

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. med. Klaudii Bardowskiej zatytułowanej: „**Biomarkery nawrotu i progresji w rakach pęcherza moczowego nienaciekających mięśniówki - związek z reakcją zapalną i aktywacją układu plazminogenu**”

Przewód doktorski prowadzony jest **w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medycznych.**

Wśród chorób cywilizacyjnych XXI wieku, oprócz cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, otyłości, chorób sercowo-naczyniowych (SN), przewlekłej choroby nerek (PChN) należą także nowotwory. Rak pęcherza moczowego jest w tym gronie jednostką szczególną, a środowisko, w tym szczególnie narażenie na dym tytoniowy, aminy aromatyczne, pestycydy, alkoholizm, przebyta radioterapia z powodu raka prostaty lub trzonu macicy, nadużywanie leków w tym NSAID czy stosowanie cyklofosfamidu sprzyja nowotworzeniu. Oprócz klasycznych czynników ryzyka w grupie chorych z rozpoznaniem rakiem pęcherza moczowego wyodrębniono również szereg czynników związanych ściśle z przewlekłym stanem zapalnym, czy ze sposobem odżywiania. Zmiany w stężeniu markerów związanych istotnie z ryzykiem nowotworu są głównym tematem przedstawionej mi do oceny dysertacji. Poszukiwanie nowych wczesnych markerów określających ryzyko powstawania, progresji nowotworu i odpowiedzi na terapię onkologiczną w tej grupie chorych należy uznać za działanie ze wszech miar cenne i ważne z praktycznego punktu widzenia.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zgodnie z uchwałą **Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego Collegium Maius**, z dnia 26.06.2025r., zatytułowana: „**Biomarkery nawrotu i progresji w rakach pęcherza moczowego nienaciekających**

mięśniówki - związek z reakcją zapalną i aktywacją układu plazminogenu” liczy 57 stron wydruku komputerowego, podzielonego na 11 rozdziałów, w tym wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń, wstęp, zastosowane metody badawcze, wyniki badań, analizę statystyczną, dyskusję, wnioski oraz podsumowanie w postaci streszczenia najważniejszych wyników badawczych w języku polskim i angielskim.

Zbiór dokumentów zawiera także spis 5 rycin i 12 tabel oraz 82 pozycji piśmiennictwa.

W liczącym 8 stron *Wstępie* zawartym w rozdziale 1, Kandydatka w sposób zwięzły aczkolwiek wyczerpujący, opierając się w głównej mierze na piśmiennictwie z ostatnich 10 lat opisała częstość występowania raka pęcherza moczowego (BCa), czynniki sprzyjające nowotworzeniu, rolę cystoskopii oraz cytologii moczu w rozpoznawaniu raka pęcherza moczowego oraz zabiegu TURB, szczególnie w przypadku nienaciekających mięśniówkę nowotworów. Cenne jest opisanie przez Kandydatki w kolejnych podrozdziałach badanych markerów związane z reakcją zapalną, aktywacją układu plazminogenu i stanem odżywienia pacjenta zawierając ścieżkę patofizjologiczną uwzględniającą rolę w karcynogenezie rozpuszczalnego receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu (suPAR), inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), interleukinę 8 (IL-8), apolipoproteinę E (APOE), a także klasyczne wskaźniki, takie jak: stosunek liczebności neutrofilów do limfocytów (NLR), pochodny współczynnik NLR (dNLR), stosunek liczebności monocytów do limfocytów (MLR) i stosunek liczebności płytek krwi do limfocytów (PLR). Ponadto Kandydatka opisała używane skale prognostyczne dla chorób nowotworowych odzwierciedlające stan odżywienia: (zmodyfikowaną) skalę prognostyczną Glasgow ((m)GPS) oraz prognostyczny indeks żywieniowy (PNI). Ponadto Kandydatka przedstawiła dostępne modele prognostyczne w celu oceny prawdopodobieństwa nawrotu i progresji NMIBC. Wstęp dowodzi znajomości Doktorantki na temat aktualnych danych dotyczących raka pęcherza moczowego oraz próby oceny wczesnych wskaźników prognostycznych i monitorujących przebieg choroby i jej terapii.

Cele pracy zostały sformułowane jasno i czytelnie pod postacią 2 celów szczegółowych. Głównymi celami badawczymi było określenie czy markery związane z reakcją zapalną i aktywacją układu plazminogenu mogą być wiarygodnymi wskaźnikami nawrotu lub progresji NMIBC po zabiegu TURB. Dodatkowo Doktorantka postawiła za cel badania sprawdzenie czy badane markery mogą zastąpić lub zmniejszyć częstość

wykonywania zabiegów cystoskopii podczas długotrwałej opieki po terapii. Cele pracy zostały sformułowane poprawnie.

Przedstawione w rozdziale 3 *Materialy i metody badawcze* badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (numer opinii: KB - 692/2019) jako prospektywne jednośrodkowe pilotażowe badanie obserwacyjne. Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej i Dobrej Praktyki Klinicznej. Na udział w projekcie wszyscy pacjenci wrzucili pisemną, świadomą zgodę.

Grupę chorych kwalifikowanych do badania stanowili pacjenci hospitalizowani w Klinice Urologii i Urologii Onkologicznej we Wrocławiu z powodu rozpoznania lub podejrzenia raka pęcherza moczowego nienaciekającego mięśniówki (NMIBC) w latach 2020-2022. Badanie finansowane było z grantu naukowego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Diamantowy Grant”. Badanie zostało zarejestrowane w bazie clinicaltrials.gov, z numerem rejestracyjnym: NCT06235853. Doktorantka określiła kryteria włączenia i wyłączenia oraz w sposób przejrzysty punkty końcowe uwzględniając punkty końcowe co potwierdza dojrzałość warsztatu badawczego Doktorantki – pierwszorzędowe w postaci nawrotu raka pęcherza moczowego (w czasie obserwacji), progresji raka pęcherza moczowego do stadium zaawansowania T2 lub wyżej (w czasie obserwacji) oraz drugorzędowe punkty końcowe: zgonu zależnego od raka pęcherza moczowego, zgonu niezależnego od raka pęcherza moczowego, konieczności wykonania leczenia radykalnego (cystektomii radykalnej) oraz pojawienia się nowotworu urotelialnego w innym miejscu niż pęcherz moczowy (układy zbiorcze nerek, moczowody, cewka moczowa).

Kandydatka poddała screeningowi łącznie 318 chorych z podejrzeniem NMIBC natomiast ostatecznie do badania włączono 223 pacjentów (mediana wieku pacjentów w grupie badanej wynosiła 70 lat; IQR (65 - 76); 162 pacjentów stanowili mężczyźni, a 61 kobiety. BCG-terapia przed rekrutacją do badania zastosowano u 107 pacjentów (45,3%), a chemioterapię dopęcherzową przed włączeniem do badania zastosowano u 42 chorych (18,8%).

Wymagane dane antropometryczne (płeć, wiek, wzrost, masa ciała, BMI) i dane kliniczne (dotyczące chorób współistniejących, farmakoterapii, uwzględniające narażenie na dym

tytoniowy oraz niezbędne do oznaczenia wskaźnika współchorobowości Charlson (CCI) Kandydatka zebrała na podstawie wywiadu i analizy dostępnej dokumentacji medycznej. Ponadto Doktorantka poddała analizie wyniki badań histopatologicznych uzyskanych po przeprowadzeniu zabiegów endoskopowych TURB u wszystkich pacjentów.

Od pacjentów włączonych do badania zebrano dane antropometryczne (płeć, wiek, wzrost, masa ciała, BMI) i dane kliniczne (dotyczące chorób współistniejących, farmakoterapii, uwzględniające nikotynizm oraz niezbędne do oznaczenia wskaźnika współchorobowości Charlson (CCI)). Pacjentom pobrano krew i mocz w celu oznaczenia podstawowych parametrów (morfologia 5-DIFF, CRP, albumina) oraz badanych biomarkerów: suPAR, PAI-1, IL-8 (oznaczenie z krwi) oraz APOE, VEGF, IL-8 (oznaczenie z moczu).

Niedosyt może budzić jedynie brak grupy kontrolnej, referencyjnej względem płci i wieku.

Od każdego pacjenta zakwalifikowanego do badania pobierano próbki krwi i moczu. Materiał każdorazowo dostarczany był do Laboratorium Specjalistycznego Katedry i Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej we Wrocławiu. Wszystkie oznaczenia zostały przeprowadzone metodą ELISA za pomocą zestawów firmy R&D Systems oraz Thermo Fisher Scientific. Do oznaczenia ilościowego metodą ELISA: suPAR, PAI-1, IL-8 we krwi oraz VEGF, APOE, IL-8 w moczu zostały użyte: Human uPAR Quantikine ELISA Kit DUP00, Human Serpin E1/PAI-1 Quantikine ELISA Kit DSE100, Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit D8000C, Human VEGF Quantikine ELISA Kit DVE00, Apolipoprotein E Human ELISA Kit EHAPOE. W przypadku oznaczania stężeń IL-8 konieczne było 10-krotne rozcieńczenie próbek krwi i moczu. Stężenia markerów w moczu zostały znormalizowane względem stężenia kreatyniny w próbce.

Kandydatka podzieliła grupę badawczą na dwie podgrupy w zależności od wyniku uzyskanego podczas pierwszej kontroli po trzech miesiącach. Grupę 1 (n=92) stanowili pacjenci, u których nie stwierdzono nowotworu (brak nieprawidłowości stwierdzonych w badaniu cystoskopowym lub brak nowotworu w badaniu histopatologicznym materiału z kolejnego zabiegu TURB), natomiast grupę 2 (n=131) stanowili chorzy, u których doszło do nawrotu lub progresji nowotworu do MIBC. Średni czas od przeprowadzenia zabiegu TURB do wykonania kontrolnego badania wyniósł 97 dni.

Wszystkie obliczenia przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego Statistica 13.2 StatSoft Inc. Polska. Zgodność z rozkładem normalnym sprawdzano przy użyciu testów normalności W Shapiro-Wilka i w zależności od typu rozkładu były prezentowane jako wartość średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD) lub mediana i zakres międzykwartylowy (IQR). Analiza tabel dwudzielczych wykonana została z zastosowaniem testu Fishera, a analiza tabel wielodzielczych z wykorzystaniem testu Chi-kwadrat. Istotność różnic wartości zmiennych ciągłych pomiędzy dwoma grupami oceniana była testem t-Studenta dla zmiennych o rozkładzie normalnym lub testem U Mann-Whitney w przypadku rozkładu nie-normalnego. Analiza wartości predykcyjnej badanych biomarkerów została przeprowadzona przy użyciu analizy krzywych ROC. Asocjacje pomiędzy danymi ciągłymi zostały zbadane z wykorzystaniem współczynnika korelacji rang Spearmana ze względu na dominujący rozkład nie-normalny danych. Analiza statystyczna została przeprowadzona poprawnie.

Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie przez Doktorantkę nowych analiz statystycznych z wykorzystaniem modeli uczenia maszynowego (ML). Wykonano optymalizację hiperparametryczną algorytmów dla modeli ML: Random Forest, Support Vector Machine (SVM), Naïve Bayes, K-nearest Neighbours (KNN) i MLP, AdaBoost, XGBoost oraz LightGBM.

Doktorantka przedstawiła *Wyniki* pracy na 14 stronach, zawierając je w 12 tabelach i 5 rycinach. Doktorantka po 3 miesięcznej obserwacji od zabiegu TURB nie stwierdziła u 92 pacjentów nowotworu (Grupa 1), natomiast u 131 pacjentów zaobserwowała nawrót lub progresję (Grupa 2). Kandydatka nie wykazała istotnych różnic klinicznych pomiędzy grupami. Natomiast w Grupie 2 Doktorantka stwierdziła wyższe stężenia IL-8 we krwi, suPAR oraz VEGF i APOE w moczu. Stężenie IL-8 we krwi i VEGF w moczu osiągnęły najwyższą wartość prognostyczną dla nawrotu lub progresji nowotworu. Cenne okazało się użycie przez Doktorantkę modeli uczenia maszynowego (ML), utworzonych ze zmiennych w postaci: stężenia badanych markerów, wieku pacjentów, BCG-terapii oraz punktów ryzyka nawrotu i progresji modelu EORTC. W modelu stwierdzono wysoką wartość prognostyczną. Żaden z markerów związanych ze stanem odżywienia nie wykazał wartości predykcyjnej dla punktów końcowych badania. NLR, dNLR oraz MLR zwiększyły wartość prognostyczną modelu Europejskiej Organizacji Badań i Leczenia Raka (EORTC) w zakresie nawrotu i progresji.

Kandydatka wykazując się umiejętnością dyskusji otrzymanych wyników, w sposób dojrzały przeprowadziła omówienie wyników w zakresie dostępnego piśmiennictwa w tej tematyce podkreślając brak dostatecznej ilości doniesień literaturowych, do których można by odnieść uzyskane wyniki. Spośród markerów związanych z reakcją zapalną, aktywacją plazminogenu oraz stanem odżywienia nie zidentyfikowano żadnego pojedynczego parametru o wiarygodnej wartości prognostycznej w badanym kontekście.

Niezwykle cenną obserwacją jest stwierdzenie przez Doktorantkę, że możliwości wpływu BCG-terapii na obniżenie APOE i VEGF, które wykazują działanie prokancerogenne, co potwierdzałoby korzystny efekt wlewek BCG w leczeniu pacjentów z NMIBC. Autorka podkreśliła, że zgodnie z dostępną literaturą, brak jest doniesień, które porównywałyby stężenie badanych markerów związanych z reakcją zapalną i aktywacją układu plazminogenu w zależności od zastosowania BCG-terapii. Przedstawienie rzetelnych danych przez Kandydatkę w grupie pacjentów, którzy otrzymali BCG-terapię i fakt umiejętności krytycznej analizy, w tym braku danych dotyczących szczepienia przeciw gruźlicy w badanej grupie pacjentów oraz stwierdzenie wynikającego z tego faktu ograniczenia możliwości formułowania dalszych hipotez wyjaśniających zaobserwowane różnice pomiędzy badanymi podgrupami budzi szacunek dla Doktorantki.

Natomiast stworzenie aplikacji wykorzystującej model zawierający panel 6 markerów związanych z reakcją zapalną i aktywacją układu plazminogenu składających się z PAI-1, suPAR, IL-8 oznaczonych we krwi oraz VEGF, APOE i IL-8 oznaczonych w moczu w połączeniu z modelem prognostycznym EORTC mogący prognozować nawrót lub progresję NMIBC po zabiegu TURB mógłby być istotnym wkładem naukowym Kandydatki.

Doktorantka zwracając uwagę na ograniczenia badania w rozdziale dotyczącym krytycznej analizy materiału i metodyki wynikające z ograniczonej liczebności grupy badanej dotyczących danych z jednego ośrodka oraz konieczność wydłużenia czasu obserwacji wykazuje dojrzałość młodego naukowca umiejącego w sposób krytyczny podejść do własnych procesów badawczych i zasługuje na uznanie.

Praca doktorska lek. med. Klaudii Bardowskiej ma bardzo staranną szatę edycyjną, jest napisana czytelnym językiem. Opisy tabel i rycin ułatwiają orientację w analizowanych wynikach. Ułatwieniem jest zamieszczenie wykazu skrótów, które zostały zamieszczone na stronach 6-8. Zestawienie piśmiennictwa i cytacje są poprawne.

Pracę kończy 5 starannie przedstawionych wniosków, podsumowujących pracę i odpowiadających na postawione cele pracy. Wnioski prezentowane w cyklu prac odpowiadają na postawione tezy wskazując na istotną rolę panelu 6 markerów związanych z reakcją zapalną i aktywacją układu plazminogenu składających się z PAI-1, suPAR, IL-8 oznaczonych we krwi oraz VEGF, APOE i IL-8 oznaczonych w moczu w połączeniu z modelem prognostycznym EORTC mogą prognozować nawrót lub progresję NMIBC po zabiegu TURB. Pojedyncze wskaźniki mają niewystarczającą wartość predykcyjną w przewidywaniu nawrotu lub progresji w tej grupie chorych. Natomiast wśród markerów związanych z reakcją zapalną i stanem odżywienia nie zidentyfikowano żadnego parametru o wiarygodnej wartości prognostycznej w badanym kontekście. Wyżej wymienione wskaźniki nie pozwalają na zastąpienie nimi lub zmniejszenie częstości wykonywania cystoskopii podczas obserwacji u pacjentów po leczeniu NMIBC co Kandydatka ujęła w jasno sformułowanych wnioskach.

Szczególnie wart jest podkreślenia fakt opublikowania wyników w 2 artykułach o autorstwie zbiorowym, w których Doktorantka jest pierwszym autorem w obydwóch publikacjach.

Świadczy to o przemyślanym warsztacie badawczym Kandydatki z umiejętnością upowszechniania uzyskanych wyników w czasopismach o uznanym wpływie ważności:

1. Evaluation of six novel biomarkers for predicting recurrence of non-muscle invasive bladder cancer after endoscopic resection- a prospective observational study.

Bardowska K, Krajewski W, Kołodziej A, Kościelska-Kasprzak K, Bartoszek D, Żabińska M, Chorbińska J, Kubacki F, Królicki T, Krajewska M, Szydełko T, Kamińska D. - World J Urol. 2025 (IF-2.9; MEIN- 100 pkt) oraz

2. Preoperative systemic inflammatory biomarkers can improve recurrence prediction of non-muscle invasive bladder cancer after endoscopic resection - a prospective observational study.

Bardowska K, Krajewski W, Kołodziej A, Kościelska-Kasprzak K, Bartoszek D, Żabińska M, Chorbińska J, Królicki T, Krajewska M, Szydełko T, Kamińska D. - Contemp Oncol (Pozn). 2025 (IF-1.3; MEIN- 70 pkt).

Z roli recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na konieczność przeprowadzania dalszych prospektywnych analiz z uwzględnieniem porównania powtarzalnych badań w długofalowej obserwacji.

Wniosek końcowy

Wielce Szanowny Przewodniczący Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego Collegium Maius,

Rozprawa doktorska lek. med. Klaudii Bardowskiej jest przykładem kompleksowego, dobrze zaplanowanego badania klinicznego, o ważnych implikacjach praktycznych dotyczących wczesnego rozpoznawania i monitorowania terapii onkologicznej raka pęcherza moczowego. Wnioski wynikające z pracy powinny utwierdzić w przekonaniu wszystkich lekarzy odpowiedzialnych za leczenie chorych z rozpoznanym rakiem pęcherza o konieczności stworzenia ujednoliconych rekomendacji dotyczących wczesnego wykrywania chorób nowotworowych i terapii onkologicznej co w konsekwencji mogłoby przyczynić się do poprawy jakości życia i zmniejszenia śmiertelności w tej populacji pacjentów. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wpisują się w cykl obserwacji poczynionych w różnych ośrodkach nefrologicznych na świecie, przyczyniając się do tworzenia całościowego obrazu wczesnej diagnostyki i terapii raka pęcherza moczowego szczególnie w fazie wczesnej nienaciekającego mięśniówki i konieczność dalszych badań prospektywnych. Mając powyższe na uwadze, wnoszę o dopuszczenie lek. med. Klaudii Bardowskiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim, gdyż przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie kryteria określone w art. 187 Ustawy 1-2 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668).

Ze względu na jakość i kompleksowość przeprowadzonych badań, niezmierną staranność samej pracy jak i uzyskane wyniki – wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. n.med. Katarzyna Krzanowska

Katedra i Klinika Nefrologii i Transplantologii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego
Collegium Medicum w Krakowie

Katarzyna Krzanowska

Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Krzanowska
Specjalista chorób wewnętrznych
NEFROLOG
TRANSPLANTOLOG
KLINICZNY
8179888