



LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

Viktors Kozirovskis

**Embriogēzi regulējošā Sonic Hedgehog signālceļa nozīme sīkšūnu plaušu
vēža prognozē un rezistences attīstībā**

Promocijas darbs

zinātnes doktora grāda (Ph.D.) iegūšanai
Medicīnas un veselības zinātnēs

Rīga, 2022

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē un
Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Onkoloģijas klīnikā

Promocijas darba vadītāji :

Dr. habil. med., prof. **Uldis Vikmanis**

Dr. med., prof. **Gunta Purkalne**

Konsultanti:

Aija Linē, *Dr. biol.*, asoc. prof., Latvijas Universitāte, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Recenzenti:

- 1) **Alinta Hegmane**, *Dr. med.*, asoc. prof., Latvijas Universitāte
- 2) **Simona Doniņa**, *Dr. med.* asoc. prof., Rīgas Stradiņa universitāte
- 3) **Gyula Ostoros**, *Dr. med.*, National Korny Institute of TB and Pulmonology

ANOTĀCIJA

Sīkšūnu plaušu vēzis (SŠPV) ir visagresīvākais plaušu vēža paveids, kur ķīmijterapija ļauj ievērojami pagarināt pacienta dzīvi un samazināt slimības simptomus. Daudzos gadījumos ir iespējama pilnas remisijas sasniegšana. Tomēr metastātisku SŠPV uzskata par neizārstējamu slimību, jo praktiski vienmēr audzējs recidivē un kļūst neuzņēmīgs pret specifisko terapiju. Vēža cilmes šūnas var būt atbildīgas par SŠPV recidīvu un rezistences attīstību. Hedgehog signālceļš regulē vairākus ar cilmšūnām un proliferāciju saistītus gēnus, tādejādi veicinot cilmšūnu un audu progenitoro šūnu izdzīvošanu un proliferāciju.

Darba mērķis. Pierādīt, ka klīniskajiem parametriem un Sonic Hedgehog (Shh) embriogēnēzi regulējošā signālceļa aktivitātei ir prognostiska nozīme sīkšūnu plaušu vēža pacientiem, kā arī izvērtēt iespējamo signālceļa saistību ar rezistences veidošanos.

Darba uzdevumi.

1. Izvērtēt klīniskos prognostiskos faktorus un ārstēšanas rezultātus sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā.
2. Izvērtēt iespējamo prognostisko nozīmi ar Shh signālceļu saistīto gēnu aktivitātei attiecībā uz pētījuma SŠPV pacientu dzīvildzi.
3. Izvērtēt Shh signālceļa iespējamo nozīmi rezistences attīstībā, salīdzinot ar Sonic Hedgehog signālceļu saistīto gēnu ekspresiju SŠPV biopsiju paraugos pirms terapijas un recidīva laikā.

Materiāli un metodes. Promocijas darbs tika sadalīts trīs daļās atkarībā no pētījuma uzdevuma.

Pirmajā pētījuma daļā retrospektīvi tika analizēti 100 secīgi pirmreizējie SŠPV pacienti, kas bija nozīmēti specifiskai terapijai laika posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada decembrim. Tika apkopoti pacientu klīniskie un demogrāfiskie dati un veikta korelāciju analīze to ietekmei uz kopējo dzīvildzi (OS).

Otrajā, prospektīvajā, pētījuma daļā laikā posmā no 2010. gada oktobra līdz 2014. gada janvārim rekrutēja un analizēja 12 SŠPV pacientus ar III un IV stadijas slimību. Pacienti tika iedalīti īsas (OS ≤ 9,6 mēneši) un garas (OS > 9,6 mēneši) dzīvildzes grupās un tajās tika salīdzināta mRNS ekspresija katram Shh signālceļa asociētajam gēnam (*Gli1*, *SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BM11*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) pirmsterapijas audzēja biopsiju paraugos.

Trešajā pētījuma daļā tika analizēti 3 SŠPV slimnieki no prospektīvās pētījuma daļas, kam tika iegūti audzēja biopsiju paraugi arī recidīva laikā. mRNS līmeni katram Shh signālceļa saistītajam gēnam salīdzināja viena un tā paša pacienta pirmsterapijas un recidivējoša audzēja biopsiju paraugos, kā arī salīdzināja katra Shh signālceļa saistītā gēna ekspresijas līmeņa vidējās vērtības visos pirmsterapijas un recidīva paraugos.

Darba rezultāti. Pētījumā apskatītajiem 100 sīkšūnu plaušu vēža pacientiem kopējās dzīvildzes rādītāji bija 10,2 mēneši lokalizētai stadijai un 7,1 mēnesis izplatītai stadijai. 5 gadu dzīvildze attiecīgi bija 2,6% un 0%. Daudzfaktoru Cox regresijas analīzē neatkarīgie prognostiskie rādītāji bija sieviešu dzimums (HR 2,4601; 95% CI 1,13 – 5,31; p=0,0226) un

pacienta ECOG 0-1 (HR 2,1437; 95% CI 1,35 – 3,41; p=0,0014). Viena faktora Cox regresijas analizē labvēlīgs prognostisks rādītājs bija lokalizēta slimības stadija (HR 1,8618; 95% CI 1,21 – 2,86; p=0,0049).

Shh signālceļa galvenā mērķa gēna un atslēgas transkripcijas faktora *Gli1* statistiski ticami augstākas ekspresijas vidējās vērtības tika konstatētas garās dzīvildzes SŠPV pacientiem pirmsterapijas biopsijas paraugos, salīdzinot ar īsās dzīvildzes grupu (p = 0,0196, 95% CI: 0,000016 to 0,000147). Pārējo Hedgehog signālceļa asociēto gēnu (*SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) ekspresijas līmenis starp grupām statistiski ticami neatšķīrās.

2,9 reizes zemāka Hedgehog signālceļa aktivitātes galvenā marķiera *Gli1* ekspresija tika novērota recidivējošas slimības biopsijas paraugā (p = 0,0529), kā arī statistiski nenozīmīgi samazināts Shh signālceļa 6 saistīto gēnu (*PTCH1*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1* un *ZEB1*) ekspresijas līmenis tika novērots recidīva laikā. Salīdzinot ar pirmsterapijas paraugu, pāra biopsijās šo gēnu ekspresija attiecīgi bija 2,6; 2,2; 1,9; 1,8; 1,2 un 1,1 reizes zemāka. 1,8 reizes zemāka ekspresija tika novērota recidīva biopsijas paraugā Gli aktivatoram *SMO* bez statistiski nozīmīgas atšķirības. Vienīgi Hedgehog signālceļa inhibitors *SUFU* un divi Shh inducējamie gēni – *BCL2* un *BMI1* uzrādīja attiecīgi 0,8; 0,9 un 0,8 reizes augstāku, bet statistiski nenozīmīgu, ekspresiju pie recidīva.

Secinājumi.

1. Būtiskākie klīniskie prognostiskie faktori, kas statistiski ticami uzlaboja dzīvildzi, bija pacientu sieviešu dzimums, labs vispārējais stāvoklis un lokalizēta slimības stadija. Ārstēšanas rezultāti analizētājiem 100 sīkšūnu plaušu vēža pacientiem bija sliktāki, salīdzinot ar publicētiem literatūras datiem.
2. Statistiski ticami augstāka Sonic Hedgehog signālceļa galvenā mērķa gēna un atslēgas transkripcijas faktora *Gli1* ekspresija tika konstatēta garās dzīvildzes (OS > 9,6 mēneši) sīkšūnu plaušu vēža pacientiem pirmsterapijas biopsijas paraugos, salīdzinot ar īsās dzīvildzes grupu.
3. Hedgehog signālceļa komponentu un ar to saistīto gēnu ekspresijas tiešs salīdzinājums viena sīkšūnu plaušu vēža pacienta pāra biopsijās pirms terapijas un recidivējošā audzējā liecina par Hedgehog signālceļa lielākās komponentu daļas aktivitātes samazinājumu recidivējošā sīkšūnu plaušu vēža audos, kaut starpība nerasniedza statistiski nozīmīgu vērtību. Tādējādi Hedgehog signālceļa aktivācija varētu nebūt universāls mehānisms sīkšūnu plaušu vēža rezistences attīstībai.

Atslēgas vārdi. recidivējošs SŠPV; vēža cilmes šūnas; Sonic Hedgehog signālceļš; gēnu ekspresija; pāra biopsijas

ABSTRACT

Small cell lung cancer (SCLC) is the most aggressive type of lung cancer where chemotherapy allows to prolong the life of the patient and reduce the symptoms of the disease significantly. Complete remission is possible in many cases. However, metastatic SCLC is considered to be an incurable disease because the tumor almost always recurs and becomes resistant to the specific treatment. Cancer stem cells may be responsible for the recurrence of SCLC and development of resistance. The Hedgehog signalling pathway regulates several genes associated with stem cells and proliferation, thus promoting the survival and proliferation of stem cells and tissue progenitor cells.

Research Objective. To demonstrate that clinical parameters and the activity of the Sonic Hedgehog (Shh) embryonic signalling pathway are of prognostic relevance in small cell lung cancer patients and to evaluate the possible association of the signalling pathway with the development of resistance.

Research Tasks.

1. To evaluate the prognostic clinical factors and treatment results in small cell lung cancer patients at the Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital.
2. To evaluate the potential prognostic role of the activity of the Shh-associated genes on the survival of the SCLC patients in the study.
3. To evaluate the potential role of the Shh pathway in the development of resistance by comparing the expression of the genes associated with the Sonic Hedgehog signalling pathway in matched pre-treatment and relapsed SCLC biopsies.

Materials and Methods. Based on the research task, the Doctoral Thesis was divided into three parts.

The first part of the research included a retrospective analysis of 100 consecutive primary SCLC patients assigned to a specific treatment between August 2006 and December 2009. The clinical and demographic data of the patients were collected, and a correlation analysis was carried out to establish their impact on the overall survival (OS).

In the second, the prospective, part of the research, 12 stage III and IV SCLC patients were recruited and analysed between October 2010 and January 2014. The patients were divided into short-term (OS \leq 9.6 months) and long-term (OS $>$ 9.6 months) survival groups, and the mRNA expression for each Shh-associated gene (*Gli1*, *SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BM11*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) in the pre-treatment tumor biopsy samples was compared between the groups.

The third part of the research included analysis of 3 SCLC patients from the prospective part of the study from whom tumour biopsy samples were also obtained during the relapse. The mRNA levels for each Shh-associated gene were compared between the pre-treatment and relapsed tumour biopsies from the same patient, and comparisons were also made between the mean levels of expression for each Shh-associated gene in all pre-treatment and relapsed samples.

Study Results. The overall survival in the 100 SCLC patients in the study was 10.2 months for the limited stage and 7.1 months for the extensive stage. The 5-year survival rates were 2.6% and 0%, respectively. The independent prognostic factors in the multivariable Cox regression analysis were female sex (HR 2.4601; 95% CI 1.13-5.31; $p=0.0226$) and patient ECOG 0-1 (HR 2.1437; 95% CI 1.35-3.41; $p=0.0014$). In the univariate Cox regression analysis, limited-stage disease was a favourable prognostic factor (HR 1.8618; 95% CI 1.21-2.86; $p=0.0049$).

The mean expression values for the major Shh pathway target gene and the key transcription factor *Gli1* were statistically significantly higher in the pre-treatment biopsy samples of the long-term survivors, compared with the short-term group ($p=0.0196$, 95% CI: 0.000016 to 0.000147). The expression levels for the other Hedgehog-associated genes (*SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMII*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) were not statistically significantly different between the groups.

2.9 times lower mean expression of the key Hedgehog pathway activity marker *Gli1* was observed in the relapsed samples ($p = 0.0529$), and a reduced expression of 6 Shh-associated genes (*PTCH1*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1* and *ZEB1*) was observed during relapse, although statistically insignificant. Compared to the pre-treatment sample, the expression of these genes in the matched biopsies was 2.6, 2.2, 1.9, 1.8, 1.2 and 1.1 times lower, respectively. A 1.8 times lower expression was observed in the relapsed biopsy sample for the Gli activator *SMO*, with no statistically significant difference. Only the Hedgehog pathway inhibitor *SUFU* and two Shh inducible genes, the *BCL2* and *BMII*, showed a 0.8, 0.9 and 0.8 times higher, but statistically insignificant, expression at relapse, respectively.

Conclusions.

1. Female sex, good performance status and limited-stage disease were the most significant prognostic clinical factors statistically significantly associated with improved survival. Based on a comparison with the published literature data, the treatment results were worse in the 100 analysed small cell lung cancer patients.
2. A significantly higher expression of the major Shh pathway target gene and the key transcription factor *Gli1* was found in the pre-treatment biopsy samples from the long-term (OS > 9.6 months) survivors, compared with the short-term survival group.
3. A direct comparison of the Hedgehog signalling pathway components and the associated gene expression between the matched pre-treatment and relapsed tumour biopsies from the same small cell lung cancer patient suggest a decreased activity of a majority of the Hedgehog pathway components in relapsed small cell lung cancer tissue, although the difference did not reach statistical significance. Thus, activation of the Hedgehog pathway might not be a universal mechanism for the development of resistance in small cell lung cancer.

Keywords: relapsed SCLC; cancer stem cells; Shh signalling pathway; gene expression; matched biopsies

SATURS

Anotācija	3
Abstract	5
Darbā izmantotie apzīmējumi un saīsinājumi	9
Ievads	12
Problēmas aktualitāte	13
Darba mērķis	14
Darba uzdevumi	14
Darba hipotēze	14
Pētījuma zinātniskā novitāte	14
Sadarbības partneri un materiāli tehniskais nodrošinājums	15
Darba struktūra un autora personīgais ieguldījums	15
Ētiskie aspekti	15
1. Literatūras apskats	16
1.1. Sīkšūnu plaušu vēža epidemioloģija	16
1.2. Sīkšūnu plaušu vēža etioloģija un onkoģenēze	19
1.3. Sīkšūnu plaušu vēža molekulāri ģenētiskā klasifikācija	21
1.4. Sīkšūnu plaušu vēža ārstēšana	22
1.4.1. Lokalizēta sīkšūnu plaušu vēža ārstēšana	22
1.4.2. Izplatīta sīkšūnu plaušu vēža ārstēšana	24
1.4.3. Recidivējoša sīkšūnu plaušu vēža ārstēšana	24
1.5. Audzēju rezistence uz specifisko terapiju un vēža cilmes šūnas	25
1.5.1 Audzēja šūnu rezistences attīstības matemātiskais modelis	25
1.5.2 Rezistences patoģenētiskie mehānismi	26
1.5.3 Audu cilmes šūnas	26
1.5.4 Vēža cilmes šūnu teorija	26
1.5.5 Audu cilmes šūnu un vēža cilmes šūnu „dabiskā” rezistence	28
1.5.6 Audu cilmes šūnu un vēža cilmes šūnu bioķīmiskās un molekulārās rezistences mehānismi	28
1.5.7 Vēža cilmes šūnas kā pamats sīkšūnu plaušu vēža recidīvam un rezistencei	29
1.6. Embriogēzi regulējošā Hedgehog (Hh) signālceļa nozīme sīkšūnu plaušu vēža cilmes šūnu funkcionēšanā un rezistences attīstībā	30
1.6.1 Pārskats par Hh signālceļu	30
1.6.2 Pētījumu dati par Hh signālceļa aktivāciju sīkšūnu plaušu vēža cilmes šūnās	32
1.6.3 Hh signālceļa aktivācijas iespējamie iemesli	34
1.6.4 Hh signālceļa aktivācijas saistība ar rezistenci uz pretvēža terapiju pētījumos ar citiem audzējiem	36
1.6.5 Hh signālceļa saistība ar EMT (epithelial-to-mesenchymal transition), anti-apoptotisku BCL2 (B-cell Lymphoma 2) proteīnu un cilmes šūnu funkcionālo marķieri BMI1	36
2. Materiāls un metodes	39
2.1. Klīnisko prognostisko faktoru un ārstēšanas rezultātu analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiēm Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā	39
2.2. Hedgehog signālceļa asociēto ģēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors	40
2.3. Hedgehog signālceļa saistīto ģēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā	42
3. Rezultāti	43
3.1. Klīnisko prognostisko faktoru analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā	43

3.2. Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors	50
3.3. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā	64
4. Diskusija	78
4.1. Klīnisko prognostisko faktoru analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā	78
4.2. Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors	80
4.3. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā	83
Secinājumi	85
Praktiskās rekomendācijas	86
Publikācijas un ziņojumi par darba tēmu	87
Pateicības	89
Izmantotā literatūra	90
Pielikumi	103
1. pielikums. Ētikas komisijas atļauja	103
2. pielikums. Pacienta informācijas un piekrišanas veidlapas	104
3. pielikums. Galvenās publikācijas	108

DARBĀ IZMANTOTIE APZĪMĒJUMI UN SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Skaidrojums latviski	Skaidrojums angļiski
AJCC	Amerikas Apvienotā vēža komiteja	American Joint Committee of Cancer
95% CI	95% ticamības intervāls	95% Confidence interval
ABC	ATF-saistošā kasete	ATP-binding cassette
ABCB1	ATF-saistošās kasetes B apakšģimenes loceklis 1	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1
ABCC1	ATF-saistošās kasetes C apakšģimenes loceklis 1	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1
ABCG2	ATF-saistošās kasetes G apakšģimenes loceklis 1	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2
AKT	Proteīnkināze B	Protein kinase B (PKB)
ALDH1	Aldehīda dehidrogenāze 1	Aldehyde Dehydrogenase 1
ASCL1 (ASH1)	<i>Achaete-scute</i> homologs 1	Achaete-scute homologue 1
BCL2	B-šūnu limfomas 2 antiapoptotiskais proteīns	B-Cell Lymphoma 2 Apoptosis Regulator
BMI1	BMI1 Protoonkogēns	BMI1 Proto-Oncogene
BP	Blakus populācija	Side population
cAMP	cikliskais 3',5' adenozinmonofosfāts	3',5' cyclic adenosine monophosphate
CAV	Ciklofosfamīds-(doksorubicīns)Adriamicīns-Vinkristīns	Cyclophosphamide-(doxorubicin)Adriamycin-Vincristine
CE	Karboplatīns/Etopozīds	Carboplatin/Etoposide
CEA	Ciklofosfamīds/Etopozīds/(doksorubicīns)Adriamicīns	Cyclophosphamide/Etoposide/(doxorubicin)Adriamycin
CHGA	Hromogranīns A	Chromogranin A
CREBBP	cAMP atbildes elementa saistošā proteīna saistošais proteīns	cAMP-response element binding Binding Protein
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe	Deoxyribonucleic acid
ECOG	Austrumu onkologu sadarbības grupa	Eastern Cooperative Oncology Group
EMT	Epiteliālā-uz-mezenhimālo pāreja	Epithelial-to-mesenchymal transition
EP300	E1A saistošais proteīns P300	E1A Binding Protein P300
ESMO	Eiropas onkologu ķīmijterapietu biedrība	European Society for Medical Oncology
EZH2	Zeste 2 homologa pastiprinātājs	Enhancer of zeste 2
FOXC2	<i>Forkhead box C2</i>	Forkhead Box C2
GLI	Ar gliomu saistītais onkogēns	Glioma-Associated Oncogene
Gli1	Ar gliomu saistītā onkogēna homologs 1	Glioma-Associated Oncogene Homolog 1
Gy	Grejs	Gray
HAT	Histona acetiltransferāze	Histone acetyltransferase
HES	HES saimes pamata spirāles-cilpas-spirāles transkripcijas faktors	HES family (hairy and enhancer of split) Basic Helix-Loop-Helix transcription factor
HEY	HEY saimes pamata spirāles-cilpas-spirāles transkripcijas faktors	HEY family (hairy ears, Y-linked) Basic Helix-Loop-Helix transcription factor
Hh	Hedgehog signālceļš	Hedgehog
Hhip/HHIP	Hedgehog mijiedarbības proteīns	Hedgehog Interacting Protein

HMT	Histona metiltransferāze	Histone methyltransferase
HR	Riska attiecība	Hazard ratio
IKK	Inhibējošās kapa B kināzes	Inhibitory kappa B kinases
LDH	Laktātdehidrogenāze	Lactate Dehydrogenase
MAP3K7	Mitogēna aktivētā proteīnkināze kināze kināze 7	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7
MEK	Mitogēnu aktivētā ekstracelulāro signālu regulētā kināze	Mitogen activated extracellular signal regulated kinase
MHC	Galvenais audu saderības komplekss	Major histocompatibility complex
miRNS/miRNA	MikroRNS	MicroRNA
MLL	Jauktas līnijas leukēmijas histonu metiltransferāze	Mixed-lineage leukemia histone methyltransferase
MRI	Magnētiskās rezonanses izmeklējums	Magnetic resonance imaging
mRNS	Matricas ribonukleīnskābe	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Rapamicīna mērķa receptors zīdītājiem	Mammalian target of rapamycin
MYC jeb BHLHE39	Pamata spirāles-cilpas-spirāles E klases proteīns 39	Class E basic helix-loop-helix protein 39
NCAM	Neirālo šūnu adhēzijas molekula	Neural cell adhesion molecule
NCCN	Nacionālais visaptverošais vēža tīkls	National Comprehensive Cancer Network
NeuroD1	Neironu diferenciācijas faktors 1	Neurogenic differentiation factor 1
NF-kappaβ	Kodola faktors kapa B	Nuclear factor-kappa B
N-MYC jeb BHLHE37	Pamata spirāles-cilpas-spirāles E klases proteīns 37	Class E basic helix-loop-helix protein 37
PCI	Profilaktiska galvas apstarošana	Prophylactic cranial irradiation
PD-1	Programmētās šūnu nāves proteīns 1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmētās šūnu nāves ligands 1	Programmed Cell Death Ligand 1
PE	Cisplatīns/Etopozīds	Cisplatin/Etoposide
PI3K	Fosfatidilinozitola 3 kināze	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIK3CA	PI3K katalītiskā apakšvienība alfa	PI3K Catalytic Subunit Alpha
PĶR/PCR	Polimerāzes ķēdes reakcija	Polymerase chain reaction
POU2F3	POU domēna 2. klases transkripcijas faktors 3	POU Domain Class 2 Transcription Factor 3
POU5F1	POU 5. klases <i>homeobox</i> 1	POU Class 5 Homeobox 1
PROM1 jeb CD133	Prominīns-1	Prominin-1
PSKUS	Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca	Paul Stradins Clinical University Hospital
Ptch/PTCH1	Proteīns salāpīts homologs 1	Protein Patched Homolog 1
PTEN	Fosfatāzes un tensīna homologs	Phosphatase and tensin homolog
PVO	Pasaules Veselības Organizācija	World Health Organization
RAF	RAF saimes onkogēns	RAF (Rapidly accelerated fibrosarcoma) oncogene
RAS	RAS saimes onkogēns	RAS (rat sarcoma viral) oncogene
SALL4	<i>Spalt</i> ģimenes transkripcijas faktors 4	Spalt Like Transcription Factor 4
Shh	Sonic Hedgehog signālceļš	Sonic Hedgehog
siRNA	Mazā interferējošā RNS	Small interfering RNA
SMO	Nogludinātais transmembrānu proteīns	Smoothed transmembrane protein

SNAI1/SNAI2	Cinka pirkstu proteīns SNAI1 un SNAI2	Zinc Finger Protein SNAI1 and SNAI2
SOX2	Dzimumu noteicošā reģiona Y 2 domēna transkripcijas faktors	Sex determining region Y-box 2 Transcription Factor
SŠPV/SCLC	Sīkšūnu plaušu vēzis	Small cell lung cancer
SUFU	Saplūdušā homologa supresors	Suppressor Of Fused Homolog
SVV	Seneca ielejas vīruss	Seneca Valley virus
SYP	Sinaptofizīns	Synaptophysin
TGF-β	Transformējošais augšanas faktors beta	Transforming growth factor-beta
TMB	Audzēja mutāciju slogs	Tumor mutational burden
TNM	Audzēja-limfmezglu-metastāžu	Tumour–Node–Metastasis
Twist1 jeb BHLHa38	Pamata spirāles-cilpas-spirāles A klases proteīns 38	Class A Basic Helix-Loop-Helix Protein 38
YAP1	Jā saistītais proteīns 1	Yes-associated protein 1
ZEB1/ ZEB2	Cinka pirkstu <i>E-box</i> saistošs <i>homeobox</i> 1 un 2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 and 2

IEVADS

Sīkšūnu plaušu vēzis ir visagresīvākais plaušu vēža paveids. Pacientu vidējā dzīvildze bez terapijas vai pielietojot tikai lokālo terapiju (ķirurģiska vai staru terapija) ir no 1 līdz 3 mēnešiem kopš diagnozes brīža. Sīkšūnu plaušu vēža ārstēšanas pamatmetode ir sistēmiskā ķīmijterapija, kas ļauj ievērojami pagarināt pacienta dzīvi un samazināt slimības simptomus. Vidējā dzīvildze pieaug 4 – 5 reizes. Daudzos gadījumos ir iespējama pilnas remisijas sasniegšana. Tomēr metastātisku sīkšūnu plaušu vēzi uzskata par neizārstējamu slimību, jo gandrīz vienmēr audzējs recidivē un kļūst neuzņēmīgs pret specifisko terapiju. Rezistences veidošanās mehānisma izprašana var palīdzēt ārstiem prognozēt terapijas efektivitāti, kā arī radīt jaunus terapeitiskus līdzekļus šī vēža ārstēšanā.

Pēdējos gados aizvien vairāk zinātnisko pierādījumu guvusi tā saucamā vēža cilmsūnu teorija, kas ļauj izskaidrot, kāpēc ļaundabīgiem audzējiem terapijas gaitā attīstās rezistence. Vēža cilmsūnu hipotēzes būtība ir tā, ka audzējā pastāv šūnu hierarhija, kad pašatjaunojošo cilmsūnu neliela populācija izveido visas pārējās audzēja šūnas asimetriskas dalīšanās, proliferācijas un defektīvas diferenciacijas ceļā. Zinātnieki turpina debates vai šīs audzēju iniciējošās šūnas rodas normālo audu cilmsūnu malignas transformācijas rezultātā, vai no augstāk diferencētām audzēja šūnām, kas malignizācijas gaitā ir ieguvušas cilmsūnām līdzīgas īpašības. Neatkarīgi no to izcelsmes, vēža šūnu subpopulācija ar cilmsūnu īpašībām, ieskaitot lēnu dalīšanos un rezistenci uz pretvēža terapiju, var būtiski ietekmēt ārstēšanas rezultātus. Ja ļaundabīgā audzējā ir šūnas, kuras netiek nogalinātas ar standarta ķīmijterapiju un staru terapiju, tieši šīs šūnas ir atbildīgas par audzēja recidīvu un/vai metastāzēm pēc acīmredzami veiksmīgas sākotnējās ārstēšanas. Sīkšūnu plaušu vēzis ir ļaundabīga slimība, kur klīniskā pieredze liecina par vēža cilmsūnu subpopulācijas esamību audzējā. Standarta ķīmijterapija var reducēt audzēja masu ļoti efektīvi un pat inducēt pilnu remisiju lielākajai pacientu daļai. Diemžēl, recidīvs rodas gandrīz vienmēr. Tas liecina, ka noteiktas, uz terapiju nejutīgas šūnas izdzīvo sākotnējās ārstēšanas laikā un turpmāk audzēju atjauno. Turklāt, recidivējošā audzējā lielākā vēža šūnu populācijas daļa iegūst cilmsūnām raksturīgu rezistenci uz pretvēža līdzekļiem. Ņemot vērā, ka audzēja recidīvi pēc panāktas remisijas ir galvenais mirstības cēlonis onkoloģiskiem pacientiem, īpaši aktuāla ir jaunu, tieši vēža cilmes šūnas selektīvi ietekmējošu terapeitisko līdzekļu izstrāde.

Daudz vēl ir jāprecizē par vēža cilmsūnām katrā konkrētā ļaundabīgā slimībā. Tomēr jau tagad ir iegūti dati par embriogēni regulējošo signālceļu nozīmīgumu vēža cilmsūnu funkcionēšanā. Īpaši svarīgi starp tiem ir Notch, Hedgehog un Wnt signālceļi. Hedgehog signālceļš regulē vairākus ar cilmsūnām un proliferāciju saistītus gēnus, tādējādi veicinot cilmsūnu un audu progenitoro šūnu izdzīvošanu un augšanu.

PROBLĒMAS AKTUALITĀTE

Pēdējā laikā literatūrā parādījušies dati par Hedgehog signālceļa saistību ar medikamentu izvadīšanas mehānismiem no audzēja šūnām un multi-zāļu rezistences attīstību (Sims-Mourtada et al., 2007). Vēža cilmšūnām raksturīgā Hedgehog signālceļa paaugstināta aktivitāte tika aprakstīta sīkšūnu plaušu vēža šūnu līnijās un audzēju paraugos (Watkins et al., 2003b). Šī signālceļa ligandu inhibīcija palēnināja sīkšūnu plaušu vēža šūnu līniju un ksenograftu proliferāciju (Pasca di Magliano and Hebrok, 2003). Iegūti dati par Hedgehog sistēmas saistību ar aizkuņģa dziedera vēža (Xu et al., 2009), prostatas vēža (Sanchez et al., 2004), B-šūnu hroniskas limfocitozes (Hegde et al., 2008), nieru šūnu karcinomas (Dormoy et al., 2009) proliferācijas uzturēšanu un apoptozes inhibīciju. Pētījumos ir iegūti arī klīniski pierādījumi par paaugstinātas Hedgehog signālceļa aktivitātes un nelabvēlīgas slimības gaitas korelāciju pie krūts vēža (ten Haaf et al., 2009), barības vada vēža (Yoshikawa et al., 2008) un anālā kanāla vēža (Ajani et al., 2010). Daudzos audzējos Hh signālceļa izmainīta aktivitāte saistīta ar klīniski novēroto rezistenci uz pretvēža terapiju un nelabvēlīgu prognozi. Hh signālceļa paaugstināta aktivitāte bieži tiek konstatēta plaušu audzējos, it īpaši sīkšūnu plaušu vēža šūnās. Vairākos pētījumos ir iegūti dati, ka Hh signālceļš ir nozīmīgs normālo plaušu neiroendokrīno cilmšūnu un atbilstoši sīkšūnu plaušu vēža cilmšūnu funkcionēšanā. Pastāv ierobežojumi Hh signālceļa izpētei *in vitro* modeļos – t. i. sīkšūnu plaušu vēža šūnu līnijās un ksenograftos. Ir maz publicēto datu par Hh signālceļa komponentu aktivitāti gēnu/mRNS līmenī sīkšūnu plaušu vēža šūnās sakarā ar šī audzēja svaigi sasaldēto paraugu pieejamības trūkumu. Pētījumos pārsvarā tiek izmantoti formalīnā fiksēti, parafīnā imbibēti paraugi, kur Hh signālceļa komponentu aktivitāte tiek noteikta semikvantitatīvi proteīnu līmenī ar imūnhistoķīmijas metodi vai retāk mRNS līmenī ar *in situ* hibridizācijas metodi. Respektīvi, pagaidām ir maz zinātniskās informācijas par iespējamām aktivējošām/inaktivējošām mutācijām šī signālceļa gēnos, kas var neizpausties proteīnu līmenī, bet var būt ļoti nozīmīgas klīniski (piemēram, kā aktivējošas EGFR mutācijas ne-sīkšūnu plaušu vēzim). Vēl viens iespējamais cēlonis Hh signālceļa izmainītai aktivitātei varētu būt epigēnētiskie traucējumi un to ietekmējošas izmaiņas citos molekulārajos signālceļos. Molekulāro mehānismu izpēte uzrāda Hh signālceļa ciešu saistību ar multizāļu rezistences gēnu aktivitāti, epiteliālas-uzmezenhimālo pārejas, kā arī anti-apoptotiskiem notikumiem.

Šis projekts ir īpaši aktuāls, jo sniedz informāciju gēnu/mRNS līmenī par līdz šim maz pētītu *in vivo* Hh signālceļa gēnu ekspresiju un dod iespēju to salīdzināt pirmsterapijas un rezistentā sīkšūnu plaušu audzējā. Publicētas informācijas par šāda dizaina pētījumiem pasaules literatūrā pagaidām nav.

DARBA MĒRĶIS

Izvērtēt, vai Sonic Hedgehog signālceļa aktivitātei ir prognostiska nozīme un saistība ar sīkšūnu plaušu vēža rezistences attīstību.

DARBA UZDEVUMI

1. Izvērtēt klīniskos prognostiskos faktorus un ārstēšanas rezultātus sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā.
2. Izvērtēt iespējamo prognostisko nozīmi ar Sonic Hedgehog signālceļu saistīto gēnu aktivitātei attiecībā uz pētījuma sīkšūnu plaušu vēža pacientu dzīvildzi.
3. Izvērtēt Shh signālceļa iespējamo nozīmi rezistences attīstībā, salīdzinot ar Sonic Hedgehog signālceļu saistīto gēnu ekspresiju sīkšūnu plaušu vēža biopsiju paraugos pirms terapijas un recidīva laikā.

DARBA HIPOTĒZE

Embriogēni regulējošā Sonic Hedgehog signālceļa aktivitātei ir nozīme sīkšūnu plaušu vēža slimības prognozē un rezistences attīstībā.

PĒTĪJUMA ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE

Pirmo reizi Latvijā veikta sīkšūnu plaušu vēža pacientu saņemtās ārstēšanas un dzīvildzes datu analīze. Pētījuma dati norāda uz Sonic Hedgehog signālceļa galvenā mērķa gēna *Gli1* paaugstinātu ekspresiju kā iespējamo sīkšūnu plaušu vēža prognostisko biomarkieri, kā arī uz samazinātu Sonic Hedgehog signālceļa aktivitāti recidivējošā audzējā.

SADARBĪBAS PARTNERI UN MATERIĀLI TEHNISKAIS NODROŠINĀJUMS

Pētījums noticis LZP sadarbības projektu Nr. 05.0023.03.1 „Latvijas populācijas genofonda izpēte saistībā ar cilvēka patoloģiju” un Nr. 10.0010.01 "Slimību etioloģijas, patoģenēzes un cilvēka novecošanas procesu ģenētiska izpēte Latvijas populācijā" apakšprojekta „MikroRNS, mRNS un SNP kā biomarkieri plaušu vēža agrīnai diagnostikai, prognostikai un terapijas efektivitātes prognozēšanai” ietvaros. Pacientu diagnostika, atlase, audzēju biopsiju paraugu iegūšana pirms terapijas un recidīva laikā, ārstēšana un novērošana veikta VSIA Paula Stradiņa KUS Torakālās ķirurģijas centrā un Onkoloģijas klīnikā. Vēža šūnu klātbūtni pētījuma biopsijās citoloģiski verificēja sertificēta laboratorijas ārste Dr. Romalda Grigalinoviča. Audzēju biopsiju paraugu reālā laika kvantitatīva PĶR izmeklēšana veikta Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

DARBA STRUKTŪRA UN AUTORA PERSONĪGAIS IEGULDĪJUMS

Promocijas darba autors ir izvirzījis pētījuma hipotēzi, izveidojis pētījuma protokolu, atlasījis pacientus pētījumam, vadījis viņu ārstēšanu un novērošanu, kā arī reģistrējis pacientu klīniskos un ģenētiskos datus, veicis to statistisko apstrādi un analīzi. Autors ir sarakstījis šo darbu un ar to saistītās publikācijas.

ĒTISKIE ASPEKTI

Pētījuma veikšanai 2008. gada 27. jūnijā tika saņemta Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauja (1. pielikums). Pētījums veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju atbilstoši labas klīniskās prakses nolikumam. Visi pētījumā iesaistītie pacienti ir parakstījuši informētās piekrišanas lapu (2. pielikums) divos eksemplāros, no kuriem viens eksemplārs izsniegts pacientam uz rokas, bet otrs glabājas pie pētnieka.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Sīkšūnu plaušu vēža epidemioloģija

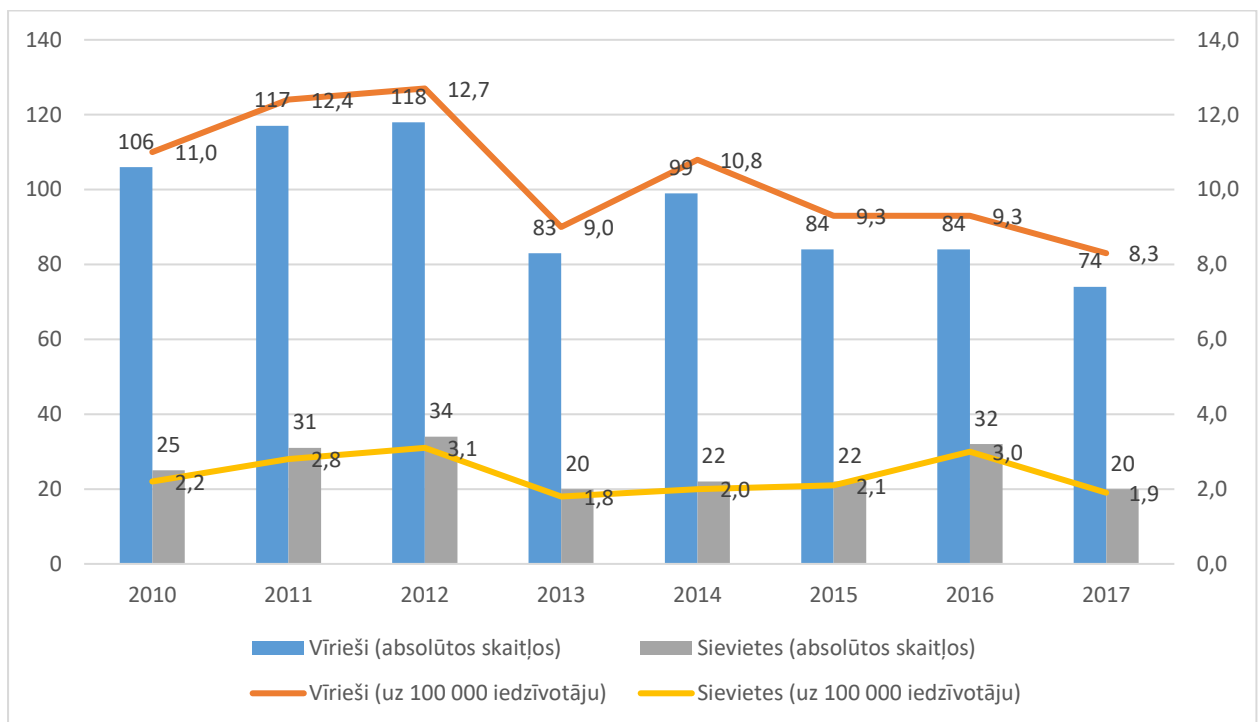
Latvijas dati

Saslimstība ar sīkšūnu plaušu vēzi Latvijā pēdējo 10 gadu laikā ir ar nelielu mazināšanās tendenci.

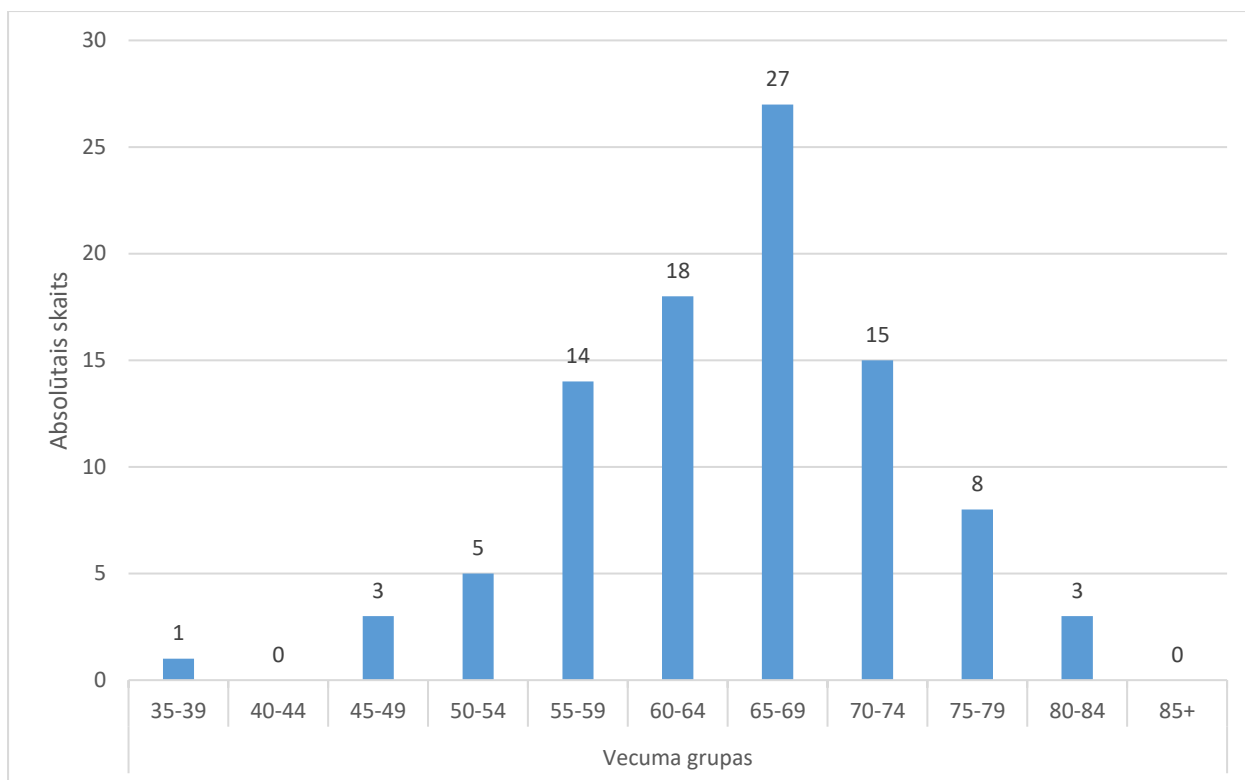
2010. gadā reģistrēti 11 188 primārie onkoloģiskie pacienti, no kuriem 1 144 bija diagnosticēti

plaušu vēzis, un sīkšūnu plaušu vēža forma bija aptuveni 11% – 131 pacientam, pārsvarā vīriešiem (106 vīrieši; 25 sievietes). Savukārt 2017. gadā no 11 762 primārajiem pacientiem plaušu vēzis tika atklāts 1 124 pacientiem, sīkšūnu plaušu vēzis – aptuveni 8% – 94 pacientiem (74 vīrieši; 20 sievietes).

Sīkšūnu plaušu vēža saslimstība Latvijā mazinās pārsvarā vīriešiem – 2010. gadā biežums bija 11,0, bet 2017. gadā – 8,3 uz 100 000 iedzīvotāju gadā; sievietēm tas palika praktiski nemainīgs – 2010. gadā 2,2, 2017. gadā – 1,9 uz 100 000 iedzīvotāju gadā (1.1. attēls). 95% saslimušo bija vecāki par 50 gadiem, visbiežākais saslimušo vecums bija 65-69 g.v. (1.2. attēls). (SKPC, 2019).

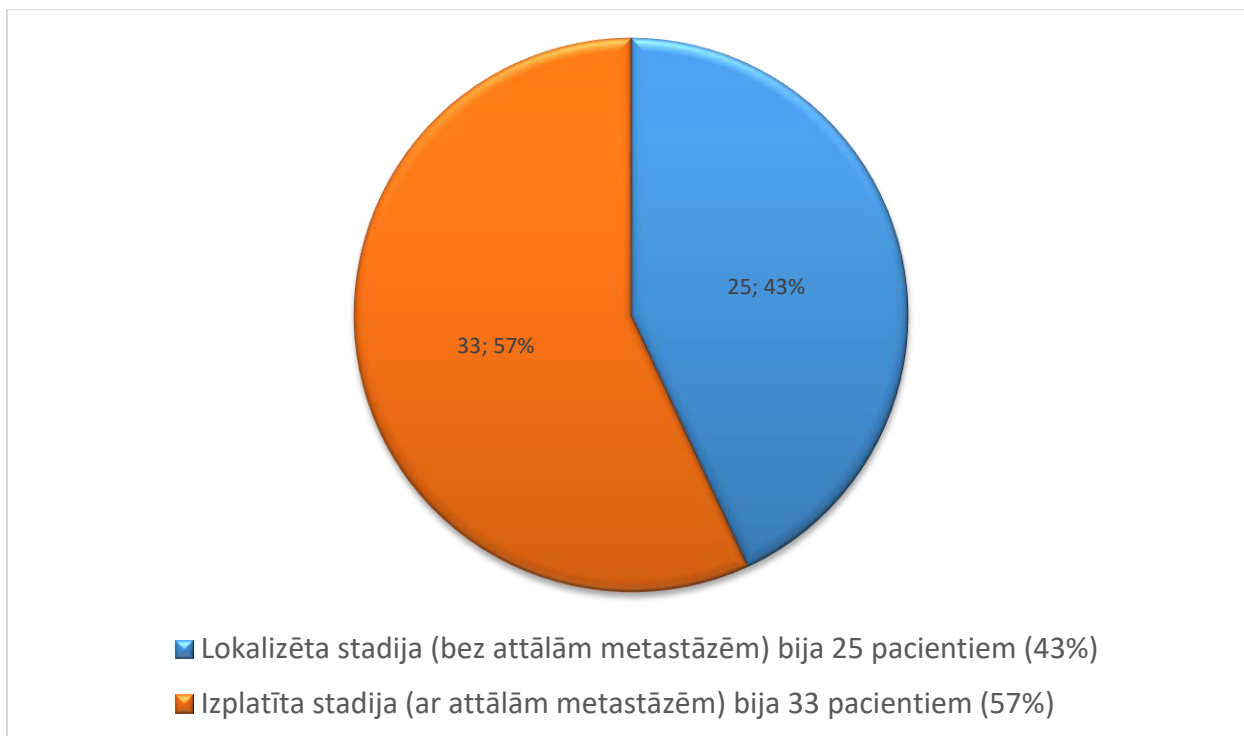


1.1. attēls. Saslimstība ar sīkšūnu plaušu vēzi Latvijā (SPKC dati)



1.2. attēls. Saslimstība ar sīkšūnu plaušu vēzi 2017. gadā dažādās vecuma grupās. 95 % pacientu bija vecumā virs 50 gadiem (SPKC dati)

Centralizēti aprēķināti stadiju sadalījuma un mirstības dati atsevišķi sīkšūnu plaušu vēzim Latvijā nav pieejami. Ir iespējama informācijas ekstrapolācija no viena centra (PSKUS) darba analīzes datiem. Šeit 2012. gadā tika ārstēti 58 pirmreizējie sīkšūnu plaušu vēža pacienti no Latvijā kopā 2012. gadā atklātiem 152 pirmreizējiem gadījumiem. Lokalizēta stadija (bez attālām metastāzēm) bija 25 pacientiem (43%) un izplatīta stadija (ar attālām metastāzēm) bija 33 pacientiem (57%). (1.3. attēls). (PSKUS iekšējā informācija, 2012).



1.3. attēls. 2012. gadā PSKUS ārstēto pirmreizējo sīkšūnu plaušu vēža pacientu (n=58) sadalījums pēc stadijas (PSKUS iekšējā informācija, 2012).

Latvijā nav pieejami publicēti dati par sīkšūnu plaušu vēža mirstību, un viens no dotā promocijas darba uzdevumiem bija šīs informācijas iegūšana un publicēšana (3.11. tabula). (Kozirovskis et al., 2012).

Pasaules dati

Sīkšūnu plaušu vēža pacientu saslimstības, demogrāfisko, klīnisko un dzīvildzes datu atspoguļošana vēža reģistros ir trūcīga. Informācija pārsvarā tiek iegūta viena vai vairāku centru pētījumu populācijās.

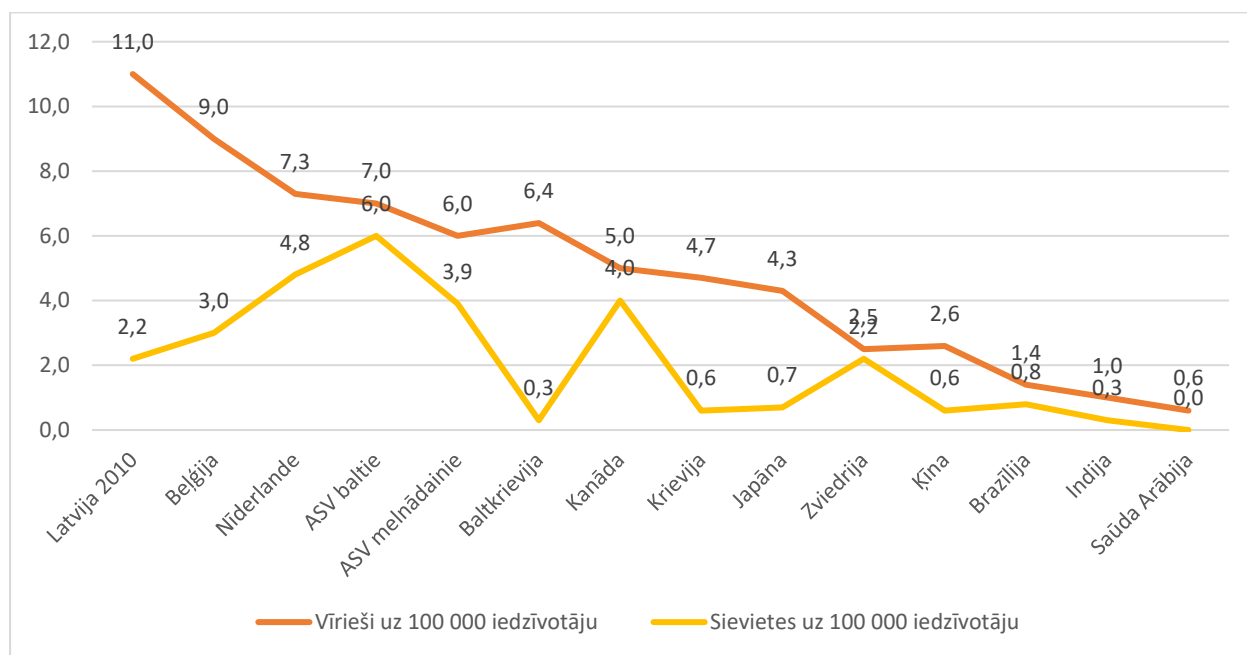
Samazinoties smēķētāju īpatsvaram ASV populācijā, saslimstība ar sīkšūnu plaušu vēzi arī kritās (ACS, 2021). Pašreiz sīkšūnu plaušu vēzis sastāda aptuveni 13%, salīdzinot ar agrāk novērotajiem 20-25% starp visiem jaunatklātajiem plaušu vēža gadījumiem. Jāatzīmē, ka mainījies arī dzimumu sadalījums starp smēķētājiem. Ja 1965. gadā ASV smēķēja 50% vīriešu un 35% sievietes, tad 2010. gadā šīs proporcijas attiecīgi bija 30% un 20%. Līdz ar to pašreiz sievietes slimo ar sīkšūnu plaušu vēzi salīdzinoši biežāk. Slimības stadiju sadalījums laikā gaitā nav būtiski mainījies un sastāda aptuveni 40% lokalizētai stadijai un aptuveni 60% izplatītai stadijai (Govindan et al., 2006). ASV sīkšūnu plaušu vēža pacientu dzīvildze pēdējos 15 gados nav būtiski uzlabojusies un saglabājas zema - tikai 14-15% pacientu ir dzīvi pēc 2 gadiem kopš diagnozes brīža (Siegel et al., 2021).

Lielajā Spāņu multicentru plaušu vēža pētījumā 2016.-2020. gados sīkšūnu plaušu vēzis sastādīja 12.9%, ar izplatītas un lokalizētas stadijas biežumu attiecīgi 62,6% un 36,6%. Vidējā dzīvildze kopējā populācijā bija 9,5 mēneši, bet 2 gadu dzīvildze – 14,8% (Franco et al., 2021).

Korejas populācijā 2014. gadā sīkšūnu plaušu vēža biežums bija 13,5%, ar izplatītas un lokalizētas stadijas biežumu attiecīgi 63,4% un 36,6%. Vidējā dzīvildze kopējā populācijā bija 8 mēneši (Choi et al., 2019).

Japānas populācijā 2012.-2016. gados sīkšūnu plaušu vēža biežums bija 19.1%, stadiju sadalījuma informācija trūkst, bet 3 gadu dzīvildze – 15,9% (Sekine et al., 2020).

Analizējot sīkšūnu plaušu vēža saslimstību pēc dzimumiem pasaules valstīs tāpat kā Latvijā lielākoties ar to slimo vīrieši (1.4. attēls). Izņēmumi ir ASV baltās rases iedzīvotāji, kur vīriešiem – 2003.-2007. gados biežums vidēji bija 7,0, bet sievietēm – 6,0 uz 100 000 iedzīvotājiem gadā. Arī Kanādā un Zviedrijā biežums vīriešiem un sievietēm attiecīgi bija 5,0 un 4,0, 2,5 un 2,2 uz 100 000 iedzīvotājiem gadā (Cheng et al., 2016b).



1.4. attēls. Saslimstība ar sīkšūnu plaušu vēzi dažādās populācijās (SPKC dati, Cheng et al., 2016)

1.2. Sīkšūnu plaušu vēža etioloģija un onkoģenēze

Divu veidu gēni – proto-onkogēni un audzēja supresorgēni atbild par šūnu dalīšanās un diferencēšanās procesus nodrošinošo olbaltumu sintēzi. Tieši šo gēnu mutācijas uzskata par galveno notikumu ļaundabīgo audzēju patoģenēzē. Cancer Gene Census vēža gēnu skaitīšanas datu bāzē uz 2021. gada jūniju ir uzskaitīti 723 gēni, kuru mutācijas ir cēloniski saistītas ar ļaundabīgiem audzējiem. Mutācijas aptuveni 80% ir somatiskas, 10% ir ciltstēva un var pārmantoties, bet 10% ir gan somatiskās, gan ciltstēva. Vēža šūnu lielākajā daļā ir 60 vai vairāk mutācijas. Starp tām var būt gan neitrālas mutācijas (*passenger mutations*), gan klīniski nozīmīgas mutācijas (*driver mutations*) (Alsulami et al., 2021). Jāpiebilst, ka proto-onkogēnu un audzēja supresorgēnu ekspresijas izmaiņas var būt saistītas ne tikai ar šo gēnu kodējošās secības izmaiņām, bet arī ar epigēnētiskām modifikācijām (piemēram, DNS metilācijas izmaiņām vai hromatīna organizāciju, deacetilējoties histoniem). Svarīgu lomu var spēlēt arī mazās regulējošās RNS (mikroRNS), kas regulē dažādu proto-onkogēnu un audzēja supresorgēnu darbību un tādējādi var ierosināt karcinogēni pie normālo funkciju zuduma. Bez tam vēža fenotips bieži ir atkarīgs arī no ne-onkogēnām iedzimtām ģenētiskā koda variācijām. Pēc Cilvēka Genoma Projekta datiem starp indivīdiem atšķirīgs ir aptuveni

0,1% genoma. Aptuveni 80% šo variāciju ir Viena Nukleotīda Polimorfisms (*Single Nucleotide Polymorphisms*), kad DNS secībā atšķiras tikai viens nukleotīds. Retāk novēro atšķirības gēnu kopiju skaita ziņā. Šis ģenētiskais „pirkstu nospiedums” var noteikt, piemēram, indivīda uzņēmību uz vēža attīstību un onkoloģiskās slimības gaitu, kā arī ar to var izskaidrot pretvēža terapijas efektivitātes variācijas indivīdu starpā (Deng et al., 2017).

Ģenētiska predispozīcija sīkšņu plaušu vēzim nav pierādīta, izņemot netiešu ietekmi no ģenētiskām variācijām, kas varētu būt saistītas ar palielinātu nikotīna atkarības attīstības risku un attiecīgi arī palielinātu ar smēķēšanu saistīto kancerogēnu ekspozīciju. Tikai 2% gadījumu sīkšņu plaušu vēzis attīstās nesmēķētājiem (Varghese et al., 2014), par kuriem tiek definēti cilvēki, kas dzīves laikā izsmēķējuši mazāk par 100 cigaretēm. Pētījumos iegūti norādījumi par iespējamo gaisa piesārņojuma (Lamichhane et al., 2017) un iekšstelpu radona ekspozīcijas (Rodríguez-Martínez et al., 2018) lomu sīkšņu plaušu vēža attīstībā nesmēķētājiem.

Sīkšņu plaušu vēzis ir spilgts ar smēķēšanu saistītās ļaundabīgās slimības piemērs. Epidemioloģiskā saite starp tabakas izstrādājumu dūmu ieelpošanu un sīkšņu plaušu vēža saslimstību ir viena no stiprākajām ar aptuveni 30 gadu nobīdes laiku starp abām līknēm (Huang et al., 2015). Arī visaptverošās ģenētiskas profilēšanas pētījumos sīkšņu plaušu vēzis uzrāda nepārprotamu ar smēķēšanu saistītu ģenētisko izmaiņu spektru ar ļoti augstu mutāciju slogu.

Cigarešu dūmu kancerogēni izraisa divu svarīgāko audzēja supresorgēnu *TP53* un *RBI* vienlaicīgu inaktivāciju, kas tiek uzskatīta par galveno iniciējošo notikumu sīkšņu plaušu vēža onkoģenēzē un konstatējama šīs slimības gadījumu lielākajā daļā (George et al., 2015). Normāli p53 olbaltums tiek aktivēts šūnu DNS bojājuma vai hipoksijas gadījumā un nodrošina genoma stabilitāti, inducējot šūnu cikla arestu vai apoptozi pie genomiska stresa. Funkcionāls p53 zudums noved pie genoma nestabilitātes, kas tālāk ļauj uzkrāt citas vēzim klīniski nozīmīgas mutācijas (*driver mutations*). Par *TP53* mutāciju kā iniciējošu notikumu sīkšņu plaušu vēža attīstībā liecina arī fakts, ka *TP53* mutācija parasti tiek konstatēta vizuāli neizmainītajā bronhu epitēlijā ap audzēju (Wistuba et al., 2000). *RBI* jeb retinoblastomas uzņēmības gēna mutācija pirmo reizi tika atklāta retinoblastomai, kas līdzīgi sīkšņu plaušu vēzim ir neironālo progenitoru audzējs (Friend et al., 1988). RB proteīns ir galvenais šūnu cikla S-fāzes ieejas inhibitors, ka arī tas kontrolē vairākas citas šūnas funkcijas, ieskaitot izdzīvošanu, diferenciaciju, metabolismu un genoma stabilitāti. RB olbaltums nodrošina pluripotences gēnu (*Oct4* un *Sox2*) supresiju somatiskajās šūnās (Kareta et al., 2015) un arī inhibē neirālo cilmsūnu regulētāja - *enhancer of zeste 2* (*EZH2*) proteīna ekspresiju (Sher et al., 2008). Attiecīgi *RBI* gēna mutācija var novest līdz nekontrolējamai bronhu epitēlija šūnu proliferācijai, kā arī līdz cilmsūnām raksturīgo īpašību un neuroendokrīnas diferenciacijai iegūšanai. Šajā kontekstā interesants ir novērojums par plaušu adenokarcinomas ar aktivējošām EGFR mutācijām transformācijas iespējām uz sīkšņu plaušu vēzi pēc anti-EGFR mērķterapijas saņemšanas. Pēc publicētajiem datiem tas var notikt aptuveni 5% šāda veida audzēju pēc aptuveni 19 mēnešu ilgas anti-EGFR terapijas saņemšanas un pārsvarā audzējiem ar vienlaicīgu inaktivējošu mutāciju *TP53* un *RBI* gēnos (Offin et al., 2019).

Nākošā sīkšņu plaušu vēzim nozīmīga ģenētiska novirze ir amplifikācija vai transkripcijas pastiprināšanās kādā no trim *MYC* gēniem (*MYC*, *MYCN*, vai *MYCL*), kas tika konstatēta aptuveni 20% gadījumu (Peifer et al., 2012). Precīzs sīkšņu plaušu vēža *MYC*-

izraisītas transformācijas mehānisms nav pilnībā izprasts. Tiek uzskatīts, ka MYC saimes proteīni ir transkripcijas aktivatori, kas kontrolē šūnas pluripotenci, pašatjaunošanos un epiteliālās-uz-mezenhimālo pāreju (*epithelial-to-mesenchymal transition*) (Chappell and Dalton, 2013). Eksperimentos ar ģenētiski modificētām pelēm bez funkcionējošiem *RBI* un *TP53* gēniem *MYC* ekspresijas palielināšana noveda pie agresīva, augsti metastātiska sīkšūnu plaušu vēža attīstības pēc neuroendokrīni neaktīva jeb “variantā” apakštīpa, kas atbilst cilvēku sīkšūnu plaušu vēža NeuroD1 augsti ekspresējošam transkripcijas profilam (Mollaoglu et al., 2017).

Vēl viena bieži sastopama molekulāra novirze sīkšūnu plaušu vēža šūnās ir onkogēnā PI3K/AKT/mTOR signālceļa pāraktivācija. Nelielā gadījumu skaitā tas ir fosfatāzes un tensīna homologa (PTEN) gēna delēcijas dēļ, kas ir šī signālceļa inhibitors. Tomēr biežāk novēro citu signālceļa komponentu (*PIK3CA*, *AKT2*, *AKT3*, *RICTOR*, *mTOR*) aktivējošas mutācijas vai amplifikācijas. Pie tam šīs izmaiņas signālceļā praktiski vienmēr bija savstarpēji izslēdzošas (Umemura et al., 2014, Ross et al., 2014).

Nesen sīkšūnu plaušu vēzim tika atklātas biežas (aptuveni 25% gadījumu) inaktivējošas mutācijas vēl vienā signālceļā – NOTCH, kas normāli regulē plaušu neuroendokrīno šūnu daudzumu embrionālas attīstības laikā un tādējādi noviržu gadījumā varētu būt atbildīgs par nekontrolējamu neuroendokrīno šūnu proliferāciju un SŠPV onkoģenēzi (George et al., 2015).

Nobeigumā jāatzīmē, ka sīkšūnu plaušu vēzim tika konstatēti arī bieži epiģenētisko regulētāju bojājumi, kas varētu būt nozīmīgi slimības attīstībā. Histona acetiltransferāžu (HAT) *CREBBP* un *EP300* un histona metiltransferāžu (HMT) *MLL*, *MLL2*, and *EZH2* mutācijas tika atrastas neatkarīgos pētījumos ar biežumu 4-8% katram gēnam (Peifer et al., 2012, Umemura et al., 2014, Ross et al., 2014, Augert et al., 2017).

1.3. Sīkšūnu plaušu vēža molekulāri ģenētiskā klasifikācija

PVO klasifikators sīkšūnu plaušu vēzi uzskata par relatīvi homogēnu ļaundabīgu slimību un izdala tikai 2 apakšgrupas: SŠPV un kombinēts SŠPV/NSŠPV, kad tas kombinējas ar kādu no nesīkšūnu plaušu vēža formām. Tomēr literatūrā jau aptuveni 30 gadus var atrast publikācijas ar norādījumiem par SŠPV divām apakšgrupām, izejot no neuroendokrīno marķieru – tādu kā CD56 jeb neirālo šūnu adhēzijas molekula (NCAM), sinaptofizīns (SYP) un hromogranīns A (CHGA) klātbūtnes (“klasiskais” SŠPV) vai trūkuma (“variantais” SŠPV) uz šūnu virsmas. Klasiskā un variantā SŠPV formas atšķiras gan pēc šūnu morfoloģiskām īpašībām, gan pēc šūnu augšanas rakstura, gan pēc uzņēmības pret onkolītiskiem pikornavīrusiem (SVV), gan arī pēc rezistences uz staru un ķīmijterapiju (Zhang et al., 2018). Interesanti, ka molekulāru pamatojumu šīm atšķirīgajām SŠPV formām izdevās atrast nevis konkrētu gēnu mutācijās, bet analizējot specifisko transkripcijas faktoru (*ASCL1* un *NeuroD1*) ekspresijas atšķirības. Klasiskajam SŠPV veidam bija raksturīga augsta *ASCL1* aktivitāte, savukārt variantajam SŠPV - augsta *NeuroD1* aktivitāte. Pieaugot informācijas bāzei par raksturīgām epiģenētiskām izmaiņām SŠPV šūnu līnijās no pacientiem iegūtos ksenograftos, ģenētiski modificētās pelēs un pacientu audzēju paraugos Rudin et al. 2019. gadā piedāvāja jaunu SŠPV iedalījuma modeli 4 molekulārajos apakštīpos. Molekulārās klasifikācijas pamatā ir prevalējoša ekspresija kādam no četriem atslēgas transkripcijas regulētājiem: *achaete-scute homologue 1* (*ASCL1* jeb *ASH1*), *neurogenic differentiation factor 1* (*NeuroD1*), *yes-associated protein 1* (*YAP1*) un *POU class 2*

homeobox 3 (POU2F3) ar attiecīgajiem molekulārajiem apakštipiem - SCLC-A, SCLC-N, SCLC-Y un SCLC-P (Rudin et al., 2019). Visbiežāk sastopamais apakštips rezecētos SŠPV paraugos gan mRNS, gan proteīnu līmenī bija ar prevalējošu ASCL1-augstu ekspresiju jeb SCLC-A tips (78,2% un 74,4%) (Qu et al., 2022, Qi et al., 2022). Jāpiebilst, ka lielākā paraugu daļa bija pozitīva uz 2 vai 3 apakštipu marķieriem, kas liek domāt par ievērojamu intratumorālu molekulāru heterogenitāti sīkšņu plaušu vēža pacientiem. Analizējot dažādu molekulāru apakštipu dzīvildzes datus (3 gadu kopējā dzīvildze) 232 pacientiem ar radikāli izoperētu lokalizētas stadijas sīkšņu plaušu vēzi, vislabākā prognoze bija SCLC-Y pacientiem – 82,4% un SCLC-P pacientiem – 68,9%; sliktāka dzīvildze bija SCLC-A un SCLC-N pacientiem – attiecīgi 50,1% un 48,9%. Pacientiem ar SCLC-A bija statistiski lielāks risks uz metastāzēm galvas smadzenēs vai kaulos (Qi et al., 2022).

1.4. Sīkšņu plaušu vēža ārstēšana

Sākotnējā SŠPV terapija krasi atšķiras atkarībā no slimības stadijas (Rudin et al., 2021). Sīkšņu plaušu vēža ārstēšanas pamatmetode ir sistēmiskā ķīmijterapija, kas ļauj ievērojami pagarināt pacienta dzīvi un samazināt slimības simptomus pacientiem ar metastātisku slimību. Standarta ķīmijterapijas shēma ir Platīna-Etopozīda kombinācija, kas nav mainījies pēdējo 30 gadu laikā. Kopš 2018. gada pie izplatīta sīkšņu plaušu vēža kombinācijā ar ķīmijterapiju rekomendē pielietot arī imūnterapiju ar PD-L1 inhibitoriem, kas nedaudz uzlabo vidējās bezprogresijas un kopējās dzīvildzes rezultātus (Horn et al., 2018, Paz-Ares et al., 2019). Atbildes reakcija uz terapiju ar imūno kontrolpunktu inhibitoriem novērojama tikai aptuveni 10-20% SŠPV pacientu (Chung et al., 2020, Ready et al., 2020). Tik zema imūnterapijas efektivitāte audzējam ar lielu mutāciju slogu un attiecīgi augstu imūnogenitāti var būt izskaidrojama ar vairākiem mehānismiem: zema 1. klases MHC (*major histocompatibility complex*) molekulu ekspresija uz SŠPV šūnu virsmas (Traversari et al., 1997), supresīvo regulējošo T limfocītu klātbūtne audzēja mikrovidē (Wang et al., 2012), kā arī antigēn-prezentējošo šūnu nomākums ar neuropeptīdiem no SŠPV šūnām (Makarenkova et al., 2003).

Lokalizētas slimības gadījumā ķīmijterapija gan potencē staru terapijas lokālu pretvēža efektu, gan potenciāli iznīcina mikrometastātisku slimību. Nozīme ir arī lokālai terapijai – mazākā mērā ķirurģiskai ārstēšanai un galvenokārt staru terapijai, pateicoties kurai izdevās ievērojami uzlabot SŠPV ārstēšanas rezultātus pēdējo trīs dekāžu laikā. Ne-metastātiskas slimības gadījumā izmanto ķīmijterapijas-staru terapijas kombināciju ar mērķi panākt ilgstošu intratorakālas slimības kontroli, kā arī samazināt metastātiskas diseminācijas risku. Kopš 1999. gada arī konsolidējoša profilaktiska galvas apstarošana (PCI) ir kļuvusi par standarta terapijas shēmas svarīgu sastāvdaļu lokalizēta SŠPV tiem pacientiem, kuru slimība labi reaģējusi uz sākotnējo ārstēšanu (Aupérin et al., 1999).

1.4.1. Lokalizēta sīkšņu plaušu vēža ārstēšana

Agrīna slimība ar izolētu operablu plaušu mezglu bez metastāzēm vidēnes limfmezglos un attālos orgānos (I-II stadija pēc TNM klasifikācijas).

Pēc ESMO un NCCN starptautisko vadlīniju datiem primāra ķirurģiska ārstēšana apsverama ļoti nelielai sīkšņu plaušu vēža pacientu daļai (līdz 5%), kam slimība tiek atklāta kā rezektabls izolēts plaušu mezgls bez metastāzēm vidēnes limfmezglos un attālos orgānos. Tomēr pastāv zināmas šaubas par operācijas lietderību, jo nav labu kontrolētu nejaušinātu

klīnisko pētījumu, kas salīdzinātu ķirurģisku ar ne-ķirurģisku pieeju modernas diagnostikas un staru terapijas ērā (Barnes et al., 2017). Fracionēta staru terapija vai stereotaktiska radioķirurģija ir pieļaujama alternatīva operācijai SŠPV pacientiem ar rezektablu slimību (Salem et al., 2019, Verma et al., 2017). Ķirurģiskās ārstēšanas mērķis ir veikt radikālu (R0) rezekciju, respektīvi iegūt mikroskopiski negatīvas rezekcijas līnijas. Tad pēc operācijas pacientam ir jāsaņem tikai 4 pēcoperācijas ķīmijterapijas kursus, kas nodrošina 5 gadu dzīvildzi aptuveni 50% pacientu (Yang et al., 2016). Pēcoperācijas staru terapija pielietojama, ja operācija ir neradikāla (ar R1- mikroskopiski pozitīvām vai R2- makroskopiski pozitīvām rezekcijas līnijām) vai operācijas materiāla histoloģiskā izmeklēšana ir atklājusi neparedzētas metastāzes vidēnes limfmezglos. PCI nozīme pacientiem pēc agrīna SŠPV radikālas rezekcijas/apstarošanas un saņemtas adjuvantas ķīmijterapijas nav zināma. Šie pacienti ir ar zemāku risku uz galvas smadzeņu metastāzēm (12% 5 gadu laikā) un var nebūt ieguvēji no PCI (Yang et al., 2018).

Lokāli izplatīta slimība ar inoperablu primāru audzēju vai metastāzēm vidēnes limfmezglos un bez metastāzēm attālos orgānos (III stadija pēc TNM klasifikācijas).

SŠPV pacientiem ar lokāli izplatītu slimību vislabākos ārstēšanas rezultātus sniedz kombinēta terapija ar vienlaicīgu staru-ķīmijterapiju un sekojošu PCI tiem pacientiem, kam audzējs samazinājies pēc ārstēšanas. Mūsdienīgas tehnoloģijas ar 3D konformālas vai intensitātes modulētas apstarošanas metodes pielietošanu, kad var pievadīt lielāku starojuma devu ar mazākām toksicitātēm, un pēc iespējas ātrāka staru terapijas uzsākšana (vislabāk kopā ar pirmo vai otro ķīmijterapijas kursu) pašreiz ļauj sasniegt 5 gadu dzīvildzi pat līdz ~30% pacientu (Faivre-Finn et al., 2017, De Ruyscher et al., 2006). Ja vienlaicīga staru-ķīmijterapija nav iespējama agrīni pārāk plaša apstarojama lauka dēļ – staru terapijas uzsākšanu atliek uz trešā ķīmijterapijas kursa sākumu, kad ar lielāku varbūtību notiks audzēja masas samazināšanās (Sun et al., 2013). Kad vienlaicīga staru-ķīmijterapija nav iespējama sakarā ar ļoti augstu toksicitāšu risku vecāka gadu gājuma pacientiem (≥ 75 g. v.), pacientiem ar slikti kontrolējamām blakus slimībām vai pie smaga vispārējā stāvokļa paša sīksūnu plaušu vēža dēļ – staru terapiju veic secīgi pēc pabeigtas ķīmijterapijas (4 kursiem) (Christodoulou et al., 2019). Secīgas staru terapijas laikā tipiski apstaro pēc-ķīmijterapijas atlieku primārā audzēja apjomu un arī visas reģionālo limfmezglu zonas, kur pirms ķīmijterapijas bija konstatēti metastātiskie limfmezgli (Hu et al., 2020). Konsolidējoša profilaktiska galvas apstarošana (PCI) ievērojami samazina simptomātisko galvas smadzeņu metastāžu risku un palielina kopējo dzīvildzi tādiem lokalizēta SŠPV pacientiem, kuru slimība labi reaģējusi uz staru-ķīmijterapiju. Pētījumā ar 184 pacientiem, kam audzējs samazinājies pēc staru un ķīmijterapijas saņemšanas un kam nebija galvas smadzeņu metastāžu pirms un pēc primāras ārstēšanas (verificēts ar MRI izmeklējumu), vidējā kopējā dzīvildze ar PCI bija 26 mēneši (diapazons, 19,4-32,6 mēneši), salīdzinot ar 14 mēnešiem bez PCI (diapazons, 11,4-16,6 mēneši; $p < 0,0001$) (Eze et al., 2017). Vēlīnā neirotoksicitāte ir nozīmīga pētījumos novērota PCI blakne, īpaši ja apstarošanas frakciju reizes deva pārsniedza 3 Gy un/vai saņemot PCI kopā ar ķīmijterapiju (Le Péchoux et al., 2011, Slotman and Senan, 2011, Lee et al., 1986). Pierādījumu līmenis par PCI lietderīgumu ir mazāks pacientiem ar smagu vispārējo stāvokli (vispārējais stāvoklis pēc ECOG skalas 3-4), vecākiem pacientiem (> 60 g. v.) un tiem, kam ir samazinātas neirokognitīvās funkcijas vai ir pavadošas neiroloģiskas slimības, piem. insults vai epilepsija anamnēzē (Yang et al., 2016, Wolfson et al., 2011, Farooqi et al., 2017).

1.4.2. Izplatīta sīkšūnu plaušu vēža ārstēšana

Sīkšūnu plaušu vēža gadījumā ar metastāzēm attālos orgānos (IV stadija pēc TNM klasifikācijas) pielieto 2 medikamentu ķīmijterapijas shēmu ar platīna grupas medikamentu (Cisplatīns vai Karboplatīns) un Etopozīdu. Pēdējos gados kombinācijā ar ķīmijterapiju rekomendē pielietot arī imūno kontrolpunktu PD-L1 inhibitoru ar sekojošu šī medikamenta uzturošu lietošanu līdz 1 gadam, kas pētījumos tikai nedaudz (aptuveni par 2 mēnešiem) uzlaboja vidējās kopējās dzīvildzes rādītājus. Tomēr, analizējot dzīvildzes līkņu beigu daļu, ir norādījumi par imūnterapijas spēju izraisīt ilgstošu remisiju daļai pacientu. Tā 2 gadu kopējā dzīvildze imūnterapiju saņēmušiem pacientiem bija 2 reizes lielāka – 22% pret 11% (Rudin et al., 2021). Vēl nav iegūta informācija par prediktīviem biomarkšiem vai citiem sīkšūnu plaušu vēža parametriem, kas varētu palīdzēt prognozēt imūnterapijas efektivitāti. Atšķirībā no ne-sīkšūnu plaušu vēža PD-L1 ekspresija vienā pieejamā pētījumā nekorelē ar imūnterapijas efektu, bet audzēja mutāciju slogs (Tumor mutational burden - TMB) divos pētījumos uzrāda pretrunīgus rezultātus (Rudin et al., 2020, Horn et al., 2018, Hellmann et al., 2019). Interesants ir novērojums par labāku onkoloģisko prognozi SŠPV pacientiem ar paraneoplastiskiem neiroloģiskiem sindromiem, kur parasti ir augsta imūnsistēmas aktivitāte (Iams et al., 2019).

Staru terapija izplatīta sīkšūnu plaušu vēža gadījumā pārsvarā tiek lietota simptomātiski – augšējās dobās vēnas sindroma mazināšanai, pretsāpju nolūkā kaulu metastāžu gadījumā, metastāžu izraisītas muguras smadzeņu kompresijas vai galvas smadzeņu metastāžu izraisīto neiroloģisko simptomu mazināšanai. Konsolidējošas profilaktiskas galvas apstarošanas ieguvums metastātiska sīkšūnu plaušu vēža pacientiem pašreiz nav līdz galam pierādīts, kaut 40-50% pacientu pēc pabeigtas ķīmijterapijas attīstās galvas smadzeņu metastāzes. Ņemot vērā PCI asociētu neirotoksicitāti, lielākai pacientu daļai pašreiz tiek rekomendētas MRI kontroles ar atliktu staru terapiju pie metastāžu parādīšanās. Pašreiz notiek klīniskie pētījumi, kas ļaus precizēt PCI pielietošanas lietderīgumu izplatīta sīkšūnu plaušu vēža gadījumā (Rusthoven and Kavanagh, 2017). Pacientiem ar labu atbildes reakciju uz sistēmisko terapiju, bet atlieku audzēja audiem krūšu kurvī ir apsverama konsolidējoša staru terapija intratorakālas slimības apjomam, jo vienā pētījumā (CREST pētījums) šādu pacientu apakšgrupai tika iegūti norādījumi par 2 gadu kopējās dzīvildzes uzlabošanu ar zemiem toksicitātes riskiem (Slotman et al., 2015). Vēl nav pētījumu datu par PCI un konsolidējošas staru terapijas pielietošanas rezultātiem intratorakālai atlieku slimībai tiem pacientiem, kas saņem uzturošu imūnterapiju.

1.4.3. Recidivējoša sīkšūnu plaušu vēža ārstēšana

Nākamo līniju paliatīvu ķīmijterapiju var piedāvāt SŠPV pacientiem apmierinošā vispārējā stāvoklī, kam slimība atjaunojusies pēc iepriekš sasniegtas remisijas vai primāri progresējošiem pacientiem, kam vispār nebija atbildes uz pirmās līnijas terapiju. Vidējā prognozējamā dzīvildze šiem pacientiem ir tikai 4-5 mēneši ar vecajām ārstēšanas shēmām, un daži pieejamie jaunie medikamenti šo laiku būtiski neuzlabo. Nākamo līniju paliatīva sistēmiska terapija var sniegt ievērojamu simptomu atvieglošanu daudziem recidivējoša sīkšūnu plaušu vēža pacientiem, tomēr tās efektivitāte ir stipri atkarīga no laika līdz recidīvam un iepriekš novērotas audzēja samazināšanās pakāpes (Owonikoko et al., 2012).

Ja laiks bez progresijas bijis garāks par 6 mēnešiem, vislabāk pielietot tādu pašu platīnu saturošo ķīmijterapijas shēmu kā sākotnēji, kaut efekts šeit redzams tikai aptuveni

50% pacientu, remisijas ir īsākas un bieži parādās ķīmijterapijas kumulatīvās toksicitātes problēmas (Giaccone et al., 1987, Postmus et al., 1987).

Ja laiks bez progresijas ir virs 3 mēnešiem, bet īsāks par 6 mēnešiem, var pielietot otrās līnijas paliatīvu ķīmijterapiju ar Topotekānu, CAV shēmu vai atkārtoti mēģināt platīna-Etopozīda shēmu, kas uzrāda aktivitāti nelielam pacientu skaitam (20-30% atkarībā no izmantotā medikamenta) (Dingemans et al., 2021). 2018-2019. gadā šo sarakstu papildināja imūnterapijas preparāti (Nivolumab, Pembrolizumab), kaut vēlāk III fāzes nejausināts pētījums dzīvildzes ieguvumu, salīdzinot ar ķīmijterapiju, nav uzrādījis (Spigel et al., 2021), bet 2020. gadā – DNS transkripcijas procesu inhibējošais alkilējošais līdzeklis Lurbinektedīns, kas II fāzes pētījumā ar 105 pacientiem bija efektīvs 35% pacientu (Trigo et al., 2020). Daudziem citiem citotoksiskiem līdzekļiem (Paklitaksels, Docetaksels, Irinotekāns, Temozolomīds, perorāls Etopozīds, Vinorelbīns, Gemcitabīns, Bendamustīns) arī ir uzrādīta klīniska aktivitāte pie recidivējoša sīkšūnu plaušu vēža un NCCN vadlīnijās tie ir iekļauti kā iespējami terapijas varianti, kaut arī tie nav oficiāli apstiprināti šai konkrētajai indikācijai (Ganti et al., 2021).

Savukārt, ja laiks bez progresijas ir bijis mazāks par 3 mēnešiem, slimība ir rezidenta uz platīnu saturošu ķīmijterapiju un arī jebkuras citas tālākas sistēmiskas terapijas klīniskais ieguvums ir apšaubāms (Dingemans et al., 2021). Šādiem pacientiem rekomendē dalību klīniskajos pētījumos vai simptomātisku terapiju. Rezistences veidošanās mehānisma izprašana var palīdzēt ārstiem prognozēt terapijas efektivitāti, kā arī radīt jaunus terapeitiskus līdzekļus sīkšūnu plaušu vēža ārstēšanā.

1.5. Audzēju rezistence uz specifisko terapiju un vēža cilmes šūnas

1.5.1 Audzēja šūnu rezistences attīstības matemātiskais modelis

Jau 1979. gadā Goldie un Koldman izvirzīja teoriju, ka citogēnētiskās izmaiņas, kas saistītas ar onkoģenēzi, ir cieši saistītas arī ar audzēju spējām veidot rezistenci pret noteiktiem pretvēža līdzekļu tipiem (Goldie and Coldman, 1979). Viņi attīstīja matemātisko modeli, kas prognozē vēža šūnu pārejas biežumu uz rezistentiem variantiem, izejot no konkrēta audzēja tipa ģenētiskās nestabilitātes. Šis modelis paredz, ka tādi notikumi sākas jau no 1 tūkstoša līdz 1 miljonam audzēja šūnu lielā populācijā, kas ir krietni mazāks skaits nekā audzējā, ko uzskata par klīniski nosakāmu (10^9 jeb 1 miljards šūnu). Varbūtība, ka pirmreizēji diagnosticētā audzējā ir rezistenti kloni, tiek aprēķināta kā funkcija audzēja masai un konkrēta audzēja veidam piemītošajam mutāciju biežumam. Pat, ja mutāciju biežums ir tikai 10^{-6} , tad audzējā no 10^9 šūnām (1 cm lielā) prognozējams vismaz viens rezistentu šūnu klons. Absolūtos skaitļos šīs rezistentās vēža šūnas 1 cm lielā audzējā ir niecīgā skaitā, bet, izdzīvojot ārstēšanas laikā, tās vēlāk repopulē audzēja masu. Šī teorija izskaidro, kāpēc sākotnējā terapija parasti ir efektīva un klīniski ļauj panākt audzēja daļēju un pat pilnīgu remisiju (tas ir, audzēju nevar noteikt klīniski vai radioloģiski). Recidivējošie audzēji, savukārt, ir nejūtīgi uz terapiju, jo sastāv pārsvarā no sākotnējo terapiju pārdzīvojušiem vēža šūnu kloniem.

1.5.2 Rezistences patoģenētiskie mehānismi

Uzkrājoties zinātniskajai informācijai, pakāpeniski kļuvis skaidrs, ka citotoksisks medikaments neizraisa vēža šūnas bojāeju tiešā veidā (DeVita et al., 2008). Tagad ir labi izpētīts, ka tas tikai ierosina sākotnējas izmaiņas, kas tālāk kalpo kā iniciējošais moments veselai molekulāro notikumu kaskādei, kas, savukārt, rezultējas programmētajā šūnu nāvē jeb apoptozē. Šīs kaskādes sastāvā ir detektors, kas uztver šūnas nāvi ierosinošo signālu, tālāk seko signālu novadošais tīkls un molekulāri izpildmehānismi, kuri jau ir atbildīgi par šūnas bojāeju. Apoptozi izraisošas kaskādes procesi atšķiras katrā atsevišķā audzēja tipā, ko nosaka šo mehānismu pieejamība audu šūnās normālas attīstības laikā, molekulāras izmaiņas vēža šūnās, kā arī tos ietekmē pretvēža līdzekļa/līdzekļu kombinācijas iedarbības mehānisms un pat mikrovide, kurā notiek ekspozīcija pretvēža medikamentam. Dažu audzēju spēja pretoties ķīmijterapijas citotoksiskiem efektiem, šķiet, vairāk saistīta ar vēža šūnu ģenētisko nestabilitāti un/vai ar izmaiņām galvenajos šūnu cikla kontrolpunktā un apoptozes molekulārajos mehānismos, nekā ar specifiskiem bioķīmiskiem rezistences iemesliem. Tas izskaidro nespēju pārvarēt rezistenci uz ķīmijterapiju, ja tiek pielietotas metodes, kas ietekmē tikai klasiskos bioķīmiskos rezistences mehānismus.

1.5.3 Audu cilmes šūnas

Normāli embriogēnēzē šūnu populācijas paplašinās, aktīvi proliferējot, un sekojoši diferencējas, lai veiktu augsti specializētus procesus. Daudzas šūnas migrē ekstracelulārā vidē, lai sasniegtu sev paredzēto lokalizāciju. Apoptozes jeb strikti regulējamās šūnu pašiznīcināšanās ceļā notiek atbrīvošanās no nevajadzīgām vai defektīvām šūnām. Visi šie procesi tiek regulēti ar šūnu-šūnu mijiedarbību, apkārtējās mikrovides un starpšūnu signālu palīdzību.

Pēc embrionālās attīstības beigām visi šie procesi turpinās vairākumā audu vai nu pastāvīgi (hematopoētiskās un ādas-gļotādu šūnu līnijās) vai „pēc pieprasījuma” kā atbildes reakcija uz audu bojājumu (brūču dzīšana, aknu reģenerācija).

Audiem ir spēja veidot nepieciešamo šūnu kopu, pateicoties cilmsūnu klātbūtnei. Tās ir šūnas, kas dalās ļoti reti un spēj gan pašatjaunoties, gan veidot specifiskas priekšteču šūnas, kas tālāk proliferē un diferencējas par nepieciešamajām nobriedušām šūnām (Mackenzie, 2006). Cilmes šūnas ar mūžīgas pašatjaunošanās kapacitāti nelielā daudzumā eksistē līdzās daudz lielākai proliferējošo šūnu kopai, kur šūnām pavairošanās funkcija ir ierobežota un pēc noteikta dalīšanās reižu skaita iestājas šūnu cikla arests un/vai apoptoze. Pašreiz cilmsūnu populācija atrasta daudz, ja ne visos, nobriedušajos audos (Shackleton et al., 2006, Stingl et al., 2006), kaut gan plašāki dati par to funkcionēšanu iegūti tikai hematopoētiskām (Miraglia et al., 1997) un ādas (Alonso and Fuchs, 2003) cilmsūnām. Uzkrājoties informācijai par nobriedušo audu cilmsūnām, tiek apzināta arī to svarīgā loma ļaundabīgo audzēju patoģenēzē – tā saucamā vēža cilmsūnu teorija (Dalerba et al., 2007).

1.5.4 Vēža cilmsūnu teorija

Neliela šūnu frakcija, kas ir spējīga atjaunot audzēju, tika atrasta hematoloģiskām malignitātēm un dažiem solīdiem audzējiem. Lielākajai vēža šūnu daļai šī reģenerējošā kapacitāte nepiemīt. Piemēram, ļaundabīgo audzēju šūnu ievietošana mīkstā agarā barotnē vai injicēšana pelei parasti nenoved pie kolonijas rašanas (Price and Tarin, 1989, Gianni et al.,

1988). Līdzīgi eksperimentos ar cilvēkiem, kas notika 1950-os gados un ir neiedomājami šodien ētisko standartu dēļ, 35 vēža pacientiem injicēja aptuveni 1 miljardu viņu pašu audzēju šūnu augšstilbā vai apakšdelmā (Southam and Brunschwig, 1961). Tikai 7 no šiem autotransplantantiem vainagojās ar vēža augšanu injekcijas vietā. Turpmāk pētījumi ar akūto mieloleikozi parādīja, ka tikai 0,1-1% no visām leikozes šūnām piemīt leukēmiju iniciējoša aktivitāte (Lapidot et al., 1994) un šīm šūnām raksturīgi daudzi normālo hematopoētisko cilmšūnu marķieri un īpašības (Bonnet and Dick, 1997, Hope et al., 2004). Par pluripotentu šūnu klātbūtni solīdos audzējos liecina arī klīniski novērojumi pacientiem ar teratokarcinomām, kur audzēju masā var parādīties tādi diferencēti audi kā muskuļaudi un kaulaudi (Sell, 2004). Tāpat eksperimentos ar dzīvniekiem izdevās izaudzēt normālu peli no peles teratokarcinomas šūnām (Mintz and Illmensee, 1975).

Solīdos audzējos identificētas vēža cilmes šūnas parasti ekspresē orgāna-specifiskus marķierus, kā arī tām ir raksturīgs kāds specifisks marķieru profils. Piemēram, astoņos no deviņiem krūts vēža pacientu paraugiem audzēju iniciējošā vēža šūnu populācija ekspresēja unikālu šūnu virsmas marķieru profilu CD44+CD24-/low (Al-Hajj et al., 2003). Pēc šiem marķieriem izdalītajā šūnu populācijā bija 50-100 reižu vairāk to šūnu, kas ir spējīgas ierosināt audzējus pelēm. Turklāt, līdzīgi kā sākotnējā audzējā, jaunizveidotajiem audzējiem piemita fenotipiska heterogenitāte, tumorigēnas un ne-tumorigēnas šūnas ieskaitot. No cilvēka CNS audzējiem tika izolētas cilmes šūnas ar pašatjaunošanās un polipotentas diferenciacijas īpašībām, kas ekspresēja CD133 šūnu virsmas antigēnu (Singh et al., 2004). Sākotnēji CD133 bija zināms kā hematopoētisko cilmšūnu marķieris, bet vēlāk tas tika konstatēts arī citu normālo audu cilmšūnās (Richardson et al., 2004). Nav precīzi zināms, kā audzējos rodas polipotentas vēža cilmes šūnas. Tās var veidoties normālo audu cilmšūnu ļaundabīgās transformācijas rezultātā, kancerogēnu ietekmē laika gaitā tām akumulējot mutācijas. Ir arī norādījumi, ka augsti diferencētas vēža šūnas var iegūt pastāvīgas pašatjaunošanās kapacitāti de-diferenciacijas ceļā, tādējādi iegūstot cilmes šūnas īpašības (Cozzio et al., 2003).

Vēža cilmes šūnas (ar iedzimtu vai iegūtu spēju pašatjaunoties) ir avots audzēja šūnu parastai populācijai, kam nepiemīt ilgtermiņa pašatjaunošanās kapacitāte, bet kuras saglabā ierobežotas spējas dalīties un nobriest. Normālas fizioloģijas terminos to varētu nosaukt par „diferenciaciju” un vēža šūnas tādējādi var iegūt izejas audu tipam raksturīgas iezīmes, ko plaši izmanto histopatoloģiskai un molekulārai ļaundabīgo audzēju klasifikācijai. Interesanti, ka šis diferenciacijas process parasti ir atkarīgs no ģenētiskās nekārtības ļaundabīgajās šūnās. Augsti diferencēti audzēji sastāv parasti no normāliem audiem līdzīgām šūnām raksturojas ar norobežotu un lēnu augšanu. Turpretī, pieaugot mutāciju daudzumam audzēju šūnās, notiek de-diferenciacijas process (uz vidēji diferencēto, zemu diferencēto un nediferencēto audzēju), kad vēža šūnas zaudē izejas audu īpašības, strauji proliferē, kā arī raksturojas ar agresīvu un invazīvu augšanu. Audzēja fenotipu nosaka regulējošo mehānismu iesaistīšanās un destabilizācijas pakāpe tādos procesos kā šūnu proliferācija, apoptoze, diferenciacija, migrācija un invāzija, un pat metabolisms pirms- un pēcnatālās attīstības laikā. Regulējošie mehānismi ir cieši savstarpēji saistīti, centrālie signālceļi bieži tiek izmantoti daudziem atšķirīgiem procesiem, tāpēc ir sarežģīti noteikt un pētīt specifiskus molekulārus notikumus, kas nosaka audzēju daudzsoļu evolūciju. Nozīmīgi ir kvantitatīvie efekti, konteksta specifiskums, savstarpējā signālceļu savienojamība un atgriezeniskās saites – tas viss apgrūtina izpēti procesu (DeVita et al., 2008).

1.5.5 Audu cilmsūnu un vēža cilmsūnu „dabiskā” rezistence

Interesants ir fakts, ka, ārstējot dažus ķīmijterapijas jutīgos audzējus, citotoksiskais efekts var būt lielāks audzēja šūnās nekā normālo audu šūnās, kuņģa-zarnu trakta epitēliju un kaulu smadzenes ieskaitot. Konvencionālas ķīmijterapijas devas, kas ir pietiekošas vēža šūnu lielākās daļas izskaušanai, nespēj iznīcināt normālo audu priekšteču šūnas un, beidzoties citotoksiskajai iedarbībai, tās repopulē kuņģa-zarnu trakta gļotādu un kaulu smadzenes (DeVita et al., 2008). Molekulāri ģenētiskie pētījumi atklājuši, ka šīm polipotentām priekšteču šūnām ar pašatjaunošanas īpašībām jeb audu cilmsūnām atšķirībā no audzēja šūnām ir neskarta ģenētiskā mašinerija. Rezultātā pēc genotoksiskās un citotoksiskās iedarbības beigām efektīvi ieslēdzas šūnu cikla aresta, DNS reparācijas un apoptozes mehānismi – respektīvi, cilmes šūnas efektīvi monitorē un izlabo notikušos DNS bojājumus, kā arī apoptozes ceļā atbrīvojas no šūnām ar kritiskām ģenētiskām izmaiņām, ko nav iespējams izlabot. Tas izskaidro faktu, ka normālās hematopoētiskās cilmes šūnas nav spējīgas pārdzīvot augsto devu ķīmijterapijas shēmu iedarbību, bet līdzīgo vēža cilmsūnu populāciju audzējā ar šo terapiju tomēr nav iespējams iznīcināt, jo bieži vien apoptozes mehānisms tajās ir defektīvs. Bez tam, audu cilmsūnu aizsardzību nodrošina to retā dalīšanās, jo vairumam pretvēža medikamentu efektīvai iedarbībai ir nepieciešams, lai šūna atrastos dalīšanās procesā.

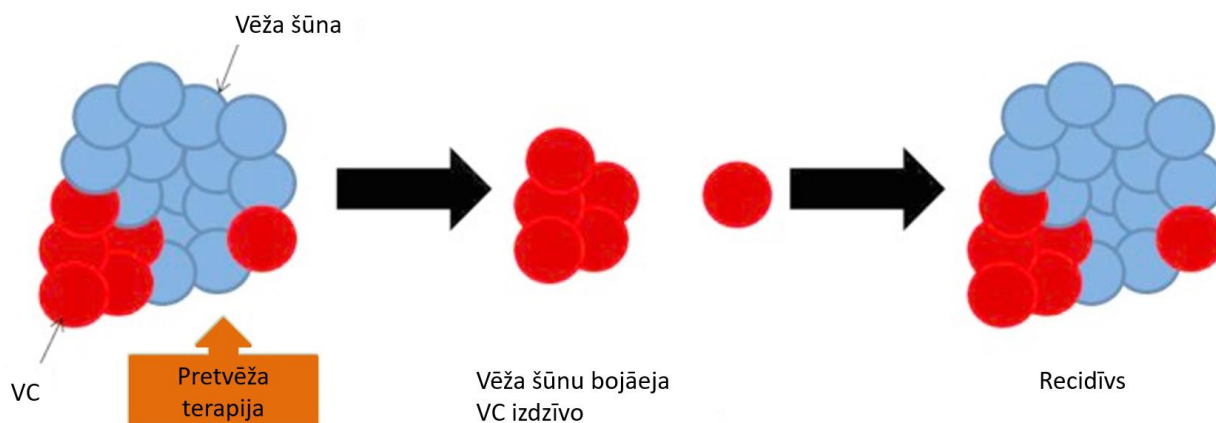
1.5.6 Audu cilmsūnu un vēža cilmsūnu bioķīmiskās un molekulārās rezistences mehānismi

Arī klasiskie bioķīmiskās un molekulārās rezistences mehānismi audu cilmsūnās ir labi attīstīti. Vēža cilmes šūnas var iegūt neuzņēmību pret ķīmijterapiju caur vairākiem mehānismiem kā, piemēram, DNS bojājumu labošanas sistēmas aktivācija, rezistence uz apoptozi, medikamenta iedarbības mērķa mutācija vai palielināta ekspresija, ķīmijterapijas līdzekļa inaktivācija vai pastiprināta tā izvadīšana no šūnas. Audzēji, kas atjaunojas pēc sākotnējās samazināšanās no ķīmijterapijas, parasti ir rezistenti uz vairākiem pretvēža medikamentiem (tiem piemīt multizāļu rezistence) (Rangwala et al., 2011). Vēža cilmsūnās ir novērojama augsta dažādu ABC (*ATP-binding cassette*) transportieru ekspresija, kas ir „izslēgta” vairumā diferencēto priekšteču un nobriedušo šūnu (Dean et al., 2005). Trīs galvenie multizāļu rezistences gēni, kas tika identificēti audzējos, pieder tieši pie šīs klases: ABCB1, kas kodē P-glikoproteīnu, ABCC1 un ABCG2. Šo gēnu kodētie transportolbaltumi, izmantojot ATF hidrolīzes enerģiju, nespecifiski izvada no šūnas gan hidrofilas, gan hidrofobas vielas, tajā skaitā arī dažādus citotoksiskus medikamentus (Gottesman et al., 2002). Peles ar mākslīgi radītu ABCB1, ABCC1 vai ABCG2 deficītu ir dzīvotspējīgas, fertīlas un ar normāli funkcionējošām cilmsūnām (Schinkel et al., 1994). Tas parāda, ka neviens no šiem gēniem nav nepieciešams cilmsūnu augšanai vai uzturēšanai. Kaut gan šīs peles ir vairāk uzņēmīgas pret tādu medikamentu iedarbību kā vinblastīns, ivermektīns, topotekāns un mitoksantrons, kas pierāda ABC transportieru nozīmi šūnu protekcijā no toksīniem. ABC transportieri izvada no šūnas arī fluorescentas krāsas Hoechst 33342 un Rhodamine 123, un tādēļ asins plūsmas-citometrijas analīzē ir iespējams atlasīt hematopoētiskas cilmes šūnas, kas veido „blāvo šūnu” kopu vai „blakus populāciju” (BP) (Goodell et al., 1996). Eksperimentos izolētas BP šūnas demonstrē polipotences īpašības, jo to neliels daudzums pēc transplantācijas spēj atjaunot hemopoētisku sistēmu pelei ar apstarošanas rezultātā iznīcinātām kaulu smadzenēm. BP šūnas tika izdalītas no daudziem audiem, ieskaitot smadzenes, krūts dziedzeri, plaušas, sirdi, aizkuņģa dziedzeri, sēkliniekus,

ādu un aknas un šīs šūnas tāpat demonstrē cilmsūnu īpašības (Wu and Alman, 2008). Atklājot šo audu specifisku cilmsūnu un BP šūnu saistību, kļuvis iespējams izdalīt cilmes šūnas no praktiski jebkuras šūnu vai audu populācijas. BP šūnas tika identificētas arī vairākos audzējos, kā piemēram 15 no 23 neuroblastomas paraugiem un krūts vēža, plaušu vēža, neuroblastomas un glioblastomas šūnu līnijās (Hirschmann-Jax et al., 2004). Interesanti, ka BP šūnas atrastas arī dažās ilgstoši kultivētās vēža šūnu līnijās. Piemēram, BP šūnas tika atdalītas no ne-BP šūnām žurku gliomas C6 šūnu līnijā un tika pierādīts, ka tikai BP šūnas spēj tālāk izveidot abu šūnu veidu saturošu populāciju, kā arī producēt šūnas gan ar neironāliem, gan ar gliāliem marķieriem un izraisīt audzēju pie ievadīšanas pelei (Kondo et al., 2004). Šis pēdējais pētījums pārliecinoši pierādījis, ka šajā šūnu līnijā BP pārstāv nenobriedušu šūnu populāciju ar pašatjaunošanas kapacitāti. Tomēr cilmsūnu atdalīšanas metode, kas balstīta uz fluorescentu krāsu izvadīšanu no šūnas nav viennozīmīga, jo vēlākie pētījumi cilmes šūnas atraduši arī ne-BP frakcijā (Zhou et al., 2002), kā arī ne-cilmes šūnas var ekspresēt ABCG2 un ABCB1 transportolbaltumus, tādējādi nokļūstot „blāvo šūnu” populācijā. Histopatoloģiskie pētījumi ziņojuši ABCB1 pastiprinātu ekspresiju vairāk diferencētos audzējos (Mizoguchi et al., 1990) un šūnu līnijās pēc apstrādes ar diferenciaciju izraisošiem aģentiem (Bates et al., 1989). Papildus ierobežojumi pastāv cilmsūnu bioloģijas un zāļu rezistences pētīšanā, izmantojot *in vitro* kultivētas vēža šūnu līnijas, jo cilmsūnu izdzīvošanai nepieciešama specifiska vide, ko nodrošina citas audzēja šūnas, stromas šūnas un augšanas faktori (Blanpain et al., 2004).

1.5.7 Vēža cilmes šūnas kā pamats sīkšūnu plaušu vēža recidīvam un rezistencei

Nemot vērā vēža cilmsūnu dabisko neuzņēmību uz pretvēža līdzekļu iedarbību, kā arī to svarīgo lomu mutāciju akumulācijas procesā, pievilcīga liekas hipotēze, ka tieši šīs šūnas ir atbildīgas par vēža recidīvu un multizāļu rezistentu genotipa nodošanu visām pēcteču šūnām repopulētā audzējā (Wicha et al., 2006). Pašreiz attiecībā uz sīkšūnu plaušu vēzi jau ir zinātniski dati, kas apstiprina šādu specifisko, pret terapiju rezistentu vēža šūnu subpopulācijas klātbūtni ar cilmsūnām raksturīgām īpašībām vai šūnu marķieru ekspresiju (Codony-Servat et al., 2016) (1.5. attēls). SŠPV šūnu līnijās ir aprakstītas blakus populācijas ar pastiprinātu Hoechst krāsas izvadīšanu un šādu specifisku vēža cilmsūnu marķieru ekspresiju - ALDH1 (*Aldehyde Dehydrogenase 1*), CD44, CD133 jeb PROM1 (*Prominin-1*), POU5F1 (*POU Class 5 Homeobox 1*), SALL4 (*Spalt Like Transcription Factor 4*), SOX2 (*SRY-Box Transcription Factor 2*) (Codony-Servat et al., 2016). Pieaugušo normālām epiteliālām cilmsūnām raksturīgs transkripcijas profils bieži tiek aktivizēts epiteliālos audzējos pie to progresijas uz agresīvu, izplatītu slimību, kā arī jau sākotnēji ir aktīvs plaušu, prostatas un urīnpūšļa sīkšūnu neuroendokrīnajos audzējos (Smith et al., 2018). Vēl vienā pētījumā ar SŠPV trim šūnu līnijām, kas tika iegūtas no viena pacienta audzēja secīgām biopsijām, slimībai progresējot tika novērota vairāku šūnu subpopulāciju parādīšanās ar cilmsūnu marķieru MYC, SOX2 un CD44 pieaugošu ekspresiju un attiecīgi arī pieaugošu rezistenci uz gamma-starojumu (Heng et al., 2021).

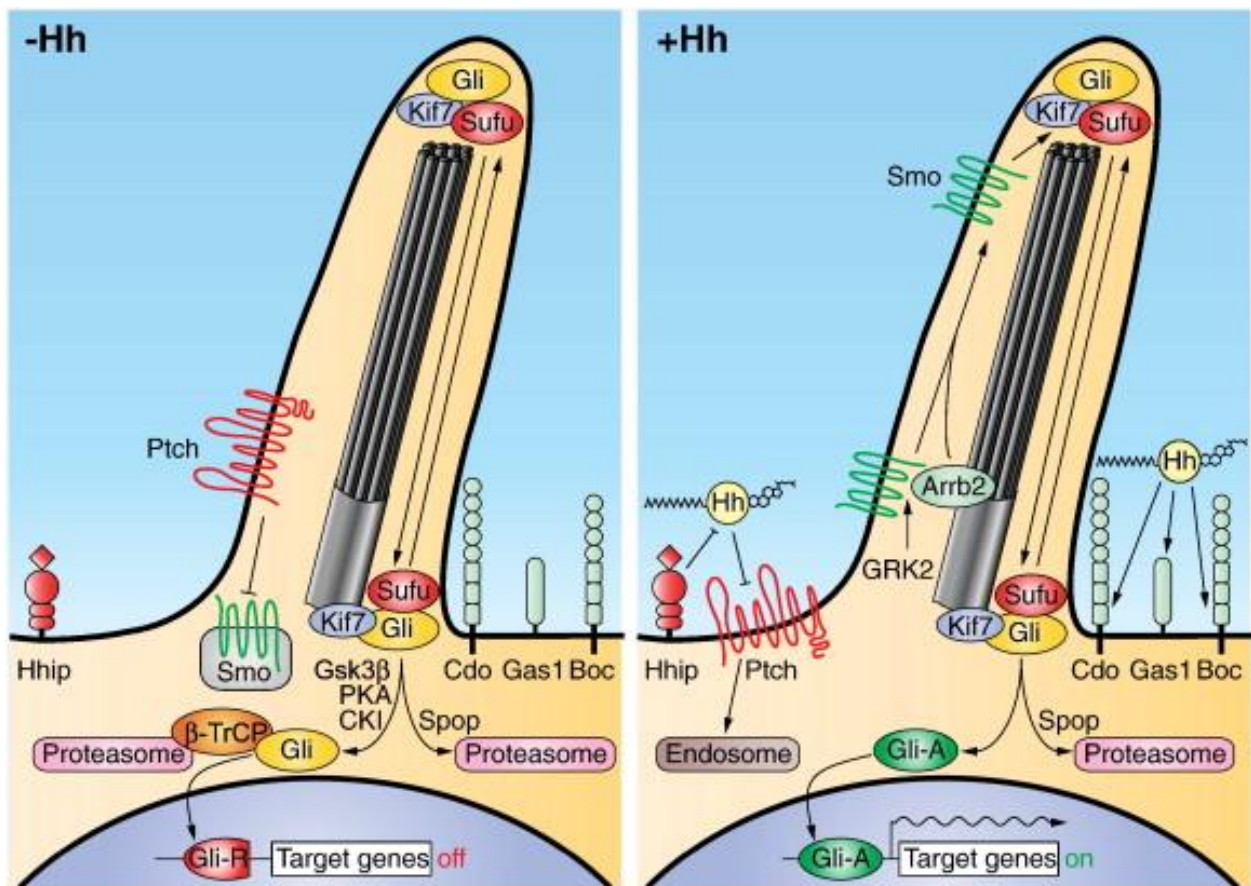


1.5. attēls. Vēža cilmes šūnas (VC) kā pamats sīkšūnu plaušu vēža recidīvam un rezistencei (Codony-Servat et al., 2016)

1.6. Embriogēni regulējošā Hedgehog (Hh) signālceļa nozīme sīkšūnu plaušu vēža cilmes šūnu funkcionēšanā un rezistences attīstībā

1.6.1 Pārskats par Hh signālceļu

Īsumā raksturojot Hh signālceļu, tas ir viens no mehānismiem, ar kura palīdzību organismā notiek audu attīstības regulācija embriogēnēzē un vēlāka audu homeostāzes uzturēšana. Dažādas šūnas var sekretēt hedgehog signālproteīnu, kas zīdītājiem var būt trīs veidu - *Sonic* (Shh), *Desert* (Dhh) un *Indian* (Ihh). Šo signālproteīnu receptors ir Ptch jeb Ptch1 (*Protein Patched Homolog 1*) un liganda/receptora kontakts izraisa Ptch inaktivāciju, kā rezultātā no tā inhibējošās ietekmes atbrīvojas *Smoothed* (Smo), kas, savukārt, palaiž intracelulāru signālu kaskādi un galu galā veicina dažādu mērķa gēnu ekspresiju caur Gli (*Glioma-Associated Oncogene Homolog*) proteīnu transkripcijas faktoriem. Gli1 (*Glioma-Associated Oncogene Homolog 1*) uzskata par galveno Hh aktivācijas indikatoru, jo tas ir vienlaicīgi gan signālceļa transkripcijas mērķis, gan arī pozitīvs regulators (Katoh and Katoh, 2009a, Gupta et al., 2010). Signālceļa inhibitori ir SuFu (*Suppressor Of Fused Homolog*), kas piedalās ar DNS saistīta Gli1 degradācijā, kā arī šūnas virsmas proteīns Hhip (*Hedgehog Interacting Protein*), kas konkurējoši saista Hh ligandus un ierobežo to darbības diapazonu (1.6. attēls) (Teglund and Toftgård, 2010).



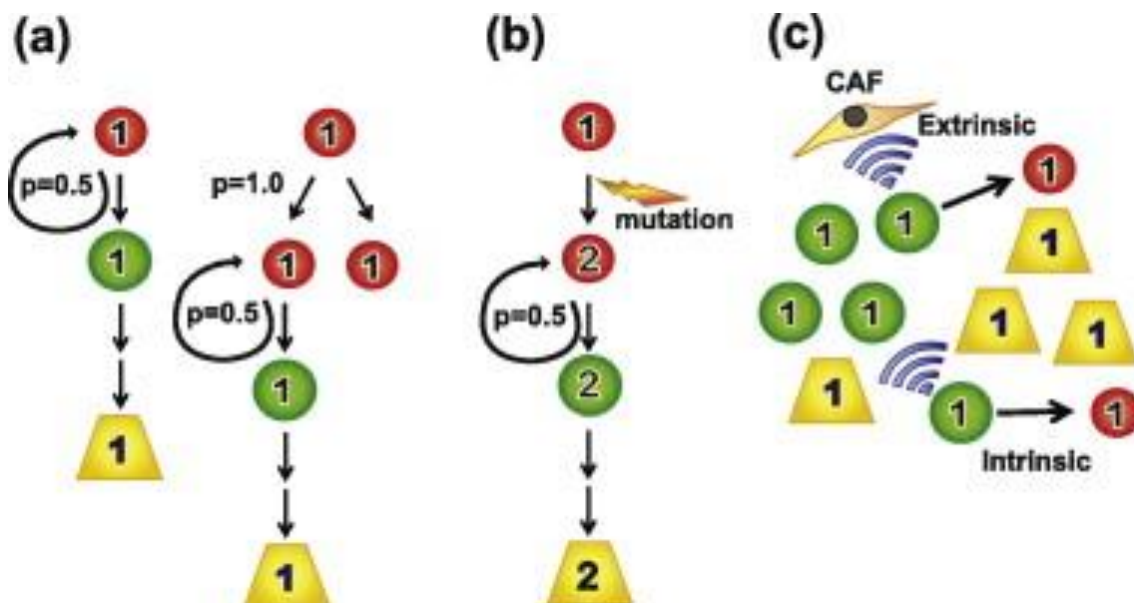
(-Hh) Kreisajā pusē parādīts modelis, kad nav Hh (*Hedgehog*) signālproteīna kontakta ar to receptoru Ptch jeb Ptch1 (*Protein Patched Homolog 1*), rezultātā Ptch inhibē Smo (*Smoothened*), neļaujot tam iet šūnas primārajā skropstiņā un rezultātā pilna garuma proteīns Gli (*Glioma-Associated Oncogene Homolog*), pārsvarā Gli3 tiek saīsināts no C termināla uz Hedgehog mērķa gēnu transkripciju represējošo proteīna formu (Gli-R, attēlā sarkans), kas tālāk tiek «nogatavināts» vairākos posmos [secīga fosforilācija ar *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta* (GSK3β), *protein kinase A* (PKA) un *casein kinase I* (CKI) proteīniem; ubikvitinizēšana kompleksā ar *Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase* (β-TrCP); daļējā degradācija 26S proteosomā] vai pilnīgi degradēts proteosomā caur *Speckle Type BTB/POZ Protein* (Spop) mediētu ubikvitinizēšanu.

(+Hh) Labajā pusē parādīts kaskādes modelis, kad Hh signālproteīns piesaistās un izraisa receptora Ptch degradāciju endosomā, kā rezultātā aktivējas Smo, un ar *G Protein-Coupled Receptor Kinase 2* (GRK2), *Arrestin Beta 2* (Arrb2), kā arī anterogrādā transporta motorbaltumvielas kinezīna 2 palīdzību gar mikrotubuliem ceļo primārajā skropstiņā, izraisot pilna garuma Gli proteīna, pārsvarā Gli2 transformāciju uz aktivējošo formu (Gli-A, attēlā zaļš), kas tālāk ieslēdz Hedgehog mērķa gēnu transkripciju. Šūnas virsmas proteīns *Hedgehog Interacting Protein* (Hhip) konkurējoši saista Hh ligandu, tādējādi ierobežojot tā darbības rajonu. Savukārt *Growth arrest-specific 1* (GAS1), *Cysteine dioxygenase* (CDO) un *Brother Of CDO* (Boc) olbaltumvielas šūnas virsmā pastiprina Hh signālu plūsmu.

1.6. attēls. Hh signālceļa struktūra (Teglund and Toftgård, 2010)

1.6.2 Pētījumu dati par Hh signālceļa aktivāciju sīkšūnu plaušu vēža cilmšūnās

Daudzsološa ir hipotēze, ka parastas vēža šūnas var iegūt vēža cilmšūnu īpašības (ieskaitot rezistenci uz pretvēža līdzekļiem) (Zhou et al., 2001, Bunting et al., 2000), pateicoties signāliem, ko izdala apkārt esošas vēža vai audzēja stromas šūnas (Alison et al., 2012) (1.7. attēls).



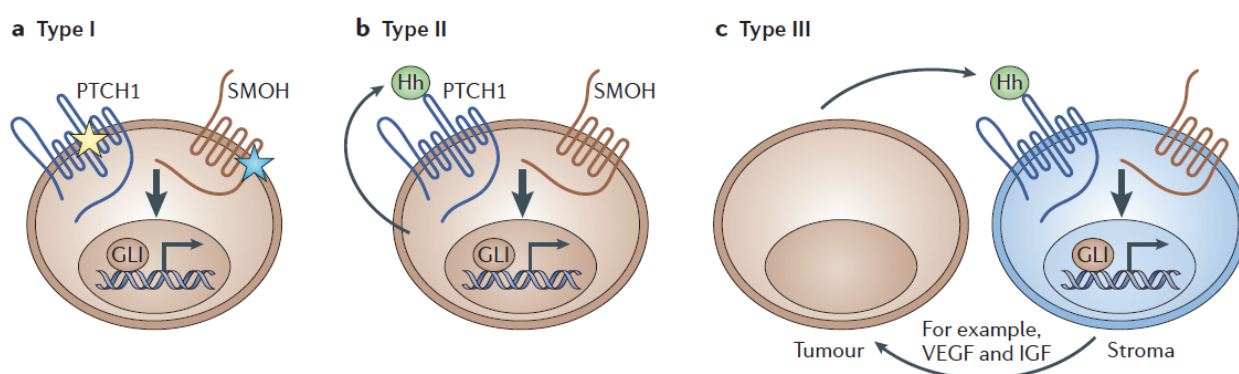
- Vēža cilmšūna (attēlā sarkana) asimetriski dalās uz vienu identisku cilmšūnu un otru tranzīta proliferējošu šūnu (attēlā zaļa). Tranzīta proliferējošās šūnas var dalīties noteiktu reizi skaitu pirms visas izveido nobriedušas šūnas ar galīgo diferenciaciju (attēlā dzeltena). Vēža cilmšūna var dalīties arī simetriski uz divām identiskām meitas cilmšūnām.
- Atsevišķas vēža cilmes šūnas var iegūt jaunas mutācijas, kas dos sākumu jaunai vēža šūnu klonālai populācijai ar atšķirīgu ģenētisku identitāti.
- Tranzīta proliferējošās vai pat diferencētas šūnas var iegūt cilmšūnu īpašības signālu dēļ, ko izdala apkārt esošas vēža vai audzēja stromas šūnas, piemēram, vēža asociētie fibroblasti (*cancer-associated fibroblasts* - CAFs).

1.7. attēls. Parakrīns vēža cilmšūnu attīstības modelis (Alison et al., 2012)

Hh signālceļa intraepitēliāla aktivācija eksperimentos ar dzīvniekiem ir vērojama gļotādas reģenerācijas procesā, kas liek domāt par tā izmantošanu normāli klusējošās šūnās, atjaunojot elpceļu epitēliju pēc bojājuma. Interesanti, ka šie paaugstinātas Hh signālceļa aktivitātes reģioni atbilst plaušu neuroendokrīno cilmšūnu lokalizācijas vietai - bronhiolu bifurkācijās novietotajiem neuroendokrīnajiem ķermenīšiem. Dzīvnieku modelī tika apstiprināta Hh signālu aktivācija embrionālas attīstības laikā, novirzot elpceļu epitēlija priekšteču šūnas neuroendokrīnas diferenciacijas ceļā, kā arī pieaugušai pelei pastāvīgi zema šī signālceļa līmeņa aktivitāte vērojama bazāli lokalizēto epitēliālo šūnu nelielā daļā. Ņemot vērā sīkšūnu plaušu vēža neuroendokrīno dabu, tika izvirzīta hipotēze, ka liela nozīme tā attīstībā ir tieši neuroendokrīno cilmšūnu defektiem, un izmainīta Hh signālceļa aktivitāte šeit var būt viens no galvenajiem faktoriem.

Imūnhistoķīmiski izmeklējot desmit sīkšūnu plaušu vēža pacientu paraugus, piecos no tiem tika konstatēta intraepiteliāla Shh un Gli1 (*Glioma-Associated Oncogene Homolog 1*) ekspresija, kas liecina par Hh signālceļa aktivāciju. Jāpiebilst, ka līdzīgu Shh un Gli1 ekspresiju izdevās konstatēt tikai 4 no 40 ne-sīkšūnu vēža paraugiem (Watkins et al., 2003b). Šie dati netieši liecina par Hh signālceļa aktivāciju plaušu audzējos, lielākā mērā tieši sīkšūnu plaušu vēzī.

Tālāki pētījumi ar sīkšūnu plaušu vēža dzīvnieku modeļiem vairāk norādīja uz Hh signālceļa aktivāciju caur parakrīno vai autokrīno mehānismu (1.8. attēls) (Barakat et al., 2010, Rubin and de Sauvage, 2006), nevis aktivējošo mutāciju dēļ, kas tika konstatētas pie citiem audzējiem. Sīkšūnu plaušu vēža šūnas *in vivo* demonstrē skaidru novietojuma segregāciju atkarībā no Shh signālu raidīšanas un uztveršanas, līdzīgi kā novēro elpceļu attīstības un reģenerācijas laikā (Watkins et al., 2003a).



Var būt vairāku tipu Hh signālceļa aktivācijas mehānismi audzējos:

- Signālceļa komponentu mutācija. Inhibējošo proteīnu tādu kā PTCH1 (*Protein Patched Homolog 1*) inaktivējošas mutācijas vai pozitīvo regulētāju tādu kā SMOH jeb Smo (*Smoothened*) aktivējošas mutācijas.
- Autokrīna aktivācija jeb Hh signālproteīna (Shh) pārekspressija vēža šūnā, kas aktivē Hh signālceļu šajā pašā vēža šūnā. Tas var notikt visās audzēja šūnās vai uzturēt tikai vēža cilmsūnu funkcionēšanu.
- Parakrīna aktivācija jeb Shh pārekspressija vēža šūnā izraisa Hh signālceļa aktivāciju blakus esošajās audzēja stromas šūnās un tās sāk ražot augšanas faktorus (piem. IGF – *insulin-like growth factor*; VEGF – *vascular endothelial growth factor*), kas atgriezeniski stimulē tālāku audzēja izdzīvošanu vai augšanu.

1.8. attēls. Dažādi Hh signālceļa aktivācijas modeļi audzējos (Rubin and de Sauvage, 2006)

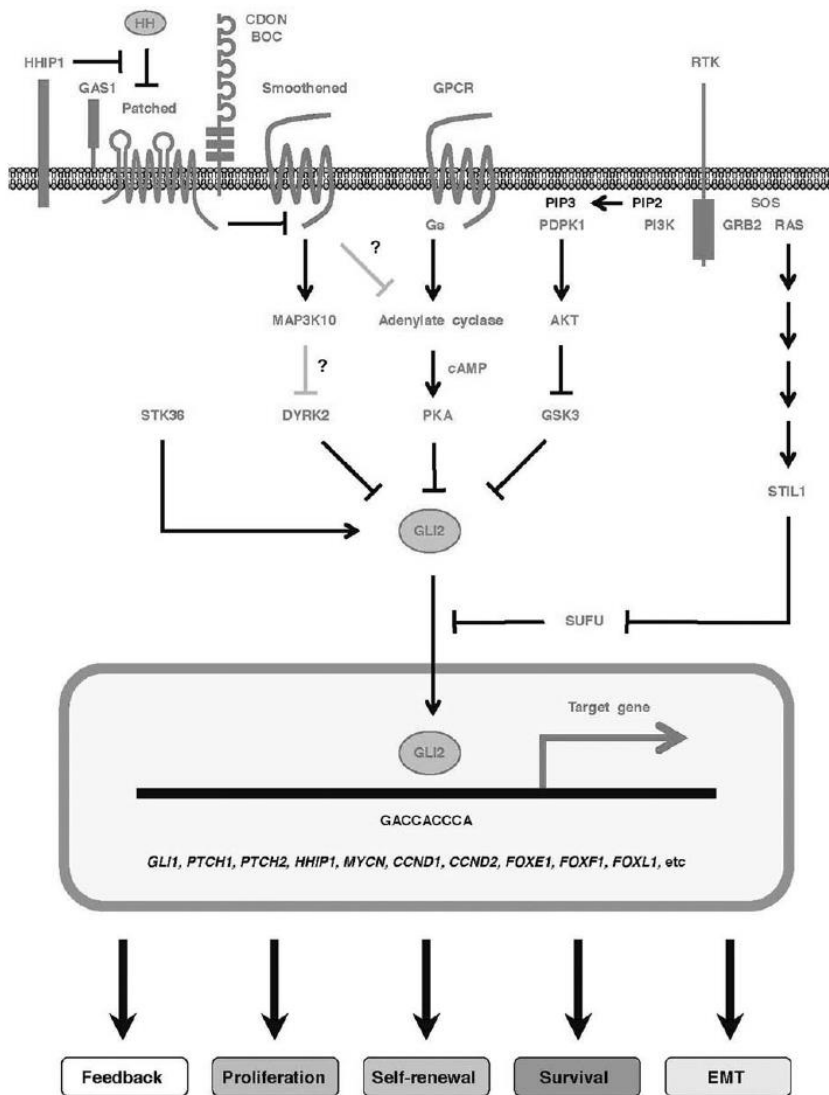
Hh signālceļa aktivācija tika konstatēta arī pētījumos ar sīkšūnu plaušu vēža šūnu līnijām, parādot, ka autokrīni signāli dažreiz saglabājas aktīvi *in vitro* (Pasca di Magliano and Hebrok, 2003). Hh signālceļa nomākšana ar Smo inhibitoru steroīdu alkaloidu Ciklopamīnu vai monoklonālu anti-Hh antivielu, kas neļauj Hh piesaistīties pie Ptch, bloķēja šo šūnu līniju augšanu. Tāpat, sistēmiska terapija ar Ciklopamīnu bija efektīva sīkšūnu plaušu vēža šūnu līnijas ksenografa modelī imūndefektīvajai pelei (Watkins et al., 2003b).

Interesants bija Tian et al. pētījums, kur autori izdalījuši vēža cilmsūnām līdzīgu „blakus populāciju” adenokarcinomas HCC šūnu līnijai un sīkšūnu plaušu vēža H1339 šūnu līnijai. Hh signālceļa aktivatoru Smo izdevās konstatēt tikai BP šūnās un tieši šo šūnu augšanu efektīvi mazināja Smo inhibitors GDC-0449 (Tian et al., 2012). Tomēr jāpiebilst, ka Hh signālceļa aktivitāte proteīnu līmenī *in vitro* šūnu līnijās un dzīvnieku modeļos ir reta parādība. Tā, piemēram, pētījumā ar 20 sīkšūnu plaušu vēža šūnu līnijām Gli1 proteīns, ko pētījumos izmanto kā Hh signālceļa aktivitātes marķieri, tika konstatēts tikai vienā. Turpretī, tajā pašā pētījumā, imūnhistoķīmiski izmeklējot 40 sīkšūnu plaušu vēža pacientu paraugus, Gli1 proteīna ekspresija tika konstatēta 34 (85%) no tiem (Vestergaard et al., 2006). Tik liela atšķirība likusi pētniekiem secināt, ka šūnu līnijas un no tām izveidoti ksenografi neatspoguļo reālu Hh signālceļa stāvokli sīkšūnu plaušu vēzī *in vivo*, un, visticamāk, kļūstot dzīvotspējīgām *in vitro*, sīkšūnu plaušu vēža šūnas zaudē svarīgāko Hh signālceļa komponentu ekspresiju.

Lielākais publicētais pētījums, kas analizējis Hh signālceļa *in vivo* aktivitāti 172 plaušu vēža pacientu (tajā skaitā 13 sīkšūnu plaušu vēža pacientu) paraugos, ir uzrādījis paaugstinātu Shh liganda saturu gan mRNS, gan proteīna līmenī 127 no 172 (73%) audzējiem kopumā un 10 no 13 (77%) sīkšūnu plaušu vēža paraugiem (Chi et al., 2006). Pētot Hh signālceļa atsevišķu citu gēnu (*Hhip*, *Ptch1*, *Gli1*) ekspresiju mRNS/proteīnu līmenī, nav bijis iespējams korelēt to aktivitāti ar Shh liganda ekspresiju. Tā, piemēram, nosakāmas Shh ekspresijas nebija piecos no 16 audzējiem, kur tika konstatēta vismaz 2 no 3 Hh signālceļa aktivitāti norādošo gēnu ekspresija (*Ptch1* + *Gli1* vai *Hhip*). Un arī otrādi, pie izteiktas Shh ekspresijas bieži netika konstatēta *Ptch1*, *Gli1* vai *Hhip* gēnu aktivitāte. Viennozīmīgi šajā pētījumā tika pierādīts tikai tas, ka Hh signālceļa gēnu ekspresija notiek tieši audzēja šūnās, nevis stromas šūnās.

1.6.3 Hh signālceļa aktivācijas iespējamie iemesli

Augstākminētais liek secināt, ka paaugstinātu Hh signālceļa aktivitāti izraisa vēl nenoskaidrotas aktivējošas/inaktivējošas mutācijas tā komponentu kodējošos gēnos un/vai epiģenētiskie/pēc-transkripcijas traucējumi (1.9. attēls) (Kato and Kato, 2009a). Šajā sakarā nevar nepieminēt pēc-transkripcijas gēnu noklusināšanu ar pēdējos gados arvien aktuālākām audzēju miRNS (mikroRNS). Tās ir audzēja šūnu producētas endogēnas 19-22 nukleotīdu garas nekodējošas RNS molekulas, kas komplementāri piesaistās pie mērķa mRNS, izraisot tās degradāciju vai translācijas inhibīciju (Garzon et al., 2010, Krol et al., 2010, Zandberga et al., 2013). Sīkšūnu plaušu vēža pacientiem miR-92a-2* tika novērota statistiski ticami saistība ar rezistenci uz ķīmijterapiju un nelabvēlīgu prognozi (Ranade et al., 2010).



Hh signālproteīna (HH) inducēta Ptch (*Patched*) degradācija izraisa Smo (*Smoothened*) un MAP3K10 (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 10*) aktivāciju, kas, savukārt, samazina PKA (*protein kinase A*), GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) vai DYRK2 (*Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 2*) mediētu Gli (*Glioma-Associated Oncogene Homolog*) inhibīciju un noved pie aktivējošās Gli proteīna formas (pārsvarā Gli2) stabilizācijas un akumulācijas šūnas kodolā.

RTK (*Receptor tyrosine kinase*) signālceļš potencē Hh aktivitāti, samazinot GSK3 aktivitāti caur PI3K/AKT signāliem vai arī samazinot otrā inhibitora - SuFu (*Suppressor Of Fused Homolog*) aktivitāti caur RAS (*Rat sarcoma virus*) - STIL1 (*STIL Centriolar Assembly Protein*) signāliem.

GPCR (*G Protein-Coupled Receptor*) – Gs (*Glutamine Synthase*) signālceļš mazina Hh aktivitāti, pastiprinot Gli inhibējošās PKA darbību caur cAMP (*Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate*).

Aktivējošā Gli forma šūnas kodolā piesaistās pie GACCACCCA nukleotīdu secības un regulē dažādu mērķa gēnu transkripciju, kas ir iesaistīti tādos svarīgos šūnu procesos kā homeostāzes uzturēšana, proliferācija, pašatjaunošanās, izdzīvošana un Epitēliālā-uz-mezenhimālo pāreja (*Epithelial-to-mesenchymal transition – EMT*).

1.9. attēls. Hh un citu šūnas molekulāro signālceļu mijiedarbība (Katoh and Katoh, 2009)

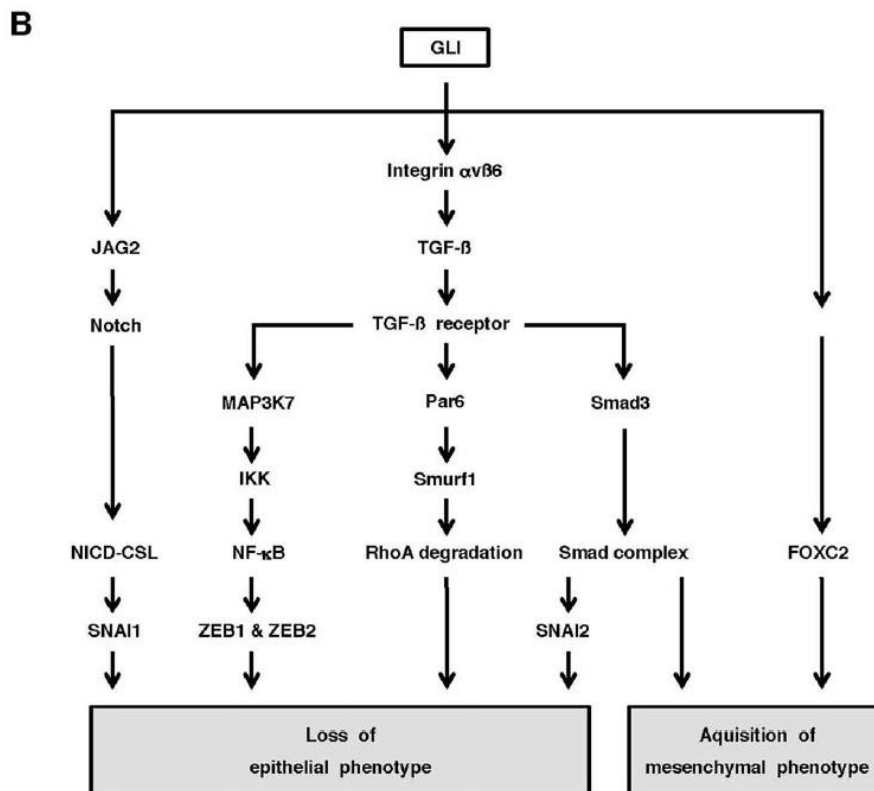
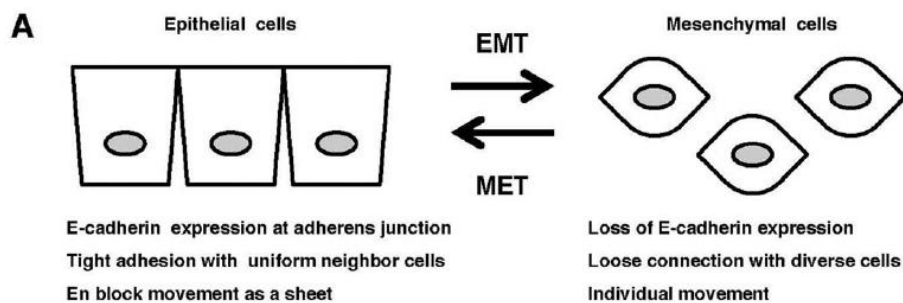
1.6.4 Hh signālceļa aktivācijas saistība ar rezistenci uz pretvēža terapiju pētījumos ar citiem audzējiem

Hh signālceļa paaugstinātas aktivitātes tieša un netieša saistība ar rezistenci uz pretvēža terapiju un agresīvāku slimības gaitu tika uzrādīta arī pētījumos ar citiem audzējiem.

Piemēram, Gli1 proteīna ekspresija krūts audzēju paraugos statistiski ticami korelēja ar lielāku audzēja stadiju, metastāžu skaitu paduses limfmezglos un īsāku dzīvildzi ([ten Haaf et al., 2009](#)). [Sims-Mourtada et al.](#) novēroja ievērojamu Shh un Gli1 ekspresijas palielināšanos lielākajā daļā reziduālo barības vada adenokarcinomu pēc saņemtas staru-ķīmijterapijas, kā arī Hh signālceļa aktivizēšanās tika novērota barības vada vēža ksenografta modelī repopulācijas laikā pēc staru-ķīmijterapijas ([Sims-Mourtada et al., 2006](#)). Barības vada adenokarcinomas un prostatas vēža šūnu līniju stimulācija ar Shh ligandu pastiprināja Hh signālceļa transkripcijas faktora Gli1, kā arī multizāļu rezistences gēnu ABCB1 jeb MDR1 jeb p-glikoproteīns un ABCG2 jeb BCRP1 (breast cancer resistance protein 1) ekspresiju. Savukārt, bloķējot Hh signālus ar Gli1 specifisku siRNS (*Gli-1-specific small interfering RNA*) vai pievienojot šūnu līnijai Ciklopamīnu (Hh signālceļa nespecifisku inhibitoru), tika panākta Gli1 un arī abu multizāļu rezistences gēnu ekspresijas samazināšanās ([Sims-Mourtada et al., 2007](#)). [Yoshikawa et al.](#) pētījumā plakanšūnu barības vada vēža pacientiem, kas saņēma pirmsoperācijas staru-ķīmijterapiju, Gli1 ekspresija audzēja šūnās bija spēcīgs un neatkarīgs riska faktors agrīnam recidīvam un sliktai prognozei pēc ārstēšanas ([Yoshikawa et al., 2008](#)). Pacientiem, kas saņēma paliatīvu staru-ķīmijterapiju sakarā ar anālā kanāla vēzi, tika atrasta Shh, Gli1 un NF-kappaβ ekspresijas saistība ar slimības laiku līdz progresijai ([Ajani et al., 2010](#)).

1.6.5 Hh signālceļa saistība ar EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*), anti-apoptotisku BCL2 (*B-cell Lymphoma 2*) proteīnu un cilmšūnu funkcionālo marķieri BMI1

Interesanti, ka NF-kappaβ ir TGF-β - MAP3K7 - IKK - NF-κB - ZEB1/ ZEB2 signālceļa sastāvdaļa, un šī kaskāde tiek aktivēta ar Hh signāliem. Hh signālceļš tieši vai pastarpināti ietekmē arī FOXC2 un SNAI1/SNAI2, kuri kopā ar ZEB1/ZEB2 ir atbildīgi par epiteliālās-uz-mezenhimālo pārejas norisi audzēja šūnās. EMT nodrošina audzēja šūnu invāzijas īpašības un metastazēšanos organismā, bet attālos orgānos vēža šūnu kolonizācija parasti notiek ar pretējās mezenhimālās-uz-epiteliālo pārejas palīdzību (2.0. attēls) ([Katoh and Katoh, 2009a](#)).

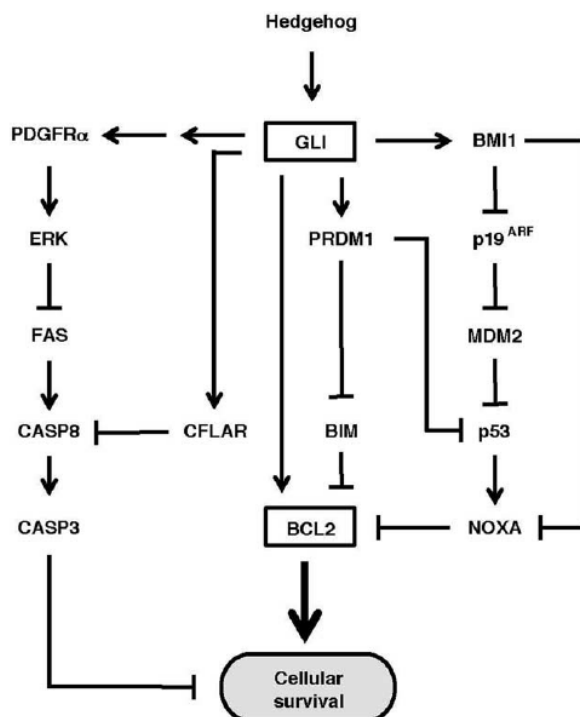


(A) Shematisks attēls Epiteliālās-uz-mezenhimālo pārejai (EMT) un Mezenhimālās-uz-epiteliālo pārejai (MET). EMT gadījumā šūnas ar epiteliālām īpašībām (E-kadherīna ekspresija blakus esošo šūnu savienojuma vietās, kas nodrošina šūnu ciešu savstarpējo adhēziju un pārvietošanu vienā blokā kā loksne) iegūst mezenhimālo šūnu īpašības (zaudē E-kadherīna ekspresiju, šūnas vairs nav cieši saistītas viena ar otru un attiecīgi pārvietojas neatkarīgi viena no otras). MET gadījumā process notiek otrādi – šūnas ar mezenhimālām īpašībām iegūst epiteliālo šūnu fenotipu.

(B) EMT process, ko izraisa *Hedgehog* signālceļa galvenā transkripcijas mērķa Gli (*Glioma-Associated Oncogene Homolog*) iedarbība uz multipliem EMT regulatoriem - SNAI1 un SNAI2 (*Snail Family Transcriptional Repressor 1 and 2*), ZEB1 un ZEB2 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 and 2*) un FOXC2 (*Forkhead Box C2*).

2.0. attēls. Hh signālceļš un EMT (Epithelial-to-mesenchymal transition) (Katoh and Katoh, 2009)

Ļaundabīgo šūnu gēnu ekspresijas analīze B-šūnu hroniskās limfocitārās leikozes pacientiem uzrādīja paaugstinātu Hh signālceļa aktivitāti un tā signālmolekulu Gli1, SuFu transkriptu pārekspresija korelēja ar citiem sliktākas prognozes riska faktoriem, tādiem kā CD38 ekspresija un citoģenētiskas izmaiņas (Hegde et al., 2008). Šajā, kā arī virknē citu pētījumu tika konstatēta Hh signālceļa saistība ar svarīgu anti-apoptotisku BCL2 (*B-cell Lymphoma 2*) gēnu ekspresiju. Kopā ar vēl vienu cilmsūnu funkcionālo marķieri BMI1, kas ir polikombu grupas (*Polycomb group*) proteīns un ir iesaistīts hromatīna remodelācijā un epiģenētiskā dažādu gēnu noklusināšanā, tas nodrošina audzēja šūnu rezistenci uz apoptozi (2.1. attēls) (Kato and Katoh, 2009a). Interesanti, ka BMI1 ekspresija citā pētījumā ar 64 sīkšūnu plaušu vēža paraugu kohortu tika konstatēta 63 (98.4%) no 64 audzējiem (Koch et al., 2008). Savukārt, BCL2 gēna pārekspresija tika aprakstīta 75-95% sīkšūnu plaušu audzēju un parasti ir saistīta ar BCL2 lokusa gēna amplifikāciju 18. hromosomā (18q21). BCL2 inhibīcija uzrāda pretvēža aktivitāti sīkšūnu plaušu vēža līnijās un ksenograftos (Pietanza and Rudin, 2012).



Hedgehog signālceļa galvenais transkripcijas mērķis Gli (*Glioma-Associated Oncogene Homolog*) veicina vēža šūnu un īpaši vēža cilmsūnu izdzīvošanu, ietekmējot vairākus apoptozes regulātorus:

- 2 anti-apoptotisko proteīnu tiešā aktivācija - BCL2 (*B-cell Lymphoma/Leukemia-2*) un CFLAR (*CASP8 And FADD Like Apoptosis Regulator*)
- vairāku pro-apoptotisko proteīnu nomākšana caur BMI1 (*BMI1 polycomb ring finger oncogene*), PRDM1 (*PR/SET Domain 1*) un PDGFRα (*Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*) - ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) signāliem. Rezultātā samazinās FAS (*Fas Cell Surface Death Receptor*), BIM (*BCL2-Interacting Mediator Of Cell Death*), p19, ARF (*ADP Ribosylation Factor*), p53 un NOXA jeb PMAIP1 (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*) aktivitāte un vēža šūna nevar realizēt «programmētās nāves» procesu.

2.1. attēls. Hh signālceļa saistība ar BCL2 un BMI1 (Kato and Katoh, 2009)

2. MATERIĀLS UN METODEDES

2.1. Klīnisko prognostisko faktoru un ārstēšanas rezultātu analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā

Pētāmā grupa

Retrospektīvā pētījumā apkopoti 100 secīgi pirmreizējie pacienti ar morfoloģiski pierādītu sīkšūnu plaušu vēzi (C34), kas multidisciplinārajā konsīlijā bija nozīmēti specifiskai terapijai Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā laika posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada decembrim (Kozirovskis et al., 2012). Dati iegūti no medicīniskās dokumentācijas – multidisciplināro konsīliju slēdzieniem, ambulatorajām kartēm, dienas stacionāra un stacionāra kartēm, programmas “Ārstu birojs”, radioloģisko izmeklējumu atbilžu programmas “AI-RIS PSKUS”. Pacientu nāves datumi iegūti no Nacionālā veselības dienesta Pētniecības un statistikas departamenta datu bāzes “PREDA”.

Iekļaušanas kritēriji:

1. Pacientam morfoloģiski (histoloģiski vai citoloģiski) pierādīts sīkšūnu plaušu vēzis.
2. Pacients multidisciplinārajā konsīlijā bija nozīmēts specifiskai terapijai (“*Intention-To-Treat*” grupa).

Jāuzsver, ka šeit netika analizēti pacienti, kam jau sākotnēji pēc diagnozes noteikšanas nebija iespējama ķīmijterapija un kam pēc literatūras datiem vidējā dzīvildze bez ārstēšanas vai pielietojot tikai lokālo terapiju (ķirurģiska vai staru terapija) ir no 1 līdz 3 mēnešiem kopš diagnozes brīža (Zelen, 1973).

Datu iegūšanas metodes:

Tika apkopoti dati par vecumu, dzimumu, diagnostiskas procedūras veidu un datumu, veselības aprūpes iestādi, kur veikta diagnostika, stadiju un metastāžu lokalizāciju, pacientu vispārējo stāvokli pēc ECOG skalas (Oken et al., 1982), laiku no diagnozes līdz specifiskās terapijas uzsākšanai, saņemtās ķīmijterapijas veidu un līniju skaitu, saņemtās staru terapijas veidu, radioloģiskajos izmeklējumos apstiprinātu labāko atbildes reakciju uz saņemto terapiju un nāves datumu.

Statistiskā analīze

Iegūtos rezultātus ievadīja MS Excel datu bāzē, statistiskā analīze veikta, izmantojot MedCalc statistiskās analīzes programmu, v.10.2.0.0 (MedCalc Software, Ostend, Beļģija). Kopējo dzīvildzi (OS) aprēķināja un salīdzināja, izmantojot Kaplana-Meijera metodi un *log-rank* testu. Korelāciju analīzi veica, izmantojot Cox proporcionālā riska regresijas metodi.

2.2. Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors

Pētāmā grupa

Prospektīvs pētījums, kurā iekļauti 12 pirmreizējie pacienti ar histoloģiski pierādītu III un IV stadijas sīkšūnu plaušu vēzi, kas ir piekrituši pētījuma audzēja biopsiju paraugu iegūšanai diagnostiskas fibrobronhoskopijas laikā no 2010. gada oktobra līdz 2014. gada janvārim un kuri vēlāk saņēma specifisku terapiju Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā. Pirmsterapijas pētījuma biopsijas tika iegūtas 20 pacientiem. Pēc iekļaušanas kritēriju izvērtēšanas 8 pacienti tika izslēgti no analīzes, jo 5 pacientiem pētījuma biopsijā vēža šūnu klātbūtne nebija citoloģiski apstiprināta un vēl 2 pacientiem tika iegūta sliktas kvalitātes parauga RNS. 1 pacients nomira agrīni ārstēšanas laikā no ar vēzi nesaistītiem iemesliem un arī tika izslēgts no analīzes.

Iekļaušanas kritēriji:

1. Parakstīta pacienta informētās piekrišanas lapa
2. Pacientam histoloģiski pierādīts III vai IV stadijas sīkšūnu plaušu vēzis.
3. Citoloģiski apstiprināta vēža šūnu klātbūtne pētījuma biopsijā, izmeklējot parauga nospiedumu uz priekšmetstikliņa pirms ievietošanas konservantā.
4. Labas kvalitātes RNS pētījuma biopsijā.
5. Pacients ir saņēmis vismaz divus paliatīvās ķīmijterapijas kursus.
6. Pacientam ir veikti kontroles izmeklējumi dinamiskā un fiksētā progresijas un nāves datumā.

Datu iegūšanas metodes:

1. Tika apkopota klīniskā informācija par pētījuma pacientu vecumu, dzimumu, stadiju un metastāžu lokalizāciju, pacientu vispārējo stāvokli pēc ECOG skalas, saņemto specifisku terapiju, radioloģiskajos izmeklējumos apstiprinātu labāko atbildes reakciju uz saņemto terapiju, novirzes saņemtās ķīmijterapijas devās un intervālos, slimības progresijas laiku/veidu un nāves datumu.
2. Pētījuma audzēja biopsiju paraugi pēc paņemšanas un nospieduma uz citoloģijas stikliņa izdarīšanas tika ievietoti RNS konservantā – RNAlater solution (*Thermo Fisher Scientific, USA*) un līdz analīzei uzglabāti -20°C .
3. Pētījuma biopsijas audu mRNS sagatavošana ar Lysing Matrix D (*MP Biomedicals, USA*) tika veikta audu homogenizātorā (*FastPrep®-24 Instrument*) ar ātrumu 0.4 m/s 40 sekunžu laikā. Kopējā RNS tika izolēta ar MirVana total RNA Isolation Kit (*Thermo Fisher Scientific, USA*) atbilstoši ražotāja protokolam. RNS tika apstrādātā ar DNase I (*Thermo Fisher Scientific, USA*) un RNS koncentrācija un tīrības pakāpe tika noteikta Nanodrop ND-100 spektrofotometrā. cDNS tika sintezēta, izmantojot nejaušus heksamēru praimērus no kopējās RNS 1 μg , izmantojot Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit (*Thermo Fisher Scientific, MA, USA*) atbilstoši ražotāja instrukcijām.
4. Reālā laika kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija (qPCR) tika veikta, izmantojot 2 μl 1:10 atšķaidītus cDNA reakcijas maisījumus, ABSolute Blue™ SYBR green Low ROX (*Thermo Fisher Scientific, USA*) un ViiA 7 real-time polymerase chain reaction system (*Applied Biosystems, Life Technologies, USA*). Ekspresijas datu normalizācijai

tika aprēķināts normalizācijas faktors katram cDNS no 3 visstabilāko references gēnu (*ACTB*, *LRP10*, *YWHAZ*) ekspresijas līmeņiem, kas tika atlasīti no 7 biežāk lietotiem endogēnās kontroles gēniem ar geNorm programmatūru. Visi salīdzinošie reālā laika qPCR eksperimenti tika veikti dublikātos un dati tika analizēti kā to vidējās vērtības \pm standartnovirzes.

Statistiskā analīze

Datu statistiskajai apstrādei vispirms izveidoja datubāzi datorprogrammā MS Excel, pēc tam datus konvertēja profesionālajā pētījumu datu statistiskās apstrādes programmā SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) for Windows 21.0 versijā. Vidējo kopējo dzīvildzi aprēķināja, izmantojot Kaplana-Meijera metodi un *log-rank* testu. Pēc aprēķinātas vidējās kopējās dzīvildzes pacientus sadalīja īsas dzīvildzes un garas dzīvildzes grupās. Veicot salīdzinošo analīzi, atkarībā no mainīgo vērtību tipa izmantoja Stjudenta (t-testu) vai hī kvadrāta (χ^2) testu. mRNS ekspresijas līmeņa vidējās vērtības katram Shh signālceļa asociētajam gēnam (*Gli1*, *SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) salīdzināja īsas dzīvildzes un garas dzīvildzes grupu pacientu pirmsterapijas pētījuma audzēja biopsiju paraugos, izmantojot neatkarīgo paraugkopu t-testu un aprēķinot 95% ticamības intervālu. Visu hipotēžu pārbaudēs izmantoja abpusējās (2-tailed) statistiskās hipotēzes, un atšķirības starp grupām tika uzskatītas par būtiskām pie $p < 0,05$.

2.3. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā

Pētāmā grupa

Punktā 2.2 aprakstīto pētījuma pacientu apakšgrupa no 3 sīkšūnu plaušu vēža slimniekiem, kam tika iegūti pētījuma audzēja biopsiju paraugi pirms terapijas un recidīva laikā.

Iekļaušanas kritēriji:

1. Visi punktā 2.2 aprakstītie iekļaušanas kritēriji.
2. Citoloģiski apstiprināta vēža šūnu klātbūtne recidivējoša audzēja pētījuma biopsijā, izmeklējot parauga nospiedumu uz priekšmetstikliņa pirms ievietošanas konservantā.
3. Labas kvalitātes RNS recidivējoša audzēja pētījuma biopsijā.

Datu iegūšanas metodes:

1. Visas punktā 2.2 aprakstītas datu iegūšanas metodes

Statistiskā analīze

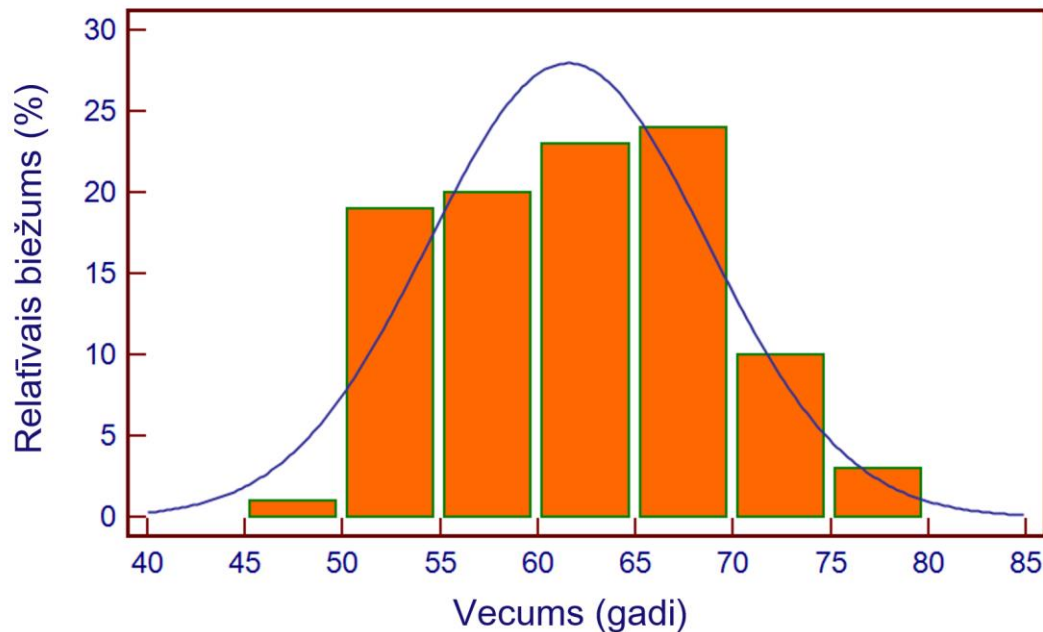
Iegūtos rezultātus ievadīja MS Excel datu bāzē, veikta statistiskā analīze, izmantojot MedCalc statistiskās analīzes programmu, v.10.2.0.0 (*MedCalc Software, Ostend, Beļģija*). Veicot salīdzinošo analīzi, atkarībā no mainīgo vērtību tipa izmantoja Stjudenta (t-testu) vai hī kvadrāta (χ^2) testu. mRNS līmeni katram Shh signālceļa saistītajam gēnam (*Gli1, SMO, SUFU, PTCH1, HHIP, BCL2, BMI1, ZEB1, ZEB2, N-MYC, Twist1*) salīdzināja viena un tā paša pacienta pirmsterapijas un recidivējoša pētījuma audzēja biopsiju paraugos, izmantojot divu sapārotu paraugkopu t-testu. Katra Shh signālceļa saistītā gēna ekspresijas līmeņa vidējās vērtības arī salīdzināja visos pirmsterapijas un recidivējošos paraugos, aprēķinot 95% ticamības intervālu. Visu hipotēžu pārbaudēs izmantoja abpusējās (*2-tailed*) statistiskās hipotēzes, un atšķirības starp grupām tika uzskatītas par būtiskām pie $p < 0,05$.

3. REZULTĀTI

3.1. Klīnisko prognostisko faktoru analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā

100 secīgi pirmreizējie pacienti ar morfoloģiski pierādītu sīkšūnu plaušu vēzi, kas multidisciplinārajā konsīlijā bija nozīmēti specifiskai terapijai Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā laika posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada decembrim tika iekļauti retrospektīvā pētījumā.

Iekļauto pacientu vidējais vecums bija $61,52 \pm SD 7,13$ (47-77, 95% CI 60,1-62,9) gadi (3.10. attēls), no tiem 90 bija vīrieši (90 %) un 10 sievietes (10 %).



3.10. attēls. Pacientu sadalījums pa vecuma grupām

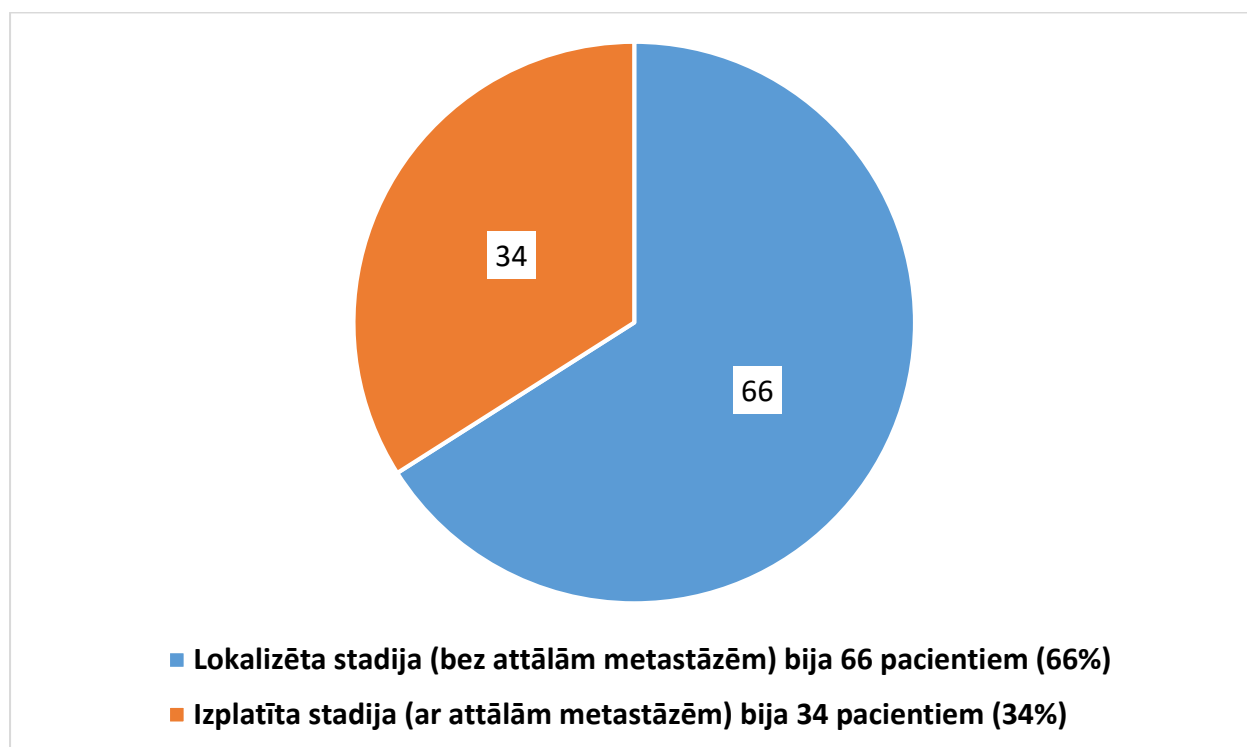
Pēc diagnostiskās procedūras veida slimības morfoloģiskai verifikācijai visbiežāk izmantoja fibrobronhoskopijas procedūru – 71 pacientam. 9 pacientiem tika veikta mediastinoskopija, 7 pacientiem supraklavikulāra limfmezgla biopsija, 5 pacientiem veiktas torakotomijas ar 3 diagnostiskām operācijām un 2 ārstnieciskām operācijām - 1 pneimonektomiju un 1 lobektomiju. Vienam pacientam metastātiska slimība morfoloģiski tika apstiprināta aknu veidojuma punkcijas biopsijas materiālā un vēl vienam pacientam galvas smadzeņu metastāzes rezekcijas materiālā.

87 pacientiem slimība tika pierādīta ar histoloģisko (imūnhistoķīmisko) biopsijas materiāla izmeklējumu, 13 pacientiem – tikai citoloģiski, nepietiekoši liela biopsijas parauga dēļ.

Pēc veselības aprūpes iestādes, kur tika veikta diagnostika, 93 pacienti bija no Paula Stradiņa KUS torakālās ķirurģijas, pneimonoloģijas un neiroķirurģijas nodaļām, bet 7

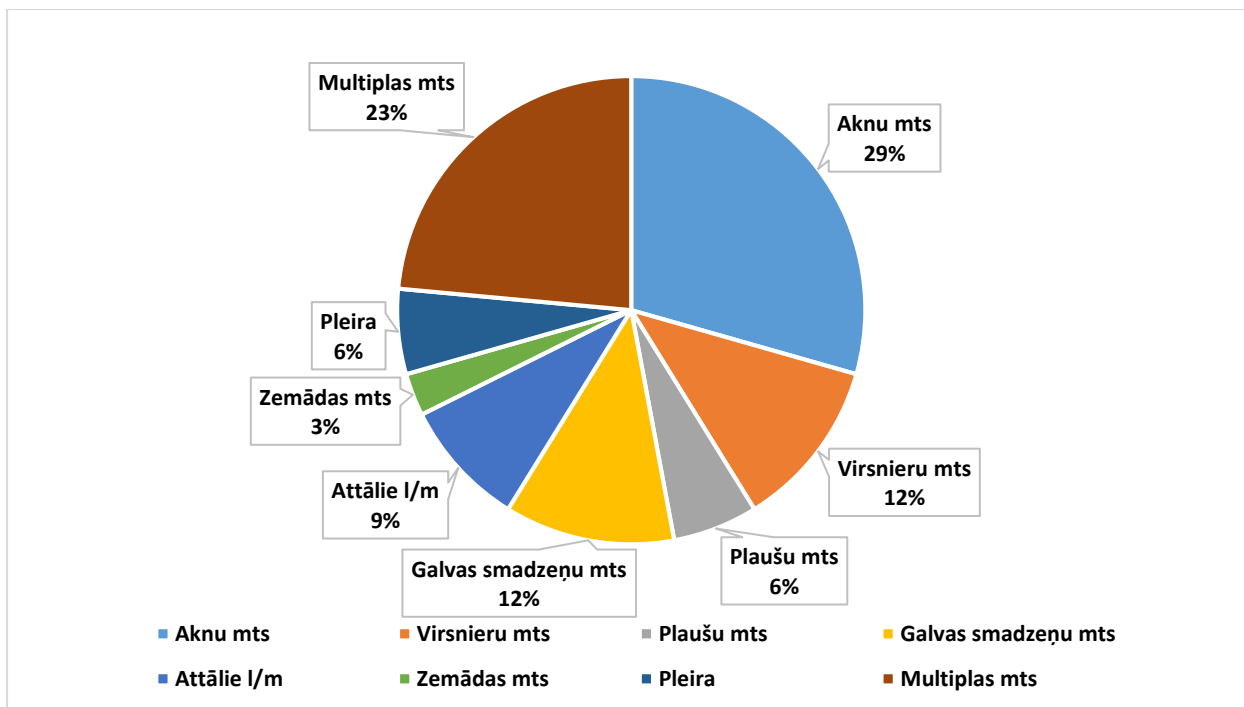
pacienti tika novirzīti no Rīgas 1. slimnīcas, Tuberkulozes un plaušu slimību centra, stacionāriem “Biķernieki” un “Gaiļezers”.

66 pacientiem (66%) bija lokalizēta sīkšūnu plaušu vēža stadija (bez attālām metastāzēm) un 34 pacientiem (34%) bija izplatīta slimības stadija (ar attālām metastāzēm) (3.11. attēls).



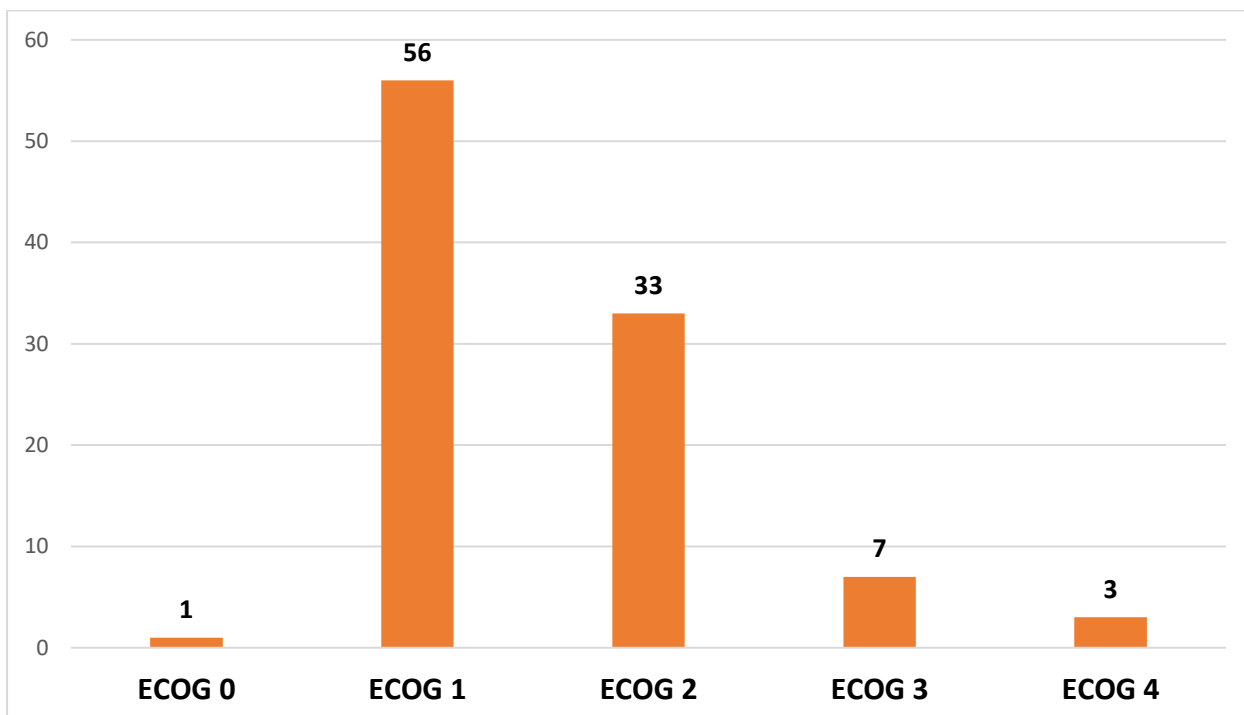
3.11. attēls. Pacientu sadalījums pa stadijām

Izplatītas stadijas pacientiem visbiežāk metastāzes novēroja izolēti aknās – 10 pacientiem (29%), tad sekoja kombinētas metastāžu lokalizācijas – 8 pacientiem (23%), metastāzes galvas smadzenēs - 4 pacientiem (12%), metastāzes virsnierēs - 4 pacientiem (12%), metastāzes plaušās - 2 pacientiem (6%), metastāzes ne-reģionālos limfmezglos - 3 pacientiem (9%), metastāzes pleirā - 2 pacientiem (6%) un vienam pacientam bija zemādas metastāzes (3%) (3.12. attēls). Interesanti, ka izolētas kaulu metastāzes pacientiem netika novērotas. 2 pacientiem bija kaulu + aknu metastāžu kombinācija un vēl vienam vienlaicīgi bija kaulu + plaušu metastāzes. 2 pacientiem metastāzes ne-reģionālos limfmezglos kombinējas ar aknu vai virsnieru metastāzēm. Pa vienam pacientam bija ar aknu + virsnieru, aknu + plaušu + zemādas un pleiras + perikarda metastāžu kombināciju.



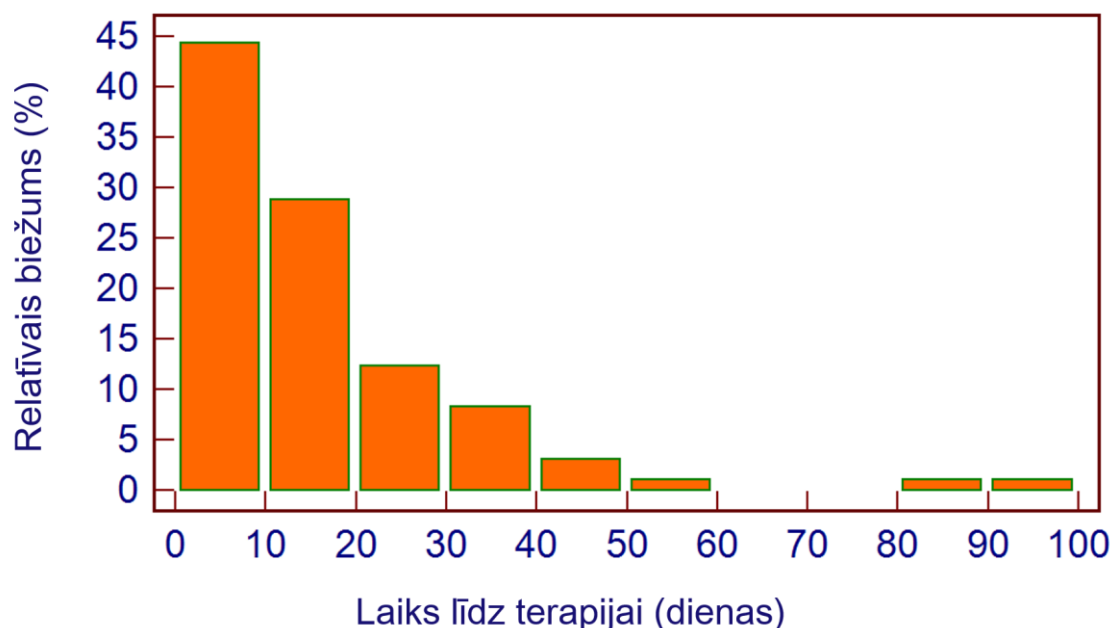
3.12. attēls. Metastāžu lokalizācija pētījumā iekļautajiem pacientiem (mts – metastāzes, l/m - limfmezgli)

Analizējot pacientu vispārējo stāvokli pēc ECOG skalas (Oken et al., 1982), visvairāk pētījuma populācijā bija slimnieku ar ECOG 1 – 56 pacienti un ECOG 2 – 33 pacienti. 7 pacienti bija ar ECOG 3, 3 – ar ECOG 4 un 1 – ar ECOG 0 (3.13. attēls). ECOG 4 pacienti specifisku terapiju nav saņēmuši, tika ārstēti simptomātiski.



3.13. attēls. Pacientu sadalījums pēc vispārējā stāvokļa pēc ECOG skalas

Pēc laika no diagnozes līdz specifiskās terapijas uzsākšanai vidējais gaidīšanas laiks pētījuma pacientiem bija $15,55 \pm SD 15,62$ (0-96, 95% CI 12,4-18,7) dienas (3.14. attēls).



3.14. attēls. Laiks no diagnozes līdz specifiskās terapijas uzsākšanai

Pēc saņemtās ķīmijterapijas veida un līniju skaita 97 pētījuma pacienti tika ārstēti ar 1. līnijas paliatīvu ķīmijterapiju (73 – PE shēmu, 19 – CE shēmu, 5 – CAV shēmu), 29 pacienti bija saņēmuši 2. līnijas terapiju (25 – CAV shēmu, 1 – CEA shēmu, 1 – PE shēmu, 2 – perorālu Etopozīdu). 6 pacienti bija saņēmuši ar 3. līnijas terapiju (1 – Topotekānu, 1 – Paklitakselu, 3 - perorālu Etopozīdu, 1 - perorālu Ciklofosfamīdu). 1 pacients bija saņēmis paliatīvas ķīmijterapijas 4. līniju ar Paklitakselu.

Staru terapiju primārajam audzējam un metastātiskiem videnes limfmezgliem bija saņēmuši 39 pētījuma pacienti. Tikai 1 pacients bija saņēmis vienlaicīgu staru-ķīmijterapiju, pārējiem pacientiem staru terapiju veica secīgi pēc pabeigtas ķīmijterapijas. Konsolidējoša profilaktiska galvas apstarošana tika veikta 9 pacientiem. 15 pacienti staru terapiju bija saņēmuši simptomātiski – audzēja vai metastāžu izraisīto simptomu mazināšanai.

Analizējot radioloģiskos izmeklējumus apstiprinātu labāko atbildes reakciju uz saņemto terapiju, pilna remisija tika sasniegta 5 lokalizētas stadijas pacientiem un 1 izplatītas stadijas pacientam, bet daļēja remisija attiecīgi bija 39 un 15 pacientiem. Aprēķinot atbildes biežumu uz terapiju pēc pilnas un daļējas remisijas kopā – tā tika novērota 67% lokalizētas stadijas pacientiem un 47% izplatītas stadijas pacientiem. Stabila slimība attiecīgi bija 12 un 3 pacientiem, bet slimības progresija – 11 lokalizētas stadijas pacientiem un 14 izplatītas stadijas pacientiem (3.11. tabula).

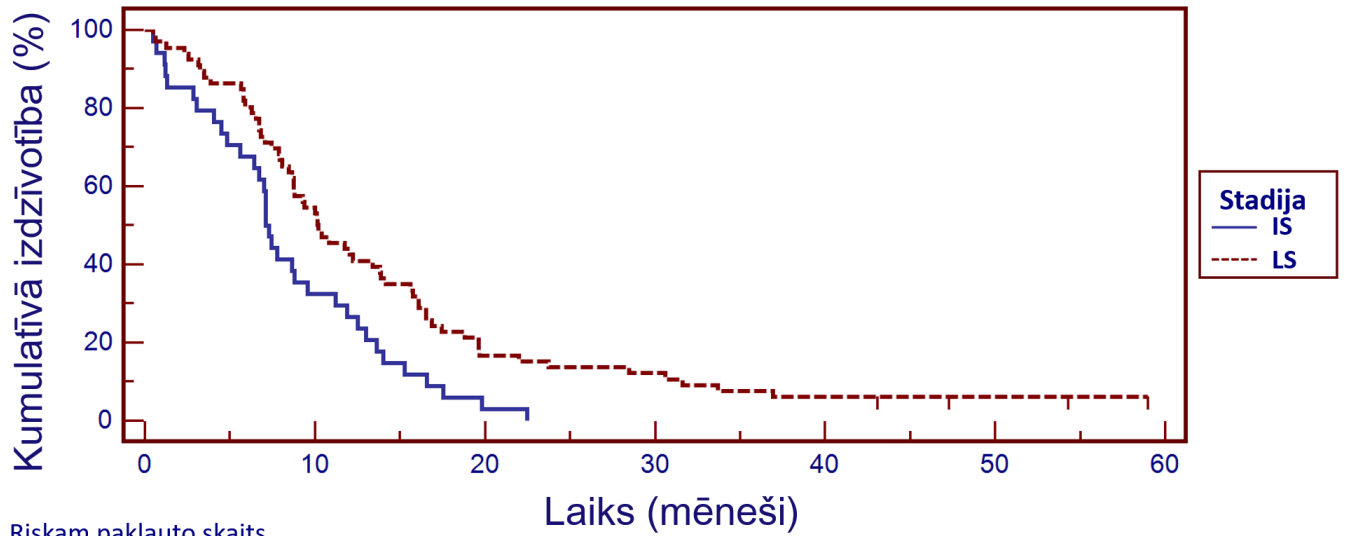
3.11. tabula. Radioloģiski apstiprināta vislabākā atbildes reakcija uz saņemto terapiju, atbildes reakcijas biežums un dzīvildzes dati pētījumā iekļautajiem pacientiem

Stadija	Pacienti	Labākā atbildes reakcija uz saņemto terapiju					Dzīvildze				
		CR	PR	SD	PD	Atbildes reakcijas biežums (CR+PR)	Vidējā dzīvildze (mēneši)	1 gada	2 gadu	3 gadu	5 gadu
LS	66	5	39	12	11	67%	10	42%	14%	6%	2,6%
IS	34	1	15	3	14	47%	7	27%	0%	-	-

LS - Lokalizēta stadija (bez attālām metastāzēm); IS - Izplatīta stadija (ar attālām metastāzēm); CR - complete response (pilna remisija); PR - partial response (daļēja remisija); SD - stable disease (stabila slimība); PD - progressive disease (slimības progresija)

Vidējā kopējā dzīvildze (mOS) pētījuma pacientiem ar lokalizētu stadiju bija 10,2 mēneši, 1 gada dzīvildze – 42%, 2 gadu dzīvildze – 14%, 3 gadu dzīvildze – 6%, 5 gadu dzīvildze – 2,6%, bet pacientiem ar izplatītu stadiju attiecīgi mOS bija 7,1 mēneši, 1 gada dzīvildze – 27%, 2 gadu dzīvildze – 0% (3.15. attēls un 3.11. tabula). Salīdzinot dzīvildzes datus, atšķirība starp stadijām bija statistiski ticama HR 2,03; 95% CI 1,25-3,29; p = 0,0041. Tikai 4 (2.6%) lokalizētas stadijas pacienti sasnieguši dzīvildzi virs 5 gadiem – 2 sievietes (33%) un 2 vīrieši (3%). Abām sievietēm terapijas rezultātā sasniegta daļēja remisija, viena paciente pazudusi no uzraudzības pēc 5,5 gadiem, bet otrā joprojām ir dzīva un bez slimības progresijas jau 13 gadus. Vienam ilgdzīvotājam vīrietim bija panākta pilna remisija un viņš ir pazudis no uzraudzības pēc 9 gadiem. Otram pacientam ar daļējo remisiju slimības progresijas nav jau 13,5 gadu laikā.

HR 2,03; 95 % TI 1,25-3,29; p = 0,0041. mOS 10,2 mēn. vs 7,1 mēn.



Riskam pakļauto skaits

Grupa: IS	34	11	1	0	0	0	0
Grupa: LS	66	36	11	8	4	2	1

LS - lokalizēta stadija (bez attālām metastāzēm); IS - izplatīta stadija (ar attālām metastāzēm); mOS – vidējā kopējā dzīvildze

3.15. attēls. Kaplana-Maijera kopējās dzīvildzes (OS) līkne pētījuma pacientiem ar lokalizētu un izplatītu stadiju

Daudzfaktoru Cox regresijas analīze parāda, ka neatkarīgie prognostiskie rādītāji, kas pētījuma pacientiem ietekmēja kopējo dzīvildzi, ir sieviešu dzimums un pacienta labs vispārējais stāvoklis (ECOG 0-1). Viena faktora Cox regresijas analīze uzrādīja arī lokalizētu slimības stadiju kā labvēlīgu prognostisku rādītāju (3.12. tabula).

3.12. tabula. Klīnisko prognostisko faktoru analīze pētījumā iekļautajiem pacientiem pēc Cox proporcionālā riska modeļa

Faktors	RA	95% TI	p	RA	95% TI	p
	Viena faktora (<i>univariate</i>)			Daudzfaktoru (<i>multivariate</i>)		
Dzimums	1,9532	0,97 – 3,92	0,0610	2,4601	1,13 – 5,31	0,0226
ECOG 0-1 vai 2-3	2,2687	1,48 – 3,47	0,0002	2,1437	1,35 – 3,41	0,0014
Lokalizēta vai izplatīta stadija	1,8618	1,21 – 2,86	0,0049	1,5840	0,97 – 2,58	0,0651
Vecums zem vai virs 60 g. v.	1,2080	0,80 – 1,82	0,3665	0,9920	0,64 – 1,53	0,9713
Laiks līdz terapijai zem vai virs 4 nedēļām	0,8552	0,51 – 1,45	0,5610	0,6395	0,37 – 1,10	0,1055
Labās vai kreisās plaušas vēzis	0,9275	0,62 – 1,38	0,7108	1,0631	0,68 – 1,66	0,7886

RA – riska attiecība; 95 % TI – 95 % ticamības intervāls

3.2. Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors

12 pirmreizējiem III/IV stadijas sīkšūnu plaušu vēža pacientiem ar kvalitatīvu pirmsterapijas pētījuma biopsijas paraugu un izvērtējamiem klīniskiem datiem tika aprēķināta vidējā kopējā dzīvildze (OS) – 9,6 mēneši, pēc kuras tālāk pacientus iedalīja īsas dzīvildzes un garas dzīvildzes grupās. Abu grupu pacientu demogrāfiskie un klīniskie dati ir parādīti 3.21. tabulā. Statistiski ticamas atšķirības starp grupām nebija ne pēc viena no analizētajiem demogrāfiskajiem vai klīniskajiem parametriem. Dzīvildzes un saņemtās terapijas dati ir parādīti 3.22. tabulā.

3.21. tabula. Demogrāfiskie un klīniskie dati 12 pacientiem, kam analizēja dzīvildzi un Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresiju. Veicot grupu salīdzinošo analīzi, izmantoja Stjūdenta (t-testu) vai hī kvadrāta (χ^2) testu atkarībā no mainīgo vērtību tipa.

Pacientu parametrs	Garas dzīvildzes grupa (OS >9,6 mēneši, n=6)	Īsas dzīvildzes grupa (OS ≤ 9,6 mēneši, n=6)	p-vērtība
Dzimums			p=1,0
Vīrieši	5	5	
Sievietes	1	1	
Vecums			p=0,078
Vidējais (robežas)	61,5 (54-77)	51,5 (49-70)	
Vispārējais stāvoklis pēc ECOG skalas			p=0,446
0	1	1	
1	0	2	
2	4	2	
3	1	1	
4	0	0	
Stadija			p=0,565
III A	1	0	
III B	2	2	
IV	3	4	
Ārstēšanas devu/intervālu novirzes toksicitātes dēļ			p=0,079
Nav	2	5	
Ir	4	1	
Labākā atbildes reakcija uz saņemto terapiju			p=0,301
CR	0	0	
PR	6	4	
SD	0	1	
PD	0	1	
Slimības progresijas veids			p=0,601
Lokāla	2	1	

Attāla	2	3
Kombinēta	1	2
Nav progresējusi (uz 01.10.2018)	1	0

CR - *complete response* (pilna remisija); PR - *partial response* (daļēja remisija); SD - *stable disease* (stabila slimība); PD - *progressive disease* (slimības progresija); OS - *overall survival* (kopējā dzīvildze)

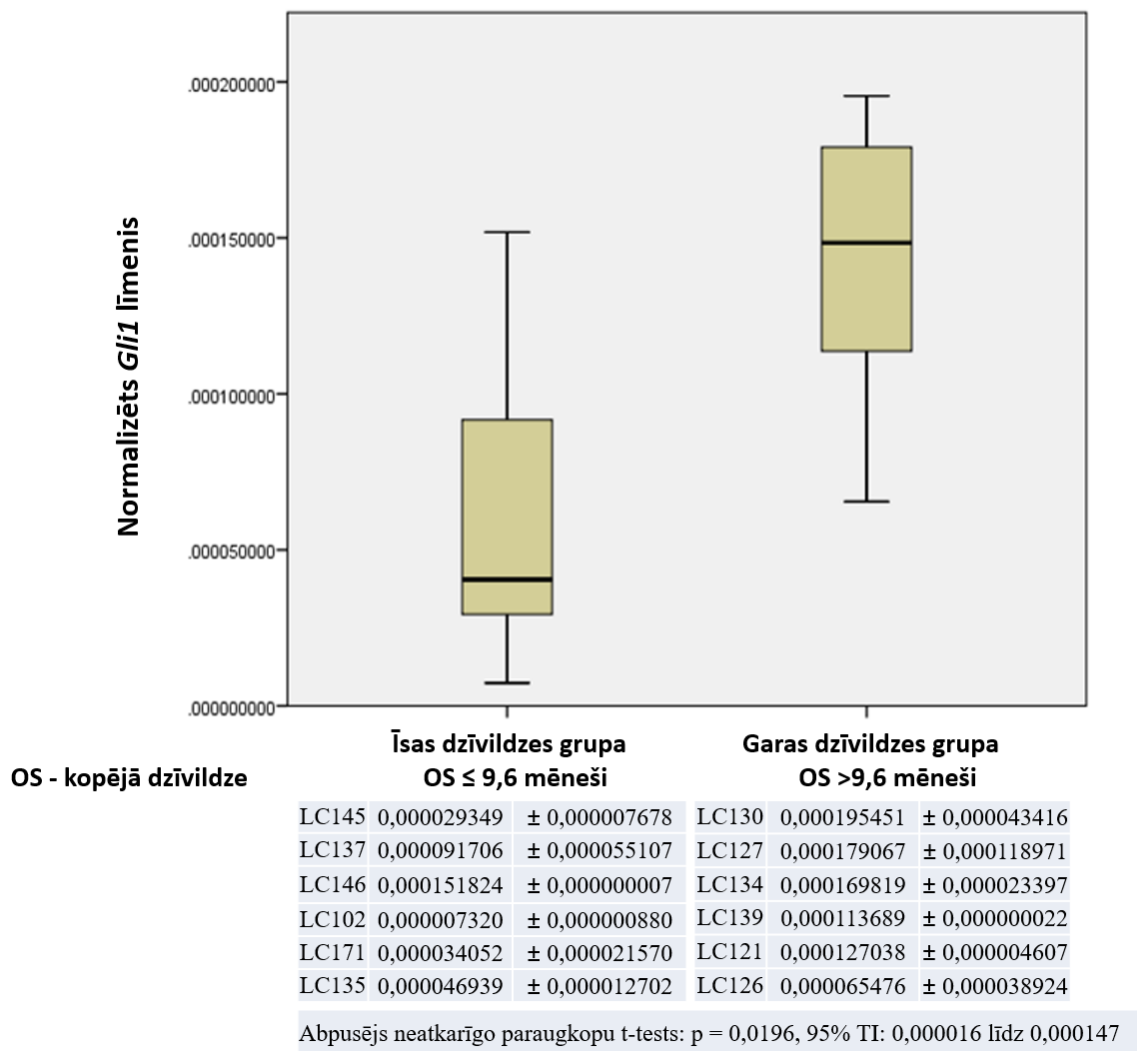
3.22. tabula. Dzīvildzes un saņemtās terapijas dati 12 pacientiem, kam analizēja dzīvildzi un Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresiju.

Pacienta ID Nr.	Dzīvildze mēnešos (dienās)	Dzīvildze mēnešos (dienās)	Saņemtā terapija
LC145		4 (140)	4 CE
LC137		6 (191)	6 PE → RT (57,6/50,4/45 Gy)
LC146		8 (250)	4 PE → 3 CAV
LC102		8 (252)	5 PE
LC171		8 (267)	1 PE → 5 CAV
LC135		8 (269)	4 PE → RT (54/50,4 Gy) → 37,5 Gy WBRT
LC130	10 (305)		5 PE → 3 CAV
LC127	10 (318)		5 PE → 30 Gy WBRT
LC134	12 (383)		5 PE → RT (54/54/45 Gy) → 36 Gy WBRT
LC139	13 (396)		6 PE → RT (54/50,4 Gy) → PCI (30 Gy)
LC121	15 (462)		6 CE → RT (54/50,4/50,4 Gy) → PCI (36 Gy) → 1 CAV
LC126	82 (2499) uz 01.10.2018		5 PE → RT (56/50,4 Gy) → PCI (36 Gy)

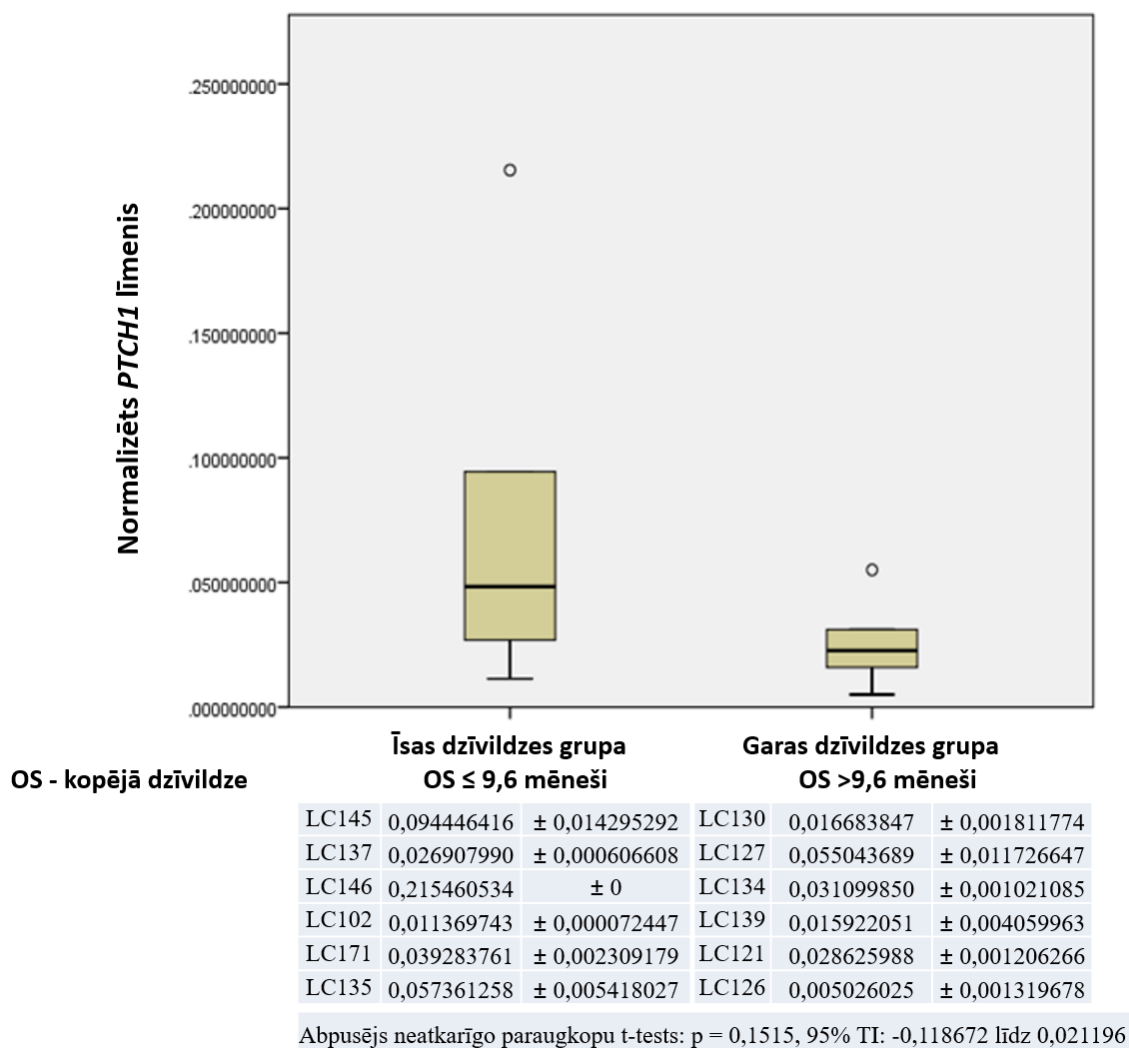
CE – Karboplatīns/Etopozīds; PE – Cisplatīns/Etopozīds; RT – *radiation therapy* (staru terapija); CAV – Ciklofosfamīds/(doksorubicīns)Adriamicīns/Vinkristīns; WBRT - *whole brain radiation therapy* (visu galvas smadzeņu apstarošana); PCI – *prophylactic cranial irradiation* (profilaktiska galvas apstarošana)

mRNS ekspresijas līmeņa vidējās vērtības katram Shh signālceļa asociētajam gēnam (*Gli1*, *SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) salīdzināja īsas dzīvildzes un garas dzīvildzes grupu pacientu pirmsterapijas pētījuma audzēja biopsiju paraugos.

Hedgehog signālceļa galvenā mērķa gēna un signālceļa aktivitātes marķiera *Gli1* vidējā ekspresija 6 sīkšūnu plaušu vēža pacientiem garas dzīvildzes grupā (OS > 9,6 mēneši) bija $0,000141757 \pm 0,000038223$. Īsas dzīvildzes grupas (OS ≤ 9,6 mēneši) 6 pacientiem pirmsterapijas *Gli1* mRNS vidējā ekspresija attiecīgi bija $0,000060198 \pm 0,000016324$. Statistiski ticami augstākas *Gli1* ekspresijas vidējās vērtības tika konstatētas garas dzīvildzes sīkšūnu plaušu vēža pacientiem pirmsterapijas biopsijas paraugos, salīdzinot ar īsas dzīvildzes grupu ($p = 0,0196$, 95% CI: 0,000016 līdz 0,000147) (3.23. tabula, 3.201. attēls).

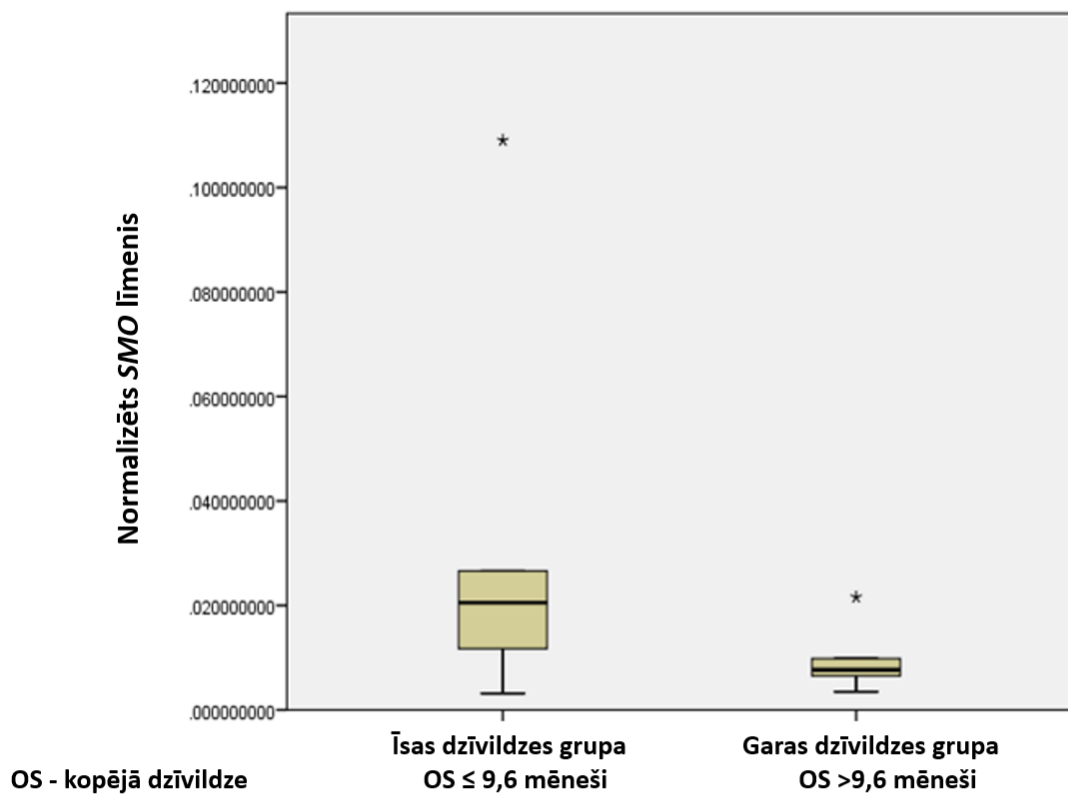


3.201. attēls. Gli1 mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



3.202. attēls. *PTCH1* mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas

Pārējo Hedgehog signālceļa asociēto gēnu (*SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) ekspresijas līmenis īsas dzīvildzes un garas dzīvildzes grupu pacientu pirmsterapijas pētījuma audzēja biopsiju paraugos statistiski ticami neatšķiras (3.202 – 3.211. attēli).

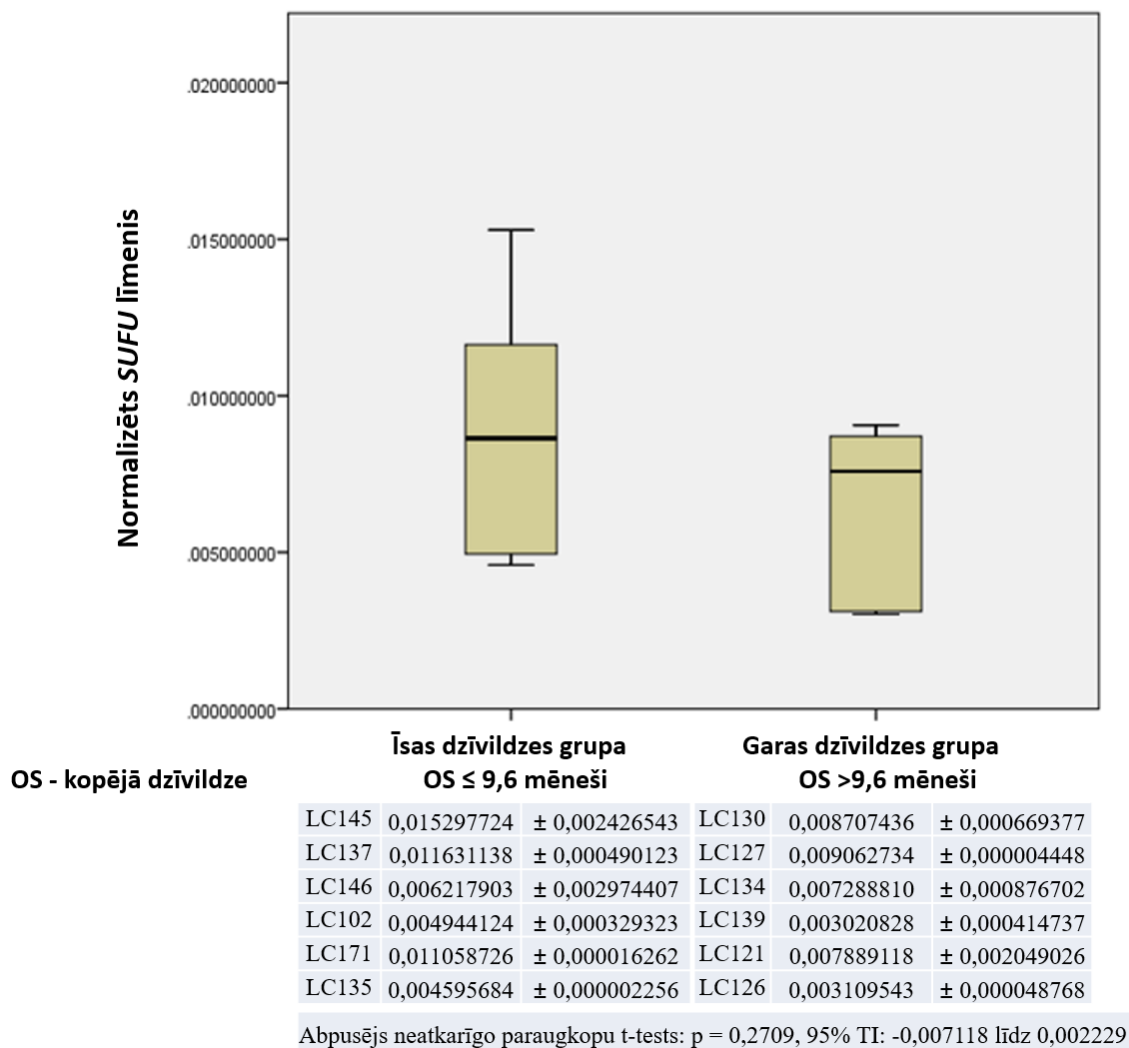


OS - kopējā dzīvildze

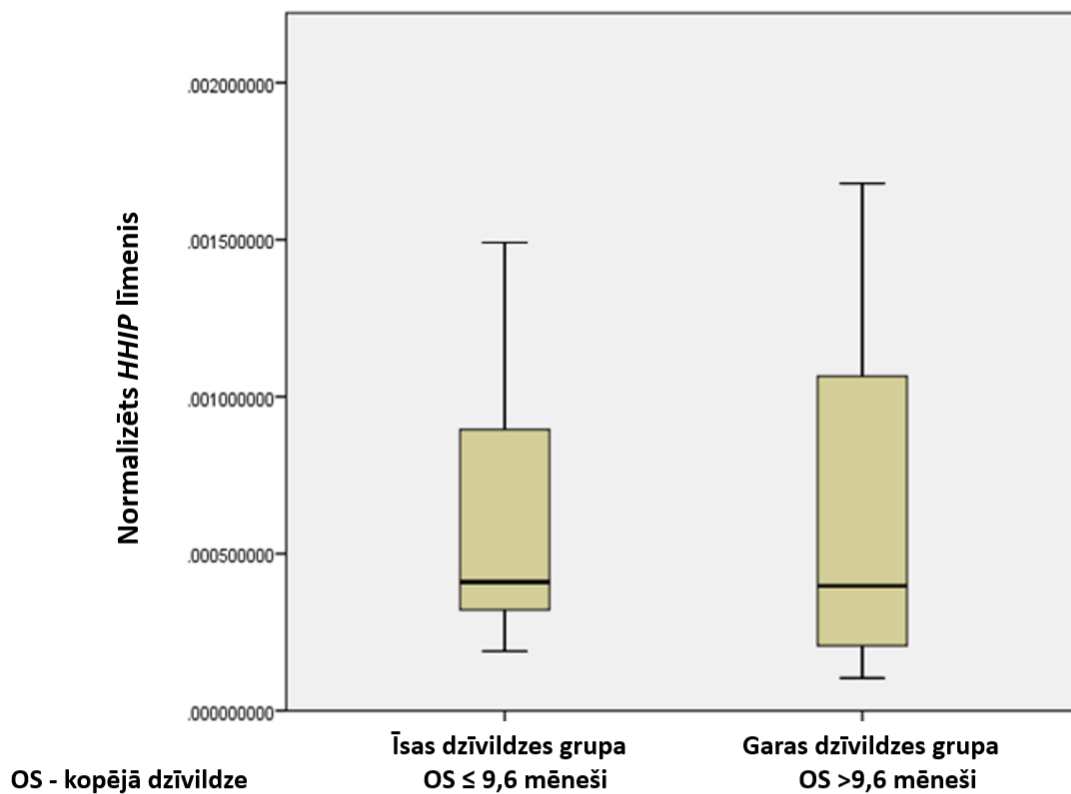
LC145	0,020202431	± 0,000594036	LC130	0,007277405	± 0,000836368
LC137	0,109027230	± 0,004914628	LC127	0,003468303	± 0,001272382
LC146	0,026588872	± 0,012033562	LC134	0,008083198	± 0,002022772
LC102	0,003148869	± 0,000487283	LC139	0,006562945	± 0,000747863
LC171	0,011730179	± 0,000758379	LC121	0,021589397	± 0,001195098
LC135	0,020848733	± 0,002213249	LC126	0,009831779	± 0,001297305

Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: $p = 0,1904$, 95% TI: $-0,058077$ līdz $0,013166$

3.203. attēls. SMO mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



3.204. attēls. *SUFU* mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas

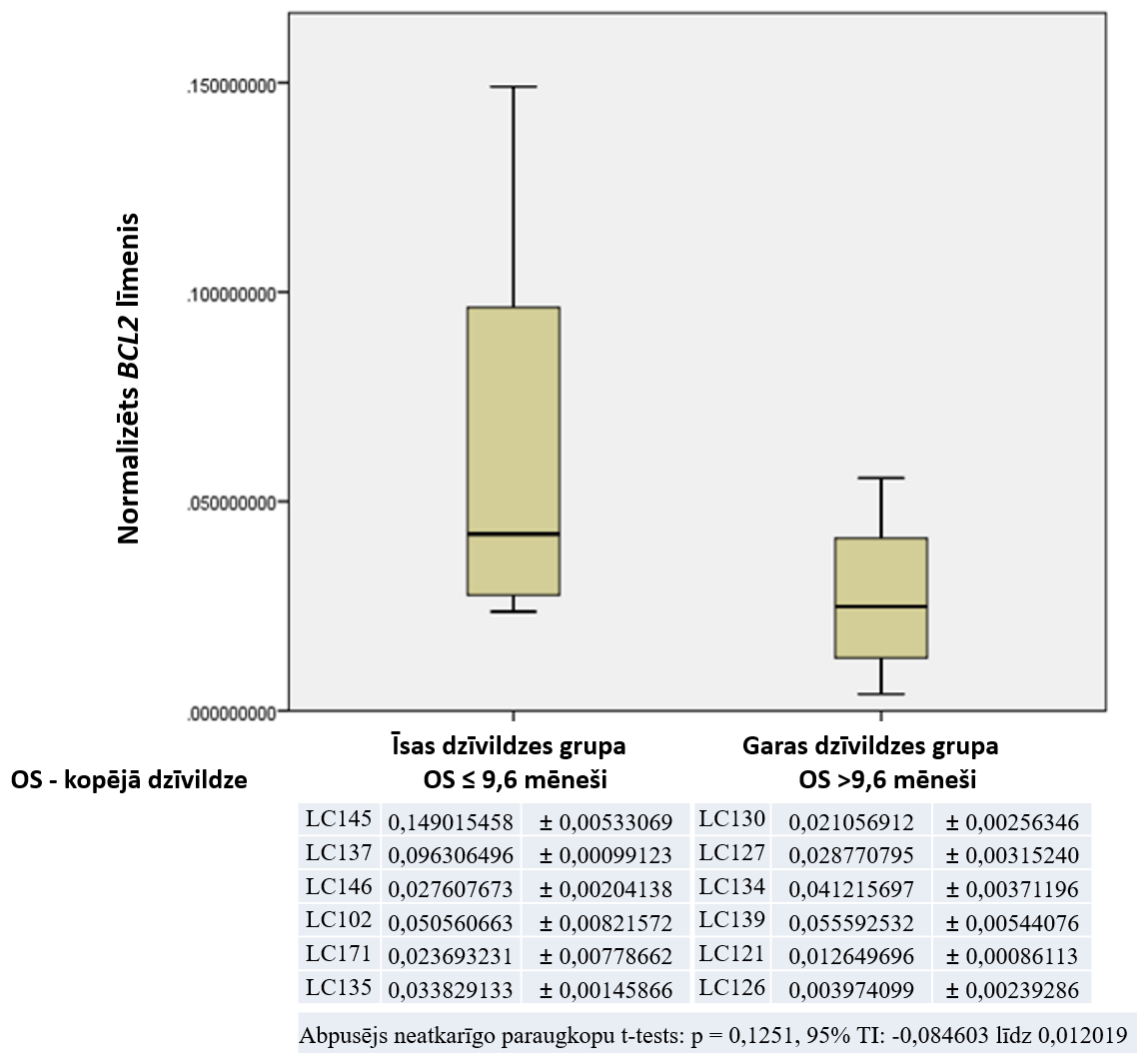


OS - kopējā dzīvildze

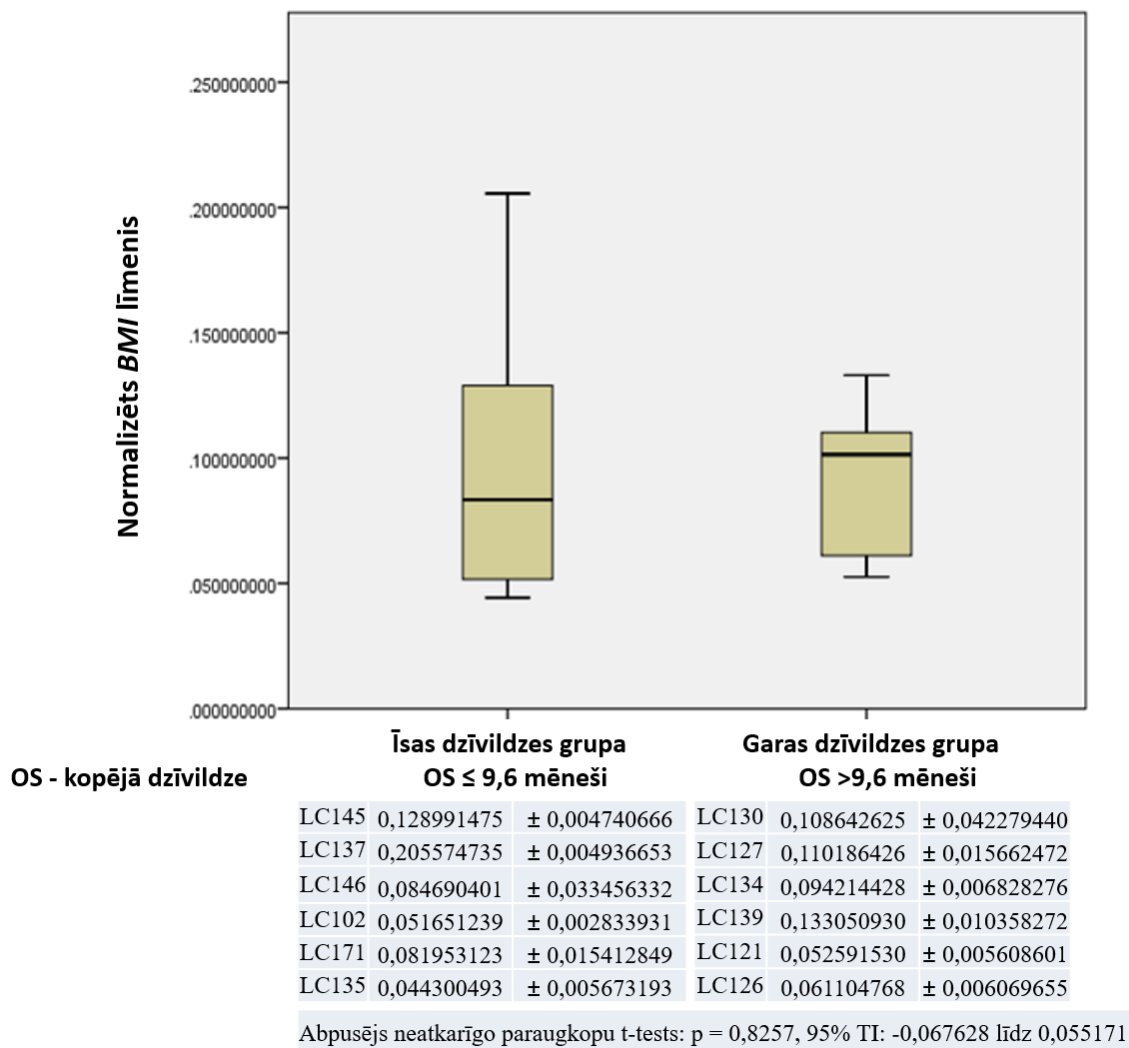
LC145	0,000474389	± 0,000243650	LC130	0,000103753	± 0,000071984
LC137	0,000321201	± 0,000126017	LC127	0,000299629	± 0,000093874
LC146	0,000344487	± 0,000254198	LC134	0,000495428	± 0,000039538
LC102	0,000189494	± 0,000084006	LC139	0,001679003	± 0,001370917
LC171	0,001490653	± 0,000204656	LC121	0,000206701	± 0
LC135	0,000895249	± 0,000137672	LC126	0,001065406	± 0,000063669

Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: $p = 0,9456$, 95% TI: $-0,000691$ līdz $0,000736$

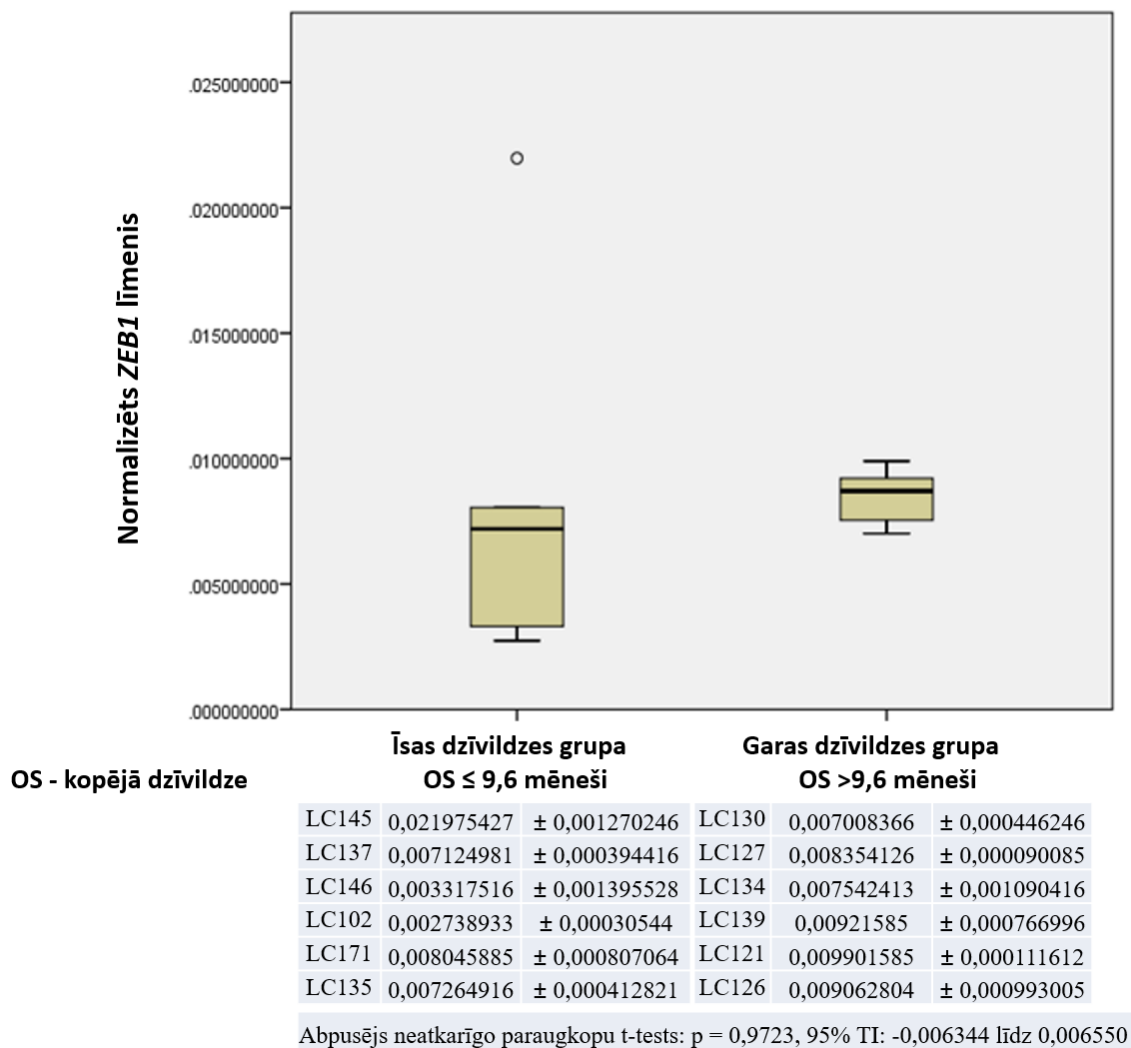
3.205. attēls. HHIP mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



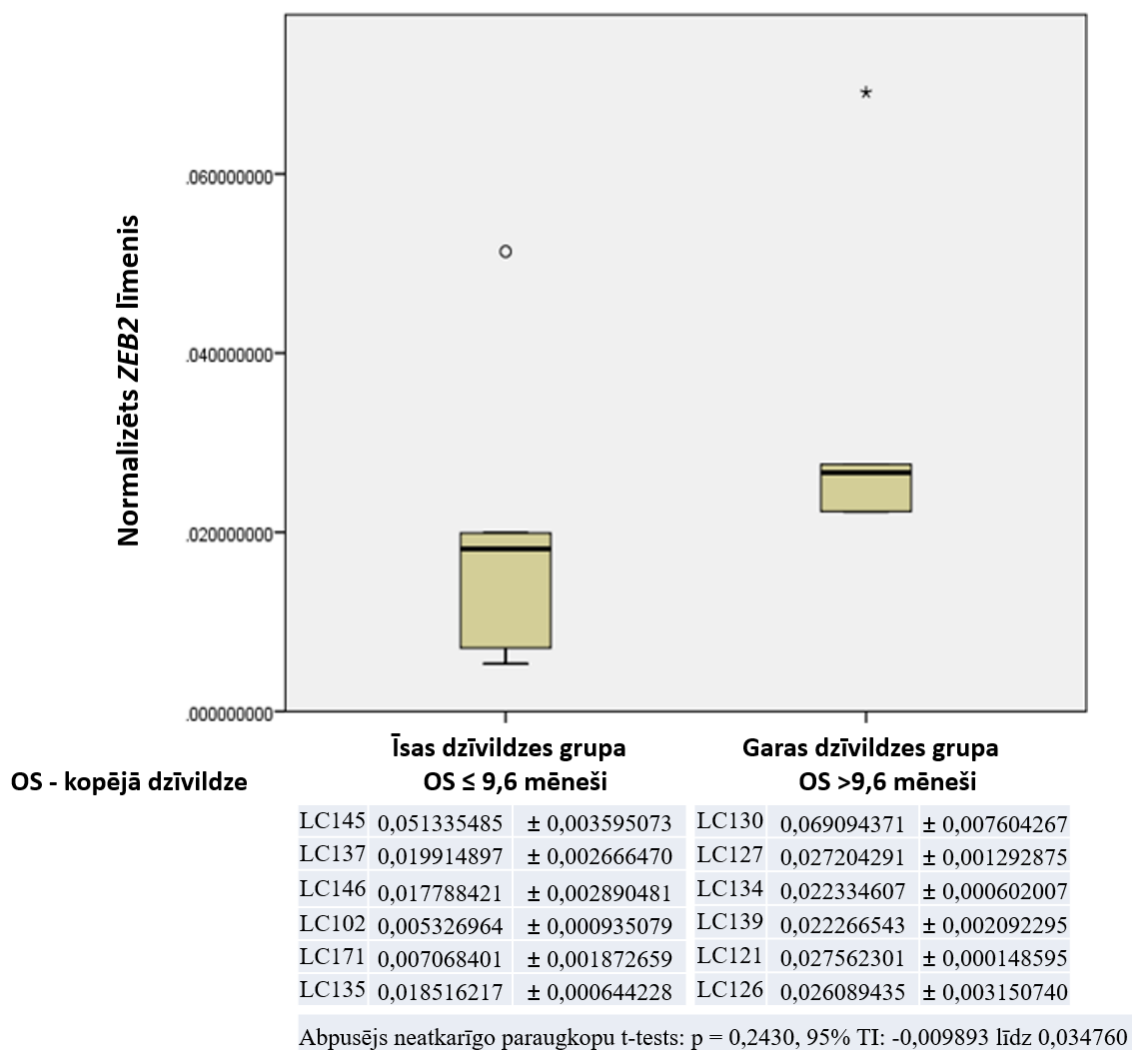
3.206. attēls. BCL2 mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



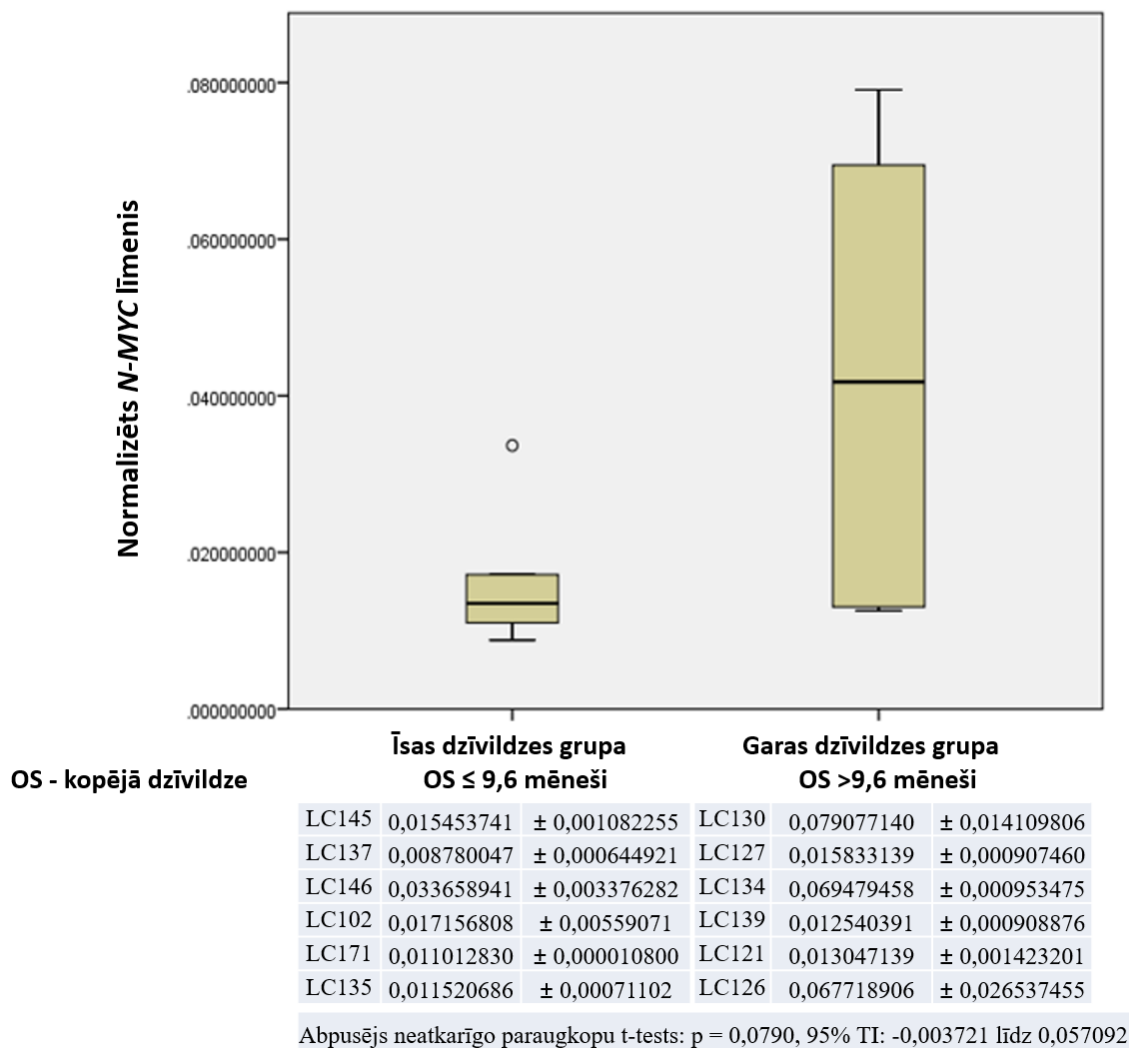
3.207. attēls. *BMI1* mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



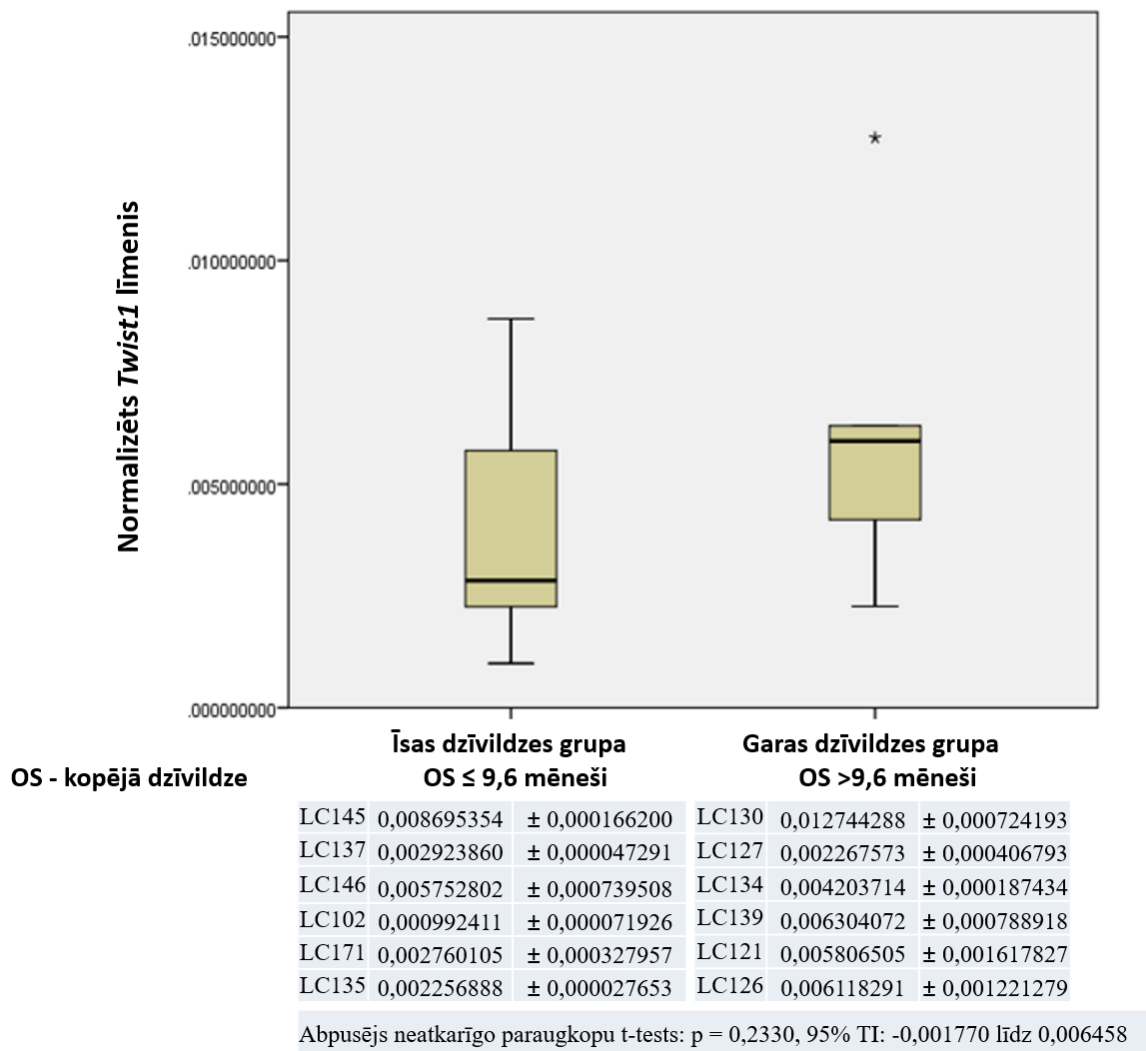
3.208. attēls. ZEB1 mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



3.209. attēls. ZEB2 mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



3.210. attēls. N-MYC mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



3.211. attēls. *Twist1* mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas

3.3. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā

Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresija tika salīdzināta pāra biopsijās III/IV stadijas sīkšūnu plaušu vēža pētījuma pacientu nelielai apakšgrupai (3 slimniekiem) ar kvalitatīviem pirmsterapijas un recidivējoša audzēja pētījuma biopsijas paraugiem. Šīs apakšgrupas pacientu demogrāfiskie, klīniskie un dzīvildzes dati ir parādīti 3.31. tabulā salīdzinājumā ar to pētījuma pacientu datiem, kam netika veikta sapārotā gēnu ekspresijas analīze. Apakšgrupa bija nelīdzvērtīga pēc pacientu vispārējā stāvokļa parametriem. Netika novērotas statistiski ticamas atšķirības pēc pacientu dzimuma, vecuma, slimības stadijas, saņemtās specifiskas terapijas, radioloģiskos izmeklējumos apstiprinātas labākās atbildes reakcijas uz saņemto terapiju, novirzēm saņemtās ķīmijterapijas devās un intervālos, slimības progresijas veida un dzīvildzes datiem.

mRNS līmeni katram Shh signālceļa saistītajam gēnam (*Gli1*, *SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) salīdzināja viena un tā paša pacienta pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) pētījuma audzēja biopsiju paraugos, izmantojot divu sapārotu paraugkopu t-testu. Katra Shh signālceļa saistītā gēna ekspresijas līmeņa vidējās vērtības arī salīdzināja visos pirmsterapijas un recidivējošos paraugos, aprēķinot 95% ticamības intervālu.

Viena un tā paša pacienta pirmsterapijas un recidivējoša audzēja biopsiju paraugos Hedgehog signālceļa aktivitātes galvenā marķiera *Gli1* līmenis bija zemāks pie recidīva, kaut starpība nav sasniegusi statistiski nozīmīgu vērtību ($p = 0,0529$, 95% CI: $-0,0002023$ līdz $0,000003115$, abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests).

2.9 reizes zemāka *Gli1* ekspresija tika novērota pie recidīva, izvērtējot vidējās vērtības visos pirmsterapijas un recidivējošos paraugos (3.301. attēls, 3.32. tabula).

3.31. tabula. Demogrāfiskie un klīniskie dati 3 sīkšūnu plaušu vēža pacientu apakšgrupai, kam veica Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājumu pirmsterapijas un recidivējoša audzēja pāra biopsijās. Veicot salīdzinošo analīzi ar pacientiem, kam netika veikta sapārotā gēnu ekspresijas analīze, izmantoja Stjudenta (t-testu) vai hī kvadrāta (χ^2) testu atkarībā no mainīgo vērtību tipa.

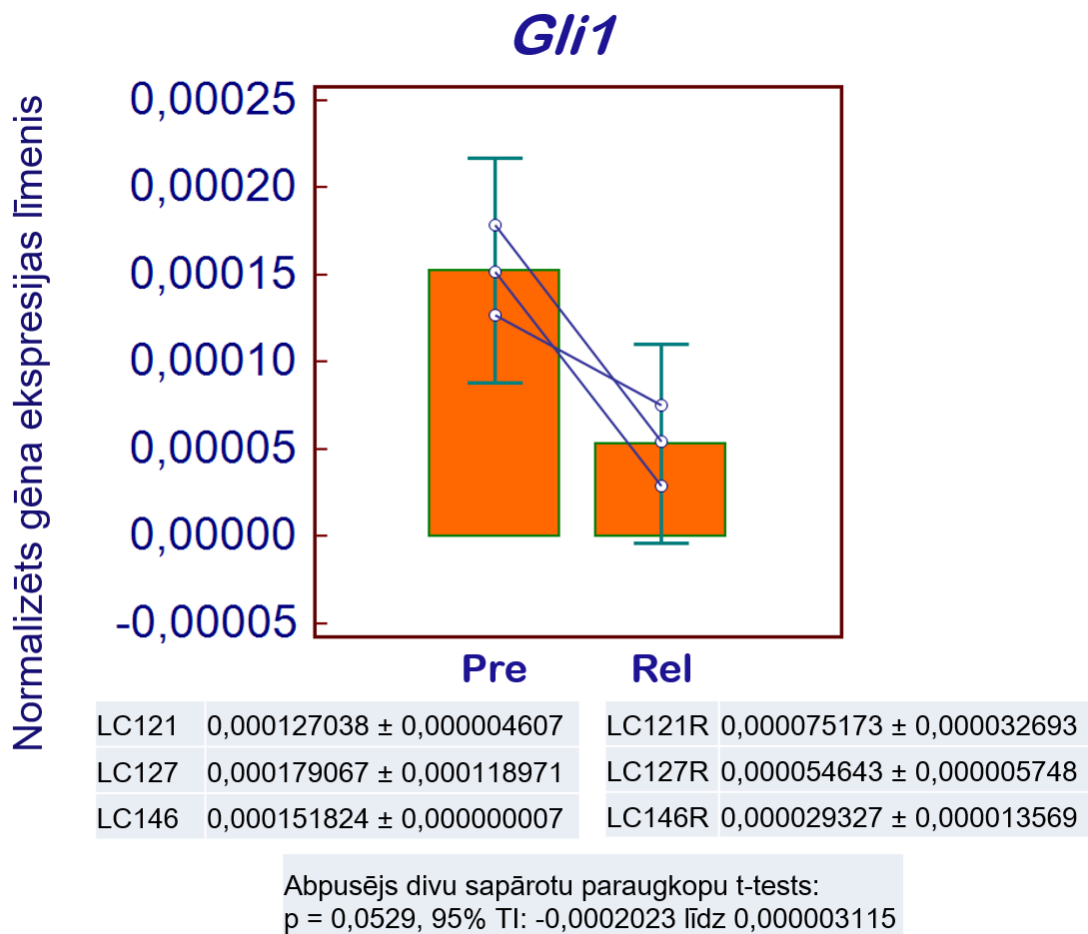
Pacientu parametrs		Sapārotā gēnu ekspresijas analīzē iekļautie pacienti (n=3)	Sapārotā gēnu ekspresijas analīzē neiekļautie pacienti (n=17)	p-vērtība
Dzimums	Vīrieši	3	13	p=0,348
	Sievietes	0	4	
Vecums	Vidējais (robežas)	60 (49-77)	56,9 (47-70)	p=0,759
Vispārējais stāvoklis pēc ECOG skalas				p=0,048
	0	2	1	
	1	0	7	
	2	1	7	
	3	0	2	
Stadija				p=0,822
	III A	0	2	
	III B	1	5	
	IV	2	10	
Ārstēšanas devu/intervālu novirzes toksicitātes dēļ				p=0,212
	Nav	1	12	
	Ir	2	5	
Saņemtā terapija				p=0,948
	Tikai ķīmijterapija	1	6	
	Ķīmijterapija un staru terapija	2	11	
Labākā atbildes reakcija uz terapiju				p=0,093
	CR	0	2	
	PR	2	13	
	SD	0	2	
	PD	1	0	
Slimības progresijas veids				p=0,075
	Lokāla	1	4	
	Attāla	0	8	
	Kombinēta	2	1	
	NK	0	2	
	Nav progresējusi (uz 01.10.2018)	0	2	
Dzīvildze	Vidējā PFS (mēneši)	6,7	25,8	p=0,469
	Vidējā OS (mēneši)	11	28,2	p=0,506

CR - *complete response* (pilna remisija); PR - *partial response* (daļēja remisija); SD - *stable disease* (stabila slimība); PD - *progressive disease* (slimības progresija); NK - *not known* (nav zināms); PFS - *progression-free survival* (bezprogresijas dzīvildze); OS - *overall survival* (kopējā dzīvildze)

3.32. tabula. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu vidējās ekspresijas salīdzinājums visu 3 pacientu pirmsterapijas un recidivējošās slimības paraugos

Gēns	Ekspresijas līmeņa vidējās vērtības 3 SŠPV pacientu pirmsterapijas (Pre) un recidivējošās (Rel) slimības biopsijās				Ekspresijas starpības novērtējums
	Pre	Vidējās vērtības 95% TI	Rel	Vidējās vērtības 95% TI	Ekspresijas samazinājums Rel biopsijās (reižu skaits)
<i>Gli1</i>	0,000153	0,000088 līdz 0,0002173	0,000053	-0,000004 līdz 0,0001101	2,9
<i>PTCH1</i>	0,09971	-0,1515 līdz 0,3509	0,03881	0,01099 līdz 0,06664	2,6
<i>HHIP1</i>	0,000284	0,000109 līdz 0,0004582	0,000130	-0,0001989 līdz 0,0004598	2,2
<i>N-MYC</i>	0,02085	-0,006934 līdz 0,04863	0,01094	-0,001096 līdz 0,02297	1,9
<i>Smo</i>	0,01722	-0,0130 līdz 0,04744	0,009398	-0,01974 līdz 0,03854	1,8
<i>ZEB2</i>	0,02419	0,01042 līdz 0,03795	0,01354	0,004276 līdz 0,0228	1,8
<i>Twist1</i>	0,004609	-0,0004286 līdz 0,009646	0,003798	-0,002644 līdz 0,01024	1,2
<i>ZEB1</i>	0,007191	-0,001361 līdz 0,01574	0,006662	0,004601 līdz 0,008722	1,1
	Pre	Vidējās vērtības 95% TI	Rel	Vidējās vērtības 95% TI	Ekspresijas pieaugums Rel biopsijās (reižu skaits)
<i>BCL2</i>	0,02301	0,0006755 līdz 0,04534	0,02509	-0,01966 līdz 0,06984	0,9
<i>SUFU</i>	0,007723	0,004172 līdz 0,01127	0,009916	0,002686 līdz 0,01715	0,8
<i>BMI1</i>	0,08249	0,0108 līdz 0,1542	0,09763	-0,02615 līdz 0,2214	0,8

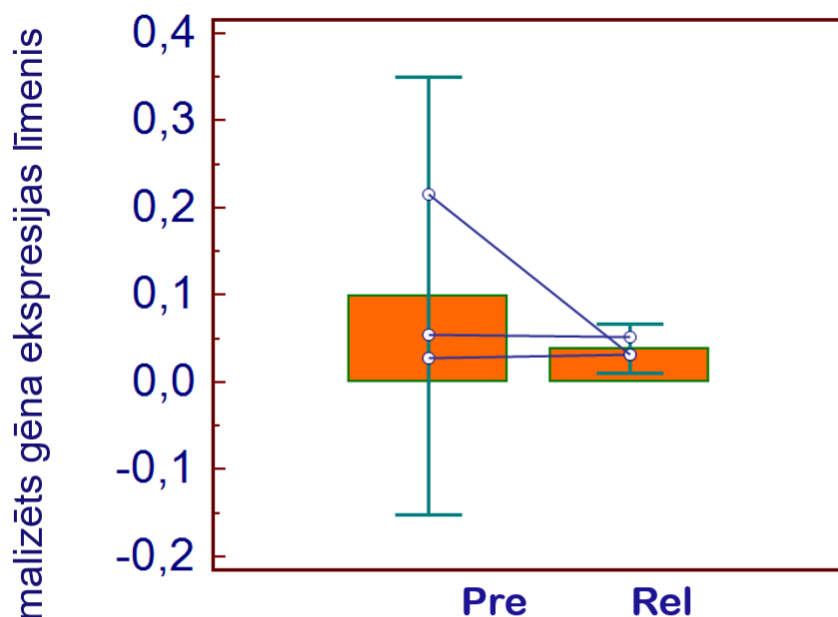
SŠPV - Sīkšūnu plaušu vēzis; 95% TI - 95% ticamības intervāls; *Gli1* - *Glioma-Associated Oncogene Homolog 1*; *PTCH1* - *Protein Patched Homolog 1*; *HHIP1* - *Hedgehog Interacting Protein*; *N-MYC* - *Class E basic helix-loop-helix protein 37*; *Smo* – *Smoothened*; *ZEB1*, *ZEB2* - *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 and 2*; *Twist1* - *Class A Basic Helix-Loop-Helix Protein 38*; *BCL2* - *B-Cell Lymphoma 2 Apoptosis Regulator*; *SUFU* - *Suppressor Of Fused Homolog*; *BMI1* - *BMI1 Proto-Oncogene*



3.301. attēls. *Gli1* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšņu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

Samazināts Hedgehog signālceļa 6 saistīto gēnu (*PTCH1*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1* un *ZEB1*) ekspresijas līmenis tika novērots recidīva laikā. Salīdzinot ar pirmsterapijas paraugu, pāra biopsijās šo gēnu ekspresija attiecīgi bija 2,6; 2,2; 1,9; 1,8; 1,2 un 1,1 reizes zemāka Rel paraugā bez statistiski nozīmīgas starpības (attiecīgi p = 0,4252, p = 0,1268, p = 0,2480, p = 0,1169, p = 0,1480 un p = 0,7595) (3.302.-3.307 attēli, 3.32. tabula).

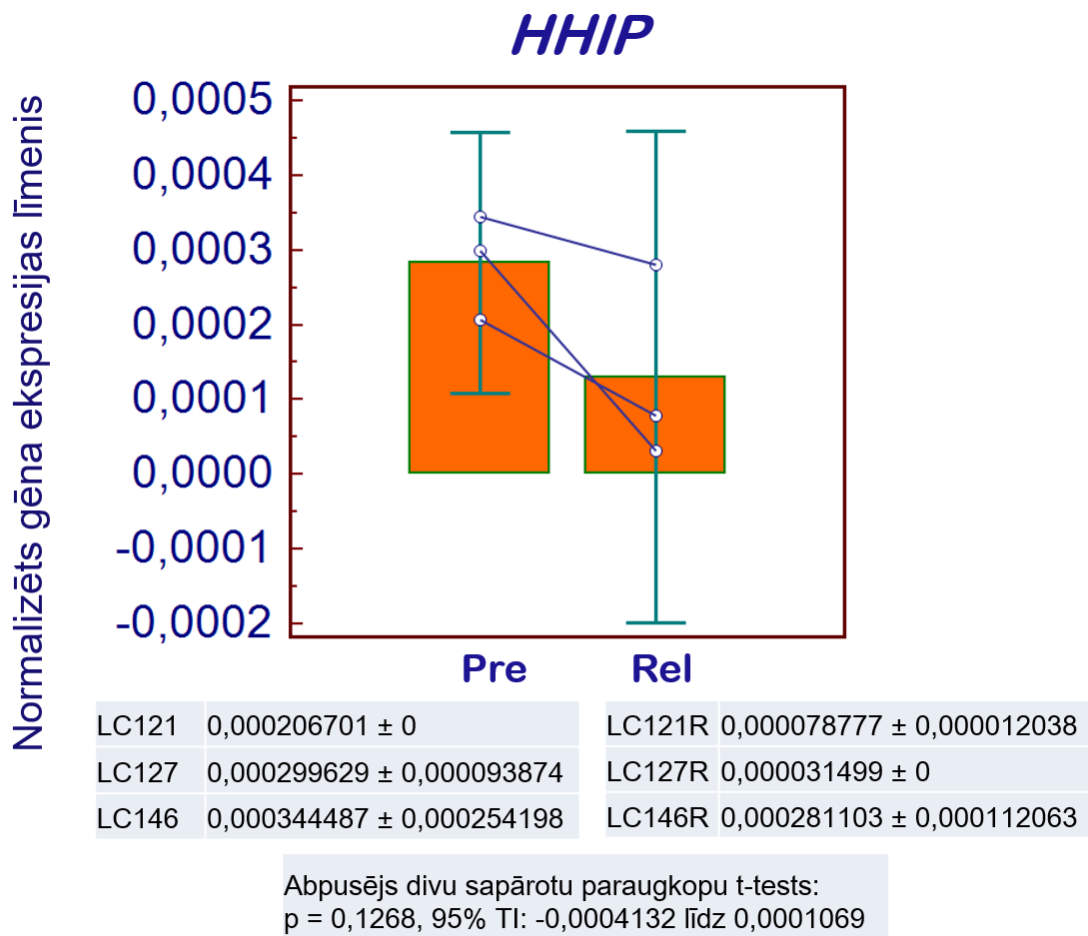
PTCH1



LC121	0,028625988 ± 0,001206266	LC121R	0,032651666 ± 0,003275214
LC127	0,055043689 ± 0,011726647	LC127R	0,051743079 ± 0,003699516
LC146	0,215460534 ± 0	LC146R	0,032049930 ± 0,000926679

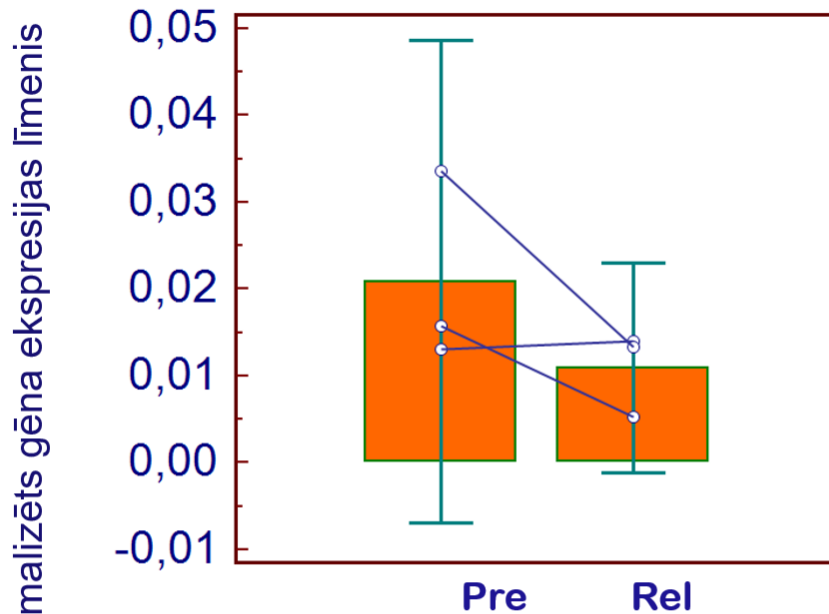
Abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests:
p = 0,4252, 95% TI: -0,3246 līdz 0,2028

3.302. attēls. *PTCH1* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabīņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības



3.303. attēls. HHIP mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

N-MYC

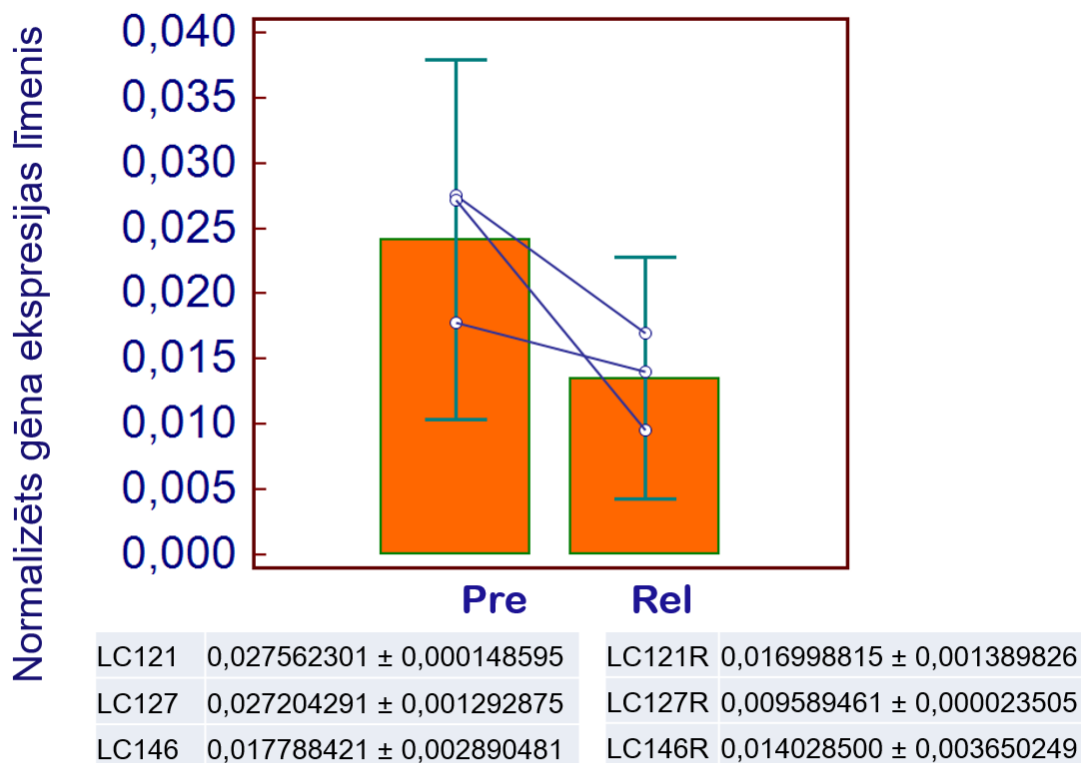


LC121	0,013047139 ± 0,001423201	LC121R	0,014048834 ± 0,002235250
LC127	0,015833139 ± 0,000907460	LC127R	0,005356463 ± 0,001633191
LC146	0,033658941 ± 0,003376282	LC146R	0,013409648 ± 0,000354864

Abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests:
 $p = 0,2480$, 95% TI: $-0,03633$ līdz $0,01652$

3.304. attēls. *N-MYC* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

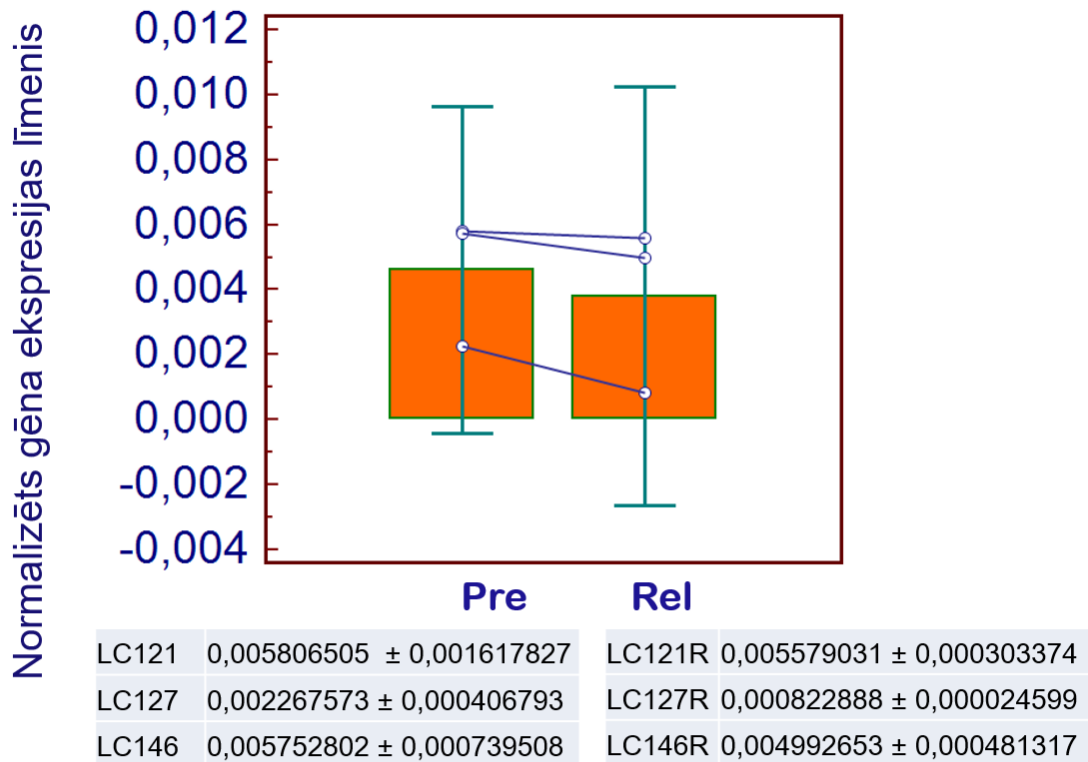
ZEB2



Abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests:
 $p = 0,1169$, 95% TI: -0,02786 līdz 0,006564

3.305. attēls. ZEB2 mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

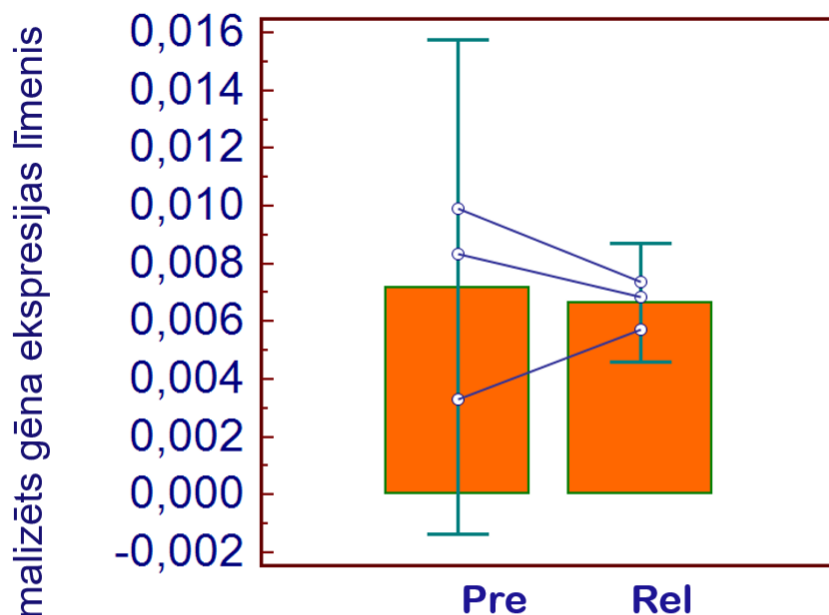
Twist1



Abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests:
 $p = 0,1480$, 95% TI: $-0,002327$ līdz $0,000705$

3.306. attēls. *Twist1* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabili atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

ZEB1

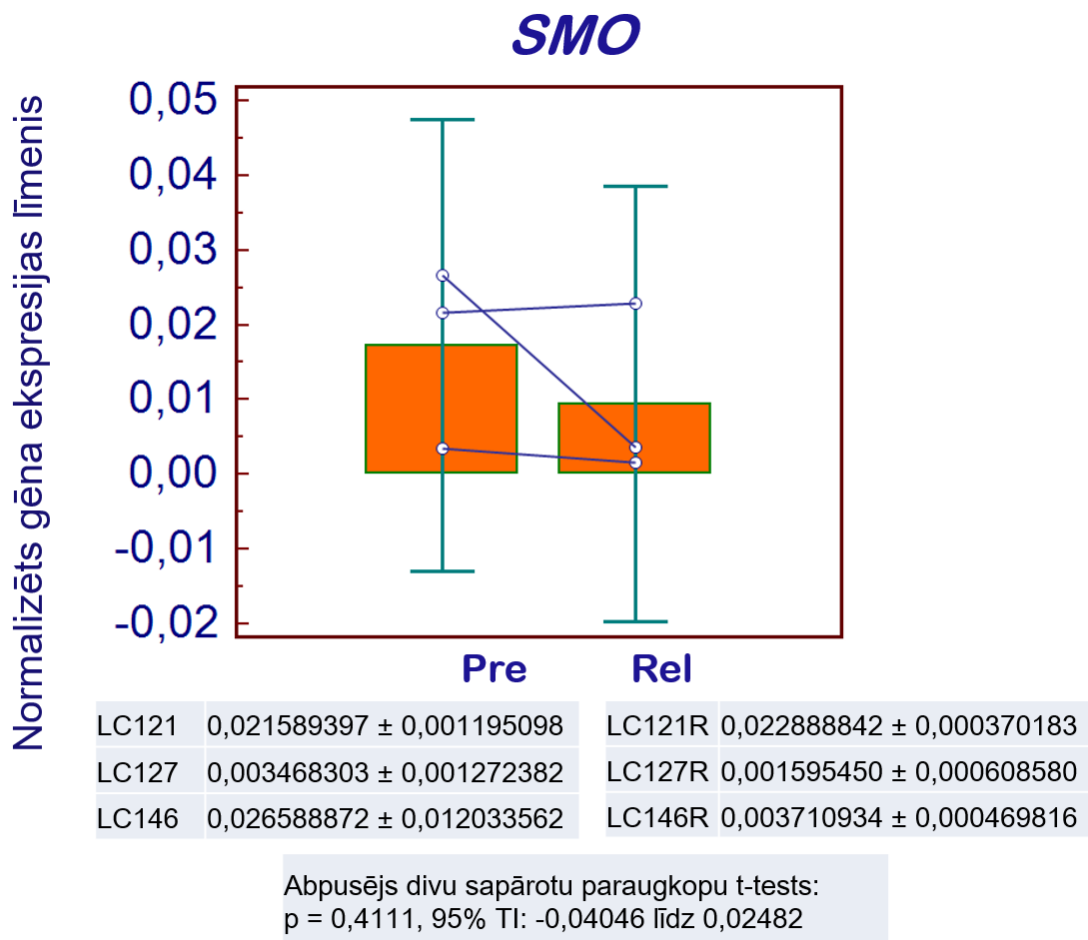


LC121	0,009901585 ± 0,000111612	LC121R	0,007368567 ± 0,000375439
LC127	0,008354126 ± 0,000090085	LC127R	0,006868277 ± 0,000006735
LC146	0,003317516 ± 0,001395528	LC146R	0,005748559 ± 0,000152126

Abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests:
 $p = 0,7595$, 95% TI: -0,007029 līdz 0,005971

3.307. attēls. ZEB1 mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

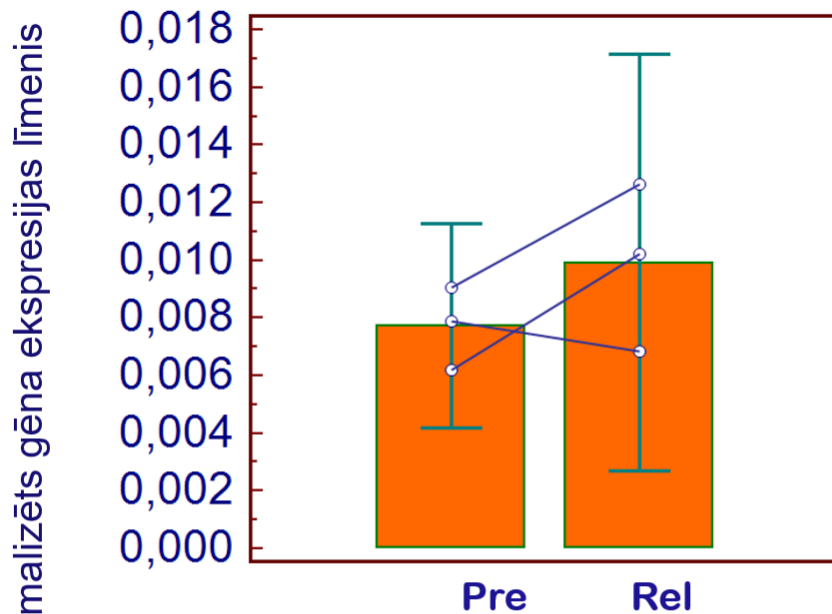
1,8 reizes zemāka ekspresija tika novērota recidivējošas slimības biopsijas paraugā *Gli* aktivatoram *SMO* bez statistiski nozīmīgas starpības ($p = 0,4111$) (3.308. attēls, 3.32. tabula).



3.308. attēls. *SMO* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

Vienīgi Hedgehog signālceļa inhibitori *SUFU* un divi Shh inducējamie gēni – *BCL2* un *BMI1* uzrādīja attiecīgi 0,8; 0,9 un 0,8 reizes augstāku ekspresiju Rel biopsijas paraugā, salīdzinot ar pirmsterapijas stāvokli. Pieaugums nebija statistiski ticams ar atbilstošiem p = 0,3074, p = 0,7921 un p = 0,3822 (3.309.-3.311 attēli, 3.32. tabula).

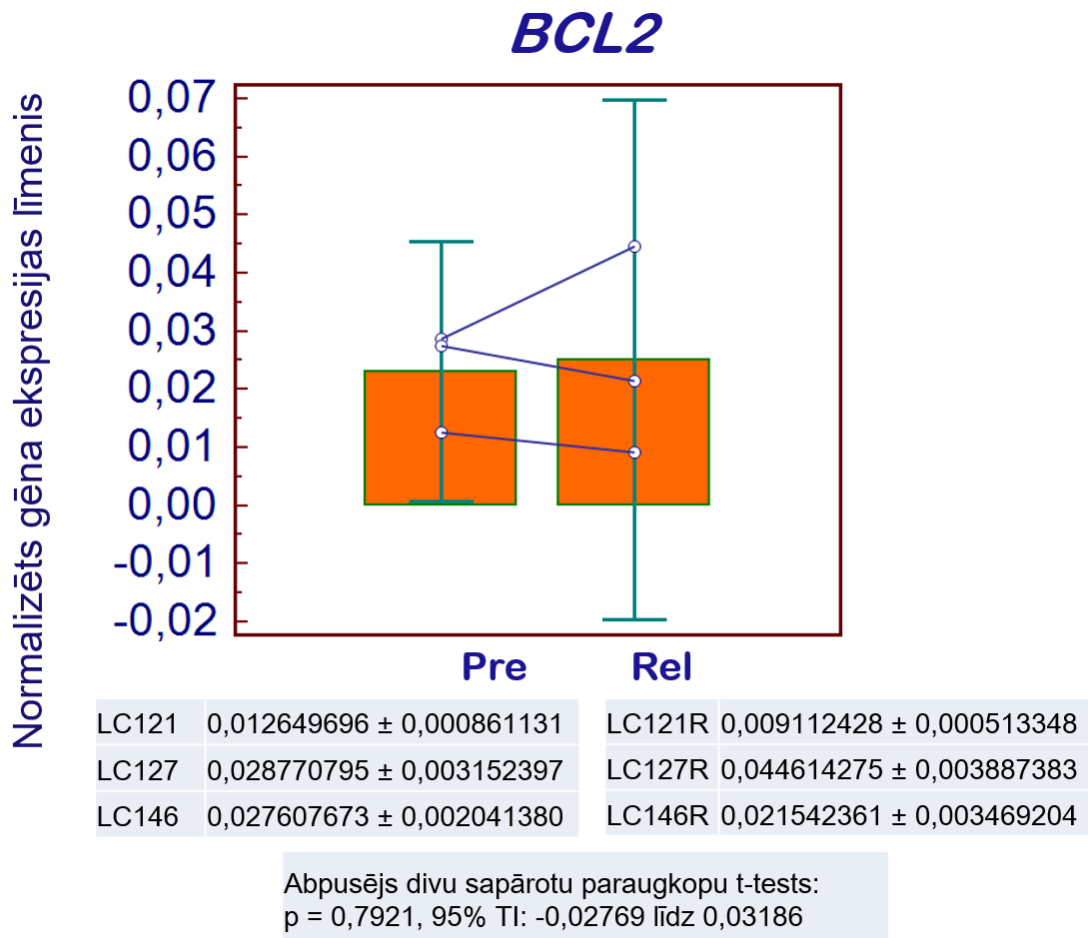
SUFU



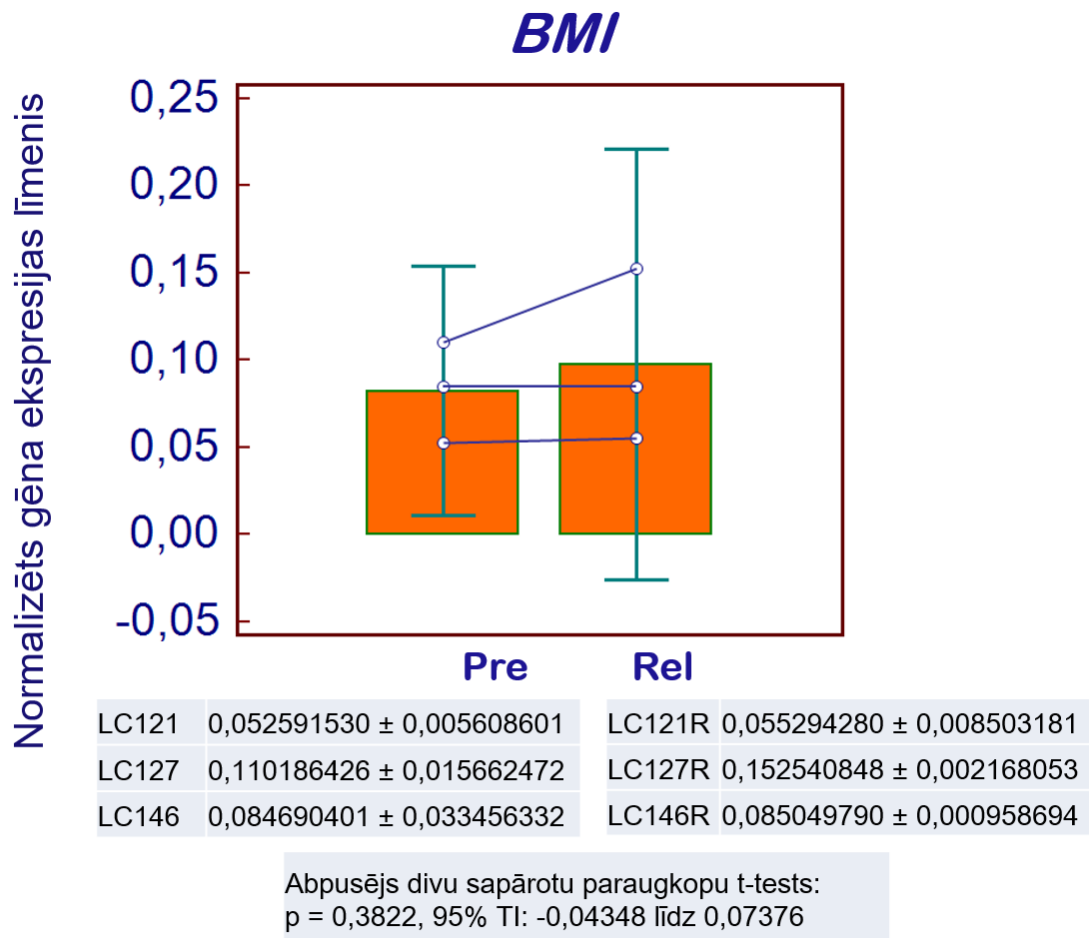
LC121	0,007889118 ± 0,002049026	LC121R	0,006861530 ± 0,001811364
LC127	0,009062734 ± 0,000004448	LC127R	0,012656821 ± 0,000917315
LC146	0,006217903 ± 0,002974407	LC146R	0,010228300 ± 0,000551187

Abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests:
 $p = 0,3074$, 95% TI: -0,004754 līdz 0,009139

3.309. attēls. *SUFU* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības



3.310. attēls. *BCL2* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības



3.311. attēls. BMI mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabiņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

4. DISKUSIJA

4.1. Klīnisko prognostisko faktoru analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā

Viens no promocijas darba uzdevumiem bija informācijas iegūšana par Latvijas sīkšūnu plaušu vēža pacientu populācijas klīniskajiem parametriem un ārstēšanas rezultātiem, kas līdz šim nekur nav bijis publicēts. Ņemot vērā SŠPV augsto jutību uz ķīmijterapiju un biežas slimības remisijas pēc pretvēža terapijas uzsākšanas, prognostisko klīnisko faktoru noteikšana un izvērtēšana ir īpaši svarīga, lemjot par specifiskas terapijas ieguvumiem un riskiem pirmreizējiem pacientiem. Ļoti saistoši būtu jau agrīni spēēt identificēt tos pacientus, kam ir prognozējama ilga dzīvildze - par ilgdzīvotājiem tiek uzskatīti sīkšūnu plaušu vēža pacienti, kas izdzīvo ilgāk par 2-3 gadiem (Tartarone et al., 2014, Lewiński and Żuławski, 2003). Pēdējos 40 gados literatūrā var atrast lielu publikāciju skaitu par pētījumiem, kas analizē demogrāfiskos, ar audzēju un pacientu saistītos klīniskos prognostiskos faktoros. Tomēr pagaidām nav izdevies definēt vienotu prognostisku algoritmu vai nomogrammas modeli, jo par vairākiem parametriem dati ir pretrunīgi. Visvairāk pierādījumu ir par slimības izplatību un pacienta vispārējo stāvokli (Albain et al., 1990, Hong et al., 2010). Aprakstīti arī vairāki citi klīniskie un laboratoriskie faktori, kas pētījumos uzrādīja negatīvu prognostisku lomu - svara zudums, vecums zem 60 gadiem, vīriešu dzimums, metastāzes galvas smadzenēs un limfmezglos, pirmsterapijas limfopēnija, augsta neitrofilo leikocītu/limfocītu vai trombocītu/limfocītu attiecība un augsts LDH (Suzuki et al., 2019, Brueckl et al., 2006). Prognostiska nozīme aprakstīta arī blakus slimību veidam un skaitam, kur kardiovaskulārām slimībām ir negatīva, bet gastrointestinālām blakus slimībām – pozitīva ietekme (Aarts et al., 2015). Interesanti ir novērojumi par labāku onkoloģisku prognozi SŠPV pacientiem ar paraneoplastiskiem neiroloģiskiem sindromiem (Iams et al., 2019, Maddison et al., 2017).

Šajā promocijas darbā analizēto pacientu dati neatklāja dzīvildzes korelāciju ar slimnieku vecumu, laiku līdz terapijas uzsākšanai un audzēja skartās plaušas pusi. Analīze apstiprināja sieviešu dzimumu un pacienta labu vispārējo stāvokli kā neatkarīgos prognostiskos rādītājus lielākai kopējai dzīvildzei. Interesanti, ka slimības stadija netika noteikta kā neatkarīgais prognostiskais faktors un statistiski nozīmīga bijusi tikai viena faktora (*univariate*) Cox regresijas analīzē.

Iespējamais izskaidrojums tam varētu būt, ka lokalizētas stadijas sīkšūnu plaušu vēža pētījuma pacientu daļai diagnozes brīdī jau ir bijušas asimptomātiskas galvas smadzeņu metastāzes un attiecīgi izplatīta slimības stadija, jo pētījuma norises laikā galvas smadzeņu datortomogrāfijas vai MRI izmeklējums pēc ESMO vadlīnijām (Felip et al., 2005) vēl nebija indicēts pacientiem bez simptomiem. Ar šo iespējams neatklāto izplatītas stadijas pacientu apakšgrupu varētu izskaidrot arī sliktākus vidējās kopējās dzīvildzes rezultātus analizētajiem pacientiem: 10,2 mēneši lokalizētai stadijai un 7,1 mēnesis izplatītai stadijai. 5 gadu dzīvildze attiecīgi bija 2,6% un 0%. Publicētajos literatūras datos galvenokārt no klīniskiem pētījumiem, kur atšķirībā no reālās dzīves situācijas pacientiem pie iekļaušanas pētījumā veica galvas smadzeņu radioloģisku izmeklēšanu, vidējā kopējā dzīvildze un 5 gadu dzīvildze bija augstākas – attiecīgi 16-24 mēneši un 14% lokalizētai stadijai un 6-12 mēneši izplatītai stadijai ar praktiski neesošiem ilgdzīvotājiem (Huber and Tufman, 2012).

Galvas smadzeņu metastāzes sīkšūnu plaušu vēža izplatītas stadijas gadījumā ir aptuveni trešdaļai pacientu un ir sliktas prognozes faktors. Daļēji to nelabvēlīgo ietekmi var neitralizēt ar konsolidējošas profilaktiskas galvas apstarošanas (PCI) pielietošanu, kas ievērojami samazina simptomātisko galvas smadzeņu metastāžu risku un palielina kopējo dzīvildzi lokalizēta SŠPV tiem pacientiem, kuru slimība labi noreagējusi uz kombinētu staru-ķīmijterapiju. Salīdzinot ar literatūras datiem sliktākus dzīvildzes rezultātus var tāpēc izskaidrot arī ar nepietiekoši biežu PCI pielietojumu šajā pētījumā iekļautiem lokalizētas stadijas pacientiem – to ir saņēmuši tikai 9 no 44 pilno/daļējo remisiju sasniegušajiem pacientiem.

Vēl viens faktors, kas var izskaidrot sliktākus dzīvildzes radītājus šī retrospektīvā pētījuma lokalizētas stadijas pacientiem, ir praktiski totāla staru terapijas pielietošana secīgi pēc pabeigtas ķīmijterapijas nevis kopā ar to. Tikai 1 pacients ir saņēmis vienlaicīgu staru-ķīmijterapiju, kur sistēmiska terapija potencē staru terapijas lokālu pretvēža efektu. Tas izskaidrojams ar tajā laikā vēl salīdzinoši nenobriedušiem publicētajiem datiem par vienlaicīgas staru-ķīmijterapijas pārākumu par secīgu pieeju, ka arī modernas staru terapijas iekārtas trūkumu slimnīcā. Pateicoties tieši progresam staru terapijas tehnoloģijās, ir izdevies ievērojami uzlabot SŠPV ārstēšanas rezultātus pēdējo 3 deķāžu laikā. Mūsdienīgas tehnoloģijas ar 3D konformālu vai intensitātes modulētu apstarošanu ļauj pievadīt lielāku starojumu ar mazākām blaknēm un vienlaicīga staru-ķīmijterapija pašreiz ļauj sasniegt 5 gadu dzīvildzi pat līdz ~30% pacientu (Faivre-Finn et al., 2017). Pēc modernā lineārā paātrinātāja iegādāšanās Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā 2010. gadā vienlaicīgu staru-ķīmijterapijas saņemumu plaušu vēža pacientu skaits ir strauji palielinājies. Jāpiebilst, ka dzīvildzes pagarināšana notiek uz paaugstinātas toksicitātes rēķina un pacientu atlasei un atbalsta terapijai ārstēšanas laikā ir izšķiroša loma. Promocijas darba autors analizējis 37 plaušu vēža pacientu toksicitātes un efektivitātes datus, kas saņēma vienlaicīgu staru-ķīmijterapiju Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā 2011.-2014. gados. Dati prezentēti 2014. gadā 6. Baltijas Onkologu kongresā.

Kā prognostisku faktoru pacientu dzīvildzei promocijas darbā izvērtēja tikai lokalizētu (bez attālām metastāzēm) vai izplatītu slimības stadiju (ar attālām metastāzēm). Lokalizēts sīkšūnu plaušu vēzis ir heterogēna slimība, kurā ietilpst gan agrīnas stadijas slimība ar izolētu operablu plaušu mezglu bez metastāzēm vidēnes limfmezglos un attālos orgānos (I-II stadija pēc TNM klasifikācijas), gan lokāli izplatīta slimība ar inoperablu primāru audzēju vai metastāzēm vidēnes limfmezglos un bez metastāzēm attālos orgānos (III stadija pēc TNM klasifikācijas). Kaut I-II stadijas SŠPV ir sastopams tikai aptuveni 15% pacientu (Salem et al., 2019), viens no iespējamiem ierobežojumiem šajā darbā ir lokalizētas stadijas sīkšūnu plaušu vēža pacientu supgrupu analīzes trūkums, vadoties pēc TNM klasifikācijas – respektīvi I, II un III stadijas ietekme uz dzīvildzi. 3 pētījuma pacientiem agrīnas lokalizētas slimības grupā tika veikta operatīva terapija ar radikālu nolūku – 1 pneimonektomija, 1 lobektomija un 1 plaušu audzēja margināla rezekcija.

4.2. Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors

Plānojot ārstēšanas taktiku sīkšūnu plaušu vēža pacientiem, papildus klīniskiem prognostiskiem faktoriem būtu ļoti svarīgi izvērtēt arī ar audzēja molekulāro bioloģiju saistītos parametrus, kas var ietekmēt slimības gaitu un atbildes reakciju uz terapiju. Pagaidām ikdienas praksē iespējams izmantot tikai neuroendokrīno marķieru (CD56, sinaptofizīns, hromogranīns A) imūnhistoķīmisku izvērtēšanu histoloģiskas izmeklēšanas laikā un atkarībā no to klātbūtnes vai trūkuma uz šūnu virsmas slimību sagrupēt “klasiskajā” vai “variantajā” apakštipā. Variantais apakštips ir primāri neuzņēmīgs pret platīna bāzes ķīmijterapiju un staru terapiju ar attiecīgi daudz sliktāku prognozi. 2019. gadā Rudin *et al.* pētnieku grupai molekulāru pamatojumu šīm atšķirīgajām sīkšūnu plaušu vēža formām izdevās atrast nevis konkrētu gēnu mutācijās, bet specifisko transkripcijas faktoru ASCL1 (*achaete-scute homologue 1*) un NeuroD1 (*neurogenic differentiation factor 1*) ekspresijas atšķirībās. Klasiskajam SŠPV veidam bija raksturīga augsta ASCL1 aktivitāte, savukārt augsta NeuroD1 - variantajam. Izvērtējot ASCL1, NeuroD1 un vēl divu papildus svarīgo transkripcijas regulētāju YAP1 (*yes-associated protein 1*) un POU2F3 (*POU class 2 homeobox 3*) prevalējošu ekspresiju, pētnieki rekomendēja sīkšūnu plaušu vēzi iedalīt 4 molekulārajos apakštipos - SCLC-A, SCLC-N, SCLC-Y and SCLC-P (Rudin *et al.*, 2019). Prognostiska nozīme šīm molekulārajiem iedalījumiem pagaidām nav validēta, ir arī piedāvājumi molekulāros apakštipus noteikt un grupēt nedaudz atšķirīgi, no citām pētnieku komandām (Baine *et al.*, 2020, Wooten *et al.*, 2019, Simpson *et al.*, 2020). Jebkurā gadījumā pašreiz ir iegūti signāli par dažādu atslēgas transkripcijas regulētāju potenciālu biomarkķera lomā, kas nākotnē varētu palīdzēt personalizēt sīkšūnu plaušu vēža pacientu ārstēšanu atkarībā no viņu audzēju apakštīpa specifiskās ievainojamības (Poirier *et al.*, 2020, Schwendenwein *et al.*, 2021).

Šajā promocijas darbā autors salīdzināja Sonic Hedgehog signālceļa galvenā mērķa gēna un atslēgas transkripcijas faktora *Gli1*, kā arī citu ar to asociēto gēnu (*SMO, SUFU, PTCH1, HHIP, BCL2, BMI1, ZEB1, ZEB2, N-MYC, Twist1*) mRNS ekspresiju īsas dzīvildzes (OS ≤ 9,6 mēneši) un garas dzīvildzes (OS > 9,6 mēneši) grupu III/IV stadiju SŠPV pacientu pirmsterapijas pētījuma audzēja biopsiju paraugos. Statistiski ticami augstākas *Gli1* ekspresijas vidējās vērtības tika konstatētas garas dzīvildzes sīkšūnu plaušu vēža pacientiem pirmsterapijas biopsijas paraugos, salīdzinot ar īsas dzīvildzes grupu ($p = 0,0196$, 95% CI: 0,000016 to 0,000147). Pārējo Hedgehog signālceļa asociēto gēnu (*SMO, SUFU, PTCH1, HHIP, BCL2, BMI1, ZEB1, ZEB2, N-MYC, Twist1*) ekspresijas līmenis īsas dzīvildzes un garas dzīvildzes grupu pacientu pirmsterapijas pētījuma audzēja biopsiju paraugos statistiski ticami neatšķiras.

Gli1 prognostiska nozīme ir aprakstīta vairākos pētījumos un meta-analizēs krūts vēzim (Wang *et al.*, 2017), kuņģa vēzim (Jian-Hui *et al.*, 2016), plaušu adenokarcinomai un plakanšūnu plaušu vēzim (Berardi *et al.*, 2014, Cui *et al.*, 2017), hepatobiliāriem audzējiem, dzemdes kakla vēzim, rabdomiosarkomai, resnās zarnas vēzim, olnīcu vēzim, urīnpūšļa vēzim, barības vada vēzim, plakanšūnu galvas un kakla vēzim un aizkuņģa dziedzera vēzim (Cheng *et al.*, 2016a). Paaugstināta *Gli1* ekspresija šūnās vairāk tika novērota audzēju izplatītajās stadijās un bija saistīta ar nelabvēlīgu prognozi. Vienīgi intrakraniāliem audzējiem *Gli1* pozitivitāte nekorelēja ar sliktāku dzīvildzi. Tieši otrādi, pazeminātai *Gli1* ekspresijai glioblastomu šūnu kodolos bija negatīva prognostiska nozīme (Kim *et al.*, 2017). Attiecībā uz

Gli1 prognostisko lomu plaušu adenokarcinomas slimniekiem, ir pētījums, kas uzrādīja garāku dzīvildzi pacientiem ar Gli1 pozitīviem audzējiem (Kim et al., 2013). Pagaidām literatūrā var atrast tikai vēl vienu pētījumu, kas izvērtēja GLI1, PTCH1, SHH un SMO proteīnu ekspresijas prognostisko lomu sīkšūnu plaušu vēzim. Šajā pētījumā tika imūnhistoķīmiski izmeklēti 36 izplatītas stadijas SŠPV pacientu formalīna fiksētus parafinā ieguldītus audzēju biopsijas paraugi un datu korelācija ar pacientu dzīvildzi. Paaugstināta Gli1, PTCH1, SHH un SMO ekspresija tika atrasta attiecīgi 12 (33,3%), 5 (13,9%), 5 (13,9%) un 6 (16,7%) paraugiem. Vienīgi Sonic Hedgehog signālproteīna SHH paaugstināta ekspresija bija statistiski ticami saistīta ar sliktākiem dzīvildzes rādītājiem (Lim et al., 2019).

Sīkšūnu plaušu vēzis ir specifiska malignitāte ar dažām bieži novērotām kritiskām ģenētiskām un epigenētiskām izmaiņām, kas noved pie Hedgehog signālceļa liganda-neatkarīgas aktivācijas un Gli1 paaugstinātas aktivitātes. *Gli1* pārekspresija var būt izraisīta piemēram ar bi-allelisku TP53 gēna inaktivāciju, kas tiek novērota praktiski visos SŠPV gadījumos (Mazzà et al., 2013, George et al., 2015). Vēl viena bieži novērota *Gli1* aktivāciju izraisoša molekulāra novirze ir NOTCH signālceļa inhibīcija, pateicoties liganda-neatkarīga inhibitora DLK1 (Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1) augstai ekspresijai, kas tika novērota 77% no 110 SŠPV audzēju paraugiem. 25% no šiem audzēju paraugiem tika novērotas arī inaktivējošas NOTCH signālceļa gēnu mutācijas (George et al., 2015). Neuroendokrīniem audzējiem un arī sīkšūnu plaušu vēzim ir raksturīga DLL3 (Delta-like ligand 3) augsta ekspresija. DLL3 ir inhibējošs NOTCH ligands, kas veicina endosomālu/lizosomālu degradāciju gan aktivējošiem NOTCH transmembrānu receptoriem, gan aktivējošam membrānas ligandam DLL1 (Chapman et al., 2011, Serth et al., 2015). NOTCH signāli samazina Gli1 ekspresiju caur HES/HEY saimes proteīniem (Katoh and Katoh, 2009b), pie samazinātas NOTCH aktivitātes tāpēc ir iespējama Gli1 funkciju pastiprināšanās. Papildus pētījumi pie NOTCH aktivācijas uzrādīja šūnu cikla inhibīciju, samazinātu audzēja augšanu un metastāžu veidošanās potenciālu, kā arī samazinātus šūnu neuroendokrīnos marķierus. Kopumā tas demonstrē NOTCH signālceļa audzēja supresora īpašības (Hassan et al., 2014). AKT endogēnā inhibitora audzēja supresorgēna PTEN (fosfatāzes un tensīna homologa) delēcijas dēļ sīkšūnu plaušu vēža šūnās var notikt onkogēnā PI3K/AKT/mTOR signālceļa pāraktivācija ar sekundāri palielinātu liganda-neatkarīgu Gli1 ekspresiju (Pietrobono et al., 2019). PTEN inaktivējošas mutācijas aprakstītas 10-18% sīkšūnu plaušu vēžu paraugos (Yokomizo et al., 1998). Tomēr biežāk novēro citu PI3K/AKT/mTOR signālceļa komponentu (*PIK3CA*, *AKT2*, *AKT3*, *RICTOR*, *mTOR*) aktivējošas mutācijas vai amplifikācijas (Umemura et al., 2014, Ross et al., 2014).

Šī promocijas darba atradne ar augstāku *Gli1* ekspresiju garas dzīvildzes sīkšūnu plaušu vēža pacientiem, iespējams, norāda uz zemāku mutāciju un epigenētisko noviržu slogu un tādējādi saglabātu sīkšūnu plaušu vēzim raksturīgu augstu Gli1 aktivitāti. Pieaugot ģenētisko un epigenētisko bojājumu skaitam audzēja šūnās, sākotnēji augsta *Gli1* ekspresija var samazināties un attiecīgi norādīt uz agresīvāku slimības gaitu un pretvēža terapijas rezistenci. Pētījums uzrādīja Sonic Hedgehog signālceļa galvenā mērķa gēna *Gli1* paaugstinātu ekspresiju kā iespējamo sīkšūnu plaušu vēža pozitīvu prognostisko biomarķieri atšķirībā no tā negatīvas prognostiskas nozīmes citu audzēju gadījumā. Iegūto rezultātu validēšanai ir nepieciešama tālāka izpēte, ņemot vērā mazu pacientu skaitu pētījumā.

Viens būtisks promocijas darba ierobežojums ir gēnu ekspresijas novērtējums mRNA, nevis proteīnu līmenī. Kvantitatīvi mRNS dati ne vienmēr atspoguļo reālo proteīna ekspresiju

ļoti īsa mRNS pussabrukšanas perioda, ribosomu noslogojuma faktora, kā arī iespējamās pēctranskripcijas regulācijas dēļ (piemēram mikroRNS izraisītas translācijas nomākšanas vai mRNS destabilizācijas dēļ) (Payne, 2015).

Vēl viens no iespējamiem trūkumiem šajā darbā ir tikai lokāli izplatītas (III stadija pēc TNM klasifikācijas) un izplatītas stadijas (IV stadija pēc TNM klasifikācijas - sīkšūnu plaušu vēzis ar metastāzēm attālos orgānos) pacientu iekļaušana analīzē. To var izskaidrot ar ierobežotām fibrobronhoskopiskas audzēja biopsijas iespējām agrīnas lokalizētas slimības (I-II stadija pēc TNM klasifikācijas) pacientiem, kur parasti tā tiek iegūta operācijas ceļā.

Atšķirīga saņemtā terapija garas un īsas dzīvildzes grupu pacientiem (3.22. tabula) izskaidrojama ar labāku atbildes reakciju uz saņemto ķīmijterapiju garas dzīvildzes grupā - daļēja remisija bija visiem 6 pacientiem, salīdzinot ar 4 pacientiem īsas dzīvildzes grupā. Līdz ar to vairāk nekā pusei pacientu varēja pielietot secīgu staru terapiju un pusei pacientu arī konsolidējošu profilaktisku galvas apstarošanu (PCI).

4.3. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā

Izskatot literatūras datus, promocijas darba autors neatrada publikācijas par līdzīga dizaina pētījumiem un šo darba daļu tāpēc var uzskatīt par pirmo ziņojumu, kas tieši salīdzina Hedgehog signālceļa komponentu un ar to saistīto gēnu ekspresiju viena sīkšūnu plaušu vēža pacienta pāra biopsijās pirms terapijas un pie slimības recidīva. Preklīniska izpēte sīkšūnu plaušu vēzim balstās galvenokārt uz eksperimentiem ar šūnu līnijām un ksenograftiem, sakarā ar ierobežoti pieejamiem audzēju paraugiem (Hamilton et al., 2012). *In vitro* modelī iegūtie dati ne vienmēr atspoguļo audzēja reālo situāciju *in vivo*, jo šūnu līniju/ksenograftu veidošanas procesā no pacienta iegūtajām vēža šūnām pēdējās var notikt neatgriezeniskas gēnu ekspresijas izmaiņas (Daniel et al., 2009). Attiecībā uz Hedgehog signālceļu ir pētījumi, kas uzrādīja ievērojami augstāku vidējo *Gli1* ekspresiju sīkšūnu plaušu vēža biopsijās, salīdzinot ar šūnu līnijās novēroto (Pedersen et al., 2003, Vestergaard et al., 2006). Šī promocijas darba priekšrocība ir tā, ka Hedgehog signālceļa gēnu mRNS ekspresija tika izvērtēta audzēju svaigās biopsijās (*in vivo*).

Recidivējošas slimības biopsijas paraugā tika novērota 2,9 reizes zemāka Hedgehog signālceļa aktivitātes galvenā marķiera *Gli1* ekspresija, kaut starpība nerasniedza statistiski nozīmīgu vērtību ($p = 0,0529$).

Samazināts Hedgehog signālceļa 6 saistīto gēnu (*PTCH1*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1* un *ZEB1*) ekspresijas līmenis tika novērots recidīva laikā. Salīdzinot ar pirmsterapijas paraugu, pāra biopsijās šo gēnu ekspresija attiecīgi bija 2,6; 2,2; 1,9; 1,8; 1,2 un 1,1 reizes zemāka, arī statistiski nenozīmīga (attiecīgi $p = 0,4252$, $p = 0,1268$, $p = 0,2480$, $p = 0,1169$, $p = 0,1480$ un $p = 0,7595$), kā arī 1,8 reizes zemāka ekspresija tika novērota recidivējošas slimības biopsijas paraugā *Gli* aktivatoram *SMO* bez statistiski nozīmīgas atšķirības ($p = 0,4111$).

Vienīgi Hedgehog signālceļa inhibitori *SUFU* un divi *Shh* inducējamie gēni – *BCL2* un *BMI1* uzrādīja attiecīgi 0,8; 0,9 un 0,8 reizes augstāku ekspresiju *Rel* biopsijas paraugā, salīdzinot ar pirmsterapijas stāvokli. Pieaugums arī nebija statistiski ticams ar atbilstošiem $p = 0,3074$, $p = 0,7921$ un $p = 0,3822$.

Vēža cilmes šūnas var būt par pamatu ļaundabīga audzēja attīstībai, atjaunošanai un rezistences iegūšanai. Daudzi pētnieki ir sasaistījuši izmainītu Hedgehog signālceļa aktivitāti ar plaušu normālo neuroendokrīno cilmšūnu un atbilstoši sīkšūnu plaušu vēža cilmšūnu funkcionēšanu un izdzīvošanu, tādējādi padarot to par potenciālo terapeitisko mērķi. Tika iegūti daudzsoļi preklīniski dati, kas uzrādīja kanonisku Hedgehog signālceļa inhibitoru un ķīmijterapijas sinerģistisku efektu sīkšūnu plaušu vēža ķīmijrezistentu šūnu subpopulācijā. Tomēr klīniskajos pētījumos ar *SMO* inhibitoru (*Vismodegib*, *LDE-225*, *BMS-833923* un *LY2940680*) pievienošanu sīkšūnu plaušu vēža pacientu ārstēšanā pozitīvi rezultāti netika iegūti.

Iespējamais izskaidrojums šādai neveiksmei varētu būt Hedgehog ceļa saistīto signālproteīnu ne-kanoniska aktivācija. Kā piemēru liganda-neatkarīgai *Gli1* aktivācijai var minēt *Gli1* gēna pārekspresiju, ko novēro *TP53* deficīta gadījumā. Pētījumā ar cilvēka medulloblastomas šūnu līnijām un *Ptc*^{-/-} peles embrioniskiem fibroblastiem to ekspozīcija *DNS* bojājošiem citotoksiskiem medikamentiem sākumā inducēja *p53* ekspresiju, kas

sekojoši veicināja Gli1 samazināšanos tā p53 atkarīgas ubikvitinizēšanas un degradācijas rezultātā (Mazzà et al., 2013). Šī sakarība var būt izšķiroša sīkšūnu plaušu vēža gadījumā, kur bi-alēliska TP53 un RBI gēnu inaktivācija tiek novērota praktiski visiem pacientiem (George et al., 2015). Liganda-neatkarīga Hedgehog signālceļa aktivācija var notikt arī aktivējošo mutāciju un amplifikāciju gadījumā citos signālceļos (RAS-RAF-MEK vai PI3K/AKT/mTOR). Piemēram, pētījumos ar melanomas, prostatas vēža un cilvēku gliomas šūnām H-RAS vai N-RAS vai AKT1 onkogēnas mutācijas potencē Gli1 funkcijas, pastiprinot tā transkripciju un pārvietošanu uz kodolu, kā arī samazinot SUFU atkarīgu degradāciju (Stecca et al., 2007). Arī C-MYC ir onkogēns, kas var aktivēt Gli1 neatkarīgi no Hedgehog signālceļa ligandiem. Tas ir bieži pārekspresēts gan sīkšūnu, gan ne-sīkšūnu plaušu vēža šūnās (Wistuba et al., 2001). C-MYC tieši piesaistās pie Gli1 promotera un aktivē tā transkripciju. C-MYC neitralizācija ar mazo molekulu inhibitoriem samazināja Gli1 mRNS daudzumu un izraisīja apoptozi eksperimentos ar Bērķita limfomas šūnu līnijām (Yoon et al., 2013). NOTCH signālceļa inhibīcija ir vēl viens bieži novērotais molekulārais mehānisms Gli1 aktivācijai sīkšūnu plaušu vēža šūnās.

Ņemot vērā multiplas iespējamās liganda-neatkarīgas mijiedarbības saistībā ar Hedgehog signālceļu, zemāka Gli1 ekspresija recidivējošas slimības biopsijas paraugā var atspoguļot tālāku audzējā notikušo dažādu signālcelu un/vai epiģenētisko procesu deregulāciju. Šajā gadījumā papildu ģenētisko/epiģenētisko izmaiņu uzkrāšanās audzējā ārstēšanas laikā samazina sākotnēji augstu Gli1 līmeni, kas ir raksturīgs sīkšūnu plaušu vēzim un izskaidrojams ar dažām kritiskām molekulārām novirzēm, tādām kā bieži novērotais TP53 deficīts vai samazināta NOTCH signālceļa aktivitāte.

Šī pētījuma sadaļas iespējamais trūkums ir primāri rezistenta pacienta iekļaušana analīzē. Vienam pacientam sīkšūnu plaušu vēzis nav reaģējis uz pretvēža terapiju, kas varētu liecināt par rezistenci asociētu molekulāro noviržu klātbūtni jau pirmsterapijas paraugā.

Šis promocijas darbs bija pirmais mēģinājums atrisināt viena sīkšūnu plaušu vēža pacienta pāra biopsiju pieejamības trūkumu, lai varētu pētīt izmaiņas vēža šūnās pirms terapijas un slimības recidīva/progresijas gadījumā. Diemžēl tikai 5 pacientiem no 20 bija iespējams veikt pētījuma fibrobronhoskopiju progresējoša audzēja parauga iegūšanai un tikai trim no viņiem izdevās iegūt kvalitatīvus abus paraugus. Galvenie iemesli šādam zemam atkārtotu biopsiju radītājam bija slimības progresija ārpus krūšu kurvja un pacientu atteikšanās no atkārtotas invazīvas procedūras. Problēmas sagādāja arī fibrobronhoskopijas ceļā iegūto audzēja biopsijas audu mazie izmēri un ievērojamas pētījuma pacientu daļas izslēgšana no analīzes, jo citoloģiski nebija apstiprināta vēža šūnu klātbūtne paraugā.

Pētījuma dati liecina par Hedgehog signālceļa lielākas komponentu daļas aktivitātes samazinājumu recidivējoša sīkšūnu plaušu vēža audos, kaut atšķirība nerasniedza statistiski nozīmīgu vērtību. Tādējādi Hedgehog signālceļa aktivācija varētu nebūt universāls mehānisms sīkšūnu plaušu vēža recidīvam un rezistences attīstībai. Lai šajā pētījumā iegūtos rezultātus apstiprinātu un atrastu pielietojumu klīnikā, būtu nepieciešams lielāks pacientu skaits. Ilgāks laika periods sīkšūnu plaušu vēža audu paraugu savākšanai vai papildu centru iekļaušana biopsiju savākšanas programmā varētu atrisināt šo problēmu.

SECINĀJUMI

1. Būtiskākie klīniskie prognostiskie faktori, kas statistiski ticami uzlaboja dzīvildzi, bija pacientu sieviešu dzimums, labs vispārējais stāvoklis un lokalizēta slimības stadija. Ārstēšanas rezultāti analizētājiem 100 sīkšūnu plaušu vēža pacientiem bija sliktāki, salīdzinot ar publicētiem literatūras datiem.
2. Statistiski ticami augstāka Sonic Hedgehog signālceļa galvenā mērķa gēna un atslēgas transkripcijas faktora *Gli1* ekspresija tika konstatēta garās dzīvildzes (OS > 9,6 mēneši) sīkšūnu plaušu vēža pacientiem pirmsterapijas biopsijas paraugos, salīdzinot ar īsās dzīvildzes grupu.
3. Hedgehog signālceļa komponentu un ar to saistīto gēnu ekspresijas tiešs salīdzinājums viena sīkšūnu plaušu vēža pacienta pāra biopsijās pirms terapijas un recidivējošā audzējā liecina par Hedgehog signālceļa lielākas komponentu daļas aktivitātes samazinājumu recidivējošā sīkšūnu plaušu vēža audos, kaut starpība nerasniedza statistiski nozīmīgu vērtību. Tādējādi Hedgehog signālceļa aktivācija varētu nebūt universāls mehānisms sīkšūnu plaušu vēža rezistences attīstībai.

PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Plānojot ārstēšanas taktiku sīkšūnu plaušu vēža pacientiem, rekomendē ņemt vērā būtiskākos klīniskos prognostiskos faktorus - pacienta dzimumu, vispārējo stāvokli un slimības stadiju.

PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR DARBA TĒMU

Zinātniskās publikācijas izdevumos, kas iekļauti starptautiskajās datu bāzēs:

1. Kozirovskis, Viktors, Zandberga, Elīna, Magone, Melita, Purkalne, Gunta, Linē, Aija and Vikmanis, Uldis. "Expression of the Sonic Hedgehog Embryonic Signalling Pathway Components in Matched Pre-Treatment and Relapsed Small Cell Lung Cancer Biopsies" Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences., vol.75, no.5, 2021, pp.335-342. <https://doi.org/10.2478/prolas-2021-0049> (SCOPUS).
2. Kozirovskis V, Zandberga E, Magone M, Purkalne G, Linē A, Vikmanis U. High expression of *Gli1* is associated with better survival in advanced SCLC. *Exp Oncol.* 2020 Mar;42(1):75-77. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-1.14266. PMID: 32231190 (PubMed; SCOPUS).
3. Zandberga E, Kozirovskis V, Ābols A, Andrējeva D, Purkalne G, Linē A. Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013 Apr;52(4):356-69. doi: 10.1002/gcc.22032. Epub 2012 Dec 10. PMID: 23404859 (PubMed; SCOPUS).
4. Kozirovskis, V., Bērziņa, V., Geriņa-Bērziņa, A., Skuja, E., Šorubalko, A. & Purkalne, G. 2012. Small cell lung cancer treatment in Paul Stradins Clinical University Hospital (Riga, Latvia) – Update after 3 year follow up. *Lung Cancer*, 77, S34-S35 (Web of Science).

Zinātniski raksti ārvalstīs izdotos recenzējamos izdevumos:

1. Taivans I, Senterjakova N, Kozirovskis V, Strazda G, Nazarovs J, et al. Non-smoking woman with adenocarcinoma of the lung, IV stage with ROS1 mutation and acquired thrombophilia. *J Pulmonol Respir Res.* 2021; 5: 064-072. DOI:10.29328/journal.jprr.1001027.

Uzstāšanās starptautiskās konferencēs:

1. Kozirovskis V, Zandberga E, Magone M, Purkalne G, Linē A, Vikmanis U. Analysis of relapsed SCLC biopsies reveals lower *Gli1* expression than in matched pre-treatment biopsies; high pre-treatment *Gli1* expression is associated with better survival in advanced SCLC. 16th Central European Lung Cancer Conference 01.-03.12.2017 Riga (mutisks ziņojums).
2. Kozirovskis V. Severe acquired thrombophilia associated with ROS1 positive lung adenocarcinoma. 9th European Regional Conference on Thoracic Oncology: New challenges in diagnosis and treatment. Vilnius, Lithuania. 15-17 June 2017 (mutisks ziņojums).
3. V. Kozirovskis, G. Purkalne. Successful treatment with Erlotinib after initial failure to find EGFR activating mutation: case report. 15th Central European Lung Cancer Conference 28-30.12.2015. Prague Medical Report Vol. 116 (2015) Supplement:

pp.47-48 http://pmr.lf1.cuni.cz/media/supplements/pmr_2015_supplement.pdf (stenda referāts).

4. Kozirovskis Viktors, Purkalne Gunta, Vija Bērziņa, Aija Geriņa-Bērziņa, Elīna Skuja, Linda Jurginauska, Arturs Šorubalko, Jeļena Nikolajeva, Jānis Kazaks, Lilija Ķēniņa. Concurrent chemoradiation therapy of lung cancer - toxicity and efficacy profile: a single-institution experience of 37 patients. 6th Baltic Congress of Oncology "Multidisciplinary approach in cancer care" 03.-04.10.2014 Vilnius. Abstracts book, p. 36-38 <http://www.lsts.lt/uploads/file/15x21%20cm%20knyga.pdf> (mutisks ziņojums).
5. Kozirovskis, Viktors, Vija Bērziņa, Aija Geriņa-Bērziņa, Elīna Skuja, Arturs Šorubalko, and Gunta Purkalne. "Small cell lung cancer treatment in Paul Stradins Clinical University Hospital (Riga, Latvia) – Update after 3 year follow up." Lung Cancer 77, Supplement 1, no.0 (June 2012): S34–S35. 14th Central European Lung Cancer Conference 24-27.06.2012 Prague (stenda referāts).
6. Viktors Kozirovskis, A. Geriņa-Bērziņa, G. Purkalne. Type 2 diabetes and cancer: review. International Conference „Nutrition and Health”. Book of Abstracts (Riga, Latvia, September 4-6, 2012). p. 38 (mutisks ziņojums).

PATEICĪBAS

Šī darba tapšana nebūtu iespējama bez daudzu cilvēku nesavtīgas līdzdalības un atbalsta. Es gribētu pateikties visiem pētījumā iesaistītiem kolēģiem un īpaši pacientiem par sapratni un pacietību.

Patiesā cieņā pateicos promocijas darba vadītājai prof. Guntai Purkalnei par saudzīgu, bet tajā pašā laikā neatlaidīgu motivāciju, atbalstu un profesionālo virzību. Prof. Guntas Purkalnes aktīvā darbība veicinājusi ne tikai onkoloģijas ķīmijterapijas nozares attīstību visas Latvijas līmenī, bet dziļi ietekmējusi arī manu personīgo izaugsmi.

Izsaku lielu pateicību disertācijas darba vadītājam, prof. Uldim Vikmanim par doto iespēju izstrādāt un aizstāvēt promocijas darbu viņa vadībā. Paldies par pacietību un uzticēšanos.

Īpaša pateicība Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra vadošajai pētniecei asoc. Prof. Aijai Linē un molekulārajai bioloģei Elīnai Zandbergai par nenovērtējamo palīdzību projekta molekulāri ģenētiskās daļas realizēšanā.

Liels paldies PSKUS bronhoskopijas speciālistei dr. Melitai Magonei un laboratorijas ārstei citoloģei dr. Romaldai Grigalinovičai par viņu precizitāti un papildus darbu ar pētījumā iesaistītiem pacientiem.

Pateicība profesoriem Jānim Gardovskim un Īzakam Rašalam par vērtīgiem padomiem un ieteikumiem promocijas darba publikāciju izstrādē, bet profesoram Valdim Pīrāgam par nemitīgu uzmuntrināšanu un idejām darba tapšanas grūtajos brīžos.

Pateicos PSKUS Onkoloģijas klīnikas kolēģēm – dr. med. Aijai Geriņai-Bērziņai, dr. med. Elīnai Sīviņai, dr. Lindai Jurginauskai un dr. Sigitai Hasnerei par atbalstu un spēju uzmuntrināt brīžos, kad tas nepieciešams. Paldies RAKUS kolēģēm – dr. Evai Vecvagarei un dr. Ievai Fleijai par palīdzību pacientu rekrutēšanā pētījumam.

Izsaku pateicību Latvijas Universitātes promocijas padomes sekretārei – asoc. profesorei Līgai Plakanei par praktiskiem padomiem promocijas procesa gaitā.

Paldies ģimenei par sapratni un atbalstu. Īpašs paldies manai sievai Signei par ieguldījumu šī darba rediģēšanā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. AARTS, M. J., AERTS, J. G., VAN DEN BORNE, B. E., BIESMA, B., LEMMENS, V. E. & KLOOVER, J. S. 2015. Comorbidity in Patients With Small-Cell Lung Cancer: Trends and Prognostic Impact. *Clin Lung Cancer*, 16, 282-91.
2. ACS 2021. Cancer Facts & Figures. American Cancer Society (ACS).
3. AJANI, J. A., WANG, X., IZZO, J. G., CRANE, C. H., ENG, C., SKIBBER, J. M., DAS, P. & RASHID, A. 2010. Molecular biomarkers correlate with disease-free survival in patients with anal canal carcinoma treated with chemoradiation. *Dig Dis Sci*, 55, 1098-105.
4. AL-HAJJ, M., WICHA, M. S., BENITO-HERNANDEZ, A., MORRISON, S. J. & CLARKE, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3983-3988.
5. ALBAIN, K. S., CROWLEY, J. J., LEBLANC, M. & LIVINGSTON, R. B. 1990. Determinants of improved outcome in small-cell lung cancer: an analysis of the 2,580-patient Southwest Oncology Group data base. *Journal of Clinical Oncology*, 8, 1563-1574.
6. ALISON, M. R., LIN, W. R., LIM, S. M. & NICHOLSON, L. J. 2012. Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev*, 38, 589-98.
7. ALONSO, L. & FUCHS, E. 2003. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 1, 11830-5.
8. ALSULAMI, A. F., TORRES, P. H. M., MOGHUL, I., ARIF, S. M., CHAPLIN, A. K., VEDITHI, S. C. & BLUNDELL, T. L. 2021. COSMIC Cancer Gene Census 3D database: understanding the impacts of mutations on cancer targets. *Briefings in bioinformatics*, 22, bbab220.
9. AUGERT, A., ZHANG, Q., BATES, B., CUI, M., WANG, X., WILDEY, G., DOWLATI, A. & MACPHERSON, D. 2017. Small Cell Lung Cancer Exhibits Frequent Inactivating Mutations in the Histone Methyltransferase KMT2D/MLL2: CALGB 151111 (Alliance). *J Thorac Oncol*, 12, 704-713.
10. AUPÉRIN, A., ARRIAGADA, R., PIGNON, J. P., LE PÉCHOUX, C., GREGOR, A., STEPHENS, R. J., KRISTJANSEN, P. E., JOHNSON, B. E., UEOKA, H., WAGNER, H. & AISNER, J. 1999. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *N Engl J Med*, 341, 476-84.
11. BAINE, M. K., HSIEH, M. S., LAI, W. V., EGGER, J. V., JUNGBLUTH, A. A., DANESHBOD, Y., BERAS, A., SPENCER, R., LOPARDO, J., BODD, F., MONTECALVO, J., SAUTER, J. L., CHANG, J. C., BUONOCORE, D. J., TRAVIS, W. D., SEN, T., POIRIER, J. T., RUDIN, C. M. & REKHTMAN, N. 2020. SCLC Subtypes Defined by ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1: A Comprehensive Immunohistochemical and Histopathologic Characterization. *J Thorac Oncol*, 15, 1823-1835.
12. BARAKAT, M. T., HUMKE, E. W. & SCOTT, M. P. 2010. Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends in molecular medicine*, 16, 337-348.
13. BARNES, H., SEE, K., BARNETT, S. & MANSER, R. 2017. Surgery for limited-stage small-cell lung cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4, CD011917-CD011917.
14. BATES, S. E., MICKLEY, L. A., CHEN, Y. N., RICHERT, N., RUDICK, J., BIEDLER, J. L. & FOJO, A. T. 1989. Expression of a drug resistance gene in human neuroblastoma cell lines: modulation by retinoic acid-induced differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 9, 4337-4344.
15. BERARDI, R., SANTINELLI, A., ONOFRI, A., BISCOTTI, T., BALLATORE, Z., CARAMANTI, M., SAVINI, A., DELISA, M. P., MORGESE, F., POMPILI, C., SALATI, M., CHIORRINI, S., BRUNELLI, A., MAZZANTI, P., BEARZI, I. & CASCINU, S. 2014. Hedgehog (Hh) Signaling is a Predictor of Clinical Outcome for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*, 5, 1-8.

16. BLANPAIN, C., LOWRY, W. E., GEOGHEGAN, A., POLAK, L. & FUCHS, E. 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 118, 635-48.
17. BONNET, D. & DICK, J. E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3, 730-737.
18. BRUECKL, W. M., HERBST, L., LECHLER, A., FUCHS, F., SCHOEBERL, A., ZIRLIK, S., KLEIN, P., BRUNNER, T. B., PAPADOPOULOS, T., HOHENBERGER, W., HAHN, E. G. & WIEST, G. H. 2006. Predictive and prognostic factors in small cell lung carcinoma (SCLC)--analysis from routine clinical practice. *Anticancer Res*, 26, 4825-32.
19. BUNTING, K. D., ZHOU, S., LU, T. & SORRENTINO, B. P. 2000. Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. *Blood*, 96, 902-9.
20. CHAPMAN, G., SPARROW, D. B., KREMMER, E. & DUNWOODIE, S. L. 2011. Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. *Hum Mol Genet*, 20, 905-16.
21. CHAPPELL, J. & DALTON, S. 2013. Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3, a014381-a014381.
22. CHENG, J., GAO, J. & TAO, K. 2016a. Prognostic role of Gli1 expression in solid malignancies: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 6, 22184.
23. CHENG, T.-Y. D., CRAMB, S. M., BAADE, P. D., YOULDEN, D. R., NWOGU, C. & REID, M. E. 2016b. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *Journal of Thoracic Oncology*, 11, 1653-1671.
24. CHI, S., HUANG, S., LI, C., ZHANG, X., HE, N., BHUTANI, M. S., JONES, D., CASTRO, C. Y., LOGRONO, R., HAQUE, A., ZWISCHENBERGER, J., TYRING, S. K., ZHANG, H. & XIE, J. 2006. Activation of the hedgehog pathway in a subset of lung cancers. *Cancer Letters*, 244, 53-60.
25. CHOI, C.-M., KIM, H. C., JUNG, C. Y., CHO, D. G., JEON, J. H., LEE, J. E., AHN, J. S., KIM, S. J., KIM, Y., CHOI, Y.-D., SUH, Y.-G., KIM, J.-E., LEE, B., WON, Y.-J. & KIM, Y.-C. 2019. Report of the Korean Association of Lung Cancer Registry (KALC-R), 2014. *Cancer Res Treat*, 51, 1400-1410.
26. CHRISTODOULOU, M., BLACKHALL, F., MISTRY, H., LEYLEK, A., KNEGJENS, J., REMOUCHAMPS, V., MARTEL-LAFAY, I., FARRÉ, N., ZWITTER, M., LEROUGE, D., POUREL, N., JANICOT, H., SCHERPEREEL, A., TISSING-TAN, C., PEIGNAUX, K., GEETS, X., KONOPA, K. & FAIVRE-FINN, C. 2019. Compliance and Outcome of Elderly Patients Treated in the Concurrent Once-Daily Versus Twice-Daily Radiotherapy (CONVERT) Trial. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 14, 63-71.
27. CHUNG, H. C., PIHA-PAUL, S. A., LOPEZ-MARTIN, J., SCHELLENS, J. H. M., KAO, S., MILLER, W. H., JR., DELORD, J. P., GAO, B., PLANCHARD, D., GOTTFRIED, M., ZER, A., JALAL, S. I., PENEL, N., MEHNERT, J. M., MATOS, I., BENNOUNA, J., KIM, D. W., XU, L., KRISHNAN, S., NORWOOD, K. & OTT, P. A. 2020. Pembrolizumab After Two or More Lines of Previous Therapy in Patients With Recurrent or Metastatic SCLC: Results From the KEYNOTE-028 and KEYNOTE-158 Studies. *J Thorac Oncol*, 15, 618-627.
28. CODONY-SERVAT, J., VERLICCHI, A. & ROSELL, R. 2016. Cancer stem cells in small cell lung cancer. *Translational lung cancer research*, 5, 16-25.
29. COZZIO, A., PASSEGUÉ, E., AYTON, P. M., KARSUNKY, H., CLEARY, M. L. & WEISSMAN, I. L. 2003. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev*, 17, 3029-35.
30. CUI, Y., CUI, C. A., YANG, Z. T., NI, W. D., JIN, Y. & XUAN, Y. H. 2017. Gli1 expression in cancer stem-like cells predicts poor prognosis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 102, 347-353.

31. DALERBA, P., CHO, R. W. & CLARKE, M. F. 2007. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*, 58, 267-84.
32. DANIEL, V. C., MARCHIONNI, L., HIERMAN, J. S., RHODES, J. T., DEVEREUX, W. L., RUDIN, C. M., YUNG, R., PARMIGIANI, G., DORSCH, M., PEACOCK, C. D. & WATKINS, D. N. 2009. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res*, 69, 3364-73.
33. DE RUYSSCHER, D., PIJLS-JOHANNESMA, M., VANSTEENKISTE, J., KESTER, A., RUTTEN, I. & LAMBIN, P. 2006. Systematic review and meta-analysis of randomised, controlled trials of the timing of chest radiotherapy in patients with limited-stage, small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 17, 543-52.
34. DEAN, M., FOJO, T. & BATES, S. 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5, 275-84.
35. DENG, N., ZHOU, H., FAN, H. & YUAN, Y. 2017. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*, 8, 110635-110649.
36. DEVITA, V. T., JR., LAWRENCE, T. S. & ROSENBERG, S. A. 2008. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology*, Philadelphia, Pa. ; London, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
37. DINGEMANS, A. C., FRÜH, M., ARDIZZONI, A., BESSE, B., FAIVRE-FINN, C., HENDRIKS, L. E., LANTUEJOUL, S., PETERS, S., REGUART, N., RUDIN, C. M., DE RUYSSCHER, D., VAN SCHIL, P. E., VANSTEENKISTE, J. & RECK, M. 2021. Small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up(☆). *Ann Oncol*, 32, 839-853.
38. DORMOY, V., DANILIN, S., LINDNER, V., THOMAS, L., ROTHHUT, S., COQUARD, C., HELWIG, J.-J., JACQMIN, D., LANG, H. & MASSFELDER, T. 2009. The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Molecular Cancer*, 8, 123.
39. EZE, C., ROENGVORAPHOJ, O., NIYAZI, M., HILDEBRANDT, G., FIETKAU, R., BELKA, C. & MANAPOV, F. 2017. Treatment Response and Prophylactic Cranial Irradiation Are Prognostic Factors in a Real-life Limited-disease Small-cell Lung Cancer Patient Cohort Comprehensively Staged With Cranial Magnetic Resonance Imaging. *Clin Lung Cancer*, 18, e243-e249.
40. FAIVRE-FINN, C., SNEE, M., ASHCROFT, L., APPEL, W., BARLESI, F., BHATNAGAR, A., BEZJAK, A., CARDENAL, F., FOURNEL, P., HARDEN, S., LE PECHOUX, C., MCMENEMIN, R., MOHAMMED, N., O'BRIEN, M., PANTAROTTO, J., SURMONT, V., VAN MEERBEECK, J. P., WOLL, P. J., LORIGAN, P., BLACKHALL, F. & TEAM, C. S. 2017. Concurrent once-daily versus twice-daily chemoradiotherapy in patients with limited-stage small-cell lung cancer (CONVERT): an open-label, phase 3, randomised, superiority trial. *The Lancet. Oncology*, 18, 1116-1125.
41. FAROOQI, A. S., HOLLIDAY, E. B., ALLEN, P. K., WEI, X., COX, J. D. & KOMAKI, R. 2017. Prophylactic cranial irradiation after definitive chemoradiotherapy for limited-stage small cell lung cancer: Do all patients benefit? *Radiother Oncol*, 122, 307-312.
42. FELIP, E., PAVLIDIS, N., STAHEL, R. A. & FORCE, E. G. T. 2005. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of small-cell lung cancer (SCLC). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 16 Suppl 1, i30-1.
43. FRANCO, F., CARCERENY, E., GUIRADO, M., ORTEGA, A. L., LÓPEZ-CASTRO, R., RODRÍGUEZ-ABREU, D., GARCÍA-CAMPELO, R., DEL BARCO, E., JUAN, O., APARISI, F., GONZÁLEZ-LARRIBA, J. L., DOMINE, M., TRIGO, J. M., COBO, M., CEREZO, S., CALZAS, J., MASSUTÍ, B., BOSCH-BARRERA, J., GARCÍA COVES, P., DOMÈNECH, M. & PROVENCIO, M. 2021. Epidemiology, treatment, and survival in small cell lung cancer in Spain: Data from the Thoracic Tumor Registry. *PLOS ONE*, 16, e0251761.

44. FRIEND, S. H., DRYJA, T. P. & WEINBERG, R. A. 1988. Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N Engl J Med*, 318, 618-22.
45. GANTI, A. K. P., LOO, B. W., BASSETTI, M., BLAKELY, C., CHIANG, A., D'AMICO, T. A., D'AVELLA, C., DOWLATI, A., DOWNEY, R. J., EDELMAN, M., FLORSHEIM, C., GOLD, K. A., GOLDMAN, J. W., GRECULA, J. C., HANN, C., IAMS, W., IYENGAR, P., KELLY, K., KHALIL, M., KOCZYWAS, M., MERRITT, R. E., MOHINDRA, N., MOLINA, J., MORAN, C., POKHAREL, S., PURI, S., QIN, A., RUSTHOVEN, C., SANDS, J., SANTANA-DAVILA, R., SHAFIQUE, M., WAQAR, S. N., GREGORY, K. M. & HUGHES, M. 2021. Small Cell Lung Cancer, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 19, 1441-1464.
46. GARZON, R., MARCUCCI, G. & CROCE, C. M. 2010. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 775-89.
47. GEORGE, J., LIM, J. S., JANG, S. J., CUN, Y., OZRETIĆ, L., KONG, G., LEENDERS, F., LU, X., FERNÁNDEZ-CUESTA, L., BOSCO, G., MÜLLER, C., DAHMEN, I., JAHCHAN, N. S., PARK, K.-S., YANG, D., KARNEZIS, A. N., VAKA, D., TORRES, A., WANG, M. S., KORBEL, J. O., MENON, R., CHUN, S.-M., KIM, D., WILKERSON, M., HAYES, N., ENGELMANN, D., PÜTZER, B., BOS, M., MICHELS, S., VLASIC, I., SEIDEL, D., PINTHER, B., SCHAUB, P., BECKER, C., ALTMÜLLER, J., YOKOTA, J., KOHNO, T., IWAKAWA, R., TSUTA, K., NOGUCHI, M., MULEY, T., HOFFMANN, H., SCHNABEL, P. A., PETERSEN, I., CHEN, Y., SOLTERMANN, A., TISCHLER, V., CHOI, C.-M., KIM, Y.-H., MASSION, P. P., ZOU, Y., JOVANOVIC, D., KONTIC, M., WRIGHT, G. M., RUSSELL, P. A., SOLOMON, B., KOCH, I., LINDNER, M., MUSCARELLA, L. A., LA TORRE, A., FIELD, J. K., JAKOPOVIC, M., KNEZEVIC, J., CASTAÑOS-VÉLEZ, E., ROZ, L., PASTORINO, U., BRUSTUGUN, O.-T., LUND-IVERSEN, M., THUNNISSEN, E., KÖHLER, J., SCHULER, M., BOTLING, J., SANDELIN, M., SANCHEZ-CESPEDES, M., SALVESEN, H. B., ACHTER, V., LANG, U., BOGUS, M., SCHNEIDER, P. M., ZANDER, T., ANSÉN, S., HALLEK, M., WOLF, J., VINGRON, M., YATABE, Y., TRAVIS, W. D., NÜRNBERG, P., REINHARDT, C., PERNER, S., HEUKAMP, L., BÜTTNER, R., HAAS, S. A., BRAMBILLA, E., PEIFER, M., SAGE, J. & THOMAS, R. K. 2015. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524, 47-53.
48. GIACCONE, G., FERRATI, P., DONADIO, M., TESTORE, F. & CALCIATI, A. 1987. Reinduction chemotherapy in small cell lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23, 1697-9.
49. GIOANNI, J., FARGES, M. F., DUPLAY, H., HERY, M., ZANGHELLINI, E., SCHNEIDER, M., MAZEAU, C., NAMER, M. & COURDI, A. 1988. In vitro clonogenicity in relation to kinetic and clinicopathological features of breast cancer. *Bull Cancer*, 75, 285-90.
50. GOLDIE, J. H. & COLDMAN, A. J. 1979. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep*, 63, 1727-33.
51. GOODELL, M. A., BROSE, K., PARADIS, G., CONNER, A. S. & MULLIGAN, R. C. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 183, 1797-1806.
52. GOTTESMAN, M. M., FOJO, T. & BATES, S. E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2, 48-58.
53. GOVINDAN, R., PAGE, N., MORGENSZTERN, D., READ, W., TIERNEY, R., VLAHIOTIS, A., SPITZNAGEL, E. L. & PICCIRILLO, J. 2006. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol*, 24, 4539-44.
54. GUPTA, S., TAKEBE, N. & LORUSSO, P. 2010. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 2, 237-50.
55. HAMILTON, G., ULSPERGER, E., GEISLER, K. & OLSZEWSKI, U. 2012. Therapy-Induced Changes of Gene Expression in a Matched Pair of Small Cell Lung Cancer (SCLC) Cell Lines. *Journal of Cancer Therapy*, Vol.03No.04, 10.
56. HASSAN, W. A., YOSHIDA, R., KUDOH, S., HASEGAWA, K., NIIMORI-KITA, K. & ITO, T. 2014. Notch1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer*, 86, 304-10.

57. HEGDE, G. V., PETERSON, K. J., EMANUEL, K., MITTAL, A. K., JOSHI, A. D., DICKINSON, J. D., KOLLESSERY, G. J., BOCIEK, R. G., BIERMAN, P., VOSE, J. M., WEISENBURGER, D. D. & JOSHI, S. S. 2008. Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Mol Cancer Res*, 6, 1928-36.
58. HELLMANN, M. D., CALLAHAN, M. K., AWAD, M. M., CALVO, E., ASCIERTO, P. A., ATMACA, A., RIZVI, N. A., HIRSCH, F. R., SELVAGGI, G., SZUSTAKOWSKI, J. D., SASSON, A., GOLHAR, R., VITAZKA, P., CHANG, H., GEESE, W. J. & ANTONIA, S. J. 2019. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell*, 35, 329.
59. HENG, W. S., PORE, M., MEIJER, C., HILTERMANN, T. J. N., CHEAH, S. C., GOSENS, R. & KRUYT, F. A. E. 2021. A unique small cell lung carcinoma disease progression model shows progressive accumulation of cancer stem cell properties and CD44 as a potential diagnostic marker. *Lung Cancer*, 154, 13-22.
60. HIRSCHMANN-JAX, C., FOSTER, A. E., WULF, G. G., NUCHTERN, J. G., JAX, T. W., GOBEL, U., GOODELL, M. A. & BRENNER, M. K. 2004. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 14228-14233.
61. HONG, S., CHO, B. C., CHOI, H. J., JUNG, M., LEE, S. H., PARK, K. S., KIM, S. K. & KIM, J. H. 2010. Prognostic Factors in Small Cell Lung Cancer: A New Prognostic Index in Korean Patients. *Oncology*, 79, 293-300.
62. HOPE, K. J., JIN, L. & DICK, J. E. 2004. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*, 5, 738-43.
63. HORN, L., MANSFIELD, A. S., SZCZĘSNA, A., HAVEL, L., KRZAKOWSKI, M., HOCHMAIR, M. J., HUEMER, F., LOSONCZY, G., JOHNSON, M. L., NISHIO, M., RECK, M., MOK, T., LAM, S., SHAMES, D. S., LIU, J., DING, B., LOPEZ-CHAVEZ, A., KABBINAVAR, F., LIN, W., SANDLER, A. & LIU, S. V. 2018. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 379, 2220-2229.
64. HU, X., BAO, Y., XU, Y. J., ZHU, H. N., LIU, J. S., ZHANG, L., GUO, Y., JIN, Y., WANG, J., MA, H. L., XU, X. L., SONG, Z. B., TANG, H. R., PENG, F., FANG, M., KONG, Y., CHEN, M. Y., DONG, B. Q., ZHU, L., YU, C., YU, X. M., HONG, W., FAN, Y., ZHANG, Y. P., CHEN, P. C., ZHAO, Q., JIANG, Y. H., ZHOU, X. M., CHEN, Q. X., SUN, W. Y., MAO, W. M. & CHEN, M. 2020. Final report of a prospective randomized study on thoracic radiotherapy target volume for limited-stage small cell lung cancer with radiation dosimetric analyses. *Cancer*, 126, 840-849.
65. HUANG, R., WEI, Y., HUNG, R. J., LIU, G., SU, L., ZHANG, R., ZONG, X., ZHANG, Z.-F., MORGENSTERN, H., BRÜSKE, I., HEINRICH, J., HONG, Y.-C., KIM, J. H., COTE, M., WENZLAFF, A., SCHWARTZ, A. G., STUCKER, I., MCLAUGHLIN, J., MARCUS, M. W., DAVIES, M. P. A., LILOGLOU, T., FIELD, J. K., MATSUO, K., BARNETT, M., THORNQUIST, M., GOODMAN, G., WANG, Y., CHEN, S., YANG, P., DUELL, E. J., ANDREW, A. S., LAZARUS, P., MUSCAT, J., WOLL, P., HORSMAN, J., TEARE, M. D., FLUGELMAN, A., RENNERT, G., ZHANG, Y., BRENNER, H., STEGMAIER, C., VAN DER HEIJDEN, E. H. F. M., ABEN, K., KIEMENEY, L., BARROS-DIOS, J., PÉREZ-RÍOS, M., RUANO-RAVINA, A., CAPORASO, N. E., BERTAZZI, P. A., LANDI, M. T., DAI, J., HONGBING SHEN, H., FERNANDEZ-TARDON, G., RODRIGUEZ-SUAREZ, M., TARDON, A. & CHRISTIANI, D. C. 2015. Associated Links Among Smoking, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Small Cell Lung Cancer: A Pooled Analysis in the International Lung Cancer Consortium. *EBioMedicine*, 2, 1677-1685.
66. HUBER, R. M. & TUFMAN, A. 2012. Update on small cell lung cancer management. *Breathe*, 8, 314.
67. IAMS, W. T., SHIUAN, E., MEADOR, C. B., ROTH, M., BORDEAUX, J., VAUPEL, C., BOYD, K. L., SUMMITT, I. B., WANG, L. L., SCHNEIDER, J. T., WARNER, J. L., ZHAO, Z. & LOVLY, C. M.

2019. Improved Prognosis and Increased Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients Who Have SCLC With Neurologic Paraneoplastic Syndromes. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 14, 1970-1981.
68. YANG, C.-F. J., CHAN, D. Y., SPEICHER, P. J., GULACK, B. C., WANG, X., HARTWIG, M. G., ONAITIS, M. W., TONG, B. C., D'AMICO, T. A., BERRY, M. F. & HARPOLE, D. H. 2016. Role of Adjuvant Therapy in a Population-Based Cohort of Patients With Early-Stage Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34, 1057-1064.
 69. YANG, Y., ZHANG, D., ZHOU, X., BAO, W., JI, Y., SHENG, L., CHENG, L., CHEN, Y., DU, X. & QIU, G. 2018. Prophylactic cranial irradiation in resected small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. *J Cancer*, 9, 433-439.
 70. YOKOMIZO, A., TINDALL, D. J., DRABKIN, H., GEMMILL, R., FRANKLIN, W., YANG, P., SUGIO, K., SMITH, D. I. & LIU, W. 1998. PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene*, 17, 475-9.
 71. YOON, J. W., GALLANT, M., LAMM, M. L., IANNACCONE, S., VIEUX, K. F., PROYTCHIEVA, M., HYJEK, E., IANNACCONE, P. & WALTERHOUSE, D. 2013. Noncanonical regulation of the Hedgehog mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt lymphoma. *Mol Cancer Res*, 11, 604-15.
 72. YOSHIKAWA, R., NAKANO, Y., TAO, L., KOISHI, K., MATSUMOTO, T., SASAKO, M., TSUJIMURA, T., HASHIMOTO-TAMAOKI, T. & FUJIWARA, Y. 2008. Hedgehog signal activation in oesophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. *Br J Cancer*, 98, 1670-4.
 73. JIAN-HUI, C., ER-TAO, Z., SI-LE, C., HUI, W., KAI-MING, W., XIN-HUA, Z., CHUANG-QI, C., SHI-RONG, C. & YU-LONG, H. 2016. CD44, Sonic Hedgehog, and Gli1 Expression Are Prognostic Biomarkers in Gastric Cancer Patients after Radical Resection. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 1013045.
 74. KARETA, M. S., GORGES, L. L., HAFEEZ, S., BENAYOUN, B. A., MARRO, S., ZMOOS, A.-F., CECCHINI, M. J., SPACEK, D., BATISTA, L. F. Z., O'BRIEN, M., NG, Y.-H., ANG, C. E., VAKA, D., ARTANDI, S. E., DICK, F. A., BRUNET, A., SAGE, J. & WERNIG, M. 2015. Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell stem cell*, 16, 39-50.
 75. KATO, Y. & KATO, M. 2009a. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*, 9, 873-86.
 76. KATO, Y. & KATO, M. 2009b. Integrative genomic analyses on GLI1: positive regulation of GLI1 by Hedgehog-GLI, TGFbeta-Smads, and RTK-PI3K-AKT signals, and negative regulation of GLI1 by Notch-CSL-HES/HEY, and GPCR-Gs-PKA signals. *Int J Oncol*, 35, 187-92.
 77. KIM, Y., DO, I. G., HONG, M. & SUH, Y. L. 2017. Negative prognostic effect of low nuclear GLI1 expression in glioblastomas. *J Neurooncol*, 133, 69-76.
 78. KIM, J. E., KIM, H., CHOE, J. Y., SUN, P., JHEON, S. & CHUNG, J. H. 2013. High expression of Sonic hedgehog signaling proteins is related to the favorable outcome, EGFR mutation, and lepidic predominant subtype in primary lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 20 Suppl 3, S570-6.
 79. KOCH, L. K., ZHOU, H., ELLINGER, J., BIERMANN, K., HÖLLER, T., VON RÜCKER, A., BÜTTNER, R. & GÜTGEMANN, I. 2008. Stem cell marker expression in small cell lung carcinoma and developing lung tissue. *Hum Pathol*, 39, 1597-605.
 80. KONDO, T., SETOGUCHI, T. & TAGA, T. 2004. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 781-786.
 81. KOZIROVSKIS, V., BĒRZIŅA, V., GERIŅA-BĒRZIŅA, A., SKUJA, E., ŠORUBALKO, A. & PURKALNE, G. 2012. Small cell lung cancer treatment in Paul Stradins Clinical University Hospital (Riga, Latvia) – Update after 3 year follow up. *Lung Cancer*, 77, S34-S35.

82. KROL, J., LOEDIGE, I. & FILIPOWICZ, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11, 597-610.
83. LAMICHHANE, D. K., KIM, H. C., CHOI, C. M., SHIN, M. H., SHIM, Y. M., LEEM, J. H., RYU, J. S., NAM, H. S. & PARK, S. M. 2017. Lung Cancer Risk and Residential Exposure to Air Pollution: A Korean Population-Based Case-Control Study. *Yonsei medical journal*, 58, 1111-1118.
84. LAPIDOT, T., SIRARD, C., VORMOOR, J., MURDOCH, B., HOANG, T., CACERES-CORTES, J., MINDEN, M., PATERSON, B., CALIGIURI, M. A. & DICK, J. E. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367, 645-648.
85. LE PÉCHOUX, C., LAPLANCHE, A., FAIVRE-FINN, C., CIULEANU, T., WANDERS, R., LEROUGE, D., KEUS, R., HATTON, M., VIDETIC, G. M., SENAN, S., WOLFSON, A., JONES, R., ARRIAGADA, R., QUOIX, E. & DUNANT, A. 2011. Clinical neurological outcome and quality of life among patients with limited small-cell cancer treated with two different doses of prophylactic cranial irradiation in the intergroup phase III trial (PCI99-01, EORTC 22003-08004, RTOG 0212 and IFCT 99-01). *Ann Oncol*, 22, 1154-1163.
86. LEE, J. S., UMSAWASDI, T., LEE, Y. Y., BARKLEY, H. T., JR., MURPHY, W. K., WELCH, S. & VALDIVIESO, M. 1986. Neurotoxicity in long-term survivors of small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 12, 313-21.
87. LEWIŃSKI, T. & ŻUŁAWSKI, M. 2003. Small cell lung cancer survival: 3 years as a minimum for predicting a favorable outcome. *Lung Cancer*, 40, 203-213.
88. LIM, S., LIM, S. M., KIM, M. J., PARK, S. Y. & KIM, J. H. 2019. Sonic Hedgehog Pathway as the Prognostic Marker in Patients with Extensive Stage Small Cell Lung Cancer. *Yonsei Med J*, 60, 898-904.
89. MACKENZIE, I. C. 2006. Stem cell properties and epithelial malignancies. *European Journal of Cancer*, 42, 1204-1212.
90. MADDISON, P., GOZZARD, P., GRAINGE, M. J. & LANG, B. 2017. Long-term survival in paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology*, 88, 1334-1339.
91. MAKARENKOVA, V. P., SHURIN, G. V., TOURKOVA, I. L., BALKIR, L., PIRTSKHALAISHVILI, G., PEREZ, L., GEREIN, V., SIEGFRIED, J. M. & SHURIN, M. R. 2003. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. *J Neuroimmunol*, 145, 55-67.
92. MAZZÀ, D., INFANTE, P., COLICCHIA, V., GRECO, A., ALFONSI, R., SILER, M., ANTONUCCI, L., PO, A., DE SMAELE, E., FERRETTI, E., CAPALBO, C., BELLAVIA, D., CANETTIERI, G., GIANNINI, G., SCREPANTI, I., GULINO, A. & DI MARCOTULLIO, L. 2013. PCAF ubiquitin ligase activity inhibits Hedgehog/Gli1 signaling in p53-dependent response to genotoxic stress. *Cell Death & Differentiation*, 20, 1688-1697.
93. MINTZ, B. & ILLMENSEE, K. 1975. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 3585-3589.
94. MIRAGLIA, S., GODFREY, W., YIN, A. H., ATKINS, K., WARNKE, R., HOLDEN, J. T., BRAY, R. A., WALLER, E. K. & BUCK, D. W. 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90, 5013-21.
95. MIZOGUCHI, T., K YAMADA, T FURUKAWA, K HIDAKA, T HISATSUGU, H SHIMAZU, T TSURUO, T SUMIZAWA & AKIYAMA., S. 1990. Expression of the MDR1 gene in human gastric and colorectal carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1679-1683.
96. MOLLAOGLU, G., GUTHRIE, M. R., BÖHM, S., BRÄGELMANN, J., CAN, I., BALLIEU, P. M., MARX, A., GEORGE, J., HEINEN, C., CHALISHAZAR, M. D., CHENG, H., IRELAND, A. S., DENNING, K. E., MUKHOPADHYAY, A., VAHRENKAMP, J. M., BERRETT, K. C., MOSBRUGER, T. L., WANG, J., KOHAN, J. L., SALAMA, M. E., WITT, B. L., PEIFER, M., THOMAS, R. K., GERTZ, J., JOHNSON, J. E., GAZDAR, A. F., WECHSLER-REYA, R. J., SOS, M. L. & OLIVER, T. G. 2017. MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer cell*, 31, 270-285.

97. OFFIN, M., CHAN, J. M., TENET, M., RIZVI, H. A., SHEN, R., RIELY, G. J., REKHTMAN, N., DANESHBOD, Y., QUINTANAL-VILLALONGA, A., PENSON, A., HELLMANN, M. D., ARCILA, M. E., LADANYI, M., PE'ER, D., KRIS, M. G., RUDIN, C. M. & YU, H. A. 2019. Concurrent RB1 and TP53 Alterations Define a Subset of EGFR-Mutant Lung Cancers at risk for Histologic Transformation and Inferior Clinical Outcomes. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 14, 1784-1793.
98. OKEN, M. M., CREECH, R. H., TORMEY, D. C., HORTON, J., DAVIS, T. E., MCFADDEN, E. T. & CARBONE, P. P. 1982. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American Journal of Clinical Oncology*, 5.
99. OWONIKOKO, T. K., BEHERA, M., CHEN, Z., BHIMANI, C., CURRAN, W. J., KHURI, F. R. & RAMALINGAM, S. S. 2012. A systematic analysis of efficacy of second-line chemotherapy in sensitive and refractory small-cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7, 866-872.
100. PAYNE, S. H. 2015. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci*, 40, 1-3.
101. PASCA DI MAGLIANO, M. & HEBROK, M. 2003. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*, 3, 903-11.
102. PAZ-ARES, L., DVORKIN, M., CHEN, Y., REINMUTH, N., HOTTA, K., TRUKHIN, D., STATSENKO, G., HOCHMAIR, M. J., ÖZGÜROĞLU, M., JI, J. H., VOITKO, O., POLTORATSKIY, A., PONCE, S., VERDERAME, F., HAVEL, L., BONDARENKO, I., KAZARNOWICZ, A., LOSONCZY, G., CONEV, N. V., ARMSTRONG, J., BYRNE, N., SHIRE, N., JIANG, H. & GOLDMAN, J. W. 2019. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 394, 1929-1939.
103. PEDERSEN, N., MORTENSEN, S., SØRENSEN, S. B., PEDERSEN, M. W., RIENECK, K., BOVIN, L. F. & POULSEN, H. S. 2003. Transcriptional gene expression profiling of small cell lung cancer cells. *Cancer Res*, 63, 1943-53.
104. PEIFER, M., FERNÁNDEZ-CUESTA, L., SOS, M. L., GEORGE, J., SEIDEL, D., KASPER, L. H., PLENKER, D., LEENDERS, F., SUN, R., ZANDER, T., MENON, R., KOKER, M., DAHMEN, I., MÜLLER, C., DI CERBO, V., SCHILDHAUS, H.-U., ALTMÜLLER, J., BAESSMANN, I., BECKER, C., DE WILDE, B., VANDESOMPELE, J., BÖHM, D., ANSÉN, S., GABLER, F., WILKENING, I., HEYNCK, S., HEUCKMANN, J. M., LU, X., CARTER, S. L., CIBULSKIS, K., BANERJI, S., GETZ, G., PARK, K.-S., RAUH, D., GRÜTTER, C., FISCHER, M., PASQUALUCCI, L., WRIGHT, G., WAINER, Z., RUSSELL, P., PETERSEN, I., CHEN, Y., STOELBEN, E., LUDWIG, C., SCHNABEL, P., HOFFMANN, H., MULEY, T., BROCKMANN, M., ENGEL-RIEDEL, W., MUSCARELLA, L. A., FAZIO, V. M., GROEN, H., TIMENS, W., SIETSMA, H., THUNNISSEN, E., SMIT, E., HEIDEMAN, D. A. M., SNIJDERS, P. J. F., CAPPUZZO, F., LIGORIO, C., DAMIANI, S., FIELD, J., SOLBERG, S., BRUSTUGUN, O. T., LUND-IVERSEN, M., SÄNGER, J., CLEMENT, J. H., SOLTERMANN, A., MOCH, H., WEDER, W., SOLOMON, B., SORIA, J.-C., VALIDIRE, P., BESSE, B., BRAMBILLA, E., BRAMBILLA, C., LANTUEJOL, S., LORIMIER, P., SCHNEIDER, P. M., HALLEK, M., PAO, W., MEYERSON, M., SAGE, J., SHENDURE, J., SCHNEIDER, R., BÜTTNER, R., WOLF, J., NÜRNBERG, P., PERNER, S., HEUKAMP, L. C., BRINDLE, P. K., HAAS, S. & THOMAS, R. K. 2012. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature genetics*, 44, 1104-1110.
105. PIETANZA, M. C. & RUDIN, C. M. 2012. Novel therapeutic approaches for small cell lung cancer: the future has arrived. *Current problems in cancer*, 36, 156-173.
106. PIETROBONO, S., GAGLIARDI, S. & STECCA, B. 2019. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Frontiers in Genetics*, 10.
107. POIRIER, J. T., GEORGE, J., OWONIKOKO, T. K., BERNS, A., BRAMBILLA, E., BYERS, L. A., CARBONE, D., CHEN, H. J., CHRISTENSEN, C. L., DIVE, C., FARAGO, A. F., GOVINDAN, R., HANN, C., HELLMANN, M. D., HORN, L., JOHNSON, J. E., JU, Y. S., KANG, S., KRASNOW, M.,

- LEE, J., LEE, S.-H., LEHMAN, J., LOK, B., LOVLY, C., MACPHERSON, D., MCFADDEN, D., MINNA, J., OSER, M., PARK, K., PARK, K.-S., POMMIER, Y., QUARANTA, V., READY, N., SAGE, J., SCAGLIOTTI, G., SOS, M. L., SUTHERLAND, K. D., TRAVIS, W. D., VAKOC, C. R., WAIT, S. J., WISTUBA, I., WONG, K. K., ZHANG, H., DAIGNEAULT, J., WIENS, J., RUDIN, C. M. & OLIVER, T. G. 2020. New Approaches to SCLC Therapy: From the Laboratory to the Clinic. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 15, 520-540.
108. POSTMUS, P. E., BERENDSEN, H. H., VAN ZANDWIJK, N., SPLINTER, T. A., BURGHOUTS, J. T. & BAKKER, W. 1987. Retreatment with the induction regimen in small cell lung cancer relapsing after an initial response to short term chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23, 1409-11.
109. PRICE, J. E. & TARIN, D. 1989. Low incidence of tumourigenicity in agarose colonies from spontaneous murine mammary tumours. *Differentiation*, 41, 202-7.
110. QI, J., ZHANG, J., LIU, N., ZHAO, L. & XU, B. 2022. Prognostic Implications of Molecular Subtypes in Primary Small Cell Lung Cancer and Their Correlation With Cancer Immunity. *Frontiers in Oncology*, 12.
111. QU, S., FETSCH, P., THOMAS, A., POMMIER, Y., SCHRUMP, D. S., MIETTINEN, M. M. & CHEN, H. 2022. Molecular Subtypes of Primary SCLC Tumors and Their Associations With Neuroendocrine and Therapeutic Markers. *J Thorac Oncol*, 17, 141-153.
112. RANADE, A. R., CHERBA, D., SRIDHAR, S., RICHARDSON, P., WEBB, C., PARIPATI, A., BOWLES, B. & WEISS, G. J. 2010. MicroRNA 92a-2*: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 5, 1273-8.
113. RANGWALA, F., OMENETTI, A. & DIEHL, A. M. 2011. Cancer Stem Cells: Repair Gone Awry? *Journal of Oncology*, 2011, 465343.
114. READY, N. E., OTT, P. A., HELLMANN, M. D., ZUGAZAGOITIA, J., HANN, C. L., DE BRAUD, F., ANTONIA, S. J., ASCIERTO, P. A., MORENO, V., ATMACA, A., SALVAGNI, S., TAYLOR, M., AMIN, A., CAMIDGE, D. R., HORN, L., CALVO, E., LI, A., LIN, W. H., CALLAHAN, M. K. & SPIGEL, D. R. 2020. Nivolumab Monotherapy and Nivolumab Plus Ipilimumab in Recurrent Small Cell Lung Cancer: Results From the CheckMate 032 Randomized Cohort. *J Thorac Oncol*, 15, 426-435.
115. RICHARDSON, G. D., ROBSON, C. N., LANG, S. H., NEAL, D. E., MAITLAND, N. J. & COLLINS, A. T. 2004. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci*, 117, 3539-45.
116. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Á., TORRES-DURÁN, M., BARROS-DIOS, J. M. & RUANO-RAVINA, A. 2018. Residential radon and small cell lung cancer. A systematic review. *Cancer Lett*, 426, 57-62.
117. ROSS, J. S., WANG, K., ELKADI, O. R., TARASEN, A., FOULKE, L., SHEEHAN, C. E., OTTO, G. A., PALMER, G., YELENSKY, R., LIPSON, D., CHMIELECKI, J., ALI, S. M., ELVIN, J., MOROSINI, D., MILLER, V. A. & STEPHENS, P. J. 2014. Next-generation sequencing reveals frequent consistent genomic alterations in small cell undifferentiated lung cancer. *Journal of clinical pathology*, 67, 772-776.
118. RUBIN, L. L. & DE SAUVAGE, F. J. 2006. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 1026-33.
119. RUDIN, C. M., AWAD, M. M., NAVARRO, A., GOTTFRIED, M., PETERS, S., CSŐSZI, T., CHEEMA, P. K., RODRIGUEZ-ABREU, D., WOLLNER, M., YANG, J. C.-H., MAZIERES, J., ORLANDI, F. J., LUFT, A., GÜMÜŞ, M., KATO, T., KALEMKERIAN, G. P., LUO, Y., EBIANA, V., PIETANZA, M. C., KIM, H. R. & INVESTIGATORS, K.-. 2020. Pembrolizumab or Placebo Plus Etoposide and Platinum as First-Line Therapy for Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: Randomized, Double-Blind, Phase III KEYNOTE-604 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38, 2369-2379.

120. RUDIN, C. M., BRAMBILLA, E., FAIVRE-FINN, C. & SAGE, J. 2021. Small-cell lung cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 7, 3-3.
121. RUDIN, C. M., POIRIER, J. T., BYERS, L. A., DIVE, C., DOWLATI, A., GEORGE, J., HEYMACH, J. V., JOHNSON, J. E., LEHMAN, J. M., MACPHERSON, D., MASSION, P. P., MINNA, J. D., OLIVER, T. G., QUARANTA, V., SAGE, J., THOMAS, R. K., VAKOC, C. R. & GAZDAR, A. F. 2019. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nature reviews. Cancer*, 19, 289-297.
122. RUSTHOVEN, C. G. & KAVANAGH, B. D. 2017. Prophylactic Cranial Irradiation (PCI) versus Active MRI Surveillance for Small Cell Lung Cancer: The Case for Equipoise. *J Thorac Oncol*, 12, 1746-1754.
123. SALEM, A., MISTRY, H., HATTON, M., LOCKE, I., MONNET, I., BLACKHALL, F. & FAIVRE-FINN, C. 2019. Association of Chemoradiotherapy With Outcomes Among Patients With Stage I to II vs Stage III Small Cell Lung Cancer: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*, 5, e185335-e185335.
124. SANCHEZ, P., HERNÁNDEZ, A. M., STECCA, B., KAHLER, A. J., DEGUEME, A. M., BARRETT, A., BEYNA, M., DATTA, M. W., DATTA, S. & RUIZ I ALTABA, A. 2004. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 12561-6.
125. SCHINKEL, A. H., SMIT, J. J., VAN TELLINGEN, O., BEIJNEN, J. H., WAGENAAR, E., VAN DEEMTER, L., MOL, C. A., VAN DER VALK, M. A., ROBANUS-MAANDAG, E. C., TE RIELE, H. P. & ET AL. 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77, 491-502.
126. SCHWENDENWEIN, A., MEGYESFALVI, Z., BARANY, N., VALKO, Z., BUGYIK, E., LANG, C., FERENCZ, B., PAKU, S., LANTOS, A., FILLINGER, J., REZELI, M., MARKO-VARGA, G., BOGOS, K., GALFFY, G., RENYI-VAMOS, F., HODA, M. A., KLEPETKO, W., HOETZENECKER, K., LASZLO, V. & DOME, B. 2021. Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: Therapeutic implications. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 20, 470-483.
127. SEKINE, I., SHINTANI, Y., SHUKUYA, T., TAKAYAMA, K., INOUE, A., OKAMOTO, I., KIURA, K., TAKAHASHI, K., DOSAKA-AKITA, H., TAKIGUCHI, Y., MIYAOKA, E., OKUMURA, M. & YOSHINO, I. 2020. A Japanese lung cancer registry study on demographics and treatment modalities in medically treated patients. *Cancer Science*, 111, 1685-1691.
128. SELL, S. 2004. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 51, 1-28.
129. SERTH, K., SCHUSTER-GOSSLER, K., KREMMER, E., HANSEN, B., MAROHN-KÖHN, B. & GOSSLER, A. 2015. O-fucosylation of DLL3 is required for its function during somitogenesis. *PLoS One*, 10, e0123776.
130. SHACKLETON, M., VAILLANT, F., SIMPSON, K. J., STINGL, J., SMYTH, G. K., ASSELIN-LABAT, M. L., WU, L., LINDEMAN, G. J. & VISVADER, J. E. 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439, 84-8.
131. SHER, F., RÖSSLER, R., BROUWER, N., BALASUBRAMANIYAN, V., BODDEKE, E. & COPRAY, S. 2008. Differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes: involvement of the polycomb group protein *Ezh2*. *Stem Cells*, 26, 2875-83.
132. SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., FUCHS, H. E. & JEMAL, A. 2021. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 7-33.
133. SIMPSON, K. L., STONEY, R., FRESE, K. K., SIMMS, N., ROWE, W., PEARCE, S. P., HUMPHREY, S., BOOTH, L., MORGAN, D., DYNOWSKI, M., TRAPANI, F., CATOZZI, A., REVILL, M., HELPS, T., GALVIN, M., GIRARD, L., NONAKA, D., CARTER, L., KREBS, M. G., COOK, N., CARTER, M., PRIEST, L., KERR, A., GAZDAR, A. F., BLACKHALL, F. & DIVE, C. 2020. A biobank of small cell lung cancer CDX models elucidates inter- and intratumoral phenotypic heterogeneity. *Nature Cancer*, 1, 437-451.

134. SIMS-MOURTADA, J., IZZO, J. G., AJANI, J. & CHAO, K. S. 2007. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. *Oncogene*, 26, 5674-9.
135. SIMS-MOURTADA, J., IZZO, J. G., APISARNTHANARAX, S., WU, T. T., MALHOTRA, U., LUTHRA, R., LIAO, Z., KOMAKI, R., VAN DER KOGEL, A., AJANI, J. & CHAO, K. S. 2006. Hedgehog: an attribute to tumor regrowth after chemoradiotherapy and a target to improve radiation response. *Clin Cancer Res*, 12, 6565-72.
136. SINGH, S. K., HAWKINS, C., CLARKE, I. D., SQUIRE, J. A., BAYANI, J., HIDE, T., HENKELMAN, R. M., CUSIMANO, M. D. & DIRKS, P. B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432, 396-401.
137. SLOTMAN, B. J. & SENAN, S. 2011. Radiotherapy in small-cell lung cancer: lessons learned and future directions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 79, 998-1003.
138. SLOTMAN, B. J., VAN TINTEREN, H., PRAAG, J. O., KNEGJENS, J. L., EL SHAROUNI, S. Y., HATTON, M., KEIJSER, A., FAIVRE-FINN, C. & SENAN, S. 2015. Use of thoracic radiotherapy for extensive stage small-cell lung cancer: a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 385, 36-42.
139. SMITH, B. A., BALANIS, N. G., NANJUNDIAH, A., SHEU, K. M., TSAI, B. L., ZHANG, Q., PARK, J. W., THOMPSON, M., HUANG, J., WITTE, O. N. & GRAEBER, T. G. 2018. A Human Adult Stem Cell Signature Marks Aggressive Variants across Epithelial Cancers. *Cell reports*, 24, 3353-3366.e5.
140. SOUTHAM, C. M. & BRUNSCHWIG, A. 1961. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. Preliminary report. *Cancer*, 14, 971-978.
141. SPIGEL, D. R., VICENTE, D., CIULEANU, T. E., GETTINGER, S., PETERS, S., HORN, L., AUDIGIER-VALETTE, C., PARDO ARANDA, N., JUAN-VIDAL, O., CHENG, Y., ZHANG, H., SHI, M., LUFT, A., WOLF, J., ANTONIA, S., NAKAGAWA, K., FAIRCHILD, J., BAUDELET, C., PANDYA, D., DOSHI, P., CHANG, H. & RECK, M. 2021. Second-line nivolumab in relapsed small-cell lung cancer: CheckMate 331(☆). *Ann Oncol*, 32, 631-641.
142. STECCA, B., MAS, C., CLEMENT, V., ZBINDEN, M., CORREA, R., PIGUET, V., BEERMANN, F. & RUIZ I ALTABA, A. 2007. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5895-900.
143. STINGL, J., EIREW, P., RICKETSON, I., SHACKLETON, M., VAILLANT, F., CHOI, D., LI, H. I. & EAVES, C. J. 2006. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, 439, 993-7.
144. SUN, J. M., AHN, Y. C., CHOI, E. K., AHN, M. J., AHN, J. S., LEE, S. H., LEE, D. H., PYO, H., SONG, S. Y., JUNG, S. H., JO, J. S., JO, J., SOHN, H. J., SUH, C., LEE, J. S., KIM, S. W. & PARK, K. 2013. Phase III trial of concurrent thoracic radiotherapy with either first- or third-cycle chemotherapy for limited-disease small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 24, 2088-92.
145. SUZUKI, R., WEI, X., ALLEN, P. K., COX, J. D., KOMAKI, R. & LIN, S. H. 2019. Prognostic Significance of Total Lymphocyte Count, Neutrophil-to-lymphocyte Ratio, and Platelet-to-lymphocyte Ratio in Limited-stage Small-cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, 20, 117-123.
146. TARTARONE, A., LEROSE, R., ARDITO, R., TROIANI, L., TEDESCO, B., BOZZA, G., CANGIANO, R. & AIETA, M. 2014. Long-term survival in small cell lung cancer: a case report and review of the literature. *Future Oncology*, 10, 523-528.
147. TEGLUND, S. & TOFTGÅRD, R. 2010. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1805, 181-208.
148. TEN HAAF, A., BEKTAS, N., VON SERENYI, S., LOSEN, I., ARWEILER, E. C., HARTMANN, A., KNÜCHEL, R. & DAHL, E. 2009. Expression of the glioma-associated oncogene homolog (GLI) 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival. *BMC cancer*, 9, 298-298.

149. TIAN, F., MYSLIWIETZ, J., ELLWART, J., GAMARRA, F., HUBER, R. M. & BERGNER, A. 2012. Effects of the Hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 on lung cancer cell lines are mediated by side populations. *Clin Exp Med*, 12, 25-30.
150. TRAVERSARI, C., MEAZZA, R., COPPOLECCHIA, M., BASSO, S., VERRECCHIA, A., VAN DER BRUGGEN, P., ARDIZZONI, A., GAGGERO, A. & FERRINI, S. 1997. IFN-gamma gene transfer restores HLA-class I expression and MAGE-3 antigen presentation to CTL in HLA-deficient small cell lung cancer. *Gene Ther*, 4, 1029-35.
151. TRIGO, J., SUBBIAH, V., BESSE, B., MORENO, V., LÓPEZ, R., SALA, M. A., PETERS, S., PONCE, S., FERNÁNDEZ, C., ALFARO, V., GÓMEZ, J., KAHATT, C., ZEAITER, A., ZAMAN, K., BONI, V., ARRONDEAU, J., MARTÍNEZ, M., DELORD, J. P., AWADA, A., KRISTELEIT, R., OLMEDO, M. E., WANNESON, L., VALDIVIA, J., RUBIO, M. J., ANTON, A., SARANTOPOULOS, J., CHAWLA, S. P., MOSQUERA-MARTINEZ, J., D'ARCANGELO, M., SANTORO, A., VILLALOBOS, V. M., SANDS, J. & PAZ-ARES, L. 2020. Lurbinectedin as second-line treatment for patients with small-cell lung cancer: a single-arm, open-label, phase 2 basket trial. *Lancet Oncol*, 21, 645-654.
152. UMEMURA, S., MIMAKI, S., MAKINOSHIMA, H., TADA, S., ISHII, G., OHMATSU, H., NIHO, S., YOH, K., MATSUMOTO, S., TAKAHASHI, A., MORISE, M., NAKAMURA, Y., OCHIAI, A., NAGAI, K., IWAKAWA, R., KOHNO, T., YOKOTA, J., OHE, Y., ESUMI, H., TSUCHIHARA, K. & GOTO, K. 2014. Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9, 1324-1331.
153. VARGHESE, A. M., ZAKOWSKI, M. F., YU, H. A., WON, H. H., RIELY, G. J., KRUG, L. M., KRIS, M. G., REKHTMAN, N., LADANYI, M., WANG, L., BERGER, M. F. & PIETANZA, M. C. 2014. Small-cell lung cancers in patients who never smoked cigarettes. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9, 892-896.
154. VERMA, V., SIMONE, C. B., 2ND, ALLEN, P. K., GAJJAR, S. R., SHAH, C., ZHEN, W., HARKENRIDER, M. M., HALLEMEIER, C. L., JABBOUR, S. K., MATTHIESEN, C. L., BRAUNSTEIN, S. E., LEE, P., DILLING, T. J., ALLEN, B. G., NICHOLS, E. M., ATTIA, A., ZENG, J., BISWAS, T., PAXIMADIS, P., WANG, F., WALKER, J. M., STAHL, J. M., DALY, M. E., DECKER, R. H., HALES, R. K., WILLERS, H., VIDETIC, G. M., MEHTA, M. P. & LIN, S. H. 2017. Multi-Institutional Experience of Stereotactic Ablative Radiation Therapy for Stage I Small Cell Lung Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 97, 362-371.
155. VESTERGAARD, J., PEDERSEN, M. W., PEDERSEN, N., ENSINGER, C., TÜMER, Z., TOMMERUP, N., POULSEN, H. S. & LARSEN, L. A. 2006. Hedgehog signaling in small-cell lung cancer: frequent in vivo but a rare event in vitro. *Lung Cancer*, 52, 281-90.
156. WANG, B., YU, T., HU, Y., XIANG, M., PENG, H., LIN, Y., HAN, L. & ZHANG, L. 2017. Prognostic role of Gli1 expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8, 81088-81097.
157. WANG, W., HODKINSON, P., MCLAREN, F., MACKINNON, A., WALLACE, W., HOWIE, S. & SETHI, T. 2012. Small cell lung cancer tumour cells induce regulatory T lymphocytes, and patient survival correlates negatively with FOXP3+ cells in tumour infiltrate. *Int J Cancer*, 131, E928-37.
158. WATKINS, D. N., BERMAN, D. M. & BAYLIN, S. B. 2003a. Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer. *Cell Cycle*, 2, 196-8.
159. WATKINS, D. N., BERMAN, D. M., BURKHOLDER, S. G., WANG, B., BEACHY, P. A. & BAYLIN, S. B. 2003b. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 422, 313-7.
160. WICHA, M. S., LIU, S. & DONTU, G. 2006. Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Research*, 66, 1883-1890.

161. WISTUBA, II, BERRY, J., BEHRENS, C., MAITRA, A., SHIVAPURKAR, N., MILCHGRUB, S., MACKAY, B., MINNA, J. D. & GAZDAR, A. F. 2000. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 2604-10.
162. WISTUBA, II, GAZDAR, A. F. & MINNA, J. D. 2001. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*, 28, 3-13.
163. WOLFSON, A. H., BAE, K., KOMAKI, R., MEYERS, C., MOVSAS, B., LE PECHOUX, C., WERNER-WASIK, M., VIDETIC, G. M., GARCES, Y. I. & CHOY, H. 2011. Primary analysis of a phase II randomized trial Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 0212: impact of different total doses and schedules of prophylactic cranial irradiation on chronic neurotoxicity and quality of life for patients with limited-disease small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81, 77-84.
164. WOOTEN, D. J., GROVES, S. M., TYSON, D. R., LIU, Q., LIM, J. S., ALBERT, R., LOPEZ, C. F., SAGE, J. & QUARANTA, V. 2019. Systems-level network modeling of Small Cell Lung Cancer subtypes identifies master regulators and destabilizers. *PLoS computational biology*, 15, e1007343-e1007343.
165. WU, C. & ALMAN, B. A. 2008. Side population cells in human cancers. *Cancer Letters*, 268, 1-9.
166. XU, X. F., GUO, C. Y., LIU, J., YANG, W. J., XIA, Y. J., XU, L., YU, Y. C. & WANG, X. P. 2009. Gli1 maintains cell survival by up-regulating IGFBP6 and Bcl-2 through promoter regions in parallel manner in pancreatic cancer cells. *J Carcinog*, 8, 13.
167. ZANDBERGA, E., KOZIROVSKIS, V., ĀBOLS, A., ANDRĒJEVA, D., PURKALNE, G. & LINĒ, A. 2013. Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 52, 356-69.
168. ZELEN, M. 1973. Keynote address on biostatistics and data retrieval. *Cancer Chemother Rep* 3, 4, 31-42.
169. ZHANG, W., GIRARD, L., ZHANG, Y.-A., HARUKI, T., PAPARI-ZAREEI, M., STASTNY, V., GHAYEE, H. K., PACAK, K., OLIVER, T. G., MINNA, J. D. & GAZDAR, A. F. 2018. Small cell lung cancer tumors and preclinical models display heterogeneity of neuroendocrine phenotypes. *Translational lung cancer research*, 7, 32-49.
170. ZHOU, S., MORRIS JOHN, J., BARNES, Y., LAN, L., SCHUETZ JOHN, D. & SORRENTINO BRIAN, P. 2002. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 12339-12344.
171. ZHOU, S., SCHUETZ, J. D., BUNTING, K. D., COLAPIETRO, A. M., SAMPATH, J., MORRIS, J. J., LAGUTINA, I., GROSVELD, G. C., OSAWA, M., NAKAUCHI, H. & SORRENTINO, B. P. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 7, 1028-34.

PIELIKUMI

1. pielikums. Ētikas komisijas atļauja

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Rīgā, Cēsu ielā 31/6, LV1012, 3.stāvs 323. kabinets

tel. 7043776

fax 7043701

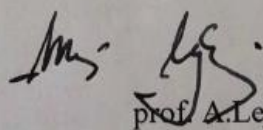
27. jūnijs 2008.g. A-8

Lēmums Nr.8

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2008.gada 27.jūnijā izskatīja P.Stradiņa KUS iesniegto pieteikuma projektu „Gēnu ekspresijas profila izmaiņas sīkšūnu plaušu vēža šūnās pie recidīva.”

Pamatojoties uz Centrālā medicīnas ētikas komitejas 2008. gada 27. jūnija sēdes protokola Nr. 4 punktu 4, tiek izsniegts atzinums, ka P.Stradiņa KUS iesniegtais pieteikuma projekts „Gēnu ekspresijas profila izmaiņas sīkšūnu plaušu vēža šūnās pie recidīva” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas komitejas
priekšsēdētāja vietnieks


prof. A. Lejnīks

2. pielikums. Pacienta informācijas un piekrišanas veidlapa

Informācija par pētījumu projektu

Pacienta eksemplārs

„Biobankas veidošana ļaundabīgo audzēju, pirmsvēža stāvokļu, autoimūnu slimību un kontroles grupas pacientu paraugiem”

Cienījamā kundze! Godātais kungs!

Mēs uzaicinām Jūs piedalīties projektā „**Biobankas veidošana ļaundabīgo audzēju, pirmsvēža stāvokļu, autoimūnu slimību un kontroles grupas pacientu paraugiem**”, un vēlamies iepazīstināt ar tā mērķi un saturu. Rūpīgi izlasiet šo informāciju pirms parakstāt piekrišanas dokumentu.

Jums nepieciešamo ārstēšanu Jūs saņemsiet neatkarīgi no Jūsu izvēles piedalīties vai nepiedalīties pētījumā.

Projekta mērķis:

Zinātnieki ir atklājuši, ka par audzēju veidošanos un metastazēšanu ir atbildīgas īpašas vēža šūnas, ko sauc par audzēju iniciējošām jeb vēža cilmes šūnām. Šīs šūnas sastāda tikai nelielu daļu no kopējās audzēja masas un ir salīdzinoši neuzņēmīgākas pret pašreiz lietotajām ķīmijterapijas zālēm un staru terapiju nekā pārējās vēža šūnas un iespējams, tās sekmīgi prot izvairīties arī no imūnsistēmas kontroles. Tāpēc pēc šķietami veiksmīgas terapijas nereti audzējs parādās atkārtoti, pateicoties izdzīvojušām vēža cilmes šūnām. Padziļināta vēža cilmes šūnu un pret-vēža imūnās reakcijas izpēte dos jaunus zināšanas par molekulārajā līmenī notiekošajiem procesiem audzēju šūnās un ļaus izvērtēt šūnu izmaiņas slimības gaitā, kas ir priekšnoteikums jaunu un daudz efektīvāku pretvēža medikamentu un ārstēšanas metožu izstrādei, kā arī jaunu diagnostikas un slimības gaitas prognostikas testu izstrādei. Šī projekta mērķis ir izveidot vēža audu biobanku (kolekciju), kas turpmāk tiks izmantota audzēju iniciējošo šūnu izpētei, ķīmijterapijas rezistences pētījumos, audzēju imunoloģijas pētījumos, kā arī lai atrastu jaunus diagnostikas un prognostikas marķierus.

Biobankas veidošanas apraksts:

Ja piekritīsiet piedalīties šajā projektā, medicīnas māsa Jums no vēnas paņems 16 ml asinis tāpat kā jebkurai citai asins analīzei. Atkarībā no ārstēšanas plāna, Jums tiks lūgta atļauja izmantot pētījuma mērķiem nelielu gabaliņu no operācijas laikā vai diagnostiskās fibrobronhoskopijas laikā izņemtā audzēja materiāla. Nepieciešamības gadījumā, ja slimība progresē pēc saņemtās terapijas, Jums var tikt piedāvāta atkārtota diagnostiska procedūra, kuras laikā tiks iegūts neliels audzēja audu gabaliņš pētījuma analīzēm. Jums ir tiesības atteikties no šīs procedūras veikšanas un tas neietekmēs Jūsu dalību šajā pētījumā, kā arī Jūsu tālāko ārstēšanu. Paņemtajiem asins un audu paraugiem tiks piešķirts unikāls kods, kas nodrošinās Jūsu konfidencialitāti. Kodētie paraugi ar speciālu transportu tiks nogādāti Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, kur tie tiks tālāk apstrādāti un uzglabāti drošā vietā ar ierobežotu pieejamību. No asins parauga tiks izdalīti baltie asinsķermenīši, pārbaudīta to dzīvotspēja un tie tiks iesaldēti līdz turpmāko pētījumu veikšanai. Tālāk tie tiks izmantoti, lai noskaidrotu to spēju reaģēt ar vēža šūnām, to skaitā vēža cilmes šūnām. No vienas audu parauga daļas tiks izdalītas potenciālās vēža cilmes šūnas un iesaldētas līdz turpmāko pētījumu veikšanai. Tālāk tās tiks izmantotas, lai pētītu molekulārās izmaiņas, salīdzinot ar normālām šūnām un procesus, kas nodrošina to rezistenci pret pret-vēža zālēm. Šie pētījumi ir ļoti svarīgi jaunu un efektīvāku medikamentu izstrādei. Otra audu parauga daļa tiks izmantota dažādiem ģenētiskiem pētījumiem, kuru mērķis ir izstrādāt diagnostikas testus audzēja savlaicīgai atklāšanai, kā arī tādu testus, kas palīdzētu individuāli piemeklēt katram slimniekam piemērotāko terapiju un medikamentu devas.

Tikai projekta darbinieki un personas ar īpašām atļaujām varēs izmantot šo informāciju vienīgi zinātniskiem pētījumiem.

Projekta ilgums:

Ļaundabīgo audzēju biobanka tiek veidota uz neierobežotu termiņu. Jūsu piekrišanas dokuments tiks uzglabāts 75 gadus pēc pēdējo izmaiņu izdarīšanas.

Iespējamie riski:

Piedalīšanās pētījumā Jūsu veselībai nenodarīs nekādu ļaunumu. Jums tiks paņemts asins paraugs gluži kā parastai analīzei. Asins parauga ņemšanas vietā retos gadījumos var rasties neliels asins izplūdums, vai vēl retāk - neliels lokāls ādas iekaisums. Audzēja audu paraugs tiks paņemts no audu materiāla, kas ticis izņemts ārstnieciskās operācijas vai diagnostiskās bronhoskopijas procedūras laikā. To izdarīs kvalificēts patologs, kas nodrošinās, lai parauga paņemšana neietekmētu parauga kvalitāti standarta diagnostikas izmeklējumiem. Tādējādi audu paraugu paņemšana nerada draudus Jūsu veselībai un neietekmē diagnostisko izmeklējumu kvalitāti.

Nepieciešamības gadījumā pēc ķīmijterapijas kursa Jums var tikt piedāvāta diagnostiska procedūra (bronhoskopija). Bronhoskopijas laikā tieva lokana trubiņa tiek ievadīta pacienta elpceļos caur muti vai degunu pēc vietējā anestētiķa (lidokaīna) inhalācijām un ārsts ar speciālām knaiblītēm atdala niecīgu gabaliņu no audzēja mezgla bronhos. Bronhoskopijas komplikāciju risks ir zems (<1%) un tās ir: asiņošana no biopsijas vietas, pārejoši elpošanas un sirdsdarbības traucējumi, gaisa uzkrāšanās pleiras telpā (pneimotorakss).

Ja pētījuma dēļ Jums attīstīsies kāda no komplikācijām, pētnieks nodrošinās, ka Jūs saņemat nepieciešamo ārstēšanu

Datu konfidencialitāte un projekta dalībnieka tiesības:

Latvijas Republikas Saeimas pieņemtais “Cilvēka genoma izpētes likums” garantē Jūsu personas datu, veselības datu, kā arī ģenētiskās izpētes rezultātā iegūtās informācijas konfidencialitāti. Tā tiks uzglabāta vietā ar ierobežotu pieejamību un netiks izsniegta ne Jūsu ģimenes locekļiem, ne apdrošināšanas firmai, ne darba devējam. Publicējot pētījuma rezultātus, Jūsu identitāte netiks atklāta. Jums būs tiesības iepazīties ar datiem, kas par Jums tiks uzglabāti Ļaundabīgo audzēju biobankā.

Brīvprātīga piedalīšanās:

Jūsu piedalīšanās šajā projektā ir brīvprātīga. Jūsu atteikšanās piedalīties šajā projektā neradīs Jums nekādas nevēlamas sekas. Jūs varēsiet jebkurā brīdī atsaukt savu piekrišanu būt par projekta dalībnieku. Šādā gadījumā Jūsu audu paraugi, veselības stāvokļa apraksts un jebkura ar personas identificēšanu saistīta informācija tiks iznīcināta.

Iespējamie ieguvumi:

Piedalīšanās projektā nedos Jums tūlītēju labumu, bet gan dos ieguldījumu Ļaundabīgo audzēju biobankas izveidei, kas kalpos par pamatu vēža cilmes šūnu izpētei un jaunu pretvēža medikamentu meklēšanai.

Saskaņā ar “Cilvēka genoma izpētes likumu” Jums nav tiesību pieprasīt maksu par asins un audu paraugu nodošanu, kā arī par izpētes rezultātu izmantošanu.

Kontaktpersona:

Ja Jums rodas kādi jautājumi, lūdzu sazinieties ar ārstu, kas Jūs uzaicināja piedalīties šajā projektā. Kontakti: Dr. Uldis Kopeika - darba tālrunis: 67069206; Dr. Viktors Kozirovskis - darba tālrunis: 67069218, projekta vadītāja: Dr. Aija Linē – darba tālrunis: 67808208.

Pacienta piekrišana piedalīties pētījumā

I. Aizpilda pacients:

1. Esmu iepazinies ar rakstisku informāciju par izpētes projekta „**Biobankas veidošana ļaundabīgo audzēju, pirmsvēža stāvokļu, autoimūnu slimību un kontroles grupas pacientu paraugiem**” mērķi, saturu, ilgumu un iespējamiem riskiem. Uz visiem mani jautājumiem esmu saņēmis saprotamas un izsmeļošas atbildes. Man bija pietiekami daudz laika, lai pārdomātu savu lēmumu piedalīties projektā.

2. Esmu informēts, ka man būs tiesības iepazīties ar datiem, kas par mani tiks iegūti un glabāti Ļaundabīgo audzēju biobankā. Apzinos, ka man nebūs tiesību pieprasīt maksu par audu paraugu nodošanu, mana veselības stāvokļa apraksta sastādīšanu vai izpēti, kā arī par izpētes rezultātu izmantošanu.

3. Mana genoma izpētes apjomu (vajadzīgo atzīmēt):

neierobežoju;

ierobežoju līdz noteiktam apjomam (norādīt izpētes ierobežojumus)

4. Manu audu paraugu un veselības stāvokļa aprakstu nosūtīšanu ģenētiskajai izpētei ārpus Latvijas (vajadzīgo atzīmēt):

atļauju;

aizliedzu.

5. Piekrītu, ka pēc ķīmijterapijas kursa nepieciešamības gadījumā man tiek veikta atkārtota bronhoskopija:

jā;

nē.

6. Vēlos, ka man tiek paziņota informācija, kas iegūta šī pētījuma rezultātā:

jā;

nē.

7. Apliecinu, ka piekrītu piedalīties projektā „**Biobankas veidošana ļaundabīgo audzēju, pirmsvēža stāvokļu, autoimūnu slimību un kontroles grupas pacientu paraugiem**” brīvprātīgi, bez maksas. Piekrītu, ka izpētei tiek ņemts mans asins paraugs un neliels gabaliņš no operācijas vai diagnostiskās procedūras laikā iegūtā audzēja audu materiāla, un sastādīts veselības stāvokļa apraksts.

Apzinos, ka jebkurā brīdī bez paskaidrojumiem varu atsaukt savu piekrišanu. Šādā gadījumā manu audu paraugi, veselības stāvokļa apraksts un jebkura ar personas identificēšanu saistīta informācija tiek iznīcināta.

Pacients:

Vārds un uzvārds (drukātiem burtiem) _____

Personas kods _____

Adrese _____

Datums _____

(diena, mēnesis, gads)

Paraksts _____

II. Aizpilda pētnieks vai ārstējošais ārsts**Pētnieks/ ārstējošais ārsts**

Vārds un uzvārds (drukātiem burtiem) _____

Amats _____

Paraksts _____

Datums _____

(diena, mēnesis, gads)

Aizpildīšanas vietas nosaukums _____

Audu parauga kods:

B C 0 0 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
07-01	
doc 032	med

3. pielikums. Galvenās publikācijas

Exp Oncol 2020
42, 1, 75–77

SHORT COMMUNICATIONS

Experimental
ONCOLOGY

HIGH EXPRESSION OF *GLI1* IS ASSOCIATED WITH BETTER SURVIVAL IN ADVANCED SCLC

V. Kozirovskis^{1,2,*}, E. Zandberga³, M. Magone¹, G. Purkalne^{1,2}, A. Line³, U. Vikmanis²

¹Pauls Stradins Clinical University Hospital, Riga LV-1002, Latvia

²University of Latvia, Riga LV-1586, Latvia

³Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga LV-1067, Latvia

Aim: Aberrant Sonic hedgehog (Shh) pathway signaling has been described in small cell lung cancer (SCLC), as well discrepancies, when analyzing expression of pathway components in SCLC cell lines vs tumor biopsies. Shh key component *GLI1* was evaluated in advanced SCLC and data correlated with patient survival. **Materials and Methods:** *GLI1* expression was analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction in pre-treatment fresh frozen tumor biopsies of 12 advanced SCLC patients and mRNA level of *GLI1* was compared in short-term vs long-term survivor's samples (stratified by median survival, independent samples t-test). **Results:** Expression of *GLI1* mRNA was significantly higher in long-term (> 9.6 months, n = 6) survivor's biopsies than in short-term (≤ 9.6 months, n = 6) survivors ($p = 0.0196$, 95% CI: 0.000016 to 0.000147, two-tailed independent samples t-test). **Conclusion:** High *GLI1* mRNA expression in SCLC was found to be positive prognostic marker associated with longer survival. Further research is needed for validation of these results due to the small number of patients in the study.

Key Words: small cell lung cancer, Sonic hedgehog pathway, *GLI1*, survival, prognosis.

DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-1.14266

Aberrant Sonic hedgehog (Shh) pathway signaling has been described in small cell lung cancer (SCLC), however, controversial results have been obtained, when analyzing expression of pathway components in SCLC cell lines vs tumor biopsies [1]. There is an increasing evidence that the embryonic signaling pathways are essential for the maintenance and chemoresistance of SCLC cancer stem cells [2]. These chemoresistant cells may be the cause for non-successful treatment of some SCLC patients, who do not respond well to therapy and survive much shorter than other patients.

The aim of this study was to evaluate the prognostic role of Shh pathway activity in SCLC. We evaluated mRNA expression of Shh pathway key component *GLI1* in advanced stage SCLC samples and correlated data with patient survival.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tissue samples. Study tissue samples were obtained along with a standard biopsies by fibrobronchoscopy from patients, diagnosed with advanced (stage III and IV) SCLC at Pauls Stradins Clinical University Hospital between October 2010 and January 2014. The Ethics Committee of the Institute of Experimental and Clinical Medicine of University of Latvia has approved this study. Written informed consent was obtained from the patients before inclusion in the study.

The tissue specimens were submerged in RNAlater solution (Thermo Fisher Scientific, USA) and stored at -20°C. Board-certified cytologist confirmed the presence of tumor cells in the sample by cytological evaluation of the smear, which was obtained from study specimen before placing it to the RNAlater. All diagno-

ses were histologically confirmed in standard biopsies as SCLC by board-certified pathologists. Pre-treatment biopsies from 20 SCLC patients were obtained and they were followed during treatment.

Clinical information, treatment and survival data were collected. 7 patients were excluded from the analysis due to the lack of cytological confirmation of tumor cell presence in a study biopsy. 1 patient died early during treatment from non-cancer related cause and therefore was also excluded from the analysis.

12 SCLC patients were stratified in a short-term and long-term survivors by median overall survival (OS) time (9.6 months) to correlate Shh related genes expression with patient survival. Demographics and clinical characteristics of 12 patients with qualitative RNA and survival data are shown in Tables 1 and 2.

Preparation of tissue mRNA. Biopsy homogenization was done by FastPrep®-24 Instrument and Lysing Matrix D (MP Biomedicals, USA) at 0.4 m/s for 40 s. Total RNA was isolated using MirVana total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) and RNA concentration and purity was quantified by Nanodrop ND-100 spectrophotometer. cDNA was synthesized by random hexamer priming from 1 µg of total RNA by using Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time polymerase chain reaction. Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed using 2 µl 1:10 diluted cDNA reaction mixtures, ABSolute Blue™ SYBR green Low ROX (Thermo Fisher Scientific, USA) and ViiA 7 real-time polymerase chain reaction system (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Sequences of primers used in this study are available on request. To normalize the expression data, normalization factor was calculated

Submitted: April 14, 2019.

*Correspondence: E-mail: viktors.kozirovskis@stradini.lv

Abbreviations used: OS – overall survival; SCLC – small cell lung cancer; Shh – Sonic hedgehog.

for each cDNA from the expression values of three most stable reference genes (*ACTB*, *LRP10*, *YWHAZ*) selected among seven frequently used housekeeping genes by using geNorm software. All quantitative real-time polymerase chain reaction experiments were performed in duplicates and the data were presented in graphs as means \pm standard deviation.

Statistical analysis. *GLI1* mRNA level was compared by calculating two-tailed independent samples t-test in short-term vs long-term survivor's samples, stratified by median survival. Data were statistically interpreted using SPSS Statistics 21. *P*-values of < 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

A small cohort of 12 patients with qualitative RNA and survival data was analysed:

- 6 SCLC patients in long-term survivors group (OS > 9.6 months) had mean *GLI1* mRNA level of $0.000141757 \pm 0.000038223$ in their pre-treatment samples.
- 6 SCLC patients in short-term survivors group (OS ≤ 9.6 months) accordingly had mean *GLI1* mRNA level of $0.000060198 \pm 0.000016324$.

Significantly higher *GLI1* mRNA levels were found by two-tailed independent samples t-test in pre-treatment biopsies of long-term SCLC survivors when comparing with short-term survivors ($p = 0.0196$, 95% CI: 0.000016 to 0.000147) (Figure).

Negative prognostic role of *GLI1* has been drawn from numerous studies and meta-analyses for breast [3] and gastric cancer [4], lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma [5, 6], gallbladder and liver cancer, cervical cancer, rhabdomyosarcoma, colon cancer, ovarian cancer, bladder cancer, esophageal cancer, head and neck squamous cell carcinoma, pancreatic cancer [7]. Over-expression of *GLI1* tends to progressive stages and is related to unfavourable prognosis. Only in intracranial tumors *GLI1* positivity was not correlated to poorer survival. Further study has confirmed the adverse effect of low nuclear *GLI1* expression in glioblastomas, which is in contrast with the negative prognostic effect of high *GLI1* expression reported in non-cranial malignancies [8]. Concerning *GLI1* as a prognostic factor in lung adenocarcinoma there is also study that has reported longer survival in *GLI1* positive tumors [9].

SCLC is a specific malignancy with a few common critical genetic and epigenetic alterations, leading to frequent *GLI1* overexpression and ligand-independent *GLI1* activation. *GLI1* activation could be caused for example by bi-allelic inactivation of *TP53* genes and *TP53* deficiency observed nearly in all SCLC cases [10, 11]. Another frequently observed *GLI1* activating alteration in SCLC is downregulation of Notch pathway and downregulation of PI3K-AKT oncogenic signaling. Notch pathway signaling was found to be downregulated in 77% of 110 SCLC clinical tumor specimens, while Notch family genomic alterations were found here in 25% of cases [11]. Loss of function of tumor suppressor PTEN, an endogenous inhibitor of AKT, which could

Table 1. Characteristics of 12 patients qualified for gene expression and survival analysis. The comparison between groups was carried out by the Student's *t*-test or the Chi Square test, according to the type of variable

Patient characteristics	Long-term survivors (OS > 9.6 months, n = 6)	Short-term survivors (OS ≤ 9.6 months, n = 6)	<i>P</i> -value
Gender			
Male	5	5	$p = 1.0$
Female	1	1	
Age			
Median (range)	61.5 (54–77)	51.5 (49–70)	$p = 0.078$
ECOG			
0	1	1	$p = 0.446$
1	0	2	
2	4	2	
3	1	1	
4	0	0	
Stage			
III A	1	0	$p = 0.565$
III B	2	2	
IV	3	4	
Deviations of treatment dosing/timing due toxicity			
None	2	5	$p = 0.079$
Present	4	1	
Best response			
CR	0	0	$p = 0.301$
PR	6	4	
SD	0	1	
PD	0	1	
Disease progression type			
Local	2	1	$p = 0.601$
Distant	2	3	
Combined	1	2	
Not progressed	1	0	

Note: CR – complete response; PR – partial response; SD – stable disease; PD – progressive disease.

Table 2. Survival and treatment data of 12 study patients

Patient ID Nr.	Survival in months (days)	Survival in months (days)	Received treatment
Patient LC145	4 (140)		4 CE
Patient LC137	6 (191)		6 PE \rightarrow RT (57.6/50.4/45 Gy)
Patient LC146	8 (250)		4 PE \rightarrow 3 CAV
Patient LC102	8 (252)		5 PE
Patient LC171	8 (267)		1 PE \rightarrow 5 CAV
Patient LC135	8 (269)		4 PE \rightarrow RT (54/50.4 Gy) \rightarrow 37.5 Gy WBRT
Patient LC130	10 (305)		5 PE \rightarrow 3 CAV
Patient LC127	10 (318)		5 PE \rightarrow 30 Gy WBRT
Patient LC134	12 (383)		5 PE \rightarrow RT (54/54/45 Gy) \rightarrow 36 Gy WBRT
Patient LC139	13 (396)		6 PE \rightarrow RT (54/50.4 Gy) \rightarrow PCI (30 Gy)
Patient LC121	15 (462)		6 CE \rightarrow RT (54/50.4/50.4 Gy) \rightarrow PCI (36 Gy) \rightarrow 1 CAV
Patient LC126	82 (2499)		5 PE \rightarrow RT (56/50.4 Gy) \rightarrow PCI (36 Gy)

Note: CE – carboplatin/etoposide; PE – cisplatin/etoposide; RT – radiation therapy; CAV – cyclophosphamide/adriamycin/vincristine; WBRT – whole brain radiation therapy; PCI – prophylactic cranial irradiation.

be found in 10–18% of SCLC tumors [12], will also lead to increased transcriptional activity of *GLI1*.

Our finding with higher *GLI1* expression in long-term SCLC survivors might reflect in this case lower mutational burden and only few epigenetic changes with retained *GLI1* upregulation characteristic for SCLC. *GLI1* downregulation and increased chemoresistance in short-term SCLC survivors may be explained by the higher number of genetic and epigenetic changes in tumor cells.

The main objects for SCLC molecular research still are cell lines and xenografts due to the clinical features

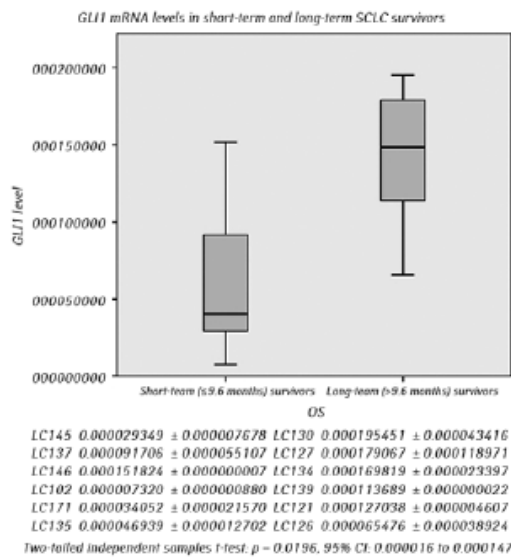


Figure. Dot plots showing normalized *GLI1* gene expression levels in pre-treatment SCLC biopsies of long- vs short-term survivors cohorts. The median gene expression level for each group is indicated by a line inside the box. Data presented in graphs are means obtained from experiments in duplicates ± standard deviation

of disease. Aberrant Shh pathway signaling has been described in SCLC, as well as discrepancies, when analyzing expression of pathway components in SCLC cell lines/xenografts vs tumor biopsies. Only small percentage of SCLC cell lines express transcriptional regulator *GLI1*, which can be used as an indicator of Shh signalling activity [13]. Contrary, when *GLI1* immunohistochemical staining was performed on SCLC biopsies to investigate human tumors for *GLI1* expression, 34 (85%) out of 40 SCLC tumors demonstrated *GLI1* expression and 26 of these displayed medium or strong *GLI1* reactivity [14]. Thus, caution should be taken when working with tumor derived cell lines, as the expression and signaling may not reflect the *in vivo* situation. These findings were supported also by Affymetrix oligonucleotide microarray analysis of human SCLC tumors, where significantly higher mean *GLI1* expression in SCLC tissues was found when compared to that of the 20 SCLC cell lines investigated [15].

So advantage of this study was that mRNA expression of key Shh pathway member *GLI1* was evaluated in SCLC fresh biopsies and survival data of patients were available. Unfortunately, small size of biopsy samples was an issue, which lead to exclusion of notable part of study patients from analysis due to the lack of cancer cells in a study specimen.

In conclusion, at our best knowledge this represents the first study investigating the prognostic role of *GLI1* in SCLC patients. Our findings suggest that the Shh pathway activation might be a positive prognostic marker in SCLC contrary to its negative role observed

in other malignancies. Further research is needed for validation of these results due to the small number of patients in the study.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Romalda Grigalinoviča for her extra work while being study dedicated cytologist in this project.

FUNDING

This work was supported by the Latvian National Research Programme BIOMEDICINE 2014–2017.

DISCLOSURE OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, *et al.* A primary xenograft model of small cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture *in-vitro*. *Cancer Res* 2009; **69**: 3364–73.
2. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, *et al.* Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003; **422**: 313–7.
3. Wang B, Yu T, Hu Y, *et al.* Prognostic role of *Gli1* expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; **8**: 81088–97.
4. Jian-Hui C, Er-Tao Z, Si-Le C, *et al.* CD44, Sonic hedgehog, and *Gli1* expression are prognostic biomarkers in gastric cancer patients after radical resection. *Gastroenterol Res Pract* 2016; Article ID 1013045.
5. Berardi R, Santinelli A, Onofri A, *et al.* Hedgehog (Hh) signaling is a predictor of clinical outcome for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Carcinog Mutagen* 2014; **5**: 175.
6. Cui Y, Cui CA, Yang ZT, *et al.* *Gli1* expression in cancer stem-like cells predicts poor prognosis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2017; **102**: 347–53.
7. Cheng J, Gao J, Tao K, *et al.* Prognostic role of *Gli1* expression in solid malignancies: a meta-analysis. *Sci Rep* 2016; **6**: Article ID 22184.
8. Kim Y, Do IG, Hong M, *et al.* Negative prognostic effect of low nuclear *GLI1* expression in glioblastomas. *J Neurooncol* 2017; **133**: 69–76.
9. Kim JE, Kim H, Choe JY, *et al.* High expression of Sonic hedgehog signaling proteins is related to the favorable outcome, EGFR mutation, and lepidic predominant subtype in primary lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013; Suppl **3**: 570–6.
10. Mazzà D, Infante P, Colicchia V, *et al.* PCAF ubiquitin ligase activity inhibits Hedgehog/*Gli1* signaling in p53-dependent response to genotoxic stress. *Cell Death Differ* 2013; **20**: 1688–97.
11. George J, Lim JS, Jang SJ, *et al.* Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015; **524**: 47–53.
12. Yokomizo A, Tindall DJ, Drabkin H, *et al.* PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 1998; **17**: 475–9.
13. Ruiz I, Altaba A, Stecca B, *et al.* Hedgehog-Gli signaling in brain tumors: stem cells and paradevelopmental programs in cancer. *Cancer Lett* 2004; **204**: 145–57.
14. Vestergaard J, Pedersen MW, Pedersen N, *et al.* Hedgehog signaling in small-cell lung cancer: Frequent *in vivo* but a rare event *in vitro*. *Lung Cancer* 2006 **52**: 281–90.
15. Pedersen N, Mortensen S, Sorensen SB, *et al.* Transcriptional gene expression profiling of small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2003; **63**: 1943–53.

EXPRESSION OF THE SONIC HEDGEHOG EMBRYONIC SIGNALLING PATHWAY COMPONENTS IN MATCHED PRE-TREATMENT AND RELAPSED SMALL CELL LUNG CANCER BIOPSIES

Viktors Kozirovskis^{1,2,#}, Elīna Zandberga³, Melita Magone¹, Gunta Purkalne^{1,2}, Aija Linē³, and Uldis Vikmanis²

¹ Pauls Stradiņš Clinical University Hospital, 13 Pilsoņu Str., Rīga, LV-1002, LATVIA

² Faculty of Physics, Mathematics, and Optometry, University of Latvia, 3 Jelgavas Str., Rīga, LV-1004, LATVIA

³ Latvian Biomedical Research and Study Centre, 1 Rātsupītes iela Str., Rīga, LV-1067, LATVIA

Corresponding author, viktors.kozirovskis@stradini.lv

Communicated by Jānis Gardovskis

Cancer stem cells may be responsible for tumour regrowth and acquisition of resistance in small cell lung cancer (SCLC). The Hedgehog pathway regulates survival and proliferation of tissue progenitor and stem cell populations, promoting the expression of stem cell related and proliferative genes. We evaluated the Sonic Hedgehog (Shh) embryonic signalling pathway in relapsed SCLC. Expression levels of Shh related genes GLI1, SMO, SUFU, PTCH1, HHIP, BCL2, BMI, ZEB1, ZEB2, N-MYC, Twist1 were analysed by qRT-PCR in matched pre-treatment and relapsed tumour fresh frozen biopsies of three SCLC patients. Expression of each gene was compared using the paired samples t-test, as well as comparison of mean expression levels was done. Data were statistically interpreted using the MedCalc version 10.2.0.0 software. 2.9-fold lower mean mRNA expression of the major Hedgehog activation indicator GLI1 was observed in relapsed samples ($p = 0.0529$). Mean expression of six Shh inducible genes, PTCH1, HHIP, N-MYC, ZEB2, Twist1, ZEB1, was also downregulated by 2.6-, 2.2-, 1.9-, 1.8-, 1.2-, 1.1-fold, respectively ($p = 0.4252$, $p = 0.1268$, $p = 0.2480$, $p = 0.1169$, $p = 0.1480$, $p = 0.7595$, respectively). 1.8-fold mean expression decrease was found for Gli activator Smo ($p = 0.4111$). Only the Shh pathway inhibitor SUFU and two other examined Hedgehog signalling inducible genes BCL2 and BMI in relapsed SCLC showed 0.8-, 0.9-, and 0.8-fold increase of expression, respectively ($p = 0.3074$, $p = 0.7921$, and $p = 0.3822$, respectively). To our knowledge, this is the first report of comparison of Shh signalling in matched pre-treatment and relapsed SCLC biopsies. Our data show decreased activity for majority of Shh pathway components in relapsed SCLC, although difference did not reach statistical significance.

Keywords: relapsed SCLC, cancer stem cells, Sonic Hedgehog pathway, gene expression, matched biopsies.

INTRODUCTION

Small cell lung cancer is a malignant disease, where presence of a cancer stem cell (CSC) subpopulation is suggested by clinical practice. Standard chemotherapy may reduce tumour mass very effectively and even induce complete remission in the majority of patients (Okuno and Jett, 2002). Unfortunately, recurrence almost always occurs and virtu-

ally no extensive-stage disease patients remain alive for five years (Jett *et al.*, 2013). This can be explained by the survival of a small fraction of dormant and treatment-resistant CSC during initial chemotherapy and further repopulation of the tumour. The majority of cells, like CSC in recurrent tumours, acquire resistance to chemotherapy. One major characteristic feature of CSC is its ability to exclude Hoescht dye from the cell due to high expression of drug

transporters like the ABC transporter family, including ABCB1 and ABCG2 (Goodell *et al.*, 1996). Selection and further study of CSC therefore became possible in small cell lung cancer (SCLC) cell lines and mouse models within the so-called side population fraction (with poor Hoechst dye saturation). Many stemness and drug resistance associated genes were found to be overexpressed in SCLC CSC, as well as genes involved in the embryonic signalling pathways — Notch and Hedgehog (Salcido *et al.*, 2010). The Hedgehog pathway activation was found in SCLC tumours (Watkins *et al.*, 2003) and its blockade inhibited growth of SCLC tumour xenografts in mice (Vestergaard *et al.*, 2006). Additionally, increased Hedgehog signalling was found to be associated with activation of neuroendocrine precursors within the airway epithelial compartment, which could be of importance in SCLC with its primitive neuroendocrine features (Zochbauer-Muller *et al.*, 2002).

The aim of this study was to investigate and compare Sonic Hedgehog (Shh) embryonic signalling pathway activity in small cell lung cancer biopsies before and after acquisition of resistance. In this retrospective study we evaluated mRNA expression of key Shh pathway member genes in advanced stage SCLC samples before treatment and at progression of the disease.

The following genes were evaluated:

- 1) the major indicator of Hedgehog activation — positive pathway regulator and pathway transcriptional target *Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (Gli1)* (Katoh and Katoh, 2009a), as well as *Gli* activator *Smoothed (Smo)* (Gupta *et al.*, 2010);
- 2) pathway inhibitor *Suppressor Of Fused Homolog (SUFU)* (Sabot *et al.*, 2018), and
- 3) the most important genes inducible by Hedgehog signaling: pathway canonical negative feedback regulators — *Protein Patched Homolog 1 (PTCH1)* and *Hedgehog Interacting Protein (HHIP1)* (Pietrobono *et al.*, 2019), antiapoptotic *B-Cell CLL/Lymphoma 2 (BCL2)*, CSC marker and epigenetic regulator *BMI1 polycomb ring finger oncogene (BMI1)*, epithelial-to-mesenchymal transition inducers *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 and 2 (ZEB1, ZEB2)* (Katoh and Katoh, 2009a), drug resistance associated *NMYC* (Salcido *et al.*, 2010) and direct transcriptional target of *Gli1* — *Twist Family BHLH Transcription Factor 1 (Twist1)* (Kong *et al.*, 2015).

MATERIALS AND METHODS

Patients and tissue samples. Pre-treatment tissue samples for the study were collected along with standard biopsies during fibrobronchoscopy (FBS) from patients who were diagnosed with advanced (stage III B and IV) SCLC at Pauls Stradiņš Clinical University Hospital between October 2010 and January 2014. Tissue specimens were submerged in RNAlater solution (Thermo Fisher Scientific, USA) and stored at -20°C . The presence of tumour cells in the study

samples was verified by cytological evaluation of a smear, which was obtained before placing the sample in RNAlater. All diagnoses were histologically confirmed as SCLC in standard biopsies by board-certified pathologists; the presence of tumour cells in study smear was done by a board-certified cytologist. Pre-treatment biopsies from 20 SCLC patients were obtained and they were followed during treatment. At the moment of disease progression, repeated FBS and study biopsies of relapsed SCLC was done in five patients. Two patients were excluded from the analysis (one due to the lack of cytological confirmation of tumour cell presence in the pre-treatment study biopsy the other due to the bad RNA quality in the relapsed tumour biopsy). A small cohort of samples that was available for testing consisted of matched pre-treatment and relapsed SCLC biopsies from the same patient ($n = 3$).

Demographics and clinical characteristics of the studied patients and comparison of three patients, who had qualitative both pre-treatment and relapsed SCLC biopsies vs patients not included in paired gene expression analysis are shown in Table 1. Statistically significant age and ECOG differences were found between groups, while patients were comparable in terms of gender, disease stage, toxicity, received treatment, best response to therapy, disease progression type, and survival.

The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental and Clinical Medicine, University of Latvia. The tissue samples were collected after written informed consent was obtained from the patients.

Preparation of tissue mRNA. Biopsy homogenisation was done by FastPrep®-24 Instrument and Lysing Matrix D (MP Biomedicals, USA) at 0.4 m/s for 40 seconds. Total RNA was isolated using the MirVana total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity was quantified by a Nanodrop ND-100 spectrophotometer. cDNA was synthesised by random hexamer priming from 1 μg of total RNA by using the Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative RT-PCR. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using 2 μl 1 : 10 diluted cDNA reaction mixtures, ABSolute Blue™ SYBR green Low ROX (Thermo Fisher Scientific, USA) and ViiA 7 real-time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Sequences of primers used in this study are available on request. To normalise the expression data, the normalisation factor was calculated for each cDNA from the expression values of the three most stable references genes (*ACTB*, *LRP10*, *YWHAZ*) selected among seven frequently used housekeeping genes by using geNorm software. All qRT-PCR experiments were performed in duplicate and the data were presented in graphs as means \pm standard deviation.

Table 1. Characteristics of three patients with pre-treatment and relapsed SCLC biopsies vs patients not included in paired gene expression analysis. The comparison between groups was carried out by the Student's t-test or the Chi Square test, according to the type of variable

Patient characteristics	Patients included in paired gene expression analysis (n = 3)	Patients NOT included in paired gene expression analysis (n = 17)	p-value
Gender			0.348
Male	3	13	
Female	0	4	
Age			0.037
Mean (range)	60 (49–77)	56.9 (47–70)	
ECOG			0.048
0	2	1	
1	0	7	
2	1	7	
3	0	2	
Stage			0.565
III A	0	2	
III B	1	5	
IV	2	10	
Deviations of treatment dosing/timing due toxicity			0.212
none	1	12	
present	2	5	
Treatment received			0.948
Chemotherapy only	1	6	
Chemotherapy and radiation therapy	2	11	
Best response			0.093
CR	0	2	
PR	2	13	
SD	0	2	
PD	1	0	
Disease progression type			0.075
local	1	4	
distant	0	8	
combined	2	1	
NK	0	2	
not progressed	0	2	
Survival			
Mean PFS (months)	6.7	25.8	0.469
Mean OS (months)	11	28.2	0.506

SCLC, small cell lung cancer; CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; NK, not known; PFS, progression-free survival; OS, overall survival; PD, progressive disease

Statistical analysis. The mRNA level of each Shh related gene was compared in the same patient matched pre-treatment vs relapsed SCLC samples using the two-tailed paired samples t-test, as well as comparison of mean expression levels of each tested gene was done in all pre-treatment vs relapsed samples with calculation of 95% confidence intervals. Data were statistically interpreted using MedCalc version 10.2.0.0 software. *p* values of < 0.05 were considered significant.

RESULTS

To our knowledge, this is the first report that compares expression of the Shh signalling pathway components in matched pre-treatment and relapsed SCLC biopsies. Our results show decreased activity of majority of Shh pathway components in the relapsed SCLC tumour tissues, although the differences did not reach statistical significance.

2.9-fold lower mean mRNA expression of the major Hedgehog activation indicator *GLI1* was observed in relapsed SCLC biopsies when compared with matched pre-treatment biopsies, although the difference did not reach statistical significance ($p = 0.0529$, 95% CI: -0.0002023 to 0.000003115 , two-tailed paired samples t-test) (Fig. 1, Table 2).

Mean expression of six genes inducible by Hedgehog signalling — *PTCH1*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1*, and *ZEB1* was also downregulated by 2.6-, 2.2-, 1.9-, 1.8-, 1.2-, and 1.1-fold, respectively, in relapsed SCLC samples without a statistical significant difference ($p = 0.4252$, $p = 0.1268$, $p = 0.2480$, $p = 0.1169$, $p = 0.1480$, and $p = 0.7595$, respectively) (Figs. 1 and 2, Table 2).

1.8-fold mean expression decrease was found in paired biopsies at relapse for Gli activator *Smo* with no statistically significant difference ($p = 0.4111$) (Fig. 2, Table 2).

For relapsed SCLC, only Shh pathway inhibitor *SUFU* and 2 examined Hedgehog signalling inducible genes — *BCL2* and *BMI* showed increase by 0.8-, 0.9- and 0.8-fold, respectively, in their mean expression level, without statistically significant difference ($p = 0.3074$, $p = 0.7921$ and $p = 0.3822$, respectively) (Fig. 3, Table 2).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report that directly compares expression of the Shh signalling pathway components in matched pre-treatment and relapsed SCLC biopsies.

2.9 fold lower mean mRNA expression of the major Hedgehog activation indicator *GLI1* was observed in relapsed SCLC biopsies compared to matched pre-treatment biopsies, although the difference did not reach statistical significance ($p = 0.0529$).

Mean expression of six genes inducible by Hedgehog signalling — *PTCH1*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1*, and *ZEB1* was also downregulated by 2.6-, 2.2-, 1.9-, 1.8-, 1.2- and 1.1-fold, respectively, in relapsed SCLC, without statistically a significant difference ($p = 0.4252$, $p = 0.1268$, $p = 0.2480$, $p = 0.1169$, $p = 0.1480$, and $p = 0.7595$, respectively), as well as 1.8-fold mean expression decrease in relapsed samples for Gli activator *Smo*, with no statistically significant difference ($p = 0.4111$).

For relapsed biopsies, only Shh pathway inhibitor *SUFU* and the other two examined Hedgehog signalling inducible genes — *BCL2* and *BMI* showed increase by 0.8-, 0.9-, and

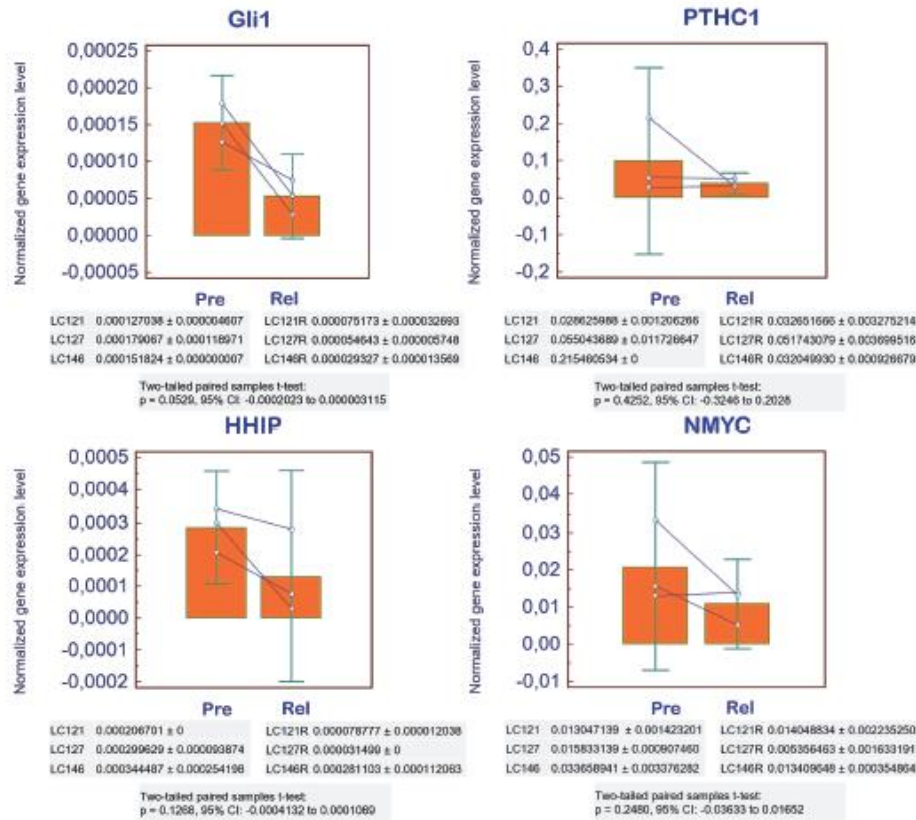


Fig. 1. Dot and line diagram with normalised gene expression levels of each Shh-related gene plotted as individual dots connected by a line for the same SCLC patient pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) samples. Bars for means with 95% CI for the mean. Data presented in graphs are means obtained from experiments in duplicates ± standard deviation. SCLC, small cell lung cancer; CI, confidence interval; *Gli1*, Glioma-Associated Oncogene Homolog 1; *PTCH1*, Protein Patched Homolog 1; *HHIP1*, Hedgehog Interacting Protein; *N-MYC*, a member of the MYC family of transcription factors.

0.8-fold, respectively, in their mean expression level, without statistically significant difference ($p = 0.3074$, $p = 0.7921$, and $p = 0.3822$, respectively).

Cancer stem cells may be responsible for tumour initiation, regrowth and acquisition of resistance. Many studies have linked the aberrant hedgehog signalling to renewal and sur-

vival of cancer stem cells in SCLC, thus making it a promising therapeutic target.

Preclinical research in SCLC is relying mainly on cell lines and xenografts, due to the lack of widely available tumour samples (Hamilton *et al.*, 2012). However, it has been observed that establishment of SCLC cell line/xenograft leads

Table 2. Comparison of mean expression level of Shh related genes in pre-treatment vs relapsed samples

Tested gene	Mean expression level in 3 SCLC pre-treatment vs relapsed samples				Estimated difference
	pre-treatment	95% CI for the mean	relapsed	95% CI for the mean	
<i>Gli1</i>	0.0001526	0.000088 to 0.0002173	0.00005305	-0.000004 to 0.0001101	2.9
<i>PTCH1</i>	0.09971	-0.1515 to 0.3509	0.03881	0.01099 to 0.06664	2.6
<i>HHIP1</i>	0.0002836	0.000109 to 0.0004582	0.0001305	-0.0001989 to 0.0004598	2.2
<i>N-MYC</i>	0.02085	-0.006934 to 0.04863	0.01094	-0.001096 to 0.02297	1.9
<i>Smo</i>	0.01722	-0.0130 to 0.04744	0.009398	-0.01974 to 0.03854	1.8
<i>ZEB2</i>	0.02419	0.01042 to 0.03795	0.01354	0.004276 to 0.0228	1.8
<i>Twist1</i>	0.004609	-0.0004286 to 0.009646	0.003798	-0.002644 to 0.01024	1.2
<i>ZEB1</i>	0.007191	-0.001361 to 0.01574	0.006662	0.004601 to 0.008722	1.1
<i>BCL2</i>	0.02301	0.0006755 to 0.04534	0.02509	-0.01966 to 0.06984	0.9
<i>SUFU</i>	0.007723	0.004172 to 0.01127	0.009916	0.002686 to 0.01715	0.8
<i>BMI</i>	0.08249	0.0108 to 0.1542	0.09763	-0.02615 to 0.2214	0.8

Shh, Sonic Hedgehog; SCLC, small cell lung cancer; CI, confidence interval; *Gli1*, Glioma-Associated Oncogene Homolog 1; *PTCH1*, Protein Patched Homolog 1; *HHIP1*, Hedgehog Interacting Protein; *N-MYC*, a member of the MYC family of transcription factors; *Smo*, Smoothened; *ZEB1*, *ZEB2*, Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 and 2; *Twist1*, Twist Family BHLH Transcription Factor 1; *BCL2*, B-Cell CLL/Lymphoma 2; *SUFU*, Suppressor Of Fused Homolog; *BMI*, BMI1 polycomb ring finger oncogene

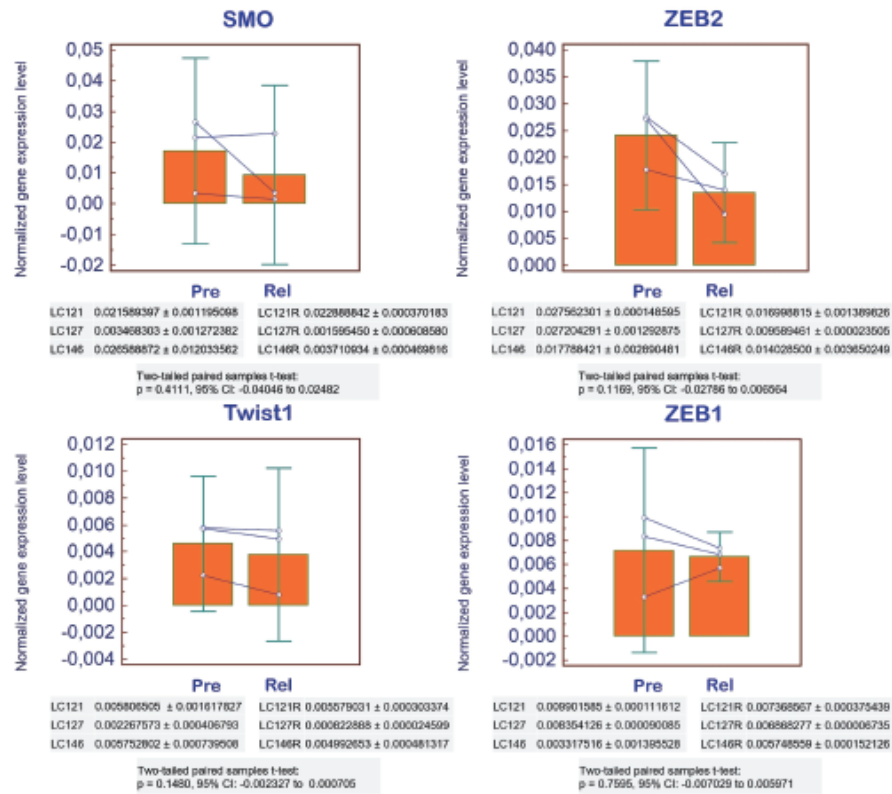


Fig. 2. Dot and line diagram with normalised gene expression levels of each Shh-related gene plotted as individual dots connected by a line for the same SCLC patient pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) samples. Bars for means with 95% CI for the mean. Data presented in graphs are means obtained from experiments in duplicates ± standard deviation. SCLC, small cell lung cancer; CI, confidence interval; *Smo*, Smoothened; *ZEB2*, Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1 and 2; *Twist1*, Twist Family BHLH Transcription Factor 1.

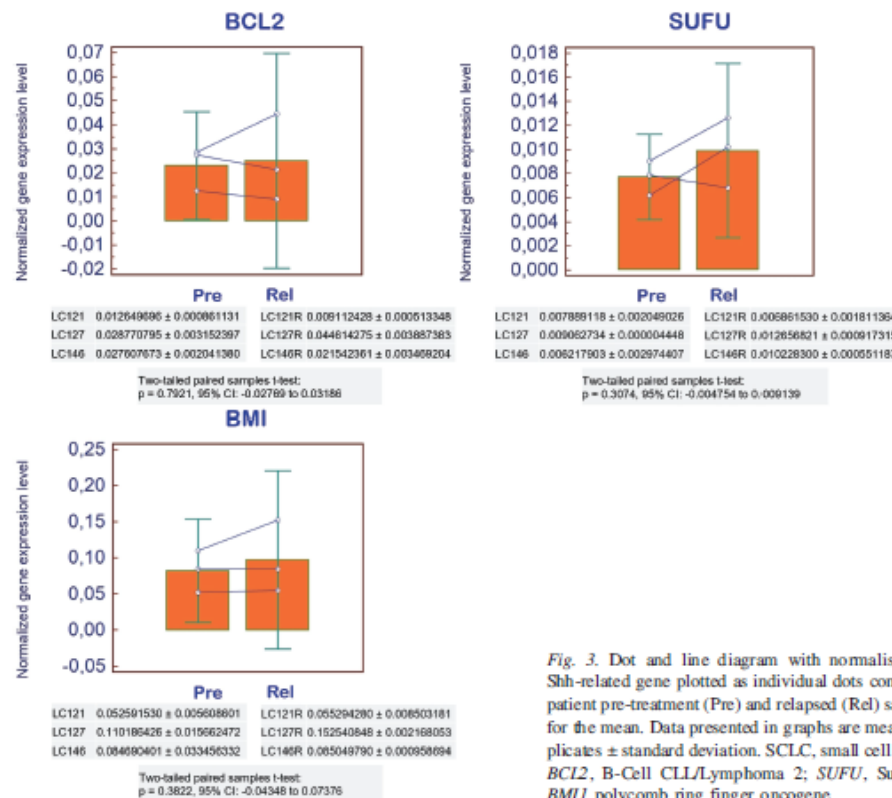


Fig. 3. Dot and line diagram with normalised gene expression levels of each Shh-related gene plotted as individual dots connected by a line for the same SCLC patient pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) samples. Bars for means with 95% CI for the mean. Data presented in graphs are means obtained from experiments in duplicates ± standard deviation. SCLC, small cell lung cancer; CI, confidence interval; *BMI*, B-Cell CLL/Lymphoma 2; *SUFU*, Suppressor of Fused Homolog; *BMI*, *BMI1* polycomb ring finger oncogene

to irreversible changes in gene expression (Daniel *et al.*, 2009). Regarding Hedgehog signalling, it was shown previously that significantly higher mean *GLII* expression is present in SCLC tumour biopsies tissues compared to that in SCLC cell lines (Pedersen *et al.*, 2003). Thus, caution should be taken when working with tumour-derived cell lines, as the expression and signalling may not reflect the *in vivo* situation. The advantage of this study is that mRNA expression of key Shh pathway members was evaluated in SCLC fresh biopsies (*in vivo*). To our knowledge, this is the first report of such analysis of Shh signalling pathway components in matched pre-treatment and relapsed SCLC samples.

Contrary to promising preclinical data that suggested a synergistic role between the canonical Shh pathway inhibitors and chemotherapy for targeting the chemoresistant subset of SCLC cells, no positive results from clinical trials evaluating activity of SMO inhibitors (Vismodegib, LDE-225, BMS-833923, and LY2940680) have been reported. One possible explanation of this failure in SCLC might be the non-canonical activation of Shh pathway key players. An example of ligand-independent *GLII* activation is *GLII* overexpression observed in the case of TP53 deficiency. Study of this mechanism showed that exposure of human medulloblastoma cell lines and *Ptc-/-* mouse embryonic fibroblasts to DNA damaging cytotoxic drugs induced concomitant expression of p53 and sequential downregulation of *GLII* through its p53-dependent ubiquitination and degradation (Mazza *et al.*, 2013). This dependency may be crucial in this particular lung cancer type because bi-allelic inactivation of *TP53* and *RB1* genes is observed nearly in all SCLC (George *et al.*, 2015).

Other possible cause of increased ligand-independent Shh signalling is presence of activating mutations in RAS-RAF-MEK, PI3K-AKT oncogenic signalling pathways or downregulation of the Notch pathway. Thus, oncogenic H- or N-RAS and AKT1 potentiate *GLII* function, by enhancing its transcriptional activity and nuclear localisation, and counteracting its cytoplasmic retention by SUFU in melanoma, prostate cancer and human glioma cells (Stecca *et al.*, 2007). Similarly, loss of function of tumour suppressor PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), an endogenous inhibitor of AKT, will lead to increased transcriptional activity of *GLII*. PTEN alterations can be found in 10–18% of SCLC tumours (Yokomizo *et al.*, 1998).

Another oncogene that was found to activate *GLII* independently from Shh ligand-mediated signalling is *C-MYC*. It is frequently overexpressed in both SCLC and non-small cell lung cancer (NSCLC) (Wistuba *et al.*, 2001). *C-MYC* directly binds to the *GLII* promoter and activates its transcription. Inhibition of *C-MYC* by small molecule inhibitors downregulates *GLII* mRNA and induces cell death in Burkitt lymphoma cells (Yoon *et al.*, 2013).

While KRAS/AKT aberrant activation is a rare event in SCLC (Maitra *et al.*, 2001; Wakuda *et al.*, 2014; Yamamoto

et al., 2008; Kodaz *et al.*, 2016), Notch pathway signalling was found to be downregulated in 77% of 110 SCLC clinical tumour specimens, among which Notch family genomic alterations were found in 25% of cases (George *et al.*, 2015). As Notch signals downregulate *GLII* expression via HES/HEY family members (Katoh and Katoh, 2009b), increased Shh signalling is possible in this case. Additional studies found reduced tumour formation, metastatic capability, cell cycle inhibition, and reduced neuroendocrine markers with Notch activation, thus demonstrating Notch as a tumour suppressor in SCLC (Hassan *et al.*, 2014). One discovered mechanism of Notch pathway downregulation is overexpression of its inhibitor *DLL3*, which enhances endosomal/lysosomal degradation of both activatory Notch single-pass transmembrane receptors and membrane-bound ligand *DLL1* (Chapman *et al.*, 2011; Serth *et al.*, 2015).

Considering multiple possible non-canonical Shh signalling interactions, our finding with lower (although statistically non-significant) *GLII* expression in relapsed SCLC samples when compared to matched pre-treatment biopsies might reflect the further increasing dysregulation of different signalling pathways and/or epigenetic mechanisms. In this case, accumulation of additional genetic/epigenetic changes over time decreases initially high *GLII* levels, which is characteristic for SCLC tumour biopsies and may be explained by a few critical genetic alterations like the frequently observed TP53 deficiency or downregulated Notch pathway signalling.

A possible limitation of the study might be the inclusion of primary resistant patients in the analysis. One patient did not respond to specific therapy, thus suggesting that resistance-associated changes were already present in the pre-treatment sample.

This study was the first attempt to solve the problem of notable lack of paired samples of newly diagnosed and recurrent SCLC. Unfortunately, only five patients from 20 had undergone FBS re-biopsy of their progressed tumour and only three qualitative matched paired samples were obtained. The main causes of such a low re-biopsy rate were distant disease progression only and refusal of patients to undergo a repeated invasive procedure. An issue was also the small size of biopsy samples and exclusion of a significant part of study patients from analysis due to lack of cancer cells in a biopsy.

Our data show decreased activity of the majority of Shh pathway components in the relapsed SCLC tumour tissues, although the differences did not reach statistical significance.

Thus, the activation of Shh signalling might not be a universal mechanism for SCLC relapse and resistance development.

Due to the small number of patients in this study, generalisation of our results is questionable. A longer period of time

for tissue sample collection or inclusion of additional centres in the tissue collection programme may solve this problem.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Romalda Grigalinoviča for her extra work while being study dedicated cytologist in this project.

REFERENCES

- Chapman, G., Sparrow, D. B., Kremmer, E., Dunwoodie, S. L. (2011). Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. *Hum. Mol. Gen.*, **20** (5), 905–916.
- Daniel, V. C., Marchionni, L., Hieman, J. S., Rhodes, J. T., Devereux, W. L., Rudin, C. M., Yung, R., Parmigiani, G., Dorsch, M., Peacock, C. D., Watkins, D. N. (2009). A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture *in vitro*. *Cancer Res.*, **69** (8), 3364–3373.
- George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., Leenders, F., Lu, X., Fernández-Cuesta, L., Bosco, G. *et al.* (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, **524** (7563), 47–53.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J. Exper. Med.*, **183** (4), 1797–1806.
- Gupta, S., Takebe, N., Lorusso, P. (2010). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, **2** (4), 237–250.
- Hamilton, G., Ulsparger, E., Geissler, K., Olszewski, U. (2012). Therapy-induced changes of gene expression in a matched pair of small cell lung cancer (SCLC) cell lines. *J. Cancer Ther.*, **3**, 442–451.
- Hassan, W. A., Yoshida, R., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K., Ito, T. (2014). Notch 1 controls cell invasion and metastasis in small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer (Amsterdam)*, **86** (3), 304–310.
- Jett, J. R., Schild, S. E., Kesler, K. A., Kalemkerian, G. P. (2013). Treatment of small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, **143** (5 Suppl), e400S–e419S.
- Katoh, Y., Katoh, M. (2009a). Hedgehog target genes: Mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.*, **9** (7), 873–886.
- Katoh, Y., Katoh, M. (2009b). Integrative genomic analyses on GLI1: positive regulation of *GLI1* by Hedgehog-GLI, TGFβ-Smads, and RTK-PI3K-AKT signals, and negative regulation of *GLI1* by Notch-CSL-HES/HEY, and GPCR-Gs-PKA signals. *Int J Oncol.* **35** (1), 187–92.
- Kodaz, H., Tažtekin, E., Erdošan, B., Hacıbekiroğlu, Z., Tozkr, H., Gürkan, H., Türkmen, E., Demirkan, B., Uzunoğlu, S., Eriçin, Z. (2016). KRAS Mutation in small cell lung carcinoma and extrapulmonary small cell cancer. *Balkan Med. J.*, **33** (4), 407–410.
- Kong, Y., Peng, Y., Liu, Y., Xin, H., Zhan, X., Tan, W. (2015). Twist1 and Snail link Hedgehog signaling to tumor-initiating cell-like properties and acquired chemoresistance independently of ABC transporters. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **33** (4), 1063–1074.
- Maitra, A., Tascilar, M., Hruban, R. H., Offerhaus, G. J., Albores-Saavedra, J. (2001). Small cell carcinoma of the gallbladder: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular pathology study of 12 cases. *Amer. J. Surg. Pathol.*, **25** (5), 595–601.
- Mazzà, D., Infante, P., Colicchia, V., Greco, A., Alfonsi, R., Siler, M., Antonucci, L., Po, A., De Smaele, E., Ferretti, E. *et al.* (2013). PCAF ubiquitin ligase activity inhibits Hedgehog/Gli1 signaling in p53-dependent response to genotoxic stress. *Cell Death Differ.*, **20** (12), 1688–1697.
- Okuno, S. H., Jett, J. R. (2002). Small cell lung cancer: Current therapy and promising new regimens. *Oncologist*, **7** (3), 234–238.
- Pedersen, N., Mortensen, S., Sørensen, S. B., Pedersen, M. W., Rieneck, K., Bovin, L. F., Poulsen, H. S. (2003). Transcriptional gene expression profiling of small cell lung cancer cells. *Cancer Res.*, **63** (8), 1943–1953.
- Pietrobono, S., Gagliardi, S., Stecca, B. (2019). Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in cancer: Activation of GLI transcription factors beyond smoothed. *Frontiers Gen.*, **10**, 556.
- Sabol, M., Trnski, D., Musani, V., Ozretić, P., Levanat, S. (2018). Role of GLI transcription factors in pathogenesis and their potential as new therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (9), 2562.
- Salcido, C. D., Larochelle, A., Taylor, B. J., Dunbar, C. E., Varticovski, L. (2010). Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. *Brit. J. Cancer*, **102** (11), 1636–1644.
- Serth, K., Schuster-Gossler, K., Kremmer, E., Hansen, B., Marohn-Köhn, B., Gossler, A. (2015). O-fucosylation of DLL3 is required for its function during somitogenesis. *PLoS One*, **10** (4), e0123776.
- Stecca, B., Mas, C., Clement, V., Zbinden, M., Correa, R., Piguet, V., Beermann, F., Ruiz i Altaba, A. (2007). Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **104** (14), 5895–5900.
- Vestergaard, J., Pedersen, M. W., Pedersen, N., Ensinger, C., Tümer, Z., Tommerup, N., Poulsen, H. S., Larsen, L. A. (2006). Hedgehog signaling in small-cell lung cancer: Frequent *in vivo* but a rare event *in vitro*. *Lung Cancer (Amsterdam)*, **52** (3), 281–290.
- Wakuda, K., Kenmotsu, H., Serizawa, M., Koh, Y., Isaka, M., Takahashi, S., Ono, A., Taira, T., Naito, T., Murakami, H. *et al.* (2014). Molecular profiling of small cell lung cancer in a Japanese cohort. *Lung Cancer (Amsterdam)*, **84** (2), 139–144.
- Watkins, D. N., Berman, D. M., Burkholder, S. G., Wang, B., Beachy, P. A., Baylin, S. B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, **422** (6929), 313–317.
- Wistuba, I. I., Gazdar, A. F., Minna, J. D. (2001). Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Seminars Oncol.*, **28** (2 Suppl 4), 3–13.
- Yamamoto, H., Shigematsu, H., Nomura, M., Lockwood, W. W., Sato, M., Okumura, N., Soh, J., Suzuki, M., Wistuba, I. I., Fong, K. M. *et al.* (2008). PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res.*, **68** (17), 6913–6921.
- Yokomizo, A., Tindall, D. J., Drabkin, H., Gemmill, R., Franklin, W., Yang, P., Sugio, K., Smith, D. I., Liu, W. (1998). PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene*, **17** (4), 475–479.
- Yoon, J. W., Gallant, M., Lamm, M. L., Iannaccone, S., Vieux, K. F., Proytcheva, M., Hyjek, E., Iannaccone, P., Walterhouse, D. (2013). Noncanonical regulation of the Hedgehog mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt lymphoma. *Mol. Cancer Res.*, **11** (6), 604–615.
- Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A. F., Minna, J. D. (2002). Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 681–708.

Received 9 February 2021

Accepted in the final form 27 May 2021

SONIC HEDGEHOG EMBRIOĢENĒZI REGULĒJOŠĀ SIGNĀLCEĻA KOMPONENTU EKSPRESIJA SĪKŠŪNU PLAUŠU VĒŽA PACIENTU PIRMSTERAPIJAS UN RECIDĪVA PĀRA BIOPSIJĀS

Vēža cilmšūnas var būt par pamatu sīkšūnu plaušu vēža (SŠPV) recidīvam un rezistences attīstībai. *Hedgehog* signālceļš regulē vairākus ar cilmšūnām un proliferāciju saistītus gēnus, tādējādi veicinot cilmšūnu un audu progenitoro šūnu izdzīvošanu un proliferāciju. Mēs izvērtējām *Sonic Hedgehog* (Shh) embriogēni regulējošo signālceļu recidīvējošā SŠPV. Izmantojot reālā laika kvantitatīvo *qRT-PCR*, tika analizēti ekspresijas līmeņi Shh saistītiem gēniem *GLII*, *SMO*, *SUFU*, *PTCHI*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1* trīs SŠPV pacientu audzēju svaiģi saldēto pāra biopsiju paraugos, kas ņemti pirms terapijas un recidīva laikā. Katra gēna ekspresijas līmeņi saistītajām paraugkopām tika salīdzināti, izmantojot Stjūdenta t-testu, kā arī tika salīdzināti vidējie ekspresijas līmeņi. Datu statistiskā analīze veikta, izmantojot *MedCalc* 10.2.0.0 versijas programmu. Recidīva paraugos bija 2,9 reizes zemāka ($p = 0,0529$) vidējā mRNS ekspresija galvenajam Hedgehog signālceļa aktivitātes indikatoram *GLII*. Arī sešu Hedgehog signālceļa inducējamo gēnu — *PTCHI*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1*, *ZEB1* — vidējā ekspresija bija attiecīgi zemāka 2,6, 2,2, 1,9, 1,8, 1,2, 1,1 reizes (ar attiecīgu $p = 0,4252$, $p = 0,1268$, $p = 0,2480$, $p = 0,1169$, $p = 0,1480$, $p = 0,7595$). 1,8 reizes zemāka vidējā ekspresija bija konstatēta Gli aktivatoram *Smo* ($p = 0,4111$). Attiecīgi 0,8, 0,9 un 0,8 reizes augstāka vidējā ekspresija recidīvējošā SŠPV (ar attiecīgu $p = 0,3074$, $p = 0,7921$ un $p = 0,3822$) bija vienīgi signālceļa inhibitoram *SUFU* un 2 citiem izmeklētiem Hedgehog signālceļa inducējamiem gēniem *BCL2* un *BMI*. Pēc mums pieejamās informācijas, šis ir pirmais ziņojums, kas salīdzina Shh signālceļa ekspresiju SŠPV pirmsterapijas un recidīva pāra biopsijās. Pētījumā iegūtie rezultāti norāda uz Shh signālceļa komponentu samazinātu aktivitāti recidīvējošā SŠPV, kaut starpība nav sasniegusi statistisku ticamību.

Volume 77, Supplement 1, June 2012 ISSN 0169-5002

lung cancer

An international journal
for lung cancer and other
thoracic malignancies

**Abstracts of the 13th Central European
Lung Cancer Conference,
June 24-27, 2012, Prague, Czech Republic**



International Lung Cancer Consortium



with vinorelbine (25 mg/m² D1 i.v. and 60 mg/m² D8 given orally). After radical resection, ACT (4 cycles of 21 day regimen) was applied to patients with stages IB, II, and IIIA of NSCLC in 21 Czech and Slovak centres. Selection of CDDP or CBDCA was based on individual centre preference. Recruitment of patients started on the 12th of January 2005 and finished on the 5th of December 2008. Evaluation was closed on the 31st of January 2011.

Results: ACT was applied to 154 eligible patients (110 men, 44 women, median of age 63 years). Out of them, 89 were smokers, 49 ex-smokers and 16 non smokers. Surgically determined stages were IB in 46 pts, IIA in 18 pts, IIB in 38 pts and IIIA in 52 pts. CBDCA was given to 77 patients and CDDP to 77 patients, 4 of whom switched to CBDCA. All of them were treated as out-patients. Altogether 586 cycles (mean no 3.81, in CDDP 3.77, in CBDCA 3.84) were administered, 84% of patients finished four cycles of planned ACT. The reasons for 25 patients ending ACT prematurely were hematological toxicity in 8 pts, non-hematological toxicity in 9 pts and other reasons in 8 pts. The most frequent WHO grade 3/4 of toxicity in cycles was neutropenia in 16.7%, leucopenia in 7.9%, anemia in 1.2%, thrombocytopenia in 0.5%, alopecia in 5.8%, nausea in 2.4%, nephrotoxicity in 0.5%, neurotoxicity, diarrhoea and mucositis in 0.2%. There was significantly higher incidence of neutropenia (p 0.041) and slightly higher incidence of vomiting (p 0.058) in CDDP regimen, and non significantly higher incidence of anemia (p 0.051) in CBDCA regimen. Median of follow-up was 31 months, 3-year survival during this period was 69.8%. After evaluation closing 98 pts have lived, 31.2% (48 pts) died because of NSCLC, 5.2% (8 pts) died because of the different reasons than toxicity or progression (7 pts died without progression, 1 patient died during the cancer recurrence but progression was not the reason of the death). Out of all alive patients, 18 survived with appearance of the recurrence and 80 pts lived without progression of the disease. Disease free interval was 43 months.

Conclusions: ACT with vinorelbine given orally on day 8 appears to be a feasible and tolerable regimen in radically resected NSCLC. Short time survival results are optimistic. Present study is ongoing and the trends of overall survival, disease free interval and other survival parameters will be evaluated in longer follow-up period.

Acknowledgement: This study was supported by Grant IGA MZ ČR NT/13569 of the Czech Ministry of Health.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.05.063>

Oral vinorelbine in combination with carboplatin in adjuvant chemotherapy of non-small cell lung cancer (NSCLC): A prospective multicentre study of feasibility, tolerability and short time survival

V. Kolek, I. Grygárková, J. Chalupa, L. Koubková, T. Janásková, J. Roubec, P. Popelková, T. Bártek, D. Sixtová, E. Pavlíková, T. Vlášek, F. Chaloupka, J. Skříčková. *Pneumo-oncological Departments of Olomouc, Liberec, Praha-Motol, Vítkovice, Ostrava, Praha-Krč, Mladá Boleslav, Pardubice, Ústí n.L., Brno, Czech Republic*

Background: Adjuvant cisplatinum-based chemotherapy is recommended for routine use in patients with stages IIA, IIB, and IIIA of non small-cell lung cancer (NSCLC) after radical resection. Results in stage IB were not conclusive. Vinorelbine is a preferable associated drug in this indication and a randomized study proved the comparable effectiveness and tolerability of vinorelbine given both orally or intravenously (i.v.) in advanced NSCLC, meanwhile oral vinorelbine gives better comfort to patients. The tolerance of adjuvant chemotherapy and implementation of planned dose intensity remains a substantial problem, which most likely reflects the difficulty associated with CDDP-based chemotherapy. NCIC CTG BR.10, IALT and ANITA trials reported treatment-related deaths,

accounting for 0.8–1.7%. In ANITA trial, median of planned dose was 56.3% in NVB and 76.1% in CDDP. Only 50% of patients finished all of 4 cycles planned. New studies targeting more tolerable regimens are needed. CDDP-based treatment is preferred, but several studies showed similar effectiveness and better tolerance of the combination of carboplatin (AUC5) and paclitaxel, pemetrexed or vinorelbine. Only few data exist about vinorelbine given orally in adjuvant chemotherapy (ACT).

Methods: This prospective multicentre study evaluates the feasibility and toxicity of ACT based on carboplatin-CBDCA (AUC 5) with vinorelbine (D1 and D8 80 mg/m² given orally with the dose of 60 mg/m² given in the first cycle). After complete resection, ACT (4 cycles of 21 day regimen) was applied to patients with stage IB, II, and IIIA of NSCLC in 10 Czech centres. Recruitment of patients started on the 1st of April 2009 and finished on the 15th of February 2010. Evaluation was closed on the 31st of January 2011. Short time survival was evaluated during this period.

Results: ACT was applied to 104 eligible patients (72 men, 32 women, median of age 64 years). All of them were treated as out-patients. There were 41 (39.8%) smokers, 57 (55.3%) ex-smokers and 5 (4.9%) non-smokers. Surgically determined stages were IB in 32 (30.8%) pts, II in 36 (34.6%) and IIIA in 36 (34.6%). Histological types of tumours were: squamous carcinoma in 58 (55.8%) pts, adenocarcinoma in 29 (27.9%) pts, large cell carcinoma in 11 (10.6%) pts and combined carcinoma in 6 (5.8%) pts. Altogether 401 cycles (mean no. 3.82 per patient) were administered, 89.4% of patients finished four cycles of planned ACT. The most frequent reasons for patients ending in ACT prematurely were WHO grade 3/4 of toxicities: neutropenia in 10.3%, leucopenia in 5.0%, alopecia in 3.3% and nausea in 4.0%. Relative dose intensity for vinorelbine was 80.8% (according to the recommended escalated dose) and relative dose intensity for CBDCA was 95.4%. Median of follow-up was 11.7 months. After evaluation closing 91 (87.5%) pts have lived, out of them 78 (75%) without recurrence of cancer. Out of those who died, eleven died on lung cancer free on other cause.

Conclusions: ACT with CBDCA (AUC 5) and vinorelbine given orally appears to be a feasible and tolerable regimen in radically resected NSCLC. Short time survival results are optimistic. Present study is ongoing and the trends of overall survival, disease free interval and other survival parameters will be evaluated in longer follow-up period.

Acknowledgement: This study was supported by Grant IGA MZ ČR NT/13569 of the Czech Ministry of Health.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.05.064>

Small cell lung cancer treatment in Paul Stradins Clinical University Hospital (Riga, Latvia) – Update after 3 year follow up

Viktors Kozirovskis*, Vija Bērziņa, Aija Geriņa-Bērziņa, Elīna Skuja, Arturs Šorubalko, Gunta Purkalne. *Paul Stradins Clinical University Hospital, Riga, Latvia*

Background: Study was conducted to analyze the treatment and survival of small cell lung cancer (SCLC) patients in Paul Stradins Clinical University Hospital.

Materials and methods: 100 patients diagnosed and treated with SCLC in 2007–2009 were analyzed retrospectively. Information was collected from medical records, clinic's database and cancer registry. Kaplan–Meier survival curves were used to analyze survival by cancer stage.

Results: 100 patients (90 men and 10 women) were identified. Limited disease (LD) was in 66, extensive disease (ED) – in 34 patients. Median time from diagnosis to treatment was 16 days (range 0–96). 97 patients received 1st line chemotherapy, 29 patients received ≥ 2

Table 1

Stage	Patients	Response					Survival			
		CR	PR	SD	PD	Response rate (CR+PR)	Median OS (months)	1 year survival	2 year survival	3 year survival
LD	66	5	39	12	11	67%	10	42%	14%	6%
ED	34	1	15	3	14	47%	7	27%	0%	–

lines of chemotherapy. Radiation therapy was used in 39 patients for local control, in 15 for symptom relief, in 9 – prophylactic cranial irradiation. Only 1 patient received concurrent chemoradiotherapy, sequential approach was used mainly. Treatment results are shown in Table 1. In 3 year follow up only 4 LD patients are still alive: 2 women (33%) with PR and 2 men (3%) with 1 PR and 1 CR.

Conclusions: Survival of SCLC patients in Paul Stradins Clinical University Hospital was inferior when compared to literature data (median OS 14–20 months and RR 70–90% for LD; 9–11 months and 60–70% for ED). Several factors were identified to improve treatment results:

- (1) Time from diagnosis to beginning of treatment should be reduced.
- (2) Concurrent chemoradiotherapy should be used instead of sequential approach in appropriate patients.
- (3) Prophylactic cranial irradiation should be used more frequently in case of complete/partial response.

Female gender and LD stage are good prognostic factors for long term survival. CR is not a necessary condition for 3 year survival.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.05.065>

Start of lymph node metastases of non-small cell lung cancer depended on cell ratio factors

O. Kshivets. *Siauliai Hospital, Siauliai, Lithuania*

Background: Significance of immune cell circuit for start of lymph node metastases (N1) of non-small cell lung cancer (LC) was investigated.

Materials and methods: In trial (1987–2012) consecutive cases after radical surgery (R0), monitored 182 LC patients (LCP) (age = 58.5 ± 7.8 years, m = 162, f = 20; bi/lobectomies = 182, N2-lymphadenectomies = 182) with pathologic stage T1–2N0–1M0 (tumor size = 3.5 ± 1.5 cm; squamous = 97, adenocarcinoma = 75, large cell = 10; T1 = 96, T2 = 86; N0 = 128, N1 = 54, N2 = 0; G1 = 50, G2 = 73, G3 = 59). Variables selected for study were input levels of immunity blood parameters, sex, age, TNMG. The percentage, absolute count and total population number (per human organism) of T-lymphocytes (CD3), B-lymphocytes (CD19), helper T-lymphocytes (CD4), suppressor/cytotoxic T-lymphocytes (CD8), killer cells (CD16), precursor T-cells (CD1), activated T-cells (CDw26), monocytes, helper/inducer T-lymphocytes (CD4 + 2H), contrasuppressor T-lymphocytes (CD8 + VV), leukocytes, lymphocytes, eosinophils, stick and segmented neutrophils were estimated. Differences between groups were evaluated using discriminant analysis, clustering, structural equation modeling, Monte Carlo, bootstrap simulation and neural networks computing.

Results: It was revealed that start of lymph node metastases significantly depended on cell ratio factors (ratio between blood cell subpopulations and cancer cells – CC): segmented neutrophils/CC, lymphocytes/CC, monocytes/CC, leucocytes/CC, CD3/CC, CD19/CC, CD4 + 2H/CC, CD8/CC, CD4/CC ($p = 0.001–0.023$). Neural networks computing, genetic algorithm selection and bootstrap simulation revealed relationships of lymph node metastases and eosinophils/CC (rank = 1), CD3/CC (rank = 2), CD4 + 2H/CC

(3), segmented neutrophils/CC (4), monocytes/CC (5), CD4/CC (6), CD8 + VV/CC (7), CD1/CC (8), CD19/CC (9), CDw26/CC (10), stick neutrophils/CC (11), CD8/CC (12), leucocytes/CC (13), lymphocytes/CC (14), CD16/CC (15). Correct detection of start of lymph node metastases was 100% by neural networks computing (error = 0.000; area under ROC curve = 1.0).

Conclusions: Start of lymph node metastases of non-small cell lung cancer depended on cell ratio factors.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.05.066>

Suppression of lung cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* by Leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1

Kyung-A. Lee^{1,*}, Kyeong-Nam Yu¹, Seung-Hee Chang¹, Myung-Haing Cho^{1,2,3,4,5}. ¹ Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, ² Department of Nanofusion Technology, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, ³ Graduate Group of Tumor Biology, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea, ⁴ Center for Food Safety and Toxicology, Seoul National University National Institute of Food and Drug Safety, Seoul, Republic of Korea, ⁵ Advanced Institute of Convergence Technology, Seoul National University, Suwon, Republic of Korea

Background: Leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1 (LETM1) is a mitochondrial inner membrane protein that encodes for the human homologue of yeast Mdm38p. It is a mitochondria-shaping protein of uncertain function. However, a previous study showed that LETM1 served as an anchor protein for complex formation between mitochondria and ribosome, and regulated mitochondrial biogenesis.

Materials and methods: To observe the effects of adenovirus-LETM1 *in vitro* and *in vivo*, we infected with adenovirus-LETM1 in A549 cells and on K-ras^{LA1} mice by delivering the LETM1 via aerosol through nose-only inhalation system.

Results: Overexpression of LETM1 could increase disruption of mitochondria of lung cancer cells through decreasing ATP and AMPK activation. Furthermore, LETM1 also affected Akt signaling and inhibited the cell cycle while apoptosis. These results established that LETM1 suppressed lung cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*.

Conclusions: Adenovirus-mediated LETM1 may provide a useful target for designing lung tumor prevention and treatment.

Acknowledgements: This work was supported by the National Research Foundation (NRF-2012-0000102) of the Ministry of Education, Science and Technology (MEST) and the R&D Program of MKE/KEIT (10035333, Development of anti-cancer therapeutic agent based on regulating cell cycle or cell death) in Korea.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.05.067>