1 - 98,8] pentru NLR și 97,8 [97,0 - 98,6] pentru dNLR), fiind eficiente în screening (CUI- de 0,605 [0,586 - 0,625] pentru NLR și 0,717 [0,700 - 0,733] pentru dNLR). Cu toate acestea, +LR este mai mic de 2 și -LR este mai mare de 0,6, demonstrând capacitate redusă de predicție. Aria de sub curbă pentru LMR este semnificativ mai mică de 0,5, indicând prezența unor valori scăzute la acest stadiu T avansat (T3 și T4, mediana = 3,40, (Q1 - Q3) = (2,43 - 4,60); {min - maxim} = {0,28 - 14,17}) în comparație cu cei în stadiul T incipient (T1 și T2, mediana = 3,98, (Q1 - Q3) = (2,87 - 5,49); {min - maxim} = {0,56 - 15,21}). Diferența observată între pacienții cu stadiu T avansat s-a dovedit statistic semnificativă (Test Mann-Whitney: statistici Z = -5,13, valoare P < 0,0001). Clasificarea combinând NLR și SII în legătură cu stadiul T nu aduce îmbunătățiri în utilitatea clinică, modelul de clasificare dovedindu-se a fi similar cu rapoartele individuale (+CUI = 0,5 [0,468 - 0,533]). Rapoartele NLR, PLR și SII au dovedit performanțe bune în analiza ROC pentru evaluarea chimio- sau radioterapiei (neo)adjuvante la pacienții cu cancer colorectal, dar numai PLR a demonstrat utilitate clinică bună pentru screening. Modelul de clasificare obținut prin combinarea rapoartelor menționate anterior demonstrează capacități modeste de identificare a cazurilor (+CUI = 0,13 [0,088 - 0,180]) sau de screening (-CUI = 0,33 [0,297 - 0,355]). Toate rapoartele investigate au dovedit abilități scăzute de clasificare pentru evenimentele așteptate cum ar fi complicațiile postoperatorii, reluarea alimentației sau a tranzitului. Regresia logistică multivariată identifică valori semnificative pentru patru dintre cele șapte evenimente expectate. Raportul dNLR s-a dovedit a fi un bun predictor al decesului, independent de gen. Atât NLR, cât și LMR demonstrează a fi predictorii buni pentru stadiul T, independenți de vârstă sau gen, iar PNI predictor eficient al stadiului M.

**Concluzii** Rapoartele evaluate conferă o valoare prognostică moderată la niveluri prag specifice pentru anumite evenimente luate în considerare, arătând o oarecare utilitate ca markeri de screening, putând juca un rol substanțial în managementul terapeutic al pacienților, dar sunt necesare studii exhaustive multicentrice pentru a demonstra relevanța lor clinică. Studiul nostru a evidențiat faptul că dNLR este un marker fiabil al

---

prognosticului de supraviețuire la pacienții cu cancer colorectal, care au fost supuși unui tratament chirurgical. Raportele inflamatorii calculate, NLR, LMR și PNI sunt potențiali markeri prognostici în ceea ce privește stadiile T și M ale bolii. Raportul trombocitelor la limfocite oferă informații importante despre efectul tratamentului neoadjuvant asupra pacienților cu cancer colorectal. Rezultatele noastre susțin necesitatea desfășurării unor studii prospective multicentrice pentru a demonstra relevanța clinică a rapoartelor markerilor inflamatorii și pentru a transpune rezultatele în managementul clinic curent al pacienților cu cancer colorectal.

#### **Studiul IV: Evaluarea neopterinei și a chitotriozidazei ca potențiali markeri serici ai cancerului colorectal**

**Scop.** Scopul nostru principal a fost să evaluăm utilitatea clinică atât a chitotriozidazei, cât și a neopterinei în diferențierea pacienților cu cancer colorectal de martorii fără neoplazii. Al doilea obiectiv în acest studiu a fost de a evalua în dinamică modul în care valorile enzimelor investigate, neopterină și chitotriozidaza, se modifică la un an de urmărire postoperatorie.

**Material și metodă.** S-a realizat un studiu prospectiv, de tip caz-martor în perioada ianuarie 2020 – mai 2021, la pacienții cu cancer colonic sau rectal stadiul I până la IV, internați în Clinica Chirurgie III, pentru rezecție chirurgicală curativă sau paliativă. Diagnosticul de cancer s-a bazat pe colonoscopie cu biopsie pozitivă de adenocarcinom, iar stadializarea s-a făcut conform tomografiei computerizate (CT) cu contrast, ecografiei cu contrast (CEUS) sau a ecoendoscopiei (EUS) și a imagisticii prin rezonanță magnetică (IRM). Ca martori, au fost selectați subiecți adulți sănătoși din populația generală, în funcție de grupa de vârstă (30-40; 41-60; 61-80; > 80 de ani), genul și mediul de proveniență corespunzătoare cazurilor. Lotul martor a îndeplinit criteriile de includere a cazurilor, adică: vârsta peste 18 ani, absența bolilor inflamatorii cronice (hepatita cronică virală „B” sau „C”, virusul imunodeficienței umane, bolile inflamatorii intestinale ș.a.), absența antecedentelor altor tipuri de cancer, femeile aflate în perioada fertilă demonstrând că nu sunt însărcinate sau în perioada de alăptare. S-au recoltat probe de sânge venos periferic de la cazuri, în momentul internării (nivelul de bază), cu o zi înainte de intervenția chirurgicală și înainte de a fi administrat orice tratament conservativ sau intervențional. La martori a fost recoltată o singură probă de sânge. S-au dozat: hemoleucograma totală, biochimia, markerii inflamatori și markerii tumorali. Probele de sânge au fost centrifugate în mai puțin de 45 de minute de la recoltare în vederea obținerii a 1,5 ml de ser, care a fost ulterior congelat și păstrat la -80°C. Dozajele biochimice ale biomarkerilor evaluați (chitotriozidaza și neopterină) s-au realizat utilizând kitul ELISA Human Neopterin Fine Test® (EH3413, Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, Hubei, China) și kitul ELISA Human CHIT1 (Chitotriozidase-1) Elabscience® (E-EL-H5620, Elabscience Biotechnology Inc, Houston, Texas, SUA) conform instrucțiunilor producătorului.

**Rezultate.** S-au evaluat patruzeci și patru de pacienți cu cancer de colon sau rect, considerați ca făcând parte din grupul de cazuri și un număr egal de subiecți fără cancer, considerați ca și martori. Subiecții celor două grupuri au avut vârste cuprinse între 31 și 86 de ani. Cincizeci și nouă de pacienți au fost inițial considerați eligibili în grupul caz, dar din cauza pandemiei de COVID-19, 15 pacienți au fost pierduți din urmărirea postoperatorie și, prin urmare, au fost excluși din studiu. Majoritatea pacienților au fost de sex masculin (29, 65,9%), iar în ceea ce privește locul de proveniență, doar o minoritate provine din mediul rural (16 subiecți, 36,4%) în fiecare grup. Douăzeci și doi de subiecți din grupul celor cu cancer colorectal sunt fumători, dintre care 5 (22,7%) fumători ușori, 8 (36,4%) moderați și 9 (40,9%) mari fumători. Zece subiecți din grupul fără cancer sunt fumători: 1 (10%) fumător ușor, 3 (30%) moderați și 6 (60%) mari fumători. Nu s-a observat o asocieră semnificativă statistic între statutul de fumător și grupuri (testul exact Fisher: valoarea  $P = 0,6495$ ). Între grupuri, nu s-a observat o diferență semnificativă statistic între fumători și nefumători, nici pentru chitotriozidază (grupul cu cancer colorectal: testul Mann-Whitney  $z$ -stat = -0,05, valoarea  $P = 0,9626$ ; grupul fără cancer: testul Mann-Whitney  $z$ -stat = 0,10, valoare  $P = 0,9219$ ; testul Mann-Whitney), sau pentru neopterină (grupul cu cancer colorectal: test Mann-Whitney  $z$ -stat = 0,49, valoare  $P = 0,6221$ ; grupul fără cancer: test Mann-Whitney  $z$ -stat = 1,11, valoarea  $P = 0,2686$ ; testul Mann-Whitney). Acest lucru demonstrează că fumatul nu reprezintă un factor de eroare care influențează evaluarea neopterinei sau a chitotriozidazei ca markeri predictivi. Valorile proteinei C reactive au fost semnificativ mai mari în grupul celor cu cancer colorectal în comparație cu grupul de martori: mediana = 1,3 mg/dL, IQR = (0,48 – 4,43) față

de mediana = 0,39 mg/dL, IQR = (0,2 - 0,7) ; Testul Mann-Whitney: z-stat = 5,4, valoarea P < 0,0001. Pacienții din grupul caz a avut valori mai mari ale chitotriozidazei (mediana = 2,9 ng/mL, IQR = (1,6 - 4,7)) și neopterinei (mediana = 5,2 ng/ml, IQR = (2,3 - 8,3)) în comparație cu subiecții din grupul martor (chitotriozidaza: mediana = 2,3 ng/mL (0,7 - 4,3); neopterina: mediana = 2,4 ng/ml, IQR = (2 - 5,3)). Majoritatea tumorilor din grupul cu cancer colorectal au fost moderat diferențiate, gradul G2 și fără metastaze la distanță. Cea mai frecvent întâlnită complicație a fost supurația de plăgă (6/31), urmată de seromul de plagă, hemoragii fără impact hemodinamic, ileusul prelungit sau retenția acută de urină, fiecare aparând la 3 din 31 de pacienți. Doi dintre subiecții cu cancer colorectal au decedat după externare, pe parcursul urmăririi oncologice. Prin urmare, numărul de pacienți în eşnționul de urmărire postoperatorie este mai mic decât grupul inițial de cazuri, fiind egal cu 42. Valorile chitotriozidazei și neopterinei au scăzut semnificativ la urmărire. Diferența între nivelul de bază și urmărirea la 1 an a neopterinei rămâne, de asemenea, semnificativă statistic după îndepărtarea valorilor extreme (testul Wilcoxon pe perechi potrivite: z-stat = 5,6, valoarea P < 0,0001). Neopterina s-a dovedit a fi sensibilă în distingerea între stadiile tumorale, a stadiului N și M atât la momentul diagnosticului, cât și la urmărirea la 1 an postoperator. Diferențe similare au fost observate și pentru chitotriozidază, dar acest marker a arătat, de asemenea, o asociere semnificativă cu gradul de diferențiere (G) al tumorii. În ceea ce privește urmărirea la 1 an postoperator a fost identificată o asociere monotonă între chitotriozidază și CEA, coeficientul de corelație Spearman ( $\rho$ ) fiind egal cu 0,30 (valoarea P = 0,0496). Împărțind numărul total de cazuri (pacienți cu cancer colorectal) în două subgrupe: subiecții cu cancer de colon și cei cu cancer de rect, s-au observat diferențe statistice între grupuri în relație cu valoarea leucocitelor, neutrofilelor și a limfocitelor, de asemea între momentul recoltării nivelului bazal (preoperator) și în momentul urmăririi la 1 an postoperator în sensul scăderii nivelelor valorilor absolute ale celulelor inflamatorii. Antigenul carcinoembrionar a urmat o scădere semnificativă în cancerul de colon după tratamentul chirurgical, iar neopterina a urmat același trend atât în cazul cancerului de colon, cât și al cancerului de rect.

**Concluzii.** Studiul nostru a arătat posibila utilitate a nivelurilor serice de chitotriozidază și neopterina în distingerea stadiilor T, N și M înainte de tratamentul chirurgical, cu performanțe mai mari ale chitotriozidazei în ceea ce privește gradul G comparativ cu neopterina. Am observat o legătură între recidiva sau metastaza tumorală și nivelurile ridicate de neopterina serică și chitotriozidază cu un contrabalans de niveluri semnificativ mai scăzute la pacienții cu evoluție bună după intervenția chirurgicală curativă. Biomarkerii serici evaluați ar putea fi de ajutor în evaluarea evoluției bolii, în mod similar observat în nivelurile de antigen carcinoembrionar, mai ales în cazurile în care CEA nu are valoare în urmărire. Sunt necesare studii suplimentare pentru a valida rezultatele noastre și pentru a aplica cei doi biomarkeri la o scară mai largă în utilizarea clinică pentru pacienții cu cancer colorectal.

### Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Lucrarea de față este unică prin complexitatea ei, coroborând datele demografice, factorii de risc, stadiul TNM, tehnicile chirurgicale de rezecție, markerii consacrați ai inflamației sistemice, în vederea identificării de noi markeri inflamatori, considerați ca factori prognostici și evaluarea potențialului de clasificare.

Identificarea biomarkerilor prognostici este punctul cheie de interes în studiul acestei patologii deoarece prin identificarea acestora se poate ghida și adapta managementul terapeutic, toate acestea pentru a crește supraviețuirea acestor pacienți. Prima direcție a cercetării de față a fost studierea markerilor inflamatori și a raporturilor dintre aceștia. Astfel au fost studiate patru rapoarte serice pentru a evalua dacă aceștia reprezintă factori prognostici ai decesului în cadrul patologiei neoplazice colorectale. În literatura de specialitate internațională a mai fost raportată această asociere dar nu pe populație din România pe care am obținut rezultate similare.

A doua direcție a cercetării a fost analiza ROC ca metodă de clasificare a unor evenimente de interes pe baza raporturilor inflamatorii. Am evaluat performanțele modelelor ROC de clasificarea a pacienților cu și fără metastaze pe baza a trei rapoarte calculate și am evaluat impactului a două tipuri de randomizare (nerestrictivă vs. restrictivă) asupra performanțelor modelelor de clasificare. Această abordare este unică în literatura de specialitate a studierii cancerului colorectal. Astfel, am pus în evidență absența utilității clinice în predicția metastazelor la pacienții cu cancer colorectal. Modelele complete studiate au demonstrat eficiență satisfăcătoare în screening. Similaritatea performanțelor din modelele restrictive și nerestrictive cu cele ale



---

modelului realizat pe întreg setul de date susțin stabilitatea modelelor de clasificare în contextul unui design experimental adecvat și posibilitatea aplicării aceluși teste, atât în cadrul grupurilor mari cât și la nivelul unor grupuri mai restrânse de subiecți, eficiența obținută fiind comparabilă atâta timp cât setul de învățare include cel puțin 70% din subiecții eligibili.

A treia direcție în care ne-am îndreptat cercetarea a fost de a demonstra utilitatea prognostică a rapoartelor biomarkerilor inflamatori preoperatori ca markeri de clasificare pentru pacienții cu cancer colorectal. În literatura de specialitate au fost studiați mai mulți biomarkeri care pot fi obținuți înainte de începerea tratamentului și pot fi considerați ca factori prognostici, în stabilirea evoluției ulterioare a bolii dar nu există un consens cu privire la valorile prag ale acestor markeri. În acest sens, am analizat și în cadrul acestui studiu rapoartele inflamatorii, fiind primul studiu de acest gen în Europa de Est. S-au evaluat abilitatea a șapte rapoarte ca markeri de clasificare a unui eveniment specific la pacienții cu cancer colorectal. S-a demonstrat astfel ca această evaluare a rapoartelor conferă o valoare prognostică individuală la niveluri prag specifice pentru anumite evenimente luate în considerare. Au demonstrat utilitate satisfăcătoare ca markeri de screening, relevanța clinică necesitând însă studii suplimentare.

În urma acestor trei abordări am decis să evaluăm două enzime ale inflamației, neopterină și chitotriozidază ca potențiali biomarkeri serici ai cancerului colorectal. A patra direcție a cercetării a fost astfel evaluarea utilității clinice atât a chitotriozidazei cât și a neopterinei în diferențierea pacienților cu cancer colorectal față de indivizii sănătoși. În cadrul acestei direcții de cercetare, am realizat de asemenea și o evaluare în dinamică a modului în care valorile acestor biomarkeri se modifică în urma intervenției chirurgicale, la un an de urmărire postoperatorie. Studiul de față a subliniat utilitatea nivelurile serice de chitotriozidază și neopterină în distingerea stadiilor T, N și M înainte de tratamentul chirurgical. De asemenea s-a pus în evidență o legătură între recidivă sau metastaze și nivelurile sanguine ale acestor markeri.

În ceea ce privește tabloul genetic implicat în cancerul colorectal, cercetarea științifică a parcurs un drum drum lung și au fost bine caracterizate, însă cealaltă componentă majoră implicată în carcinogeneza tumorilor colorectale și anume influența inflamației cronice susținute asupra bolii, rămâne slab definită. În acest context, sunt necesare studii aprofundate ale relației dintre markerii inflamatori sistemici, infiltratul tumoral, celularitatea proinflamatorie peritumorală și, nu în ultimul rând, microbiomul. Rezultatele acestor studii ar putea conduce la stabilirea unui set de modificări ale managementului diagnostic și strategiei terapeutice, pentru a îmbunătăți răspunsul la tratament, rezultând o îmbunătățire a supraviețuirii, intervalului liber de boală și calitatea vieții pacientului.

În mod similar, dezvoltarea și implementarea unor noi biomarkeri serici mai specifici și mai sensibili în viitorul apropiat va îmbunătăți strategiile de diagnosticare, permițând astfel clinicienilor să detecteze cazurile de cancer colorectal în etapele incipiente ale bolii și, prin urmare, să îmbunătățească prognosticul a mii de pacienți.

În contextul actual, medicina personalizată devine rapid un instrument indispensabil. Astfel, este necesar să se efectueze o analiză aprofundată a caracteristicilor tumorale ale fiecărui pacient pentru a găsi tratamentul adecvat în fiecare caz în parte.





**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

**DOCTORAL SCHOOL**

---

PHD THESIS SUMMARY

# **Statistical modeling of prognostic factors in colorectal cancer**

---

PhD student: **Andra Buzilă (căs. Ciocan)**

---

PhD supervisor: **Prof. Dr. Sorana D. Bolboacă**

---

Cluj - Napoca 2022

# CONTENT

INTRODUCTION	1
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	3
1. Colorectal cancer	5
1.1. Introduction	5
1.2. Epidemiology	6
1.3. Etiology and risk factors	7
1.4. Pathophysiology	10
1.5. Clinical overview, diagnosis and staging	11
1.6. Treatment	14
2. Prognostic factors - serum biomarkers	19
2.1. Serum ratios of inflammatory markers: NLR, dNLR, PLR, LMR, AGR, PNI, SII.	19
2.2. Chitotriosidase	21
2.3. Neopterin	22
3. Statistical methods in evaluating the prognostic factors in colorectal cancer.	25
PERSONAL CONTRIBUTION	27
4. Study 1. Inflammatory markers ratios as prognostic factors in colorectal cancer	29
4.1. Introduction	29
4.2. Objectives	30
4.3. Material and method	30
4.4. Results	32
4.5. Discussions	35
4.6. Conclusions	38
5. Study 2. Characteristic operating curve of the receiver as a method in cross-validating performance for prediction	39
5.1. Introduction	39
5.2. Objectives	42
5.3. Material and method	42
5.4. Results	44
5.5. Discussions	57
5.6. Conclusions	61
6. Study 3. The prognostic utility of preoperative inflammatory markers ratios as classification models in colorectal cancer	63
6.1. Introduction	63
6.2. Objectives	64
6.3. Material and method	64
6.4. Results	68
6.5. Discussions	74
6.6. Conclusions.	77
7. Study 4. Evaluation of neopterin and chitotriosidase as potential serum markers in colorectal cancer	79
7.1. Introduction	79
7.2. Objectives	80
7.3. Material and method	80
7.4. Results	82
7.5. Discussions	91
7.6. Conclusions	94
8. General conclusions	95

**Keywords:** colorectal cancer, inflammatory markers, chitotriosidase, neopterin

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the anarchic development of tumor cells present in the mucosa of the colon or rectum. Signs and symptoms may include rectal bleeding, diarrhea alternating with constipation, weight loss and asthenia or fatigue.

Despite the importance of molecular and biological characteristics in defining the prognosis of cancer, multiple studies in the literature suggest the contribution of the inflammatory response driven by tumor behavior and its response to the applied treatment. Over time, the key role of the systemic inflammatory response in cancer progression has been recognized and justified.

The onset and development of colorectal cancer is induced by a combination of genetic and environmental factors, their study becoming essential in establishing new screening strategies - one of the most important lines of action in order to reduce the incidence of this neoplasia. Over the past decade, genetic research has established the premises for identifying genes and pathogenic pathways associated with high susceptibility for colorectal cancer. In addition, the study of patterns of genes transmission has led to the identification of hereditary colorectal cancer syndromes, which can now be diagnosed, as well as special risk management and genetic counseling programs, that can further be applied to patients and their relatives. However, colon cancer occurs outside the known syndromes, therefore, various epidemiological studies are performed in order to identify the polymorphisms, which underlie the susceptibility of colorectal cancer in different populations. The results of these studies may lay the groundwork for a new generation of screening tests.

The studies of this research aimed to evaluate the factors influencing the evolution of this pathology and identify markers capable of signaling or quantifying the organic damage caused by this type of cancer. In this regard, the present research has identified the characteristics of the subjects affected by colorectal pathology.

An ideal biomarker for cancer should be characterized by high specificity and sensitivity, reliability, ease of measurement and, most importantly, the ability to detect the disease at an early stage. In the last two decades, several molecular biomarkers have been studied and the results obtained are encouraging, however, several disadvantages affect the reliability of the conclusions.

The results of the studies were published in ISI indexed journals, some currently being submitted for publication.

The study is unique in Romania by encompassing all aspects of colorectal cancer patients and by trying to detect the risk and prognostic factors, which cause this condition. It is also the first study to study chitotriosidase and neopterin combined as markers of inflammation in colorectal cancer with promising results.

## PERSONAL CONTRIBUTION

The personal contributions section includes four studies.

The research was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca (No. 492 / 21.11.2019) and the Ethics Commission of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology „Prof. Dr. Octavian Fodor” Cluj-Napoca (No. 17517 / 20.12.2019).

From the personal contributions, three original articles were published: one in Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, one in Mathematics and one in Diagnostics.

### Study I. Inflammatory markers ratios as prognostic factors in colorectal cancer

**Purpose:** The aim of our study was to analyze four ratios of serum inflammatory markers, namely the neutrophils to lymphocytes ratio, the derived neutrophils to lymphocytes ratio, the platelets to lymphocytes ratio and the systemic inflammatory index as prognostic factors for death in patients with colorectal cancer.

**Material and method.** A retrospective study was performed on subjects admitted to the 3rd Surgical Clinic, of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology „Prof. Dr. Octavian Fodor” from Cluj-Napoca, with the positive diagnosis of colon or rectal cancer in the timeframe between January 2014 and September 2019. The medical files of these patients were evaluated and demographic data, clinical diagnostic elements, histopathological results and laboratory tests were reviewed. Patients with the diagnosis of colon or rectal cancer, who received surgical treatment during hospitalization were included in the study. The exclusion criteria consisted of incomplete clinical or paraclinical data, lack of positive preoperative diagnosis or absence of surgery during hospitalization. Data collected from patients' medical records consisted of demographics (gender, age, height, weight, etc.), secondary diagnoses (type 2 diabetes, ischemic heart disease, colonic diverticulosis, irritable bowel syndrome, viral hepatitis or liver cirrhosis), onset symptoms (haematochezia or rectal bleeding, alternating diarrhea with constipation, weight loss, loss of appetite, abdominal pain or tenderness, palpable tumor mass), risk factors for the investigated disease (smoking, daily alcohol consumption, inflammatory bowel disease, colonic polyposis), laboratory blood tests (hemoglobin, platelets, leukocytes and leukocyte formula with lymphocytes and neutrophils, total proteins, serum albumin, etc.), neoadjuvant treatment - where required (especially in cases of rectal cancer) , type of surgery performed (right or left hemicolectomy, anterior rectal resection or abdominoperineal rectal resection etc.) and discharge status. Four serum ratios were calculated based on the biological results and were considered prognostic factors for this disease.

**Results.** A total of 1688 subjects, aged between 17 and 98 years, were included in the study. Patients who died were older, had multiple comorbidities (e.g. ischemic heart disease or liver cirrhosis), had a history of colonic polyposis and required emergency surgery. Subjects, who survived had small tumors, early food and transit resumption, while patients who died had significantly more postoperative complications. Patients who died had significantly lower serum total protein levels, higher neutrophil count and NLR than those who survived. Men had a higher level of leukocytes (median = 7.7 for men versus 7.38 for women; Mann-Whitney test: state = 2.6, P value = 0.0092) and neutrophils (median = 5, 28 for men versus 4.29 for women, Mann-Whitney test: state = 2.83, P value = 0.0047), as expected, but significantly lower lymphocytes (median = 1.48 for men versus 1, 58 for women, Mann-Whitney test: state = -2.22, P value = 0.0263). Men also showed higher NLR values (median (Q1 - Q3): 3.51 (2.5 - 5.3) compared to women 3.26 (2.26 - 4.7) Mann-Whitney test: state = 3.55, P value = 0.0004 Significantly higher values in men compared to women were also found in PLR (median (Q1 - Q3): 163.2 (112.4 - 244.9) for men versus 151.3 (104.7 - 232.3) for women, Mann-Whitney test: state = 2.38, value P = 0.0171 and in terms of IBS (median (Q1 - Q3): 817.6 (558 - 1443.8) for men versus 723.2 (487.9 - 1236.2) for women, Mann-Whitney test: state = 3.58, P value = 0.0003. a significant percentage of patients who died had increased leukocyte counts (deceased: survivors = 50%: 22.6%,  $\chi^2 = 21.2$ , P value =  $4.18 \times 10^{-6}$ ), neutrophils (deceased: survivors = 48.1%: 19.6%;  $\chi^2 = 25$ , P value =  $5.61 \times 10^{-7}$ ), platelets (deceased: survivors = 36.5%: 18.4%;  $\chi^2 = 10.8$ , P value = 0.0010) and total serum proteins (deceased: survivors = 39.1%: 21.1%;  $\chi^2 = 9.2$ , value P = 0.0025), outside the normal range. The NLR report, the existence of postoperative complications and comorbidities (ischemic heart disease and liver cirrhosis) have been demonstrated as prognostic factors for death, regardless of age and gender.

**Conclusions.** In conclusion, the present study identified significant predictors of death, regardless of age and gender, for patients diagnosed with colorectal cancer, namely NLR, the presence of postoperative complications, ischemic cardiomyopathy and liver cirrhosis. Patients with elevated NLR are at an advanced stage of the disease and, as a result, have poor survival. Early detection of colorectal cancer can lead to a significant decrease in the mortality rate, therefore future research should focus on finding accessible biological markers to detect this type of cancer.

---

## **Study II. Performance of inflammatory markers in the classification of patients with and without metastases: ROC analysis and effects of randomization on the performance of classification models**

**Purpose:** Given the state-of-the-art tests, our goal had a double connotation:

1. to evaluate the performance of ROC models in the context of restrictive and non-restrictive randomization of three ratios in the classification of colorectal cancer patients with and without metastases
2. to demonstrate the impact of restrictive and non-restrictive randomization on the performance of the classification models.

**Material and method.** The database was constructed by retrospective collection of: absolute values of leukocytes, neutrophils, platelets and TNM classification of tumors (T - extension of the primary tumor, N - lymph nodes, M - presence and location of distant metastases), at the time of admission, preoperatively, for the patients hospitalized in the Surgery Clinic III with the diagnosis of colon or rectal cancer between January 2014 and September 2019. The presence of distant metastases was considered the variable of interest in this study. The presence of metastases has been documented by computer imaging such as contrast-enhanced thoraco-abdomino-pelvic computer tomography (CT TAP), abdomino-pelvic MRI or contrast-enhanced ultrasonography (especially used for liver metastases). The raw data of patients diagnosed with colon or rectal cancer were evaluated and the data sheets with incomplete or inconclusive data were excluded from the study. Absolute values were used as input data for the calculation of the following ratios, used as predictors of metastases in the present study: NLR, dNLR and PLR.

**Results.** When the whole sample was used, subjects with metastases from all three evaluated ratios were correctly identified, with a statistically significant AUC of 0.5. The performance indices of the control models demonstrated moderate abilities for classification of the investigated ratios, NLR being the most efficient biomarker for the identification of metastases. At least one non-restrictive random set has the same threshold value of the Youden index for each of the ratios evaluated as predictive models (URun01 for NLR and dNLR; URun02 for dNLR; URun05 for PLR). The results obtained are lower than those reported for complete model for NLR (8/13, 61.5%). Changes in the statistical significance of AUC are identified only in the case of PLR for non-restrictive random sets with 16% of the subjects in the development group. Regarding cross-validation, with 70% of the data distributed in the learning group and 30% in the validation group, the classification models demonstrate similar AUC performance for NLR and dNLR, and for PLR, AUC is close to 0, 5 a AUC. Similar variations of true positive, true negative, false positive, and false negative values obtained from the evaluation of restrictive random sets at both learning and validation groups are identified. The above values vary, for example, in the case of true positive values at a difference between the maximum and minimum limit of 3.4% observed for PLR and 46.2% observed for AGR. ROC cross-validation analysis applied to restrictive random samples identified NLR and dNLR as markers with the highest predictive power for metastases according to the highest F1 score. However, good performance of the models is obtained when the whole set is evaluated for NLR and dNLR, but in terms of PLR, better performance is obtained in cross-validation. All these aspects materialize the stability of the classification model. The visual representation of the areas under the curve for each scenario associated with the complete model for NLR, dNLR and PLR showed a greater variability in the case of non-restrictive random sets.

**Conclusions.** Investigated ratios of inflammatory markers have shown moderate clinical utility in predicting metastases in colorectal cancer patients. Complete models have been shown to be effective in screening, but positive and negative predictive values do not fully support the reliability of their application in current clinical practice. The classification models identified in the learning groups, regardless of the method of obtaining the sets (random, non-restrictive or restrictive), showed characteristics and performance similar to the complete models. Our results showed that a simple random distribution of observations, with or without weighting patients with and without metastases, in a ROC analysis provides performance similar to complete models, when at least 70% of the available population is included in the assessment. Moreover, the size of the sample in the study group when analyzing the ROC classification of the investigated inflammatory ratios, considered as predictors of metastases in colorectal cancer patients, did not produce error on the characteristics of the models or on their performance.

### Study III. The utility of preoperative inflammatory markers ratios as classification models for colorectal cancer patients

**Purpose:** The assessment of seven ratios as a classification tool for seven outcomes in colorectal cancer patients. The threshold values identified in the main objective were later used to construct multivariate models in order to predict a specific feature.

**Material and method.** A retrospective cohort study was conducted at the Surgery Clinic III, Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor ", Cluj-Napoca, Romania. Subjects admitted with the diagnosis of colorectal cancer between January 2014 and September 2019 were eligible for the study. The medical records of the patients admitted during this period were reviewed and the necessary information collected was introduced in the database. The main criterion was given by the main diagnosis, which was established to be that of colon or rectal cancer. Demographics (age, gender, background), clinical data ((neo) adjuvant treatment, complications), laboratory tests (hemoglobin, total serum proteins, serum albumin, serum globulins, absolute leukocyte count, neutrophils, platelets, monocytes ) and histopathological results were analyzed for these patients. Patients whose medical records were incomplete, lacking data on colorectal pathology, or who had not undergone surgery during hospitalization were excluded from the study.

**Results.** A total of 1688 patients with colorectal cancer, aged between 19 and 95 years, were analyzed. The majority of subjects included in the study were men (978/1688, so 57.9%). The death rate was 3.1% (52/1688). Two of the seven evaluated ratios demonstrated satisfactory performance in the ROC analysis, as prognostic factors for death, namely NLR and dNLR. Both ratios had reasonable specificity (61.8% [59.4 - 64.2] for NLR and 73.3% [71.1 - 75.4] for dNLR), with a high negative predictive value (NLR: 98 [97.1 - 98.8] for NLR and 97.8 [97.0 - 98.6] for dNLR), being effective in screening (CUI- of 0.605 [0.586 - 0.625] for NLR and 0.717 [0.700 - 0.733 ] for dNLR). However, + LR is less than 2 and -LR is greater than 0.6, demonstrating reduced predictive power. The area under the LMR curve is significantly less than 0.5, indicating the presence of low risk values in the advanced stages (T3 and T4, median = 3.40, (Q1 - Q3) = (2.43 - 4.60); {min - maximum} = {0 , 28 - 14,17}) compared to those in the early stages (T1 and T2, median = 3.98, (Q1 - Q3) = (2.87 - 5.49); {min - maximum} = { 0.56 - 15.21}). The difference observed between patients with advanced T stage proved to be statistically significant (Mann-Whitney test: statistics Z = -5.13, P value <0.0001). The classification combining NLR and SII in relation to the T stage does not bring improvements in clinical utility, the classification model proving to be similar to the individual ratios (+ CUI = 0.5 [0.468 - 0.533]). The NLR, PLR and SII showed good performance in ROC analysis for the evaluation of chemo- or (neo) adjuvant radiotherapy in colorectal cancer patients, but only PLR demonstrated good clinical utility for screening. The classification model obtained by combining the above-mentioned ratios demonstrates modest case identification (+ CUI = 0.13 [0.088 - 0.180]) or screening (-CUI = 0.33 [0.297 - 0.355]) capabilities. All investigated ratios showed moderate classification skills for expected events such as postoperative complications, food and transit resumption. Multivariate logistic regression identifies significant values for four of the seven expected events. The dNLR proved to be a good predictor of death, regardless of gender. Both NLR and LMR prove to be good predictors for the T stage, regardless of age or gender and PNI is an effective predictor of the M stage.

**Conclusions.** The evaluated ratios provide a moderate prognostic value at specific threshold levels for certain events, proving utility as screening markers and they may play a substantial role in the therapeutic management, but comprehensive multicenter studies are needed in order to demonstrate their clinical relevance. Our study found that dNLR is a reliable marker of survival in colorectal cancer patients, who have undergone surgical treatment. Calculated inflammatory ratios, NLR, LMR and PNI are potential prognostic markers for the T and M stages. PLR provides important information about the effect of neoadjuvant treatment on patients with colorectal cancer. Our results support the need for prospective multicenter studies to demonstrate the clinical relevance of inflammatory marker ratios and to translate the results into the current clinical management of the patients with colorectal cancer .



---

## Study IV: Evaluation of neopterin and chitotriosidase as potential serum markers in colorectal cancer

**Purpose:** Our main goal was to evaluate the clinical utility of both chitotriosidase and neopterin in differentiating colorectal cancer patients from cancer-free controls. The second direction in this study was to dynamically evaluate how the values of the investigated markers, neopterin and chitotriosidase, change at one year of postoperative follow-up.

**Material and method.** A prospective case-control study was conducted between January 2020 and May 2021 in patients with stage I to IV colon or rectal cancer, admitted at the 3rd Surgical Clinic for curative or palliative surgical resection. The diagnosis of cancer was based on colonoscopy with a positive adenocarcinoma biopsy and the staging was performed according to contrast-enhanced computer tomography (CT), contrast-enhanced ultrasound (CEUS) or echoendoscopy (EUS) and magnetic resonance imaging (MRI). Controls were adult subjects selected from the general population, depending on the age group (30-40; 41-60; 61-80; > 80 years old), gender and environment. The control group met the inclusion criteria of the cases: age over 18 years, absence of chronic inflammatory diseases (chronic viral hepatitis "B" or "C", human immunodeficiency virus, inflammatory bowel diseases, etc.), no pregnant or breastfeeding women. Samples of peripheral venous blood were collected from the cases, at the time of admission (baseline), one day before surgery and before any conservative or interventional treatment was administered and at one year of postoperative follow-up. Only one blood sample was taken from witnesses. The following were measured: total blood count, biochemistry, inflammation markers and tumoral markers. Blood samples were centrifuged less than 45 minutes after collection to obtain 1.5 ml of serum, which was subsequently frozen and stored at -80°C. The biochemical assays of the evaluated biomarkers (chitotriosidase and neopterin) were performed using the Human Neopterin Fine Test ELISA kit (EH3413, Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, Hubei, China) and the Human CHIT1 ELISA kit (Chitotriosidase-1) Elabscience (E-EL-H5620, Elabscience Biotechnology Inc., Houston, Texas, USA) according to the manufacturer's instructions.

**Results.** Forty-four patients with colon or rectal cancer, considered to be part of the cases group and an equal number of cancer-free subjects, considered as witnesses, were evaluated. The age of the subjects in the two groups ranged from 31 to 86 years. Fifty-nine patients were initially considered eligible in the case group, but due to the COVID-19 pandemic, 15 patients were lost from the postoperative follow-up and were therefore excluded from the study. The majority of patients were males (29, 65.9%) and in terms of environment, only a minority came from rural areas (16 subjects, 36.4%) in each group. Twenty-two subjects in the colorectal cancer group were smokers, 5 (22.7%) were light smokers, 8 (36.4%) were moderate smokers and 9 (40.9%) were heavy smokers. Ten subjects in the cancer-free group were smokers: 1 (10%) light smoker, 3 (30%) moderate smokers and 6 (60%) heavy smokers. No statistically significant association was observed between smoking status between the groups (Fisher exact test: P value = 0.6495). No statistically significant difference was observed between smokers and non-smokers, nor for chitotriosidase (colorectal cancer group: Mann-Whitney z-stat test = -0.05, P value = 0.9626; non-cancer group: Mann test - Whitney z -state = 0.10, P value = 0.9219; Mann-Whitney test) or for neopterin (colorectal cancer group: Mann-Whitney z-state test = 0.49, P value = 0.6221 ; cancer-free group: Mann-Whitney z-state test = 1.11, P value = 0.2686; Mann-Whitney test). This demonstrates that smoking is not an error factor influencing the evaluation of neopterin or chitotriosidase as predictive markers. C-reactive protein values were significantly higher in the colorectal cancer group compared to the control group: median = 1.3 mg / dL, IQR = (0.48 - 4.43) versus median = 0.39 mg / dL, IQR = (0.2-0.7); Mann-Whitney test: z-state = 5.4, P value <0.0001. Patients in the case group had higher values of chitotriosidase (median = 2.9 ng / mL, IQR = (1.6 - 4.7)) and neopterin (median = 5.2 ng / ml, IQR = (2, 3 - 8.3)) compared to subjects in the control group (chitotriosidase: median = 2.3 ng / mL (0.7 - 4.3); neopterin: median = 2.4 ng / ml, IQR = (2 - 5.3)). Most tumors in the colorectal cancer group were moderately differentiated, grade G2 and no distant metastases. The most common complication was incisional wound infection (6/31), followed by wound seroma, bleeding without hemodynamical impact, prolonged postoperative ileus or acute urinary retention, each occurring in 3 out of 31 patients. Two of the subjects with colorectal cancer died after discharge, during the oncological follow-up. Therefore, the number of patients in the postoperative 1 year follow-up sample is lower than the initial group of cases, equal to 42. Chitotriosidase and neopterin values decreased significantly at follow-up. The difference between baseline and 1-year follow-up of neopterin also remains statistically significant after removal of the extreme values (Wilcoxon test on matching pairs: z-state = 5.6, P value <0.0001). Neopterin has been shown to be sensitive in distinguishing between the tumor stages, N and M both at the time of diagnosis and at 1 year

follow-up. Similar differences were observed for chitotriosidase, but this marker also showed a significant association with the degree of differentiation (G) of the tumor. Regarding the 1 year follow-up, a monotonous association between chitotriosidase and CEA was identified, the Spearman correlation coefficient ( $\rho$ ) being equal to 0.30 (value  $P = 0.0496$ ). Dividing the total number of cases (colorectal cancer patients) into two subgroups: subjects with colon cancer and those with rectal cancer, statistical differences were observed between groups in relation to the value of leukocytes, neutrophils and lymphocytes, also between baseline (preoperative) and at 1 year after surgery in the sense of decreasing levels of absolute values of inflammatory markers. Carcinoembryonic antigen followed a significant decrease in colon cancer after surgical treatment, and neopterin followed the same trend in both colon and rectal cancer.

**Conclusions.** Our study showed the possible utility of serum levels of chitotriosidase and neopterin in distinguishing the T, B and M stages before surgical treatment, with higher performance of chitotriosidase in G grade compared to neopterin. We observed a link between recurrence or tumor metastasis and elevated serum neopterin and chitotriosidase levels with a significantly lower level in patients with good outcome after curative surgery. The evaluated serum biomarkers could be helpful in assessing disease progression, similarly observed in carcinoembryonic antigen levels, especially in cases where CEA has no follow-up value, non-secreting tumors. Further studies are needed to validate our findings and apply the two biomarkers on a larger scale in clinical use for the patients with colorectal cancer.

### Originality and innovative contributions of the thesis

This paper is unique in its complexity, corroborating demographic data, risk factors, the TNM stage, surgical resection techniques, established markers of systemic inflammation, in order to identify new inflammatory markers, considered as prognostic factors and to evaluate their classification potential.

The identification of prognostic biomarkers is the key point of interest in our study, because by identifying them one can guide and adapt the therapeutic management, all this in order to increase survival. The first direction of this research was to study inflammatory markers and their relationships with colorectal cancer. Thus, four serum ratios were studied to assess whether they are prognostic factors for death in colorectal neoplasia. This association has also been reported in the international literature, but not on the Romanian population, on which we obtained similar results.

The second direction of research was ROC analysis as a method of classifying events of interest based on inflammation ratios. We evaluated the performance of ROC classification models for patients with and without metastases based on three calculated ratios and evaluated the impact of two types of randomization (non-restrictive vs. restrictive) on the performance of classification models. This approach is unique in the literature regarding the study of colorectal cancer. The complete models studied demonstrated satisfactory screening efficiency. The similarity of the performances in the restrictive and non-restrictive models with those of the whole set of data sets supports the stability of the classification models in the context of an appropriate experimental design and the possibility of applying the same tests, both in large groups and in smaller groups of subjects, the efficiency obtained being comparable as long as the learning set includes at least 70% of the eligible population.

The third direction in which we focused our research was to demonstrate the prognostic utility of ratios of preoperative inflammatory biomarkers as classification markers for patients with colorectal cancer. Several biomarkers have been studied in the literature, which can be obtained before starting treatment and can be considered as prognostic factors in determining the subsequent evolution of the disease but there is no consensus on the threshold values of these markers. In this regard, we also analyzed the inflammatory ratios in this study, being the first study of its kind in Eastern Europe. The ability of seven ratios to classify a specific event in colorectal cancer patients was assessed. It has thus been shown that this evaluation of the ratios confers an individual prognostic value at specific threshold levels for certain events considered. They have shown satisfactory utility as screening markers, but their clinical relevance requires further study.

Following these three approaches, we decided to evaluate two enzymes of inflammation, neopterin and chitotriosidase as potential serum biomarkers of colorectal cancer. The fourth direction of research was to evaluate the clinical utility of both chitotriosidase and neopterin in differentiating colorectal cancer patients from healthy individuals. Within this research direction, we also performed a dynamic assessment of how the values of these biomarkers change following surgery, at one year of postoperative follow-up. The present study highlighted the utility of serum levels of chitotriosidase and neopterin in distinguishing T, N and M

---

stages prior to surgical treatment. A link between recurrence or metastasis and blood levels of these markers was also highlighted.

Regarding the genetic picture involved in colorectal cancer, scientific research has come a long way and has been well characterized, but the other major component involved in the carcinogenesis of colorectal tumors, namely the influence of chronic inflammation on the disease, remains poorly defined. In this context, in-depth studies of the relationship between systemic inflammatory markers, tumor burden, peritumoral proinflammatory cellularity and, last but not least, the microbiome are needed. The results of these studies could lead to the establishment of a set of changes in diagnostic management and therapeutic strategy to restore the response to treatment, resulting in improved survival, disease-free interval and patient quality of life.

Similarly, the development and implementation of new, more specific and sensitive serum biomarkers in the near future will improve diagnostic strategies, enabling clinicians to detect colorectal cancer in the early stages of the disease and thus improve the prognosis of thousands of patients.

Nowadays, personalized medicine is fast becoming an indispensable tool. Therefore, it is necessary to perform a thorough analysis of the tumor characteristics of each patient, in order to find the appropriate treatment in each case.