
TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

Modelarea evoluției post-operatorii cu ajutorul biomarkerilor inflamației

Doctorand **Vlad-Ionuț Nechita**

Conducător de doctorat **Conf. Dr. Florin Graur**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Tumora Klatskin	17
1.1. Introducere și epidemiologie	17
1.2. Etiologie și factori de risc	17
1.3. Tablou clinic și tratament	18
2. Cancerul gastric	19
2.1. Introducere și epidemiologie	19
2.2. Etiologie și factori de risc	19
2.3. Tablou clinic și tratament	21
3. Colecistia litiazică	23
3.1. Introducere și epidemiologie	23
3.2. Etiologie și factori de risc	23
3.3. Tablou clinic, diagnostic și tratament	24
4. Biomarkerii inflamației	27
4.1. Raporturile inflamatorii	27
4.2. Neopterină	29
4.3. Chitotriozidază	30
5. Metode statistice utilizate în analiză	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
6. Studiul 1. Evaluarea raporturilor neutrofile-limfocite, trombocite-limfocite și limfocite-monocite la pacienții cu tumori Klatskin	37
6.1. Introducere	37
6.2. Scop și obiective	38
6.3. Material și metodă	38
6.4. Rezultate	40
6.5. Discuții	44
6.6. Concluzii	46
7. Studiul 2. Tumorile Klatskin: o analiză a supraviețuirii în funcție de caracteristicile tumorii și raporturile inflamatorii	49
7.1. Introducere	49
7.2. Ipoteza de lucru	51
7.3. Material și metodă	51

7.4. Rezultate	52
7.5. Discuții	58
7.6. Concluzii	61
8. Studiul 3. Raporturile inflamatorii ca predictorii pentru invazivitatea tumorii, metastazare, rezecabilitate și evoluția postoperatorie precoce în cancerul gastric	63
8.1. Introducere	63
8.2. Ipoteza de lucru	64
8.3. Material și metodă	64
8.4. Rezultate	66
8.5. Discuții	71
8.6. Concluzii	75
9. Studiu 4. Raporturile inflamatorii ca factori de prognostic ai supraviețuirii în adenocarcinomul gastric operabil	77
9.1. Introducere	77
9.2. Ipoteza de lucru	79
9.3. Material și metodă	79
9.4. Rezultate	80
9.5. Discuții	86
9.6. Concluzii	88
10. Studiu 5. Chitotriozidaza și neopterina – doi potențiali biomarkeri pentru stadiul avansat și predicția supraviețuirii în cancerul gastric – un studiu pilot	89
10.1. Introducere	89
10.2. Ipoteza de lucru	90
10.3. Material și metodă	90
10.4. Rezultate	92
10.5. Discuții	95
10.6. Concluzii	98
11. Studiu 6. Chitotriozidaza și neopterina ca potențial biomarkeri pentru evaluarea cazurilor complicate de colecistită – un studiu pilot	99
11.1. Introducere	99
11.2. Ipoteza de lucru	99
11.3. Material și metodă	100
11.4. Rezultate	102
11.5. Discuții	106

11.6. Concluzii	109
12. Concluzii generale	111
13. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	113
REFERINȚE	115

Cuvinte cheie: biomarkerii inflamației, raporturile inflamatorii, chitotriozidaza, neopterină, neoplasm gastric, tumoră Klatskin, colecistită litiazică, complicații, prognostic, evoluție postoperatorie, supraviețuire, regresii COX, curba ROC.

INTRODUCERE

În ciuda evoluției și progreselor chirurgiei, prognosticul poate continua să fie rezervat în special pentru neoplazii sau pentru cazurile chirurgicale complicate. Metodele actuale de stadializare și evaluare prognostică sunt uneori costisitoare sau invazive. În această lucrare de doctorat s-au analizat biomarkerii ai inflamației (ieftini și ușor accesibili) pentru modelarea prognostică a evoluției postoperatorii a pacientului, atât în cazul intervențiilor clasice majore cât și în cazul procedurilor laparoscopice, atât în patologia malignă, cât și în cea benignă. Alături de raporturile inflamatorii care se pot obține cu ajutorul hemoleucogramei de rutină la prezentarea subiecților, au fost analizați alți doi biomarkerii mai puțin cunoscuți: chitotriozidaza și neopterina.

Implicarea răspunsului inflamator este unul dintre primele și principalele moduri de reacție ale organismului la agresiune. Răspunsul va fi proporțional cu natura și severitatea afecțiunii. Posibila legătură între inflamație și cancer a fost sugerată în urmă cu mai bine de 150 de ani de către Rudolf Virchow care a observat o infiltrare leucocitară a tumorilor de sân. Printre markerii inflamatori uzuali și ușor de investigat, fără costuri suplimentare, se găsesc și raporturile inflamatorii rezultate în urma împărțirii valorilor absolute ale celulelor sangvine din periferie. Acești biomarkerii sunt reprezentați de: NLR (raportul neutrofilelor față de limfocite), LMR (raportul limfocitelor față de monocite), PLR (raportul plachetelor față de limfocite) și SII (indicele de inflamație sistemică) care se calculează raportând produsul dintre trombocite și neutrofile la numărul limfocitelor. Raporturile inflamatorii au fost studiate ca factori de prognostic în multiple neoplazii cum ar fi cancerul de sân, cancerul de prostată, cancerul gastroesofagian, carcinomul hepato-celular, cancerul colorectal, neoplazia pulmonară, cancerul ovarian și cancerul nazofaringian. Asocierea raporturilor inflamatorii cu diagnosticul de neoplazie și agresivitatea tumorii este susținută de multiple studii. Unii autori au dezvoltat și modele prognostice pornind de la aceste valori, astfel creșterea ale raporturilor inflamatorii au fost asociate cu un prognostic slab.

Neopterina face parte din familia pteridinelor și este un produs de catabolism al GTP (guanozin trifosfat), fiind sintetizată ca urmare a activării monocitelor și macrofagelor în urma stimulării cu interferon gamma, o citokină cu rol proinflamator. Dacă există concentrații crescute de neopterină în sânge sau urină, acestea pot reflecta o eliberare endogenă de interferon gamma cu activarea imunității celulare. În literatură există unele evidențe care sugerează creșterea ale neopterinei în patologia tumorală. Pentru situații chirurgicale acute, neopterina s-a dovedit a avea valori elevate față de martorii fără patologie.

Chitotriozidaza face parte din familia enzimelor numite chitinaze. Principalul său rol constă în apărarea organismului împotriva patogenilor care au un înveliș

chitinos ca parte a peretelui celular. Este prima enzimă chitinolitică descoperită la om, fiind codificată de gena CHIT1. Chitotriozidaza a fost evaluată ca biomarker al activării macrofagelor în diabetul de tip I cu complicații, spondilita anchilozantă, boli infecțioase precum bruceloza, dar și în patologii neoplazice precum cancerul pulmonar, gastric, de sân sau prostată. Pentru situațiile chirurgicale acute chitotriozidaza a oferit rezultate relevante pentru diagnostic și aprecierea severității bolii.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Cercetarea doctorală s-a concretizat în scrierea și publicarea a șase articole științifice indexate ISI, alături de prezentări la conferințe și congrese naționale (3 prezentări poster la Zilele UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, dintre care două premiate) și internaționale (participare cu poster la EAES - European Association for Endoscopic Surgery, Cracovia, Polonia, iunie 2022). Rezultatelor studiilor publicate sunt promițătoare, și pe lângă contribuțiile la progresul științei și valoarea intrinsecă, ele vor putea reprezenta puncte de plecare pentru noi cercetări. Aceste studii vor fi prezentate în continuare în rezumat.

Studiul 1. Evaluarea raporturilor neutrofile-limfocite, trombocite-limfocite și limfocite-monocite la pacienții cu tumori Klatskin

Acest studiu reprezintă capitolul 6 al tezei de doctorat.

Scopul primului studiu a fost de a analiza raporturile inflamatorii NLR, PLR și LMR la pacienții cu tumori Klatskin înainte de intervenție și postoperator precoce pentru a evalua asocierea acestora cu factori prognostici tumorali cunoscuți și cu procedura optimă aleasă (curativă sau paliativă).

Cincizeci și șapte de pacienți cu tumoră hilară documentată au fost incluși în studiu ca eligibili după analiza a șizeci și șase de fișe medicale codate cu diagnostic de colangiocarcinom Klatskin din baza de date internă a spitalului IRGH. S-a observat o creștere semnificativă a raportului NLR și o scădere a raportului LMR pentru pacienții cu rezecție, clasă Bismuth mai mare (III și IV) și invazie în perioada imediat postoperatorie. Aceste variații pot sugera o relație cu evoluția și severitatea bolii.

Studiul 2. Tumorile Klatskin: o analiză a supraviețuirii în funcție de caracteristicile tumorii și raporturile inflamatorii

Acest studiu reprezintă capitolul 7 al tezei de doctorat.

Studiul și-a propus să evalueze pacienții cu tumoră Klatskin și indicație chirurgicală din punct de vedere al supraviețuirii în funcție de valorile biomarkerilor inflamatori (NLR, PLR, LMR, SII) la internare. S-au evaluat și diferențele în ce privește

valorile raporturilor inflamatorii dintre grupul pacienților care au beneficiat de rezecție chirurgicală respectiv pacienții pentru care s-au descoperit tumori nerezecabile intraoperator și au avut parte doar de o abordare chirurgicală paliativă.

Pentru evaluare au fost luați în considerare 72 de pacienți cu tumoră Klatskin și indicație chirurgicală. Treizeci de pacienți reprezentând 41,66% au avut un abord paliativ, fără rezecție a masei tumorale; ceilalți patruzeci și doi de pacienți (58,33%) au avut rezecție chirurgicală cu viză curativă. Valori crescute ale biomarkerilor inflamatori la internarea pacientului au fost asociate cu posibilități chirurgicale limitate și supraviețuire redusă. HR (Rata Hazardului) crește semnificativ odată cu valorile crescute ale NLR, PLR și SII la prezentare. Conform modelului multivariat, LMR nu influențează semnificativ supraviețuirea.

Studiul 3. Raporturile inflamatorii ca predictorii pentru invazivitatea tumorii, metastazare, rezecabilitate și evoluția postoperatorie precoce în cancerul gastric

Acest studiu reprezintă capitolul 8 al tezei de doctorat.

Studiul și-a propus evaluarea biomarkerilor inflamatori precum NLR, PLR, LMR, SII și asocierea lor cu elemente prognostice deja dovedite, cum ar fi stadiul tumoral (stadiul T), invazia tumorală în unul sau mai multe organe, prezența și numărul metastazelor (M), în cancerul gastric. În al doilea rând a evaluat asocierea cu un alt factor prognostic important - tratamentul adecvat cazului: curativ sau paliativ. În al treilea rând, pentru testarea asocierii cu complicații chirurgicale precoce postoperator și deces pe durata spitalizării raporturile inflamatorii au fost, de asemenea, evaluate în a 4-a sau a 5-a zi postoperator.

Pentru acest studiu s-a folosit o cohortă retrospectivă (1 ianuarie 2016 – 31 decembrie 2019) de 657 pacienți cu cancer gastric din secția de chirurgie a Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor”, Cluj-Napoca. Un potențial prognostic s-a observat pentru NLR, PLR, LMR și SII la pacienții cu cancer gastric înainte de intervenția chirurgicală și precoce postoperator. Valori NLR, PLR și SII mai mari, respectiv valori mai mici pentru LMR la internare, au fost asociate cu caracteristicile unei extensii tumorale mai agresive. În ziua a 4-a sau a 5-a postoperatorie valorile mai mari pentru NLR, PLR și SII, respectiv mai mici LMR, au fost asociate cu complicații chirurgicale și prognostic infaust pe durata internării. Ar trebui să beneficieze de mai multă atenție în perioada postoperatorie pacienții cu valori mai mari ale NLR, PLR și SII sau LMR mai scăzute.

Studiul 4. Raporturile inflamatorii ca factori de prognostic ai supraviețuirii în adenocarcinomul gastric operabil

Acest studiu reprezintă capitolul 9 al tezei de doctorat.

Studiul a evaluat în cazul adenocarcinomului gastric rezecabil valoarea prognostică pentru supraviețuire a biomarkerilor inflamatori (NLR, PLR, LMR și SII) la internare.

În studiu au fost înrolați 549 de pacienți operați cu intenție curativă, cu gastrectomie totală sau subtotală pentru adenocarcinom gastric confirmat histologic.

În adenocarcinomul gastric rezecabil un factor de prognostic independent pentru supraviețuirea globală redusă s-a dovedit a fi NLR preoperator cu valori mai mari. În analiza multivariată, celelalte raporturi inflamatorii: PLR, LMR și SII nu au dobândit semnificație.

Studiu 5. Chitotriozidaza și neopterina – doi potențiali biomarkeri pentru stadiul avansat și predicția supraviețuirii în cancerul gastric – un studiu pilot

Acest studiu reprezintă capitolul 10 al tezei de doctorat.

Studiul și-a propus evaluarea a doi biomarkeri moleculari mai puțin cunoscuți și anume chitotriozidaza și neopterina în cancerul gastric pentru a verifica asocierea valorilor preoperatorii cu agresivitatea tumorală (elemente de stadializare TNM) și cu prognosticul. Ipoteza studiului a fost că nivelurile de neopterină și chitotriozidază crescute ar putea fi asociate cu tumori mai avansate locoregional și supraviețuirii reduse.

În studiu au fost incluși 39 de pacienți dintre care au beneficiat de gastrectomie 28 de pacienți (17 cu gastrectomie subtotală și 11 totală), iar intervenții chirurgicale paliative au avut 11 pacienți. Neopterina nu a avut modificări semnificative în grupul cu cancer gastric în stadiu mai avansat sau cu prognostic rezervat. Contrar unor date deja existente, valori mai mici ale neopterininei (dar fără semnificație statistică) au fost asociate cu prezența metastazelor, stadiul T mai avansat și supraviețuirea redusă. În ceea ce privește activitatea chitotriozidazei aceasta a fost, de asemenea, fără a atinge semnificația statistică, mai scăzută în grupul cu intervenții paliative. Valorile au fost însă semnificativ mai mari în grupurile cu supraviețuire redusă și conform modelului multivariat, a fost asociată semnificativ cu un prognostic mai rezervat. Pentru a evalua prognosticul în adenocarcinomul gastric chitotriozidaza are potențială utilitate. Studii pe eșantioane mai mari sunt necesare însă pentru confirmare.

Studiu 6. Chitotriozidaza și neopterina ca potențial biomarkeri pentru evaluarea cazurilor complicate de colecistită – un studiu pilot

Acest studiu reprezintă capitolul 11 al tezei de doctorat.

Studiul s-a concentrat pe chitotriozidază și neopterină, dorind să evalueze potențialul acestor markeri biologici în cazurile de colecistită, pe baza răspunsului inflamator asociat. Prin urmare, ne-am propus să evaluăm diferențele în activitatea chitotriozidazei și în nivelurile de neopterină în preoperator și postoperator pentru colecistita complicată la prezentare vs. cea cronică, necomplicată. Relația dintre nivelurile biomarkerilor la prezentarea pacientului și necesitatea unor manevre suplimentare în timpul abordării chirurgicale, care ar crește invazivitatea și durata intervenției au fost evaluate. Relevanța valorilor la prezentare pentru durata totală a spitalizării și perioada de spitalizare postoperatorie au fost de asemenea investigate.

La studiu au participat 51 de pacienți și am avut două grupuri în funcție de severitatea colecistitei: treizeci și șase de subiecți cu colecistită cronică necomplicată (70,58%) și cincisprezece cazuri complicate (29,41%). Pentru diagnosticul colecistitei complicate, neopterină circulantă poate fi un biomarker molecular util. Pe de altă parte activitatea chitotriozidazei nu a evidențiat diferențe semnificative între subgrupele de pacienți. O scădere semnificativă evidențiată în prima zi după colecistectomia laparoscopică sugerează utilitatea prognostică a chitotriozidazei în urmărirea precoce a pacientului. Constatările noastre necesită validare pe cohorte mai mari înainte de utilizarea acestor biomolecule în cadrul clinic.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza de doctorat prezintă o abordare complexă a biomarkerilor inflamației, printr-un număr important de studii, pe grupuri mari de pacienți, publicate în reviste prestigioase, cu impact în lumea științifică. Evaluarea biomarkerilor inflamației pe un spectru larg de patologii chirurgicale, face lucrarea de față unică și importantă în modelul prognostic al perioadei perioperatorii și postoperatorii, dar și în aprecierea învazivității și rezecabilității unor tumori maligne. Biomarkerii studiați au arătat un potențial semnificativ în toate cele șase studii ale tezei.

Primele două studii au abordat retrospectiv o patologie tumorală rară, pentru care intervențiile curative sunt dificile datorită lipsei simptomelor, prezentării tardive și a proximității cu structuri anatomice vitale. Majoritatea pacienților, fiind inoperabili, nu mai sunt direcționați spre servicii chirurgicale, sau ajung în serviciul de chirurgie doar în cazul eșecului procedurilor paliative minim invazive. Lucrarea de față aduce astfel evidențe pentru o malignitate rară, cu număr mic de pacienți și dificil de studiat. Menționăm că, cele două studii sunt primele în România care investighează într-un centru regional asocierea dintre biomarkerii inflamatori, procedură și supraviețuire pentru tumorile Klatskin cu indicație chirurgicală.

Cele trei studii asupra biomarkerilor inflamației ca modele prognostice în cancerul gastric au luat în considerare un interval de timp important permițând evaluarea unui număr mare de subiecți. România, ca țară a Europei de est, are o incidență crescută a cancerului gastric. S-a observat de asemenea o prezentare tardivă a pacienților datorită simptomelor mai puțin specifice. În studiile noastre aceasta a fost tradusă prin frecvența importantă a stadiilor avansate și a necesarului de proceduri paliative într-o patologie în care rezecția e posibilă în intervalul terapeutic. Necesitatea conștientizării, screeningului, dar și a metodelor de evaluare a prognosticului pot fi subliniate la acest capitol. Ca orice procedură clasică majoră, intervenția e grevată de riscul unor complicații imediate sau tardive care pot înrăutăți prognosticul. Pentru a evalua legătura cu posibilele complicații s-au studiat atât raporturile din preoperator, cât și cele din perioada imediat postoperatorie. Puține studii evaluează biomarkerii inflamației post-intervenționale așa cum o face studiul nostru. O valoare mai importantă pentru apariția complicațiilor au arătat raporturile post-intervenție care au fost crescute în mod semnificativ. Un caracter distinctiv îl oferă și

evaluarea unui singur tip histologic din patologia tumorală gastrică. Studiile 3 și 4 aduc evidențe suplimentare pentru o patologie tumorală frecventă cu mortalitate importantă pentru populația din România.

Studiile 5 și 6 evaluează doi biomarkeri moleculari ai inflamației mai puțin cunoscuți și încă insuficient studiați în literatură: chitotriozidaza și neopterină. Studiul 5 continuă cercetarea pe patologia tumorală gastrică. Menționăm că nu există studii în România care să evalueze acești biomarkeri pe cancerul gastric și, conform cercetărilor noastre, în literatură nu se găsesc studii care să îi evalueze împreună pe același lot de pacienți în adenocarcinomul gastric. Rezultatele sunt cu importanță prognostică.

Pentru cel de al șaselea studiu neopterină se dovedește cu utilitate în identificarea colecistitelor complicate, iar chitotriozidaza prezintă utilitate prognostică în urmărirea precoce a pacientului după colecistectomia laparoscopică. Conform cercetărilor noastre, acesta este primul studiu din literatură care evaluează chitotriozidaza și neopterină la pacienții cu colecistite complicate fără afectare hepatică, pancreatică sau renală. Rezultatele sunt semnificative și cu directă utilitate clinică pentru toate studiile menționate anterior.

Pentru a îmbunătăți activitatea de diagnosticare, evaluare, stadializare și apreciere a prognosticului, utilitatea acestor biomarkeri poate fi fructificată în domeniul clinic. Rezultatele acestor studii pot ajuta clinicianul și pot constitui un punct de plecare pentru a extinde spectrul medicinei personalizate și orientate spre pacient.

Ph.D. THESIS SUMMARY

Modeling the postoperative evolution with the biomarkers of inflammation

Ph.D. Student **Vlad-Ionuț Nechita**

Ph.D. Thesis Coordinator **Assoc. Prof. Dr. Florin Graur**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	15
1. Klatskin Tumor	17
1.1. Introduction and epidemiology	17
1.2. Etiology and risk factors	17
1.3. Clinical manifestations and treatment	18
2. Gastric cancer	19
2.1. Introduction and epidemiology	19
2.2. Etiology and risk factors	19
2.3. Clinical manifestations and treatment	21
3. Gallstones disease	23
3.1. Introduction and epidemiology	23
3.2. Etiology and risk factors	23
3.3. Clinical manifestations, diagnosis and treatment	24
4. Biomarkers of inflammation	27
4.1. Inflammatory ratios	27
4.2. Neopterin	29
4.3. Chitotriozidase	30
5. Statistical methods used in the analysis	33
PERSONAL CONTRIBUTION	35
6. Study 1. Evaluation of Neutrophil-to-lymphocyte, Platelet-to-lymphocyte, and Lymphocyte-to-monocyte Ratios in Patients with Klatskin Tumors	37
6.1. Introduction	37
6.2. Working hypothesis and aim	38
6.3. Materials and methods	38
6.4. Results	40
6.5. Discussions	44
6.6. Conclusions	46
7. Study 2. Klatskin Tumor: A Survival Analysis According to Tumor Characteristics and Inflammatory Ratios	49
7.1. Introduction	49
7.2. Working hypothesis and aim	51
7.3. Materials and methods	51
7.4. Results	52

7.5. Discussions	58
7.6. Conclusions	61
8. Study 3. Inflammatory Ratios as Predictors for Tumor Invasiveness, Metastasis, Resectability and Early Postoperative Evolution in Gastric Cancer	63
8.1. Introduction	63
8.2. Working hypothesis and aim	64
8.3. Materials and methods	64
8.4. Results	66
8.5. Discussions	71
8.6. Conclusions	75
9. Study 4. Inflammatory Ratios as Survival Prognostic Factors in Resectable Gastric Adenocarcinoma	77
9.1. Introduction	77
9.2. Working hypothesis and aim	79
9.3. Materials and methods	79
9.4. Results	80
9.5. Discussions	86
9.6. Conclusions	88
10. Study 5. Chitotriosidase and Neopterin as Two Novel Potential Biomarkers for Advanced Stage and Survival Prediction in Gastric Cancer—A Pilot Study	89
10.1. Introduction	89
10.2. Working hypothesis and aim	90
10.3. Materials and methods	90
10.4. Results	92
10.5. Discussions	95
10.6. Conclusions	98
11. Study 6. Chitotriosidase and Neopterin as Potential Biomarkers for the Evaluation of Complicated Cholecystitis—A Pilot Study	99
11.1. Introduction	99
11.2. Working hypothesis and aim	99
11.3. Materials and methods	100
11.4. Results	102
11.5. Discussions	106
11.6. Conclusions	109

12. General Conclusions	111
13. Originality and innovative contribution to the field of our research	113
REFERENCES	115

Keywords: inflammation biomarkers, inflammatory ratios, chitotriosidase, neopterin, gastric neoplasm, Klatskin tumor, gallstones, complications, prognosis, postoperative evolution, survival, COX regressions , ROC curves.

INTRODUCTION

Despite the evolution and progress of surgery, the prognosis may continue to be reserved especially for neoplasms or for complicated surgical cases. Current staging and prognostic assessment methods are sometimes expensive or invasive. In this doctoral thesis, biomarkers of inflammation (cheap and easily accessible) were analyzed for the prognostic modeling of the patient's postoperative evolution, both in the case of major classical interventions and in the case of laparoscopic procedures, both in malignant and benign pathology. Along with the inflammatory ratios that can be obtained with the help of the routine blood count at the presentation of the subjects, two other less known biomarkers were analyzed: chitotriosidase and neopterin.

The involvement of the inflammatory response is one of the first and main ways of the body's reaction to aggression. The answer will be proportional to the nature and severity of the condition. The possible connection between inflammation and cancer was suggested 150 years ago by Rudolf Virchow who observed a leukocyte infiltration of breast tumors. Among the inflammatory markers that are common and easy to investigate, without additional costs, are the inflammatory ratios resulting from the division of the absolute values of the peripheral blood cells. These biomarkers are represented by: NLR (the ratio of neutrophils to lymphocytes), LMR (ratio of lymphocytes to monocytes), PLR (ratio of platelets to lymphocytes) and SII (systemic inflammation index) which are calculated by dividing the product of platelets and neutrophils to the number of lymphocytes. Inflammatory ratios have been studied as prognostic factors in multiple tumors such as breast cancer, prostate cancer, gastroesophageal cancer, hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, lung neoplasia, ovarian cancer, and nasopharyngeal cancer. The association of inflammatory ratios with the diagnosis of neoplasia and the aggressiveness of the tumor is supported by multiple studies. Some authors also developed prognostic models starting from these values, thus increases in inflammatory ratios were associated with a poor prognosis.

Neopterin is part of the pteridine family and is a product of GTP (guanosine triphosphate) catabolism, being synthesized as a result of the activation of monocytes and macrophages following stimulation with gamma interferon, a cytokine with a pro-inflammatory role. If there are increased concentrations of neopterin in the blood or urine, they may reflect an endogenous release of gamma interferon with the activation of cellular immunity. In the literature, there are some evidences that suggest higher neopterin value for cancer subjects. For acute surgical situations, neopterin was shown to have elevated values compared to controls without pathology.

Chitotriosidase is part of the family of enzymes called chitinases. Its main role is to defend the body against pathogens that have a chitinous coating as part of the cell wall. It is the first chitinolytic enzyme discovered in humans, being encoded by the

CHIT1 gene. Chitotriosidase has been evaluated as a biomarker of macrophage activation in type I diabetes with complications, ankylosing spondylitis, infectious diseases such as brucellosis, but also in neoplastic pathology such as lung, gastric, breast or prostate cancer. For acute surgical situations, chitotriosidase provided relevant results for diagnosis and assessment of the severity of the disease.

PERSONAL CONTRIBUTION

The doctoral research resulted in the writing and publication of six ISI-indexed scientific articles, along with presentations at national conferences and congresses (3 poster presentations at the "Iuliu Hațieganu" Annual Meeting, Cluj-Napoca, in different years, of which two were awarded) and international (poster participation at EAES - European Association for Endoscopic Surgery, Krakow, Poland, June 2022). The results of the published studies are promising, and besides the contributions to the progress of science and the intrinsic value, they will be able to represent starting points for new research. These studies will be presented further in the summary.

Study 1. Evaluation of Neutrophil-to-lymphocyte, Platelet-to-lymphocyte, and Lymphocyte-to-monocyte Ratios in Patients with Klatskin Tumors

This study represents chapter 6 of the doctoral thesis.

The aim of the first study was to analyze the inflammatory ratios: NLR, PLR and LMR in patients with Klatskin tumors before intervention and in early follow-up, to evaluate their association with tumor prognostic factors and with the optimal procedure (curative or palliative intervention).

Fifty-seven patients with documented hilar tumors were included in the study as eligible after the analysis of sixty-six medical records with a diagnosis of Klatskin cholangiocarcinoma from the IRGH hospital's internal database. For early follow-up, a significant increase in the NLR and a decrease in the LMR were observed for patients with resection, higher Bismuth class (III and IV) and invasion. These variations may suggest a relationship with the evolution and severity of the disease.

Study 2. Klatskin Tumor: A Survival Analysis According to Tumor Characteristics and Inflammatory Ratios

This study represents chapter 7 of the doctoral thesis.

The study aimed to evaluate patients with Klatskin tumor and surgical indication regarding their survival according to the values of inflammatory biomarkers (NLR, PLR, LMR, and SII) at admission. The differences regarding the values of the inflammatory ratios between the group of patients with surgical resection and the

patients with unresectable tumors who had only a palliative surgical approach were also evaluated.

Seventy-two patients with Klatskin tumor and surgical indication were considered for the evaluation. Thirty patients representing 41.66% had a palliative approach, without resection of the tumor mass; the other forty-two patients (58.33%) had curative surgical resection. Elevated values of the inflammatory biomarkers at patient admission were associated with limited surgical possibilities and reduced survival. HR (Hazard Ratio) increases significantly with increased values of NLR, PLR and SII at presentation. According to the multivariate model, LMR does not significantly influence the survival.

Study 3. Inflammatory Ratios as Predictors for Tumor Invasiveness, Metastasis, Resectability and Early Postoperative Evolution in Gastric Cancer

This study represents chapter 8 of the doctoral thesis.

The study aimed to evaluate inflammatory biomarkers such as NLR, PLR, LMR, SII and their association with already proven prognostic factors, such as tumor stage (T stage), tumor invasion in one or more organs, the presence and number of metastases (M) in gastric cancer. Secondly, the study evaluated the association with another important prognostic factor - the appropriate treatment: curative or palliative intervention. Thirdly, we tested the association with postoperative surgical complications and death during hospitalization period, the inflammatory ratios were also evaluated on the 4th or 5th postoperative day.

For this study, was build a retrospective cohort (January 1, 2016 – December 31, 2019) of 657 patients with gastric cancer from the surgery department of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor", Cluj-Napoca. A prognostic potential was observed for NLR, PLR, LMR and SII in patients with gastric cancer before surgery and for early follow-up. Higher NLR, PLR and SII values, respectively lower values for LMR at admission, were associated with the characteristics of a more aggressive tumor extension. On the 4th or 5th postoperative day, higher values for NLR, PLR and SII, respectively lower LMR, were associated with surgical complications and poor prognosis during hospitalization. Patients with higher NLR, PLR and SII values or lower LMR should benefit from more attention in the postoperative period.

Study 4. Inflammatory Ratios as Survival Prognostic Factors in Resectable Gastric Adenocarcinoma

This study represents chapter 9 of the doctoral thesis.

The study evaluated the prognostic value of the inflammatory biomarkers at admission (NLR, PLR, LMR and SII) in resectable gastric adenocarcinoma regarding survival.

Five hundred forty-nine patients with curative intent surgery (for histologically confirmed gastric adenocarcinoma), with total or subtotal gastrectomy, were enrolled in the study. In resectable gastric adenocarcinoma, higher values of NLR before

surgery proved to be independent prognostic factor for reduced overall survival. In the multivariate analysis, the other inflammatory ratios: PLR, LMR and SII did not reach significance.

Study 5. Chitotriosidase and Neopterin as Two Novel Potential Biomarkers for Advanced Stage and Survival Prediction in Gastric Cancer—A Pilot Study

This study represents the 10th chapter of the doctoral thesis.

The study aimed to evaluate two less known molecular biomarkers, namely chitotriosidase and neopterin in gastric cancer to verify the association of preoperative values with tumor aggressiveness (TNM staging elements) and prognosis. The hypothesis of the study was that increased neopterin and chitotriosidase levels might be associated with loco-regionally advanced tumors and reduced survival.

Thirty-nine patients were included in the study, of which 28 patients benefited from gastrectomy (17 with subtotal gastrectomy respectively 11 total gastrectomy) and 11 patients had palliative surgical interventions. Neopterin revealed no significant changes in the group with gastric cancer in a more advanced stage or with a reserved prognosis. Contrary to existing data, lower neopterin values were associated with the presence of metastases, more advanced T stage, and reduced survival (but without statistical significance). Regarding chitotriosidase activity, this was also, without reaching statistical significance, lower in the group with palliative interventions. The values were significantly higher in the groups with reduced survival and according to the multivariate model, it was significantly associated with a reserved prognosis. To evaluate the prognosis in gastric adenocarcinoma, chitotriosidase has potential utility. However, studies on larger samples are needed for confirmation.

Study 6. Chitotriosidase and Neopterin as Potential Biomarkers for the Evaluation of Complicated Cholecystitis—A Pilot Study

This study represents the 11th chapter of the doctoral thesis.

The study focused on chitotriosidase and neopterin, evaluating this biological markers in cholecystitis, based on the associated inflammatory response. Therefore, we aimed to evaluate the differences in chitotriosidase activity and neopterin levels preoperatively and postoperatively for complicated cholecystitis vs. the chronic, uncomplicated cases. The relationship between the biomarker levels at patient presentation and the need for additional maneuvers during the surgical approach, which would increase the invasiveness and duration of the intervention, was evaluated. The relevance of the values at presentation for the total duration of hospitalization and the postoperative hospitalization period was also investigated.

Fifty-one patients were included in the study and we had two groups according to the severity of cholecystitis: thirty-six subjects with uncomplicated chronic cholecystitis (70.58%) and fifteen complicated cases (29.41%). For the diagnosis of complicated

cholecystitis, circulating neopterin may be a useful molecular biomarker. On the other hand, chitotriosidase activity did not reveal significant differences between patient subgroups. A significant decrease highlighted on the first day after laparoscopic cholecystectomy suggests the prognostic utility of chitotriosidase in the early follow-up. Our findings require validation in larger cohorts before using these biomolecules in the clinical setting.

The originality of this thesis

The doctoral thesis presents a complex evaluation of the inflammation biomarkers, through an important number of studies, on large groups of patients, published in prestigious journals, with impact in the scientific world. The evaluation of inflammatory biomarkers on a wide spectrum of surgical pathologies makes this work unique and important in the prognostic model of the perioperative and postoperative period, but also in the assessment of the invasiveness and resectability of some malignant tumors. The studied biomarkers showed a significant potential in all six studies of the thesis.

The first two studies retrospectively addressed a rare malignant pathology, for which curative interventions are difficult due to the lack of symptoms, late presentation and proximity to vital anatomical structures. The majority of patients, being inoperable, are no longer directed to surgical services, or end up in the surgery service only in case of failure of minimally invasive palliative procedures. The present work brings evidence for a rare malignancy, with a small number of patients and difficult to study. We mention that the two studies are the first in Romania to investigate, in a regional center, the association between inflammatory biomarkers, procedure and survival for Klatskin tumors with surgical indication.

The three studies on inflammatory biomarkers as prognostic factors in gastric cancer included a large number of subjects. Romania, as an Eastern European country, has a high incidence of gastric cancer. Late presentation of patients due to less specific symptoms was also observed. In our studies, this was translated in the important frequency of advanced stages and the need for palliative procedures in a pathology where resection is possible within the therapeutic range. The need for awareness, screening, and methods to evaluate the prognosis can be relevant for this chapter. Like any major classical procedure, the intervention is burdened by the risk of immediate or late complications that can worsen the prognosis. In order to evaluate the connection with possible complications, both the preoperative and the early postoperative ratios were studied. Few studies evaluated the biomarkers of inflammation after the intervention as our study does. A more important value for the occurrence of complications was shown by the follow-up values, which were significantly increased. A distinctive character is provided by the evaluation of a single histological type of gastric tumor pathology. The studies 3 and 4 provide additional evidence for a frequent malignant pathology with an important mortality for the Romanian population.

The studies 5 and 6 evaluated two molecular biomarkers that are less known and still insufficiently studied in the literature: chitotriosidase and neopterin. Study 5 continues the research on gastric cancer pathology. We mention that there are no studies in Romania that evaluate these biomarkers for gastric cancer and, according to our research, there are no studies in the literature that evaluate them together on the same group of patients in gastric adenocarcinoma. The results were important for prognostic.

For the sixth study, neopterin proves useful in the identification of complicated cholecystitis, and chitotriosidase shows prognostic utility in the early follow-up of the patients after laparoscopic cholecystectomy. According to our research, this is the first study in the literature evaluating chitotriosidase and neopterin in patients with complicated cholecystitis with normal hepatic, pancreatic, or renal functions. The results were significant and of direct clinical utility for all the previously mentioned studies.

In order to improve the activity of diagnosis, evaluation, staging and assessment of the prognosis, the usefulness of these biomarkers can be fruitful in the clinical field. The results of these studies can help the clinician and can be a starting point for expanding the spectrum of personalized and patient-oriented medicine.