



**LATVIJAS
UNIVERSITĀTE**

**Promocijas darba
kopsavilkums**

**Summary
of Doctoral Thesis**

Viktors Kozirovskis

**EMBRIOĢENĒZI REGULĒJOŠĀ
SONIC HEDGEHOG SIGNĀLCEĻA
NOZĪME SĪKŠŪNU PLAUŠU VĒŽĀ
PROGNOZĒ UN REZISTENCES
ATTĪSTĪBĀ**

**ROLE OF SONIC HEDGEHOG EMBRYONIC
SIGNALLING PATHWAY IN SMALL
CELL LUNG CANCER PROGNOSIS AND
DEVELOPMENT OF RESISTANCE**

Rīga 2022



LATVIJAS UNIVERSITĀTE

Medicīnas fakultāte

Viktors Kozirovskis

EMBRIOĢENĒZI REGULĒJOŠĀ SONIC HEDGEHOG SIGNĀLCEĻA NOZĪME SĪKŠŪNU PLAUŠU VĒŽA PROGNOZĒ UN REZISTENCES ATTĪSTĪBĀ

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

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

Rīga 2022

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē, Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Onkoloģijas klīnikā laika posmā no 2010. gada līdz 2015. gadam.

Darbs sastāv no anotācijas, ievada, četrām nodaļām, nobeiguma, literatūras saraksta, trim pielikumiem.

Darba forma: disertācija klīniskās medicīnas nozarē, onkoloģijas un hematoloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskie vadītāji: *Dr. habil. med. prof. Uldis Vikmanis;*
Dr. med. prof. Gunta Purkalne.

Darba 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 Kornyi Institute of TB and Pulmonology.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Universitātes Medicīnas un veselības zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2022. gada 16. decembrī plkst. 15.00 Latvijas Universitātes Akadēmiskā centra Zinātņu mājā, 401. auditorijā, Jelgavas ielā 3, Rīgā.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU Medicīnas un veselības zinātņu nozares
promocijas padomes priekšsēdētājs _____ / *Dr. med. Valdis Pirāgs* /
(*paraksts*)

promocijas padomes sekretāre _____ / *Dr. biol. Līga Plakane* /
(*paraksts*)

© Latvijas Universitāte, 2022
© Viktors Kozirovskis, 2022

ISBN 978-9934-18-906-7
ISBN 978-9934-18-907-4 (PDF)

ANOTĀCIJA

Sikšūnu 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, tādējādi veicinot cilmšūnu un audu progenitoru 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 faktoros 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 \leq 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*, *BMI1*, *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 analizē 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 neatšķirās.

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 inhibitori *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 analizētajiem 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/ progresējošā audzējā liecina par Hedgehog signālceļa lielākās komponentu daļas aktivitātes samazinājumu recidivējoša sīkšūnu plaušu vēža audos, kaut starpība nesasniedza 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

SATURS

ANOTĀCIJA	3
DARBĀ IZMANTOTIE APZĪMĒJUMI UN SAĪSINĀJUMI	6
1. PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS	8
1.1. Pētījuma īss teorētiskais pamatojums	8
1.2. Darba aktualitāte un novitāte	9
1.3. Darba mērķis	10
1.4. Darba uzdevumi	10
1.5. Darba hipotēze	10
2. MATERIĀLS UN METODES	11
2.1. Klinisko prognostisko faktoru un ārstēšanas rezultātu analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā	11
2.2. Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors	12
2.3. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā	13
3. REZULTĀTI	15
3.1. Klinisko prognostisko faktoru analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā	15
3.2. Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors	20
3.3. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā	34
4. DISKUSIJA	48
4.1. Klinisko prognostisko faktoru analīze sīkšūnu plaušu vēža pacientiem Paula Stradiņa KUS Onkoloģijas klīnikā	48
4.2. Hedgehog signālceļa asociēto gēnu ekspresija kā sīkšūnu plaušu vēža prognostiskais faktors	50
4.3. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu ekspresijas salīdzinājums pāra biopsijās pirms terapijas un recidīva laikā	53
SECINĀJUMI	56
PROMOCIJAS DARBA PRAKTISKĀ NOZĪME	56
PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR DARBA TĒMU	57
PATEICĪBAS	59
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	60

DARBĀ IZMANTOTIE APZĪMĒJUMI UN SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Skaidrojums latviski	Skaidrojums angļiski
95% CI	95% ticamības intervāls	95% Confidence interval
AKT	Proteīnkināze B	Protein kinase B (PKB)
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
CAV	Ciklofosfamīds-(doksorubicīns) Adriamicīns-Vinkristīns	Cyclophosphamide- (doxorubicin) Adriamycin-Vincristine
CE	Karboplatīns/Etopozīds	Carboplatin/Etoposide
CEA	Ciklofosfamīds/Etopozīds/ (doksorubicīns)Adriamicīns	Cyclophosphamide/Etoposide/ (doxorubicin)Adriamycin
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe	Deoxyribonucleic acid
ECOG	Austrumu onkologu sadarbības grupa	Eastern Cooperative Oncology Group
ESMO	Eiropas onkologu ķīmijterapiju biedrība	European Society for Medical Oncology
GLI	Ar gliomu saistītais onkogēns	Glioma-Associated Oncogene
GLI1	Ar gliomu saistītā onkogēna homologs 1	Glioma-Associated Oncogene Homolog 1
Gy	Grejs	Gray
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
HR	Riska attiecība	Hazard ratio
LDH	Laktātdehidrogenāze	Lactate Dehydrogenase
MEK	Mitogēnu aktivētā ekstracelulāro signālu regulētā kināze	Mitogen activated extracellular signal regulated kinase
MRI	Magnētiskās rezonanses izmeklējums	Magnetic resonance imaging

mRNS	Matricas ribonukleīnskābe	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Rapamicīna mērķa receptors zidītājiem	Mammalian target of rapamycin
MYC jeb BHLHE39	Pamata spirāles-cilpas-spirāles E klases proteīns 39	Class E basic helix-loop-helix protein 39
NeuroD1	Neironu diferenciācijas faktors 1	Neurogenic differentiation factor 1
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
PE	Cisplatīns/Etopozīds	Cisplatin/Etoposide
PI3K	Fosfatidilinozīta 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
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
RAF	RAF saimes onkogēns	RAF (Rapidly accelerated fibrosarcoma) oncogene
RAS	RAS saimes onkogēns	RAS (rat sarcoma viral) oncogene
Shh	Sonic Hedgehog signālceļš	Sonic Hedgehog
SMO	Nogludinātais transmembrānu proteīns	Smoothened transmembrane protein
SŠPV/SCLC	Sīkšūnu plaušu vēzis	Small cell lung cancer
SUFU	Saplūdušā homologa supresors	Suppressor Of Fused Homolog
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

1. PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

1.1. Pētījuma īss teorētiskais pamatojums

Sikšsūnu 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. Sikšsūnu 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 sikšsūnu 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 cilmšūnu teorija, kas ļauj izskaidrot, kāpēc ļaundabīgiem audzējiem terapijas gaitā attīstās rezistence. Vēža cilmšūnu hipotēzes būtība ir tā, ka audzējā pastāv šūnu hierarhija, kad pašatjaunojošo cilmšūnu 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 cilmšūnu malignas transformācijas rezultātā, vai no augstāk diferencētām audzēja šūnām, kas malignizācijas gaitā ir ieguvušas cilmšūnām līdzīgas īpašības. Neatkarīgi no to izcelsmes, vēža šūnu subpopulācija ar cilmšūnu 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 acimredzami veiksmīgas sākotnējās ārstēšanas. Sikšsūnu plaušu vēzis ir ļaundabīga slimība, kur klīniskā pieredze liecina par vēža cilmšūnu 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 cilmšūnām 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 cilmšūnas selektīvi ietekmējošu terapeitisko līdzekļu izstrāde.

Daudz vēl ir jāprecizē par vēža cilmšūnām katrā konkrētā ļaundabīgā slimībā. Tomēr jau tagad ir iegūti dati par embriogēni regulējošo signālceļu nozīmīgumu vēža cilmšūnu funkcionēšanā. Īpaši svarīgi starp tiem ir Notch,

Hedgehog un Wnt signālceļi. Hedgehog signālceļš regulē vairākus ar cilmšūnām un proliferāciju saistītus gēnus, tādējādi veicinot cilmšūnu un audu progenitoro šūnu izdzīvošanu un augšanu.

1.2. Darba aktualitāte un novitāte

Pēdējā laikā literatūrā parādījušies dati par Hedgehog signālceļa saistību ar medikamentu izvadišanas 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., 2003). 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 dziedzera vēža (Xu et al., 2009), prostatas vēža (Sanchez et al., 2004), B-šūnu hroniskas limfoleikozes (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 neuroendokrīno 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 formalinā fiksēti, parafinā 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 epigenētiskie traucējumi un to ietekmējošas izmaiņas citos molekulārajos signālceļos. Molekulāro mehānismu izpēte uzrāda Hh signālceļa ciešu saistību ar multizāļu rezistences gēnu aktivitāti, epitēliālas-uz-mezenhimālo 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.

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 biomarķieri, kā arī uz samazinātu Sonic Hedgehog signālceļa aktivitāti recidivējošā audzējā.

1.3. Darba mērķis

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

1.4. 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.

1.5. Darba hipotēze

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

2. MATERIĀLS UN METODES

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 konsilijā 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 konsiliju 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 konsilijā 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 fiksēts progresijas un nāves datums.

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 saņemtajā 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 homogenizatorā (*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 apstrādāta 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 praimerus 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 ± standartnovirzes.

Statistiskā analīze

Datu statistiskajai apstrādei vispirms izveidoja datubāzi datorprogrammā MS Excel, pēc tam datus konvertēja profesionālajā pētījumu datu statistiskās apstrādes programmā SPSS (*Statistical Pacade 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 Stjūdenta (*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 pirmsterepijas 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 ieviešanas konservantā.
3. Labas kvalitātes RNS recidivējoša audzēja pētījuma biopsijā.

Datu iegūšanas metodes

Visas punktā 2.2. aprakstītas datu iegūšanas metodes

Statistiskā analīze

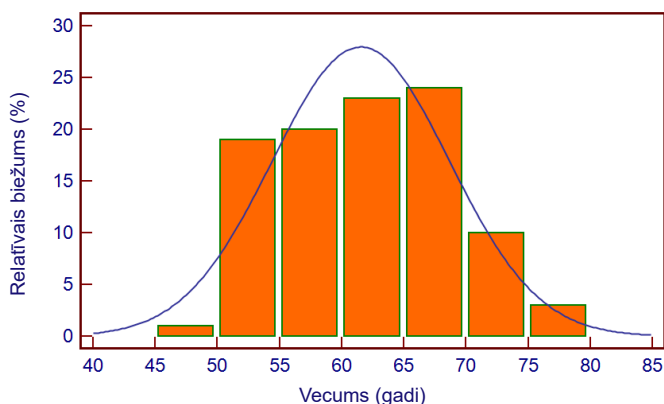
Iegūtos rezultātus ievadīja MS Excel datu bāzē, veikta statistiskā analīze, izmantojot MedCalc statistiskās analīzes programmu, v.10.2.0.0 (*MedCalc Software, Ostend, Beļģija*). Veicot salīdzinošo analīzi, atkarībā no mainīgo vērtību tipa izmantoja Stjūdenta (t-testu) vai hi kvadrāta (χ^2) testu. mRNS 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 konsilijā 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 %).



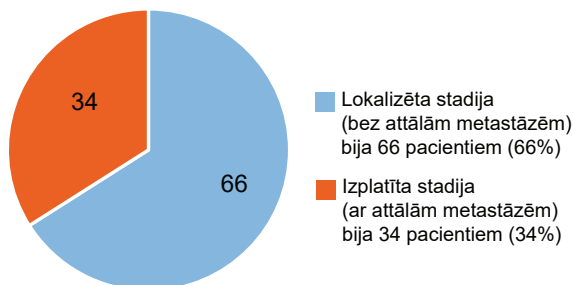
3.10. attēls. Pacientu sadalījums pa vecuma grupām

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.

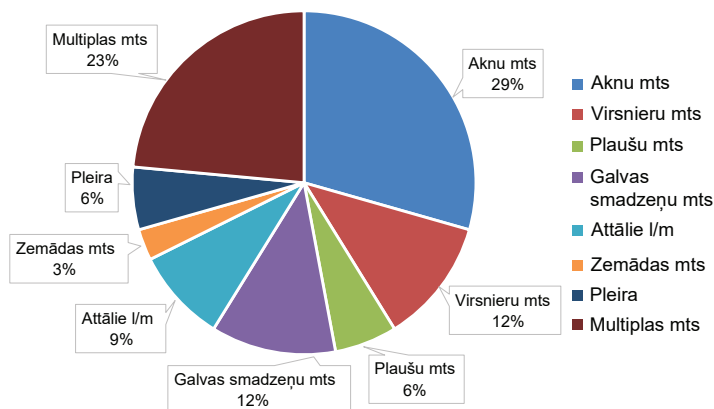
Pēc veselības aprūpes iestādes, kur tika veikta diagnostika, 93 pacienti bija no Paula Stradiņa KUS torakālās ķirurģijas, pneimonoģijas un neiroķirurģijas nodaļām, bet 7 pacienti tika novirzīti no Rīgas 1. slimnīcas, Tuberkulozes un plaušu slimību centra, stacionāriem “Biķernieki” un “Gaiļezers”.

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



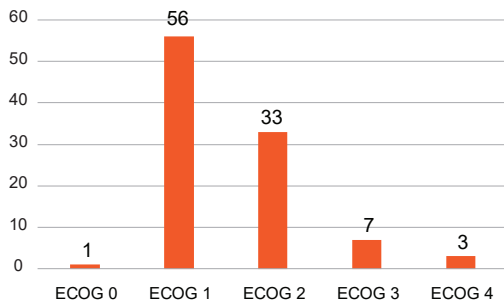
3.11. attēls. Pacientu sadalījums pa stadijām

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 kombinējās ar aknu vai virsnieru metastāzēm. Pa vienam pacientam bija ar aknu + virsnieru, aknu + plaušu + zemādas un pleiras + perikarda metastāžu kombināciju.



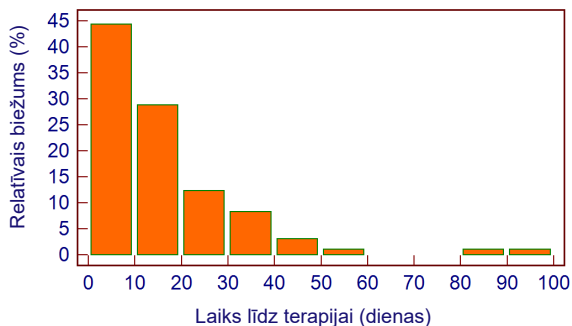
3.12. attēls. Metastāžu lokalizācija pētījumā iekļautajiem pacientiem (mts – metastāzes, l/m – limfmezgli)

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 (dienās)

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).

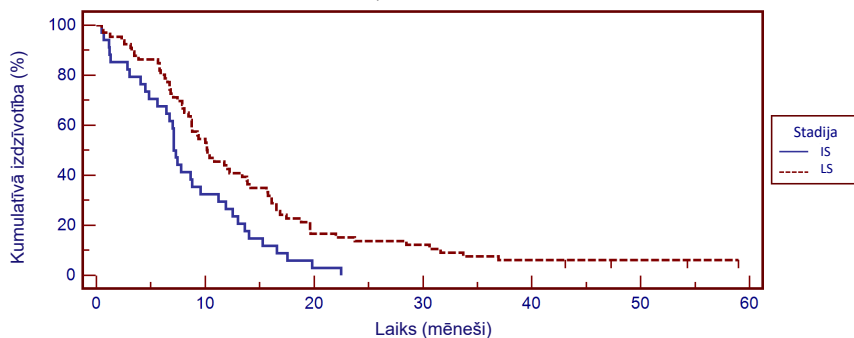
3.11. tabula. Radioloģiski apstiprināta vislabākā atbildes reakcija uz saņemto terapiju, atbildes reakcijas biežums un dzīvildzes dati pētījumā iekļautajiem pacientiem

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-Majera kopējās dzīvildzes (OS) likne 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 hi 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	

Pacientu parametrs	Garas dzīvildzes grupa (OS > 9,6 mēneši, n = 6)	Īsas dzīvildzes grupa (OS ≤ 9,6 mēneši, n = 6)	p-vērtība
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.

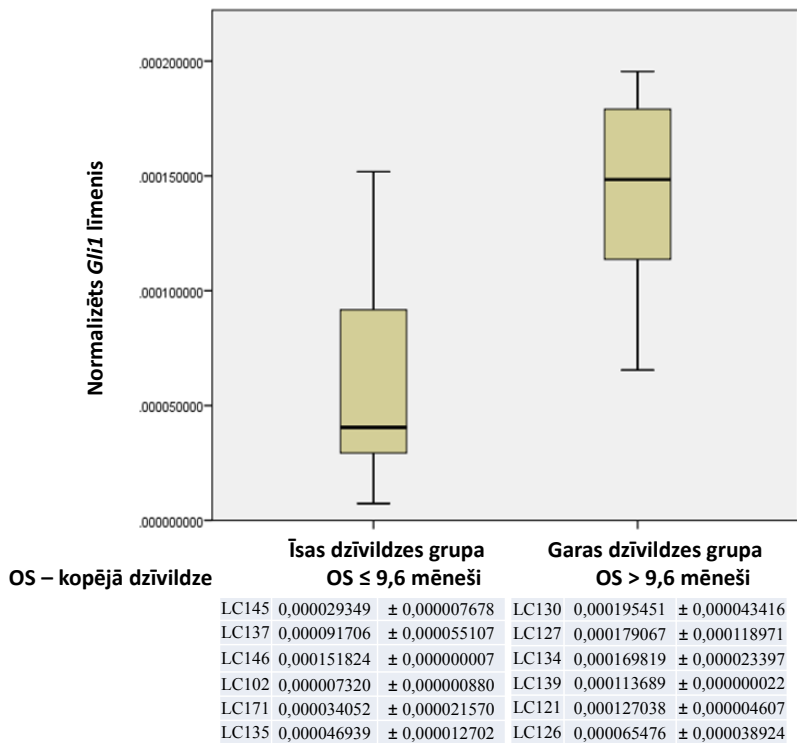
Hedgehog signālceļa galvenā mērķa gēna un signālceļa aktivitātes marķiera *Gli1* vidējā ekspresija 6 sīkšūnu plaušu vēža pacientiem garas dzīvildzes

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).

3.23. tabula. Hedgehog signālceļa saistīto gēnu vidējās ekspresijas salīdzinājums īsas dzīvildzes (OS ≤ 9,6 mēneši) un garas dzīvildzes (OS > 9,6 mēneši) grupu pacientu pirmsterapijas pētījuma audzēja biopsiju paraugos

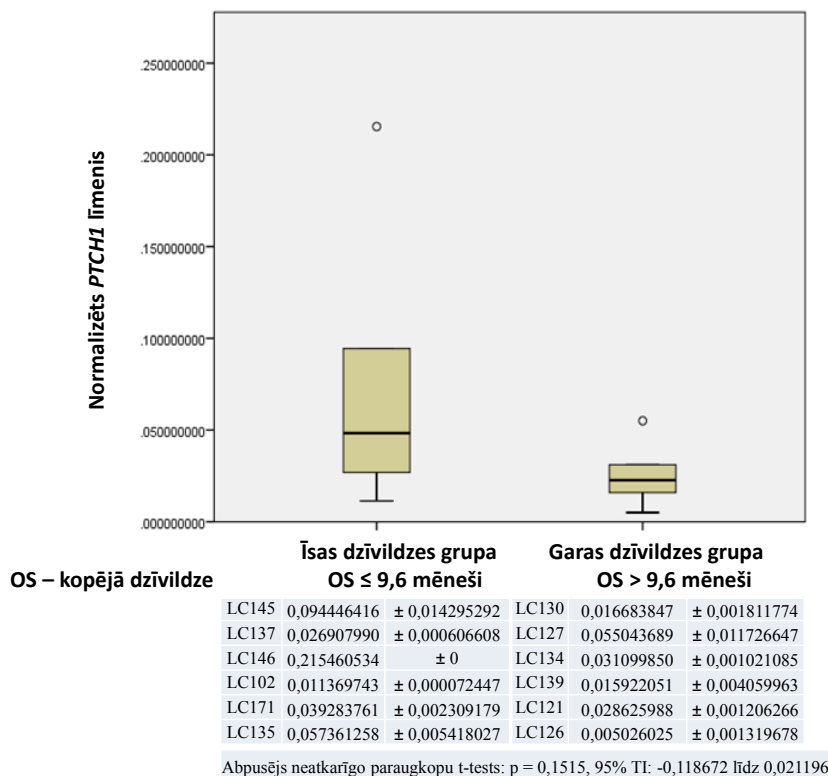
Gēns	Ekspresijas līmeņa vidējās vērtības 12 SŠPV pacientu pirmsterapijas biopsijās, atkarībā no dzīvildzes grupas				Starpības novērtējums
	Īsas dzīvildzes grupa (OS ≤ 9,6 mēneši)		Garas dzīvildzes grupa (OS > 9,6 mēneši)		Lielāka ekspresija garas dzīvildzes grupā (reižu skaits)
	Vidējā vērtība un 95% TI		Vidējā vērtība un 95% TI		
<i>N-MYC</i>	0,016264	-0,007006 līdz 0,060377	0,042949	-0,003721 līdz 0,057092	2,6 (p = 0,1)
<i>Gli1</i>	0,000060	0,000016 līdz 0,000147	0,000142	0,000016 līdz 0,000147	2,3 (p = 0,0196)
<i>Twist1</i>	0,003897	-0,001798 līdz 0,006485	0,006241	-0,001770 līdz 0,006458	1,6 (p = 0,233)
<i>ZEB2</i>	0,019992	-0,009917 līdz 0,034784	0,032425	-0,009893 līdz 0,034760	1,6 (p = 0,243)
<i>HHIP1</i>	0,000619	-0,000696 līdz 0,000741	0,000642	-0,000691 līdz 0,000736	1,04 (p = 0,946)
<i>ZEB1</i>	0,008411	-0,007233 līdz 0,007438	0,008514	-0,006344 līdz 0,006550	1,01 (p = 0,972)
					Lielāka ekspresija īsas dzīvildzes grupā (reižu skaits)
	Vidējā vērtība un 95% TI		Vidējā vērtība un 95% TI		
<i>Smo</i>	0,031924	-0,062936 līdz 0,018025	0,009469	-0,058077 līdz 0,013166	3,37 (p = 0,190)
<i>PTCH1</i>	0,074138	-0,127133 līdz 0,029657	0,0254	-0,118672 līdz 0,021196	2,9 (p = 0,152)
<i>BCL2</i>	0,063502	-0,088504 līdz 0,015920	0,027210	-0,084603 līdz 0,012019	2,3 (p = 0,142)
<i>SUFU</i>	0,008958	-0,007238 līdz 0,002349	0,006513	-0,007118 līdz 0,002229	1,3 (p = 0,271)
<i>BMI1</i>	0,099527	-0,070536 līdz 0,058079	0,093298	-0,067628 līdz 0,055171	1,06 (p = 0,826)

OS – overall survival (kopējā dzīvildze); 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



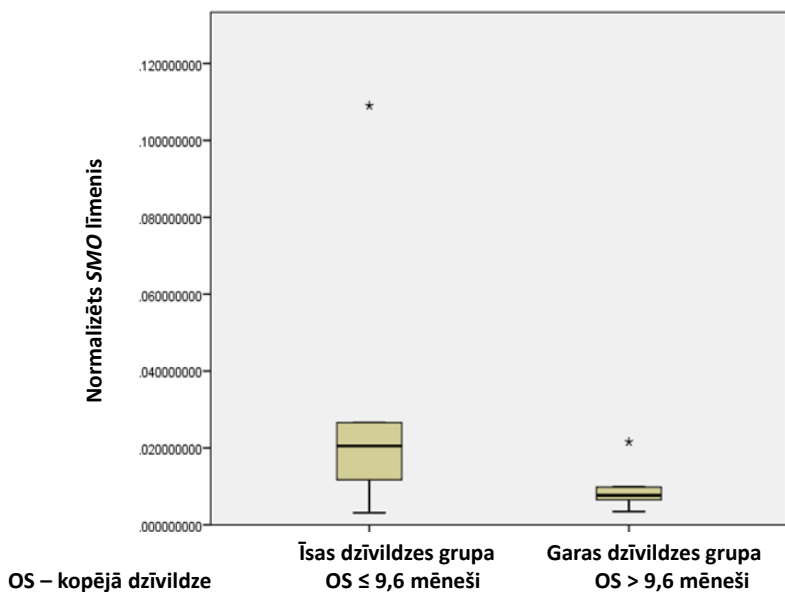
Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: p = 0,0196, 95% TI: 0,000016 līdz 0,000147

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



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

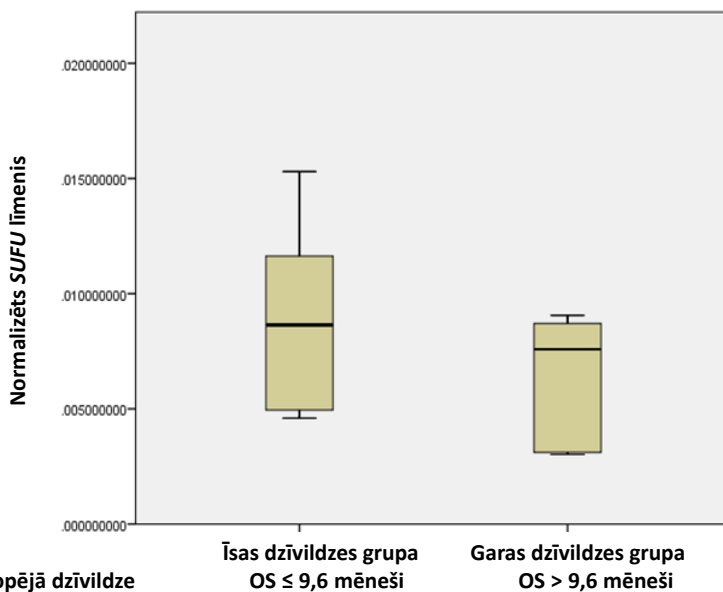
Pārējo Hedgehog signālceļa asociēto gēnu (*SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) ekspresijas līmenis īsas dzīvildzes un garas dzīvildzes grupu pacientu pirmsterapijas pētījuma audzēja biopsiju paraugos statistiski ticami neatšķiras (3.202.– 3.211. attēli).



OS – kopējā dzīvildze		Īsas dzīvildzes grupa OS ≤ 9,6 mēneši	Garas dzīvildzes grupa OS > 9,6 mēneši
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

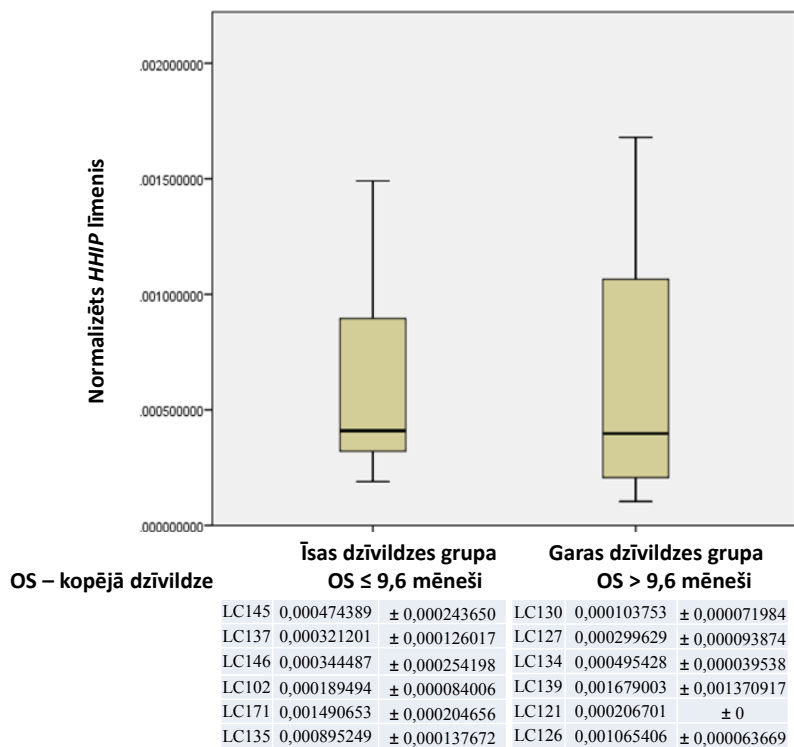
3.203. attēls. SMO mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



OS – kopējā dzīvildze	Īsas dzīvildzes grupa OS ≤ 9,6 mēneši		Garas dzīvildzes grupa OS > 9,6 mēneši	
	LC	Value ± SE	LC	Value ± SE
	LC145	0,015297724 ± 0,002426543	LC130	0,008707436 ± 0,000669377
	LC137	0,011631138 ± 0,000490123	LC127	0,009062734 ± 0,000004448
	LC146	0,006217903 ± 0,002974407	LC134	0,007288810 ± 0,000876702
	LC102	0,004944124 ± 0,000329323	LC139	0,003020828 ± 0,000414737
	LC171	0,011058726 ± 0,000016262	LC121	0,007889118 ± 0,002049026
	LC135	0,004595684 ± 0,000002256	LC126	0,003109543 ± 0,000048768

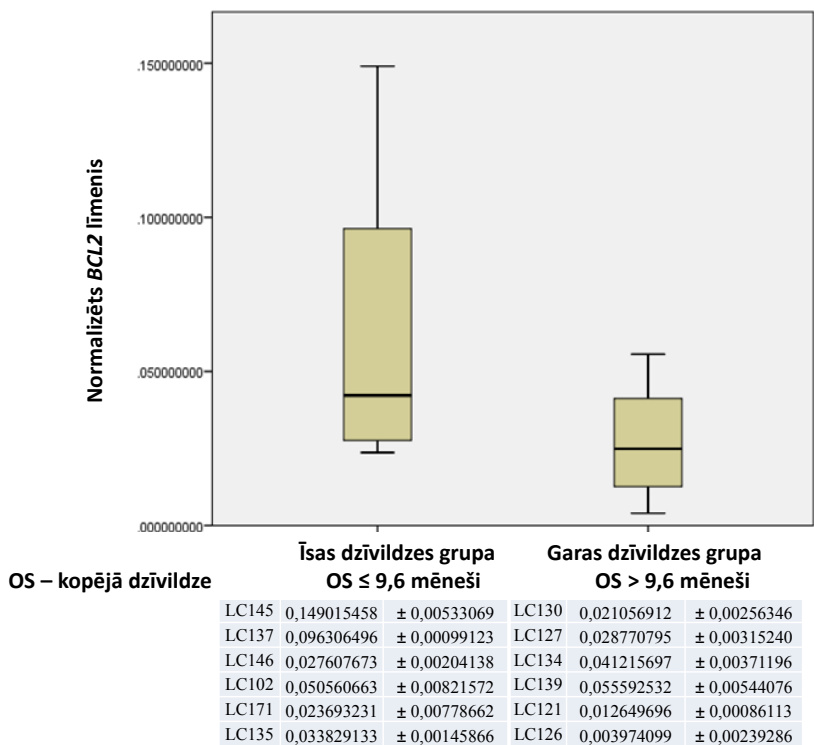
Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: p = 0,2709, 95% TI: -0,007118 līdz 0,002229

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



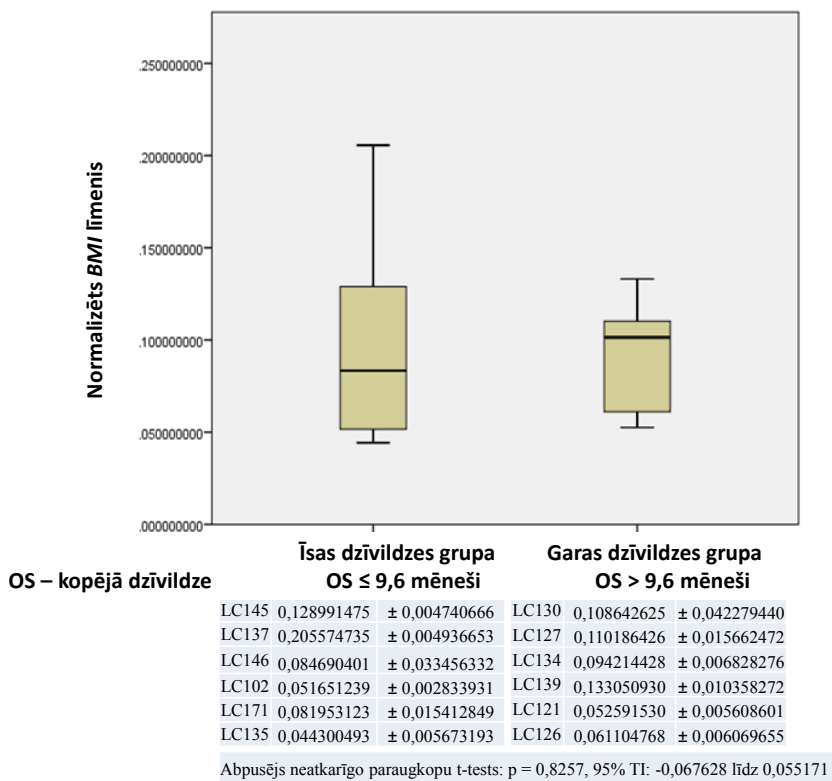
Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: p = 0,9456, 95% TI: -0,000691 līdz 0,000736

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

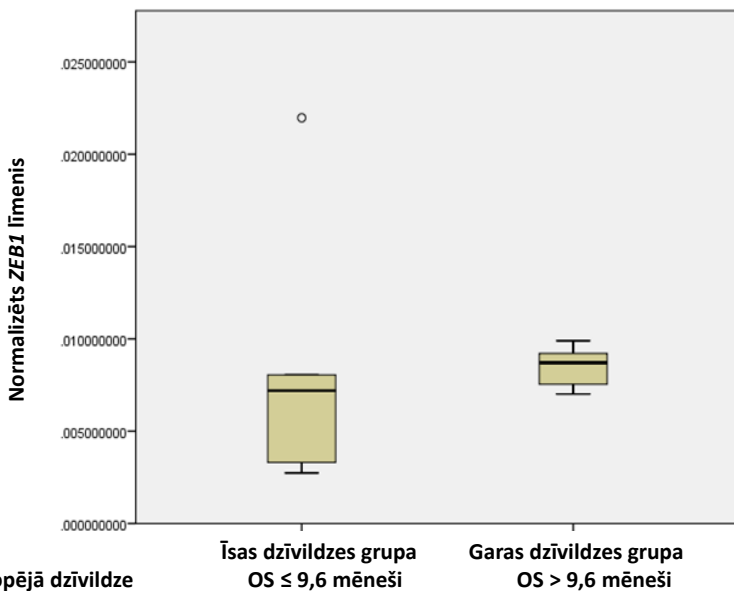


Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: p = 0,1251, 95% TI: -0,084603 līdz 0,012019

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



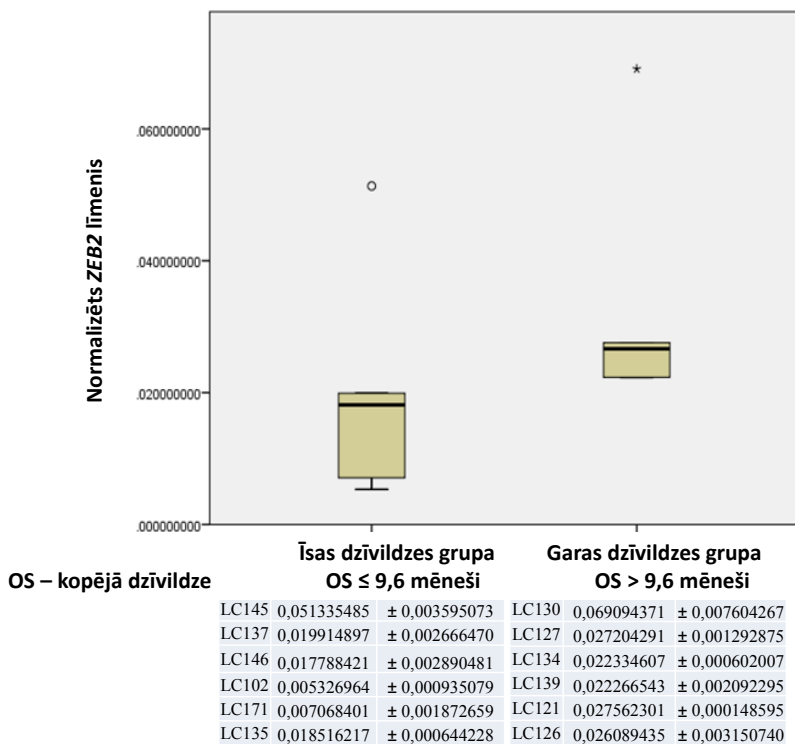
3.207. attēls. BMI mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



OS – kopējā dzīvildze	Īsas dzīvildzes grupa OS ≤ 9,6 mēneši		Garas dzīvildzes grupa OS > 9,6 mēneši	
LC145	0,021975427	± 0,001270246	LC130	0,007008366 ± 0,000446246
LC137	0,007124981	± 0,000394416	LC127	0,008354126 ± 0,000090085
LC146	0,003317516	± 0,001395528	LC134	0,007542413 ± 0,001090416
LC102	0,002738933	± 0,00030544	LC139	0,00921585 ± 0,000766996
LC171	0,008045885	± 0,000807064	LC121	0,009901585 ± 0,000111612
LC135	0,007264916	± 0,000412821	LC126	0,009062804 ± 0,000993005

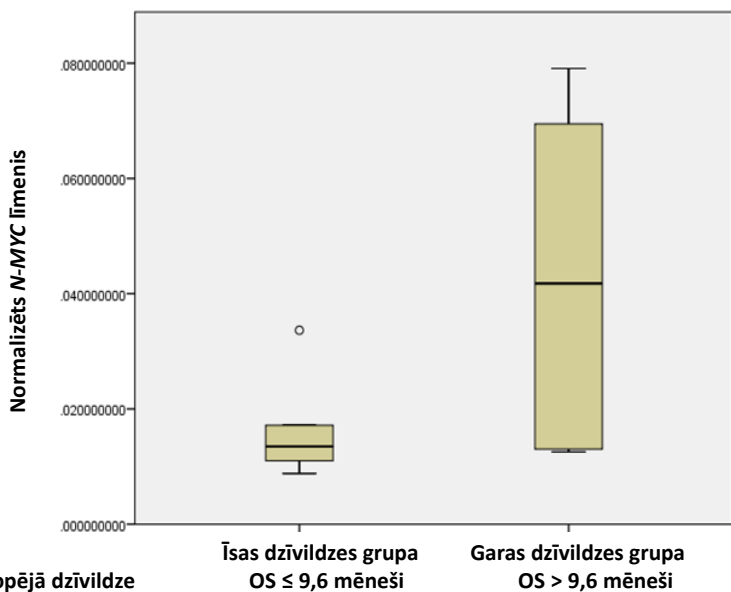
Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: p = 0,9723, 95% TI: -0,006344 līdz 0,006550

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



Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: $p = 0,2430$, 95% TI: $-0,009893$ līdz $0,034760$

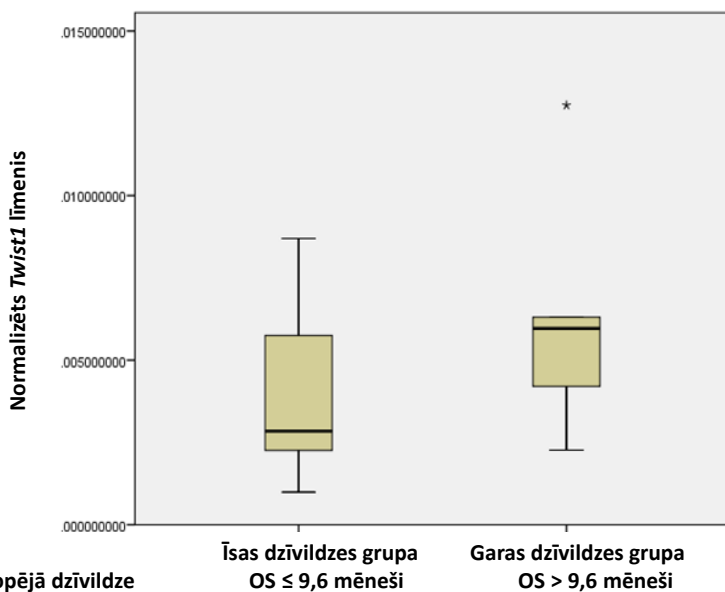
3.209. attēls. ZEB2 mRNS vērtības SŠPV pacientiem atkarībā no dzīvildzes grupas



OS – kopējā dzīvildze	Īsas dzīvildzes grupa OS ≤ 9,6 mēneši		Garas dzīvildzes grupa OS > 9,6 mēneši	
	LC	Mean ± SD	LC	Mean ± SD
	LC145	0,015453741 ± 0,001082255	LC130	0,079077140 ± 0,014109806
	LC137	0,008780047 ± 0,000644921	LC127	0,015833139 ± 0,000907460
	LC146	0,033658941 ± 0,003376282	LC134	0,069479458 ± 0,000953475
	LC102	0,017156808 ± 0,00559071	LC139	0,012540391 ± 0,000908876
	LC171	0,011012830 ± 0,000010800	LC121	0,013047139 ± 0,001423201
	LC135	0,011520686 ± 0,00071102	LC126	0,067718906 ± 0,026537455

Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: p = 0,0790, 95% TI: -0,003721 līdz 0,057092

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



OS – kopējā dzīvildze

Īsas dzīvildzes grupa OS ≤ 9,6 mēneši			Garas dzīvildzes grupa OS > 9,6 mēneši		
LC145	0,008695354	± 0,000166200	LC130	0,012744288	± 0,000724193
LC137	0,002923860	± 0,000047291	LC127	0,002267573	± 0,000406793
LC146	0,005752802	± 0,000739508	LC134	0,004203714	± 0,000187434
LC102	0,000992411	± 0,000071926	LC139	0,006304072	± 0,000788918
LC171	0,002760105	± 0,000327957	LC121	0,005806505	± 0,001617827
LC135	0,002256888	± 0,000027653	LC126	0,006118291	± 0,001221279

Abpusējs neatkarīgo paraugkopu t-tests: p = 0,2330, 95% TI: -0,001770 līdz 0,006458

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, kliniskie 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 labākas atbildes reakcijas uz saņemto terapiju, novirzēm saņemtās ķīmijterapijas devās un intervālos, slimības progresijas veida un dzīvildzes datiem.

3.31. tabula. Demogrāfiskie un kliniskie 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	

Pacientu parametrs	Sapārotā gēnu ekspresijas analizē iekļautie pacienti (n = 3)	Sapārotā gēnu ekspresijas analizē neiekļautie pacienti (n = 17)	p-vērtība
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)

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 recidiva/progresijas, kaut starpība nav sasniegusi statistiski nozīmīgu vērtību ($p = 0,0529$, 95% CI: $-0,0002023$ līdz $0,000003115$, abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests).

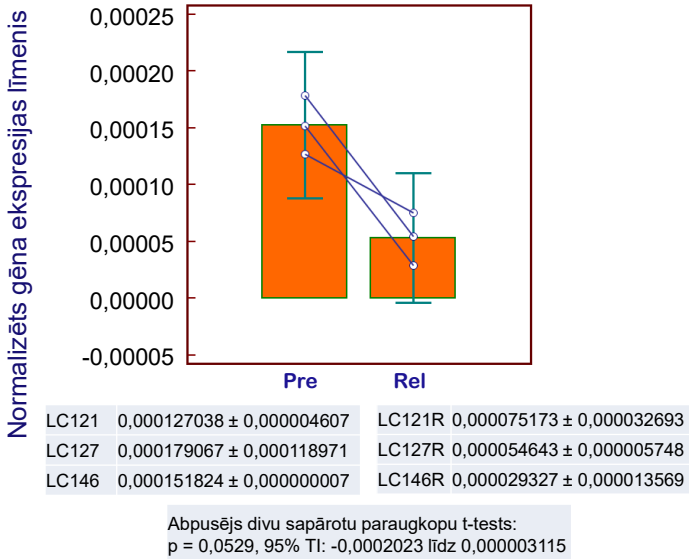
2.9 reizes zemāka *Gli1* ekspresija tika novērota pie recidiva/progresijas, izvērtējot vidējās vērtības visos pirmsterapijas un recidivējošos paraugos (3.301. attēls, 3.32. tabula).

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>BM11</i>	0,08249	0,0108 līdz 0,1542	0,09763	-0,02615 līdz 0,2214	0,8

SŠPV – Sikšūnu 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*; *BM11* – *BM11 Proto-Oncogene*

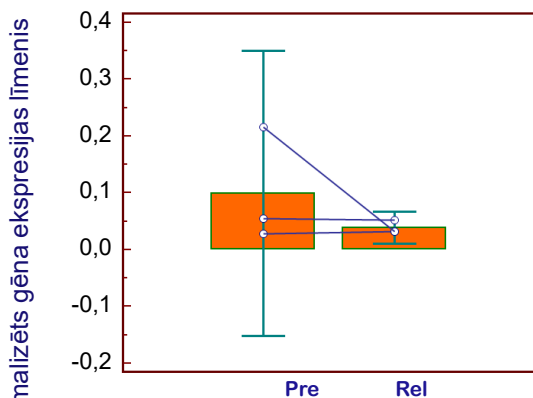
Gli1



3.301. attēls. *Gli1* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar linijām); stabīni 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

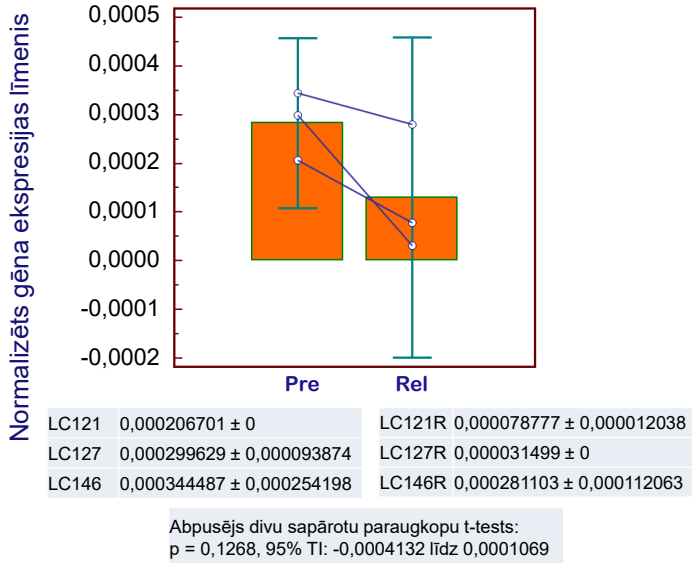


LC121	0,028625988 ± 0,001206266	LC121R	0,032651666 ± 0,003275214
LC127	0,055043689 ± 0,011726647	LC127R	0,051743079 ± 0,003699516
LC146	0,215460534 ± 0	LC146R	0,032049930 ± 0,000926679

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

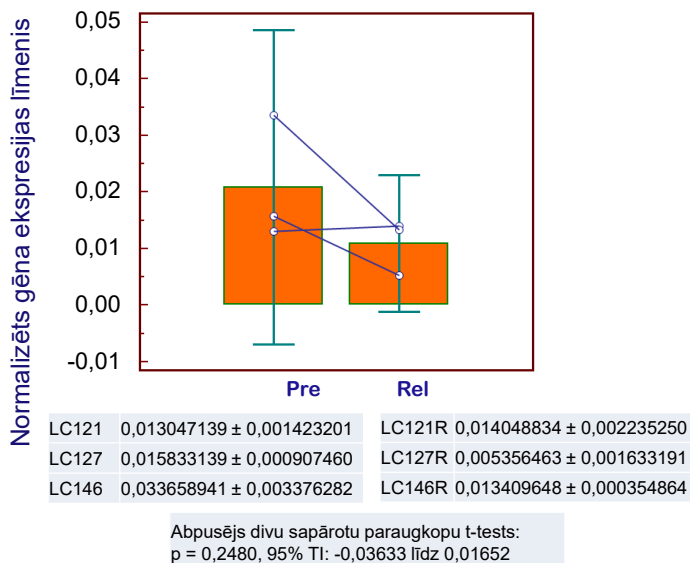
3.302. attēls. *PTCH1* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabīņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

HHIP



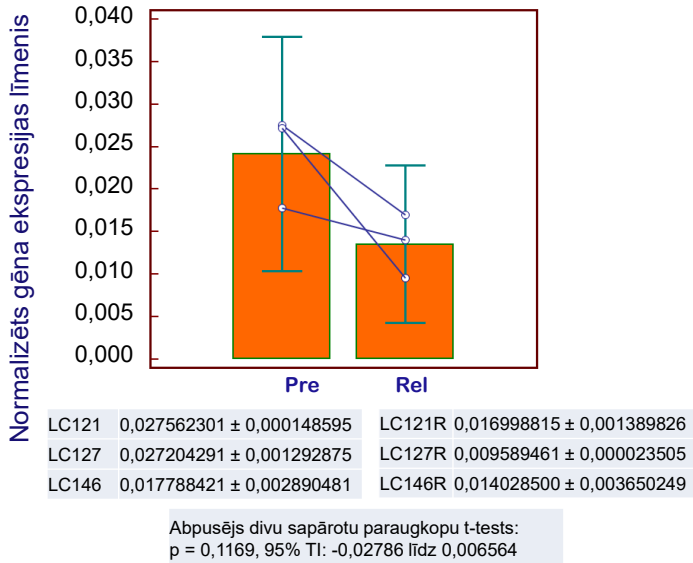
3.303. attēls. HHIP mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabīņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

N-MYC



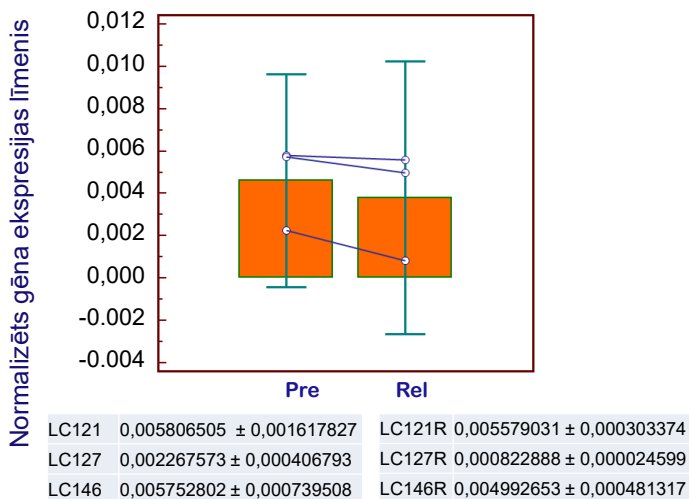
3.304. attēls. *N-MYC* mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabili atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

ZEB2



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

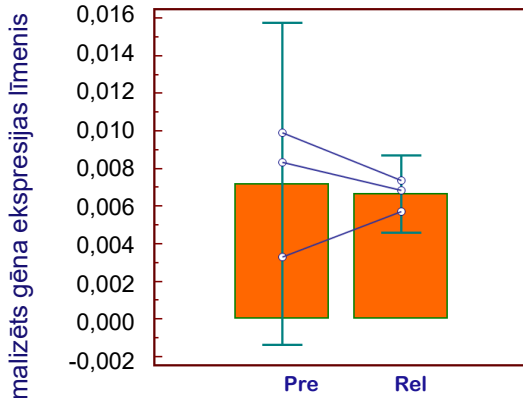
Twist1



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); stabīņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

ZEB1



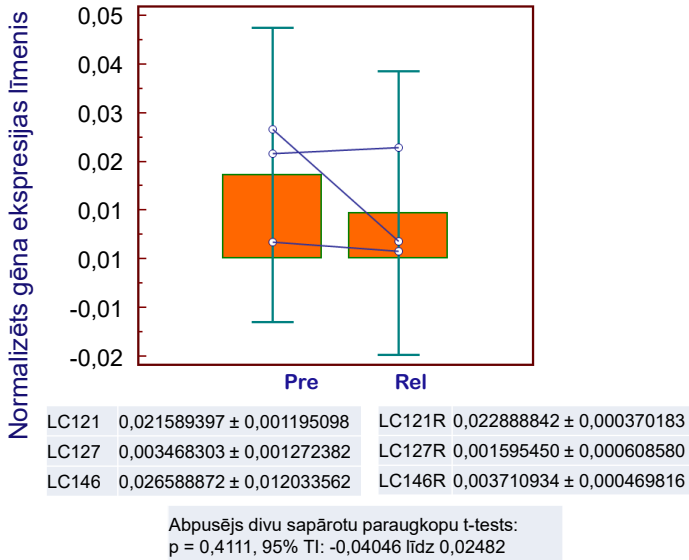
LC121	0,009901585 ± 0,000111612	LC121R	0,007368567 ± 0,000375439
LC127	0,008354126 ± 0,000090085	LC127R	0,006868277 ± 0,000006735
LC146	0,003317516 ± 0,001395528	LC146R	0,005748559 ± 0,000152126

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); stabīņi 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).

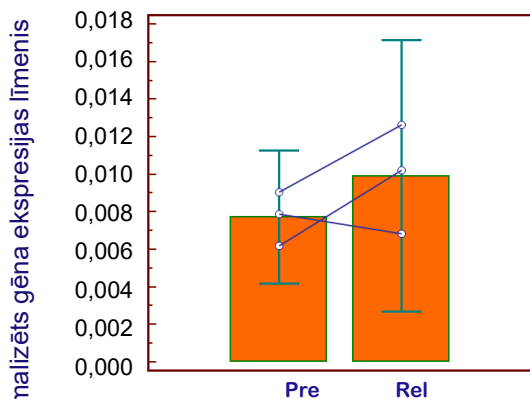
SMO



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 inhibitors *SUFU* un divi Shh inducējamie gēni – *BCL2* un *BM11* 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

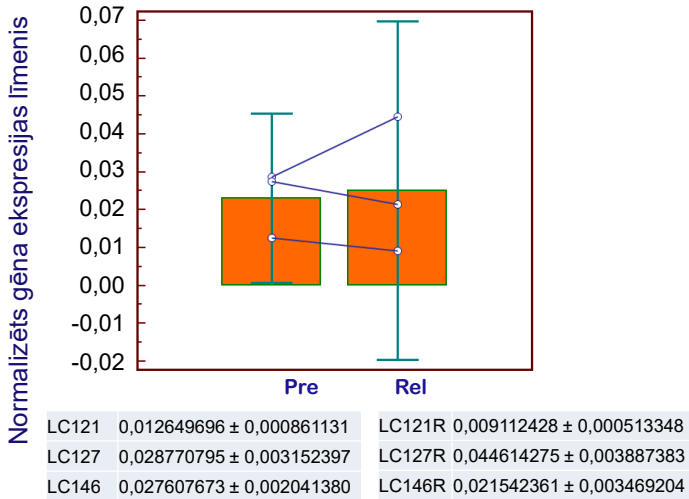


LC121	0,007889118 ± 0,002049026	LC121R	0,006861530 ± 0,001811364
LC127	0,009062734 ± 0,000004448	LC127R	0,012656821 ± 0,000917315
LC146	0,006217903 ± 0,002974407	LC146R	0,010228300 ± 0,000551187

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); stabīņi atspoguļo visu pacientu mRNS vidējās vērtības

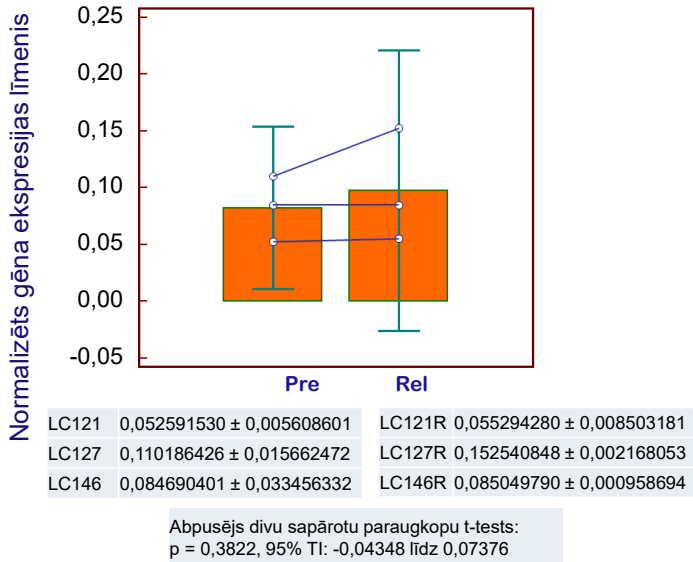
BCL2



Abpusējs divu sapārotu paraugkopu t-tests:
p = 0,7921, 95% TI: -0,02769 līdz 0,03186

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

BMI



3.311. attēls. BMI mRNS vērtības pirmsterapijas (Pre) un recidivējoša (Rel) sīkšūnu plaušu vēža pāra biopsiju paraugos (savienotas ar līnijām); stabīņi 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. Nemot 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 spēt 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 faktorus. Tomēr pagaidām nav izdevies definēt vienu 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 neutrofilo leukocītu/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 iskaidrojums 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 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, 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 patients 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 dekāžu 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 saņēmušo 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

videnes 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 ur 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 apakštīps ir primāri neuzņēmīgs pret platīna bāzes ķīmijterapiju un staru terapiju ar attiecīgi daudz sliktāku prognozi. 2019. gadā Rudin *et al.* pētnieku grupai molekulāru pamatojumu šim atšķirīgajam 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 šim molekulārajam iedalījumam 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 biomarķiera lomu, kas nākotnē varētu palīdzēt personalizēt sīkšūnu plaušu vēža pacientu ārstēšanu atkarībā no viņu audzēju apakštipa 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 ($OS \leq 9,6$ 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-analīzēs 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, rabdomyosarkomai, resnās zarnas vēzim, olnīcu vēzim, urīnpūšļa vēzim, barības vada vēzim, plakanšūnu galvas un kakla vēzim un aizkuņģa dziedzerā vēzim (Cheng et al., 2016). 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 formālina 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* pārekspressija 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, 2009), 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 biomarkieri 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 analizē. 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/progresijas. 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* modeļi iegūtie dati ne vienmēr atspoguļo audzēja reālo situāciju *in vivo*, jo šūnu līniju/kxenograftu 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 nesasniedza 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 inhibītors *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 daudzsološi preklīniski dati, kas uzrādīja kanonisku Hedgehog signālceļa inhibitoru un ķīmijterapijas

sinerģistisku efektu sīkšūnu plaušu vēža ķīmijrezistentu šūnu subpopulācijā. Tomēr klīniskajos pētījumos ar SMO inhibitoru (Vismodeģib, 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 *RB1* 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 potenciē 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 rezidenta pacienta iekļaušana analizē. Vienam pacientam sīkšūnu plaušu vēzis nav reaģējis uz pretvēža terapiju, kas varētu liecināt par rezistenci asociētu 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 zēlam 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 recidivam 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 isās 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.

PROMOCIJAS DARBA PRAKTISKĀ NOZĪME

Plānojot ārstēšanas taktiku sīkšūnu plaušu vēža pacientiem, rekomendē ņemt vērā būtiskākos klīniskos prognostiskos faktoros – 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, Elina, 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 recenzējamās 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 vadītājam 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 Elinai 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 uzmundrināšanu un idejām darba tapšanas grūtajos brīžos.

Pateicos PSKUS Onkoloģijas klinikas kolēģēm – Dr. med. Aijai Geriņai-Bērziņai, Dr. med. Elinai Sīviņai, Dr. Lindai Jurginauskai un Dr. Sigitai Hasnerei par atbalstu un spēju uzmundrināt 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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. CHENG, J., GAO, J. & TAO, K. 2016. Prognostic role of Gli1 expression in solid malignancies: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 6, 22184.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. HAMILTON, G., ULSPERGER, E., GEISSLER, 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
 19. HUBER, R. M. & TUFMAN, A. 2012. Update on small cell lung cancer management. *Breathe*, 8, 314.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. KATOH, Y. & KATOH, M. 2009. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.

30. 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.
31. MADDISON, P., GOZZARD, P., GRAINGE, M. J. & LANG, B. 2017. Long-term survival in paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology*, 88, 1334–1339.
32. 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.
33. 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.
34. PAYNE, S. H. 2015. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci*, 40, 1–3.
35. PASCA DI MAGLIANO, M. & HEBROK, M. 2003. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*, 3, 903–11.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. 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.

50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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, 313–7.
55. WISTUBA, II, GAZDAR, A. F. & MINNA, J. D. 2001. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*, 28, 3–13.
56. 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.
57. 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.
58. ZELEN, M. 1973. Keynote address on biostatistics and data retrieval. *Cancer Chemother Rep* 3, 4, 31–42.



**UNIVERSITY
OF LATVIA**

Faculty of Medicine

Viktors Kozirovskis

**ROLE OF SONIC HEDGEHOG EMBRYONIC
SIGNALLING PATHWAY IN SMALL
CELL LUNG CANCER PROGNOSIS AND
DEVELOPMENT OF RESISTANCE**

Summary of Doctoral Thesis

Submitted for the Doctor of Science degree (Ph.D.)
in Medicine and Health Sciences

Riga 2022

The Doctoral Thesis was carried out at the Faculty of Medicine of the University of Latvia and Pauls Stradins Clinical University Hospital Oncology Clinic between years 2010 and 2015.

The Thesis consists of the abstract, the introduction, four sections, the conclusion, the bibliography and three annexes.

Form of Thesis: a dissertation in clinical medicine, the sub-discipline of oncology and haematology.

Doctoral advisors: *Dr. Habil. Med., Prof. Uldis Vikmanis;*
Dr. Med., Prof. Gunta Purkalne.

Reviewers:

- 1) **Alinta Hegmane**, *Dr. Med.*, Assoc. Prof., University of Latvia;
- 2) **Simona Doņiņa**, *Dr. Med.*, Assoc. Prof., Riga Stradins University;
- 3) **Gyula Ostoros**, *Dr. Med.*, National Kornyi Institute of TB and Pulmonology.

The defence of the Doctoral Thesis will take place at the open session of the Doctoral Committee of Medicine and Health Sciences of the University of Latvia on 16 December 2022 at 15.00 in the Auditorium 401. of Academic Center House of Science, Jelgavas street 3, Riga.

The Doctoral Thesis and its Abstract are available at the Library of the University of Latvia at Kalpaka bulvaris 4.

Chair of Promotion Council in
Medicine and Health Sciences of
the University of Latvia
(signature)

_____ / *Dr. Med. Valdis Pīrāgs* /

Secretary of Promotion Council
(signature)

_____ / *Dr. Biol. Līga Plakane* /

© University of Latvia, 2022

© Viktors, Kozirovskis, 2022

ISBN 978-9934-18-906-7

ISBN 978-9934-18-907-4 (PDF)

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 tumour 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*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) in the pre-treatment tumour 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*, *BMI1*, *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 *BMI1*, 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

CONTENTS

ABSTRACT	69
LEGEND AND ABBREVIATIONS USED IN THE THESIS	72
1. GENERAL DESCRIPTION OF DOCTORAL THESIS	74
1.1. Brief Theoretical Justification for the Study	74
1.2. Relevance and Novelty Aspect of the Research	75
1.3. Research Objective	76
1.4. Research Tasks	76
1.5. Research Hypothesis	76
2. MATERIALS AND METHODS	77
2.1. Analysis of Prognostic Clinical Factors and Treatment Results in Small Cell Lung Cancer Patients at Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital ...	77
2.2. Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes as a Prognostic Factor in Small Cell Lung Cancer	78
2.3. Comparison of Hedgehog Pathway Associated Gene Expression Between Matched Pre-treatment and Relapsed Biopsies	80
3. RESULTS	81
3.1. Analysis of Prognostic Clinical Factors in Small Cell Lung Cancer Patients at Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital	81
3.2. Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes as a Prognostic Factor in Small Cell Lung Cancer	86
3.3. Comparison of Hedgehog Pathway Associated Gene Expression Between Matched Pre-treatment and Relapsed Biopsies	100
4. DISCUSSION	114
4.1. Analysis of Prognostic Clinical Factors in Small Cell Lung Cancer Patients at Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital	114
4.2. Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes as a Prognostic Factor in Small Cell Lung Cancer	116
4.3. Comparison of Hedgehog Pathway Associated Gene Expression Between Matched Pre-treatment and Relapsed Biopsies	119
CONCLUSIONS	122
PRACTICAL RECOMMENDATIONS	122
PUBLICATIONS AND REPORTS	123
ACKNOWLEDGEMENTS	125
BIBLIOGRAPHY	126

LEGEND AND ABBREVIATIONS USED IN THE THESIS

Abbreviation	Explanation in Latvian	Explanation in English
95% CI	95% ticamības intervāls	95% confidence interval
AKT	Proteīnkināze B	Protein kinase B (PKB)
ASCL1 (ASH1)	<i>Achaete-scute</i> homologs 1	<i>Achaete-scute</i> homologue 1
BCL2	B-šūnu limfomas 2 antiapoptotiskais proteīns	B-Cell Lymphoma 2 Apoptosis Regulator
BMI1	BMI1 Protoonkogēns	BMI1 Proto-Oncogene
CAV	Ciklofosfamīds-(doksorubicīns) Adriamicīns-Vinkristīns	Cyclophosphamide- (doxorubicin) Adriamycin-Vincristine
CE	Karboplatīns/Etopozīds	Carboplatin/Etoposide
CEA	Ciklofosfamīds/Etopozīds/ (doksorubicīns)Adriamicīns	Cyclophosphamide/Etoposide/ (doxorubicin)Adriamycin
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe	Deoxyribonucleic acid
ECOG	Austrumu onkologu sadarbības grupa	Eastern Cooperative Oncology Group
ESMO	Eiropas onkologu ķīmijterapiju biedrība	European Society for Medical Oncology
GLI	Ar gliomu saistītais onkogēns	Glioma-Associated Oncogene
GLI1	Ar gliomu saistītā onkogēna homologs 1	Glioma-Associated Oncogene Homolog 1
Gy	Grejs	Gray
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
HR	Riska attiecība	Hazard ratio
LDH	Laktātdehidrogenāze	Lactate Dehydrogenase
MEK	Mitogēnu aktivētā ekstracelulāro signālu regulētā kināze	Mitogen activated extracellular signal regulated kinase

MRI	Magnētiskās rezonanses izmeklējums	Magnetic resonance imaging
mRNA	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
NeuroD1	Neironu diferenciācijas faktors 1	Neurogenic differentiation factor 1
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
PE	Cisplatīns/Etopozīds	Cisplatin/Etoposide
PI3K	Fosfatidilinozītola 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
PSKUS	Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca	Pauls Stradins Clinical University Hospital
Ptch/PTCH1	Proteīns salāpīts homologs 1	Protein Patched Homolog 1
PTEN	Fosfatāzes un tensīna homologs	Phosphatase and tensin homolog
RAF	RAF saimes onkogēns	RAF (Rapidly accelerated fibrosarcoma) oncogene
RAS	RAS saimes onkogēns	RAS (rat sarcoma viral) oncogene
Shh	Sonic Hedgehog signālceļš	Sonic Hedgehog
SMO	Nogludinātais transmembrānu proteīns	Smoothened transmembrane protein
SŠPV/SCLC	Sīkšūnu plaušu vēzis	Small cell lung cancer
SUFU	Saplūdušā homologa supresors	Suppressor Of Fused Homolog
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

1. GENERAL DESCRIPTION OF DOCTORAL THESIS

1.1. Brief Theoretical Justification for the Study

Small cell lung cancer is the most aggressive type of lung cancer. The average patient survival time without treatment or when using local therapy (surgery or radiation therapy) only is between 1 and 3 months from the confirmation of the diagnosis. The main method for the treatment of small cell lung cancer is systemic chemotherapy which allows to prolong the life of the patient and reduce the symptoms of the disease significantly. The average survival time increases 4-5 times. Complete remission is possible in many cases. However, metastatic small cell lung cancer is considered to be an incurable disease because the tumour almost always recurs and becomes resistant to the specific treatment. Understanding the mechanism of developing resistance may help clinicians to prognosticate the efficacy of the treatment and create new therapeutic options for the treatment of this type of cancer.

In the past few years, increasingly more scientific evidence has been obtained for the so-called cancer stem cell theory which allows to explain why malignant tumours develop resistance during the treatment. The idea of the cell stem cell hypothesis is that a hierarchy of cells exists in the tumour where a small population of self-renewing stem cells forms all of the other tumour cells via asymmetric division, proliferation and defective differentiation. Scientists continue a debate on whether such tumour-initiating cells develop as a result of a malignant transformation of the normal tissue stem cells or from more differentiated tumour cells that have acquired properties similar to those of the stem cells during the malignisation. Regardless of their origin, the cancer cell sub-population with the properties of stem cells, including slow division and resistance to cancer therapy, may have substantial impacts on the treatment outcomes. If a malignant tumour contains cells which are not killed by using the standard chemotherapy and radiation therapy, specifically these cells are responsible for the relapse of the tumour and/or metastases following an apparently successful initial treatment. Small cell lung cancer is a malignancy where the clinical experience suggests the presence of a cancer stem cell sub-population in the tumour. The standard chemotherapy may reduce the tumour mass very efficiently and even induce a complete remission in a majority of patients. Unfortunately, a relapse occurs almost always. This suggests that certain treatment-resistant cells survive during the initial treatment and subsequently renew the tumour. Furthermore, in a relapsing tumour, the majority of the cancer cell population develops a resistance to anti-cancer agents, which is typical for stem cells. Given that tumour relapses following an achieved remission are the predominant cause of death in oncological patients, the development of new treatments selectively effective against cancer stem cells is of utmost importance.

A lot of additional details still need to be obtained regarding cancer stem cells in each particular malignant disease. Nonetheless, data regarding the relevance of embryonic signalling pathways in the functioning of cancer stem cells have already been obtained. The Notch, Hedgehog and Wnt signalling pathways are of particular relevance amongst them. The Hedgehog signalling pathway regulates several genes associated with stem cells and proliferation, thus facilitating the survival and growth of stem cells and tissue progenitor cells.

1.2. Relevance and Novelty Aspect of the Research

Recent literature data have appeared regarding the association of the Hedgehog pathway with the mechanisms of elimination of medications from tumour cells and the development of multiple drug resistance (Sims-Mourtada et al., 2007). Increased activity of the Hedgehog pathway, which is characteristic of cancer stem cells, was described in small cell lung cancer cell lines and tumour samples (Watkins et al., 2003). This inhibition of the signalling pathway ligands slowed down the proliferation of the small cell lung cancer cell lines and xenografts (Pasca di Magliano and Hebrok, 2003). Data have been obtained regarding the association of the Hedgehog system with the maintenance of proliferation and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer (Xu et al., 2009), prostate cancer (Sanchez et al., 2004), B-cell chronic lymphocytic leukemia (Hegde et al., 2008), renal cell carcinoma (Dormoy et al., 2009). Clinical evidence has also been obtained regarding a correlation between an increased activity of the Hedgehog signalling pathway and an untoward course of the disease in breast cancer (ten Haaf et al., 2009), oesophageal cancer (Yoshikawa et al., 2008) and anal canal cancer (Ajani et al., 2010). In many tumours, the increased activity of the Hh pathway is associated with the clinically observed resistance to cancer therapy and an unfavourable prognosis. An increased activity of the Hh pathway is commonly found in lung tumours, especially in small cell lung cancer cells. Data have been obtained in several studies that the Hh pathway is of relevance in the functioning of the normal pulmonary neuroendocrine stem cells and, accordingly, small cell lung cancer stem cells. There are limitations for research of the Hh pathways in *in vitro* models, i.e., small cell lung cancer cell lines and xenografts. There are scarce published data regarding the activity of the Hh pathway components on the gene/mRNA level in small cell lung cancer cells due to the limited availability of fresh-frozen samples of this tumour. Formalin-fixed and paraffin-embedded samples are most commonly used in the research, where the activity of the Hh pathway components is determined semi-quantitatively on the level of proteins using the immunohistochemistry method or, more infrequently, on the mRNA level using the *in situ* hybridisation method. Consequently, little scientific data are currently available regarding the potentially activating/inactivating mutations in the genes of this signalling pathway, which may not manifest on the protein level, but could be of very high

clinical relevance (such as EGFR activating mutations in non-small cell lung cancer). Another potential cause for an altered activity of the Hh pathway might be epigenetic disruptions and the alterations in the other molecular signalling pathways that affect it. The investigation of the molecular mechanisms reveals a close association between the Hh pathway and the activity of multiple drug resistance genes, epithelial-mesenchymal transition and also anti-apoptotic events.

This project is of a particular relevance because it provides information on the gene/mRNA level regarding the currently poorly researched *in vivo* expression of the Hh pathway genes and enables to compare it between pre-treatment and resistant small cell lung tumours. There is currently no published information in the global literature regarding any research studies of this design.

An analysis of the data regarding the treatment received by small cell lung cancer patients and the survival time has been carried for the first time in Latvia. The study data are suggestive of an increased expression of the key Shh pathway target gene *Gli1* as a potential prognostic biomarker of small cell lung cancer and also of a decreased activity of the Shh pathway in a relapsed tumour.

1.3. Research Objective

To assess whether the activity of the Shh pathway is of a prognostic relevance and is associated with the development of resistance in small cell lung cancer.

1.4. 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 relevance of the activity of the Shh pathway associated genes on the survival of the small cell lung cancer 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 small cell lung cancer biopsies.

1.5. Research Hypothesis

The activity of the Sonic Hedgehog embryonic signalling pathway is of relevance in the prognostication of small cell lung cancer and the development of resistance.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Analysis of Prognostic Clinical Factors and Treatment Results in Small Cell Lung Cancer Patients at Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital

Study Population

The retrospective study involved collection of data regarding 100 consecutive first-time patients with morphologically confirmed small-cell lung cancer (C34), who were assigned to a specific treatment by the multidisciplinary tumour board at Pauls Stradins Clinical University Hospital between August 2006 and December 2009 (Kozirovskis et al., 2012). The data were obtained from the medical records, i.e., multidisciplinary tumour board conclusions, out-patient medical records, daytime in-patient facility and hospital patient records, the “Ārstu birojs” software program, the AI-RIS PSKUS radiological examination report software program. The patient death dates were obtained from the PREDA database of the Research and Statistics Department of the National Health Service.

Inclusion Criteria:

1. A patient with morphologically (histologically or cytologically) confirmed small cell lung cancer.
2. The patient assigned to a specific treatment by the multidisciplinary tumour board (“*Intention-To-Treat*” population).

It should be emphasised that the analysis did not include any patients not eligible for chemotherapy after the initial diagnostic workup and with a average survival time of 1 to 3 months from the confirmation of the diagnosis without treatment or using local therapy (surgery or radiation therapy) only, based on literature data (Zelen, 1973).

Data Collection Methods

Data were collected regarding the age, gender, type and date of the diagnostic procedure, the diagnosing healthcare facility, the stage and the localisation of metastases, the ECOG performance status of the patients (Oken et al., 1982), the time from the diagnosis to the initiation of the specific treatment, the type of chemotherapy received and the number of treatment lines, the type of the radiation therapy received, the best radiologically confirmed response to the received treatment, and the date of death.

Statistical Analysis

The obtained results were entered into an MS Excel database, the statistical analysis was performed using the MedCalc statistical analysis software program,

v.10.2.0.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). The overall survival (OS) was calculated and compared using the Kaplan-Meier method and the Log-rank Test. The correlation analysis was carried out using the Cox Proportional Hazards Method.

2.2. Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes as a Prognostic Factor in Small Cell Lung Cancer

Study Population

A prospective study enrolling 12 first-time patients with histologically confirmed stage III and IV small cell lung cancer who had consented to the collection of study tumour biopsy samples during diagnostic fibrobronchoscopy between October 2010 and January 2014 and consequently received a specific treatment at the Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital. Pre-treatment study biopsies were obtained from 20 patients. 8 patients were excluded from the analysis following the evaluation of the inclusion criteria because presence of cancer cells was not cytologically confirmed in the study biopsy for 5 patients, and poor quality sample RNA was obtained from 2 additional patients. 1 patient died early during the treatment for reasons not related to cancer and was also excluded from the analysis.

Inclusion Criteria:

1. Signed Patient Informed Consent Form.
2. The patient has histologically confirmed stage III or IV small cell lung cancer.
3. Cytologically confirmed presence of cancer cells in the study biopsy by examining a sample imprint on a glass slide prior to its placement into the preserving agent.
4. Good quality RNA in the study biopsy.
5. The patient has received at least two cycles of palliative chemotherapy.
6. The patient has undergone follow-up examination, and progression and date of death have been recorded.

Data Collection Methods:

1. Clinical information was collected regarding the age, gender, the stage and the localisation of metastases, the ECOG performance status of the patients, the received specific treatment, the best radiologically confirmed response to the received treatment, deviations in the received chemotherapy doses and intervals, time/type of disease progression, and the date of death.
2. Following the collection and making an imprint on a glass cytology slide, the study tumour biopsy samples were placed in an RNA preserving

agent, the RNAlater solution (*Thermo Fisher Scientific, USA*), and stored at -20°C until the testing.

3. The preparation of the study biopsy tissue mRNA with Lysing Matrix D (*MP Biomedicals, USA*) was carried out in a tissue homogeniser (*FastPrep[®]-24 Instrument*) with the speed of 0.4 m/s for 40 seconds. The total RNA was isolated using a MirVana Total RNA Isolation Kit (*Thermo Fisher Scientific, USA*) following the manufacturer's protocol. The RNA was treated with DNase I (*Thermo Fisher Scientific, USA*), and the concentration and purity of RNA were determined in a Nanodrop ND-100 spectrophotometer. cDNA was synthesised using random hexamer primers from the total RNA 1 μg by applying a Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit (*Thermo Fisher Scientific, MA, USA*) in accordance with the instructions provided by the manufacturer.
4. The real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was carried out using 2 μl of 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*). For normalisation of the expression data, the normalisation factor was calculated for each cDNA using the expression levels of the 3 most stable reference genes (*ACTB, LRP10, YWHAZ*) selected from the 7 most commonly used housekeeping genes by the geNorm software. All of the comparative real-time qPCR experiments were duplicated, and the data were analysed as their mean values \pm the standard deviations.

Statistical Analysis

An MS Excel database was primarily created for the statistic data processing purposes, followed by conversion of the data in the professional study data statistic processing software program SPSS (*Statistical Pacade for Social Sciences*) for Windows, version 21.0. The median overall survival was calculated using the Kaplan-Meier method and the Log-rank Test. Based on the estimated median overall survival, the patients were divided into short-term and long-term survival groups. In the comparative analysis, the Student (t-test) or the Chi-squared (χ^2) test was used depending on the type of the variables. The mean values of the mRNA expression levels for each Shh pathway associated gene (*Gli1, SMO, SUFU, PTCH1, HHIP, BCL2, BMI1, ZEB1, ZEB2, N-MYC, Twist1*) were compared between the pre-treatment study tumour biopsy samples from the patients of the short-term and long-term survival groups by applying the Independent Samples t Test and calculating the 95% confidence interval. All of the hypotheses were tested using two-tailed statistical hypotheses, and the differences between the groups were considered significant at $p < 0.05$.

2.3. Comparison of Hedgehog Pathway Associated Gene Expression Between Matched Pre-treatment and Relapsed Biopsies

Study Population

A sub-population of 3 small cell lung cancer patients (out of the study patients described in Section 2.2) from whom pre-treatment and relapsed study tumour biopsies were obtained.

Inclusion Criteria:

1. All of the inclusion criteria described in Section 2.2
2. Cytologically confirmed presence of cancer cells in the study biopsy of the relapsed tumour by examining a sample imprint on a glass slide prior to its placement into the preserving agent
3. Good quality RNA in the study biopsy of the relapsed tumour

Data Collection Methods

All of the data acquisition methods described in Section 2.2.

Statistical Analysis

The obtained results were entered into an MS Excel database, the statistical analysis was carried out using the MedCalc statistical analysis software program, v.10.2.0.0 (*MedCalc Software, Ostend, Belgium*). In the comparative analysis, the Student (t-test) or the Chi-squared (χ^2) test was used depending on the type of the variables. The mRNA levels for each Shh pathway associated gene (*Gli1, SMO, SUFU, PTCH1, HHIP, BCL2, BMI1, ZEB1, ZEB2, N-MYC, Twist1*) were compared between the pre-treatment and relapsed study tumour biopsy samples of the same patient by applying the paired two sample t-test. The mean values obtained for each of the Shh pathway associated gene expression levels were also compared between all of the pre-treatment and relapsed samples by calculating the 95% confidence interval. All of the hypotheses were tested using the two-tailed statistical hypotheses, and the variations between the groups were considered significant at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Analysis of Prognostic Clinical Factors in Small Cell Lung Cancer Patients at Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital

100 consecutive first-time patients with morphologically confirmed small-cell lung cancer, who were assigned to a specific treatment by the multidisciplinary tumour board at Pauls Stradins Clinical University Hospital between August 2006 and December 2009, were enrolled in the retrospective study.

The mean age of the enrolled patients was $61.52 \pm \text{SD } 7.13$ (47–77, 95% CI 60.1–62.9) years (Figure 3.10), of which 90 males (90%) and 10 females (10%).

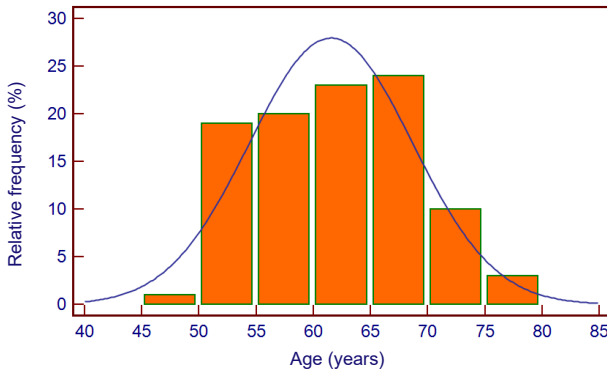


Figure 3.10. Patients by Age Groups

According to the type of the diagnostic procedure, the fibrobronchoscopy procedure was most commonly (in 71 patients) used for the morphological verification of the disease. 9 patients had a mediastinoscopy, 7 patients had a supraclavicular lymph node biopsy, 5 patients had thoracotomies with 3 diagnostic surgeries and 2 therapeutic surgeries (1 pneumonectomy and 1 lobectomy). In one patient, metastatic disease was morphologically confirmed by liver metastasis core biopsy, and another patient had it confirmed in the resected brain metastasis.

In 87 patients, the disease was confirmed in a histological (immunohistochemical) examination of the biopsy, and 13 patients had it confirmed cytologically only due to an insufficient size of the biopsy sample.

By the healthcare facility where the diagnostic workup took place, 93 patients were from the Thoracic Surgery, Pneumology and Neurosurgery Departments of Pauls Stradins Clinical University Hospital, and 7 patients were referred from Riga Hospital No. 1, the Tuberculosis and Lung Diseases Centre, and the Bikernieki and Gailezers hospitals.

66 patients (66%) had limited-stage small cell lung cancer (with no distant metastases), and 34 patients (34%) had extensive-stage disease (with distant metastases) (Figure 3.11).

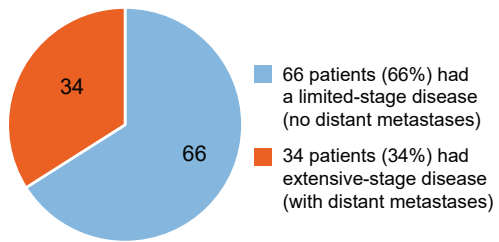


Figure 3.11. Patients by Stages

In the extensive-stage patients, metastases were most commonly localised in the liver only – 10 patients (29%), followed by combined localisations of metastases in 8 patients (23%), brain metastases in 4 patients (12%), adrenal metastases in 4 patients (12%), lung metastases in 2 patients (6%), non-regional lymph node metastases in 3 patients (9%), pleural metastases in 2 patients (6%), and subcutaneous metastases in one patient (3%) (Figure 3.12). It is interesting to note that no isolated bone metastases were found. 2 patients had a combination of bone + liver metastases, and another patient had bone + lung metastases simultaneously. In 2 patients, non-regional lymph node metastases were combined with liver or adrenal metastases. One patient had a combination of liver + adrenal metastases, one patient had a combination of liver + lung + subcutaneous metastases, and one patient had a combination of pleural + pericardial metastases.

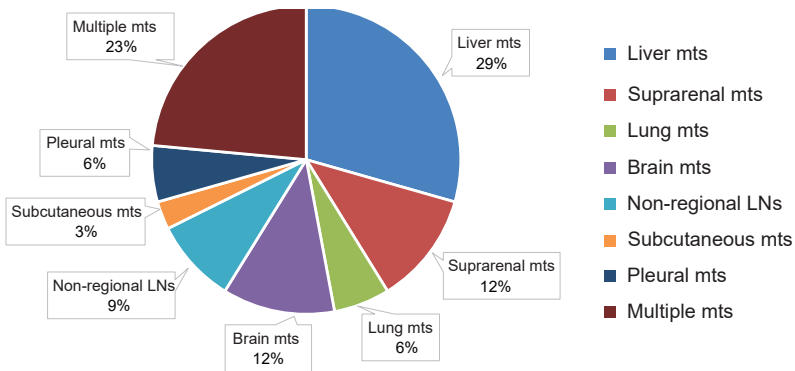


Figure 3.12. Localisation of Metastases in the Study Patients (mts – metastases, LNs – lymph nodes)

Based on the analysis of the patient ECOG performance status (Oken et al., 1982), the majority of the study population had ECOG 1 (56 patients) and ECOG 2 (33 patients). 7 patients had ECOG 3, 3 had ECOG 4, and 1 had ECOG 0 (Figure 3.13). The ECOG 4 patients had received no specific treatment and had received symptomatic treatment.

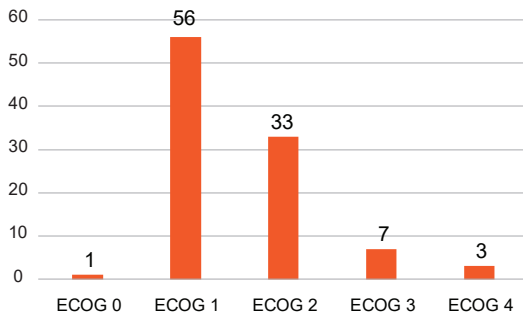


Figure 3.13. Patients by ECOG Performance Status

Based on the time from the diagnosis until the initiation of the specific treatment, the mean waiting time for the study patients was $15.55 \pm \text{SD } 15.62$ (0–96, 95% CI 12.4–18.7) days (Figure 3.14).

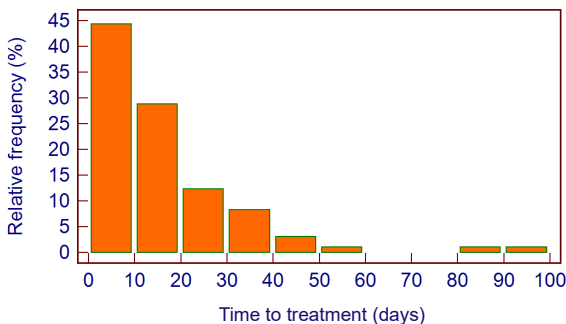


Figure 3.14. Time From Diagnosis Until Initiation of Treatment

Based on the type of the received chemotherapy and the number of lines, 97 of the study patients received 1st line palliative chemotherapy (73 – the PE regimen, 19 – the CE regimen, 5 – the CAV regimen), 29 patients had received 2nd line treatment (25 – the CAV regimen, 1 – the CEA regimen, 1 – the PE regimen, 2 – oral etoposide). 6 patients had received 3rd line treatment (1 – topotecan, 1 – paclitaxel, 3 – oral etoposide, 1 – oral cyclophosphamide). 1 patient had received 4th line palliative chemotherapy with paclitaxel.

30 study patients had received radiation therapy for their primary tumour and metastatic mediastinal lymph nodes. Only 1 patient had received concomitant radiation and chemotherapy, whereas the other patients underwent radiation therapy subsequently, after the completion of the chemotherapy. Consolidating prophylactic cranial irradiation was carried out in 9 patients. 15 patients had received radiation therapy symptomatically to mitigate the symptoms caused by the tumour or the metastases.

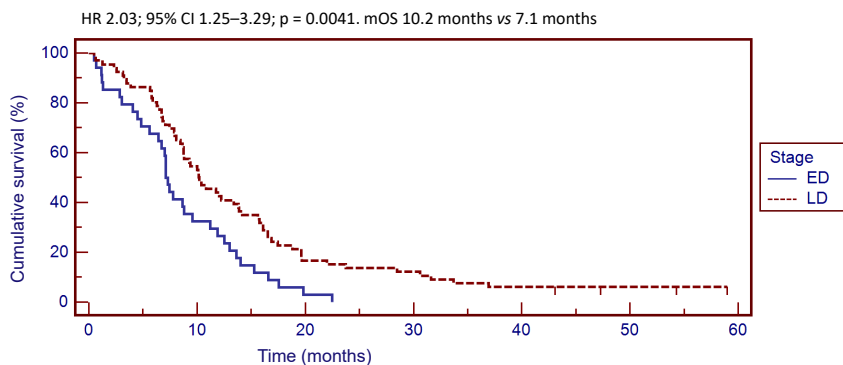
Based on the analysis of the best radiologically confirmed response to the received treatment, a complete response was achieved in 5 limited-stage patients and 1 extensive-stage patient, whereas a partial response was achieved in 39 and 15 patients respectively. Based on the estimation of the incidence of the response to treatment after complete or partial response together, it was observed in 67% of the limited-stage patients and 47% of the extensive-stage patients. 12 and 3 patients had stable disease respectively, whereas disease progression was observed in 11 limited-stage patients and 14 extensive-stage patients (Table 3.11).

Table 3.11. Radiologically Confirmed Best Response to Received Treatment, Incidence of Response, and Survival Data in the Study Patients

Stage	Patients	Best response to received treatment					Survival				
		CR	PR	SD	PD	Response incidence (CR+PR)	Median survival (months)	1-year	2-year	3-year	5-year
LS	66	5	39	12	11	67%	10	42%	14%	6%	2.6%
ES	34	1	15	3	14	47%	7	27%	0%	–	–

LS – limited stage (with no distant metastases); ES – extensive stage (with distant metastases); CR – complete response; PR – partial response; SD – stable disease; PD – progressive disease

The median overall survival (mOS) in the limited-stage study patients was 10.2 months, 1-year survival – 42%, 2-year survival – 14%, 3-year survival – 6%, 5-year survival – 2.6%, whereas respectively, in the extensive-stage patients, the mOS was 7.1 months, 1-year survival – 27%, 2-year survival – 0% (Figure 3.15 and Table 3.11). Based on the comparison of the survival data, the difference between the stages was statistically significant HR 2.03; 95% CI 1.25–3.29; $p = 0.0041$. Only 4 (2.6%) of the limited-stage patients had achieved a survival exceeding 5 years – 2 females (33%) and 2 males (3%). A partial response was achieved in both female patients as a result of the treatment, one of the patients was lost to follow-up after 5.5 years, but the other female patient is still alive and without disease progression for already 13 years. A complete response was achieved in one of the male long-term survivors, and he was lost to follow-up after 9 years. The second male patient with a partial response has not had a disease progression for already 13.5 years.



LD – limited disease (with no distant metastases); ED – extensive disease (with distant metastases); mOS – median overall survival

Figure 3.15. Kaplan-Meier Overall Survival (OS) Curve in Limited and Extensive Stage Study Patients

The multivariable Cox regression analysis demonstrates that the independent prognostic variables influencing the overall survival of the study patients are the female gender and a good performance status of the patient (ECOG 0–1). The univariate Cox regression analysis also demonstrated limited-stage disease as a favourable prognostic factor (Table 3.12).

Table 3.12. Analysis of Prognostic Clinical Factors in Study Patients Based on Cox Proportional Hazards Model

Factor	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
	Univariate			Multivariate		
Gender	1.9532	0.97–3.92	0.0610	2.4601	1.13–5.31	0.0226
ECOG 0–1 or 2–3	2.2687	1.48–3.47	0.0002	2.1437	1.35–3.41	0.0014
Limited or extensive stage	1.8618	1.21–2.86	0.0049	1.5840	0.97–2.58	0.0651
Age below or above 60 years	1.2080	0.80–1.82	0.3665	0.9920	0.64–1.53	0.9713
Time until treatment below or above 4 weeks	0.8552	0.51–1.45	0.5610	0.6395	0.37–1.10	0.1055
Right or left lung cancer	0.9275	0.62–1.38	0.7108	1.0631	0.68–1.66	0.7886

HR – hazard ratio; 95% CI – 95% confidence interval

3.2. Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes as a Prognostic Factor in Small Cell Lung Cancer

The median overall survival (OS) of 9.6 months was calculated for 12 first-time stage III/IV small cell lung cancer patients with a good quality pre-treatment study biopsy sample and evaluable clinical data, and it was used to divide the patients further into short-term and long-term survivor groups. The demographic and clinical data for the patients of the two groups are presented in Table 3.21. None of the analysed demographic or clinical parameters demonstrated any statistically significant differences between the groups. The survival and received treatment data are presented in Table 3.22.

Table 3.21. Demographic and Clinical Data for the 12 Patients Analysed for Survival and Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes. The Student (t-test) or the Chi-squared (χ^2) test was used in the comparative analysis of the groups depending on the type of the variables.

Patient parameter	Long-term survivors (OS > 9.6 months, n = 6)	Short-term survivors (OS ≤ 9.6 months, n = 6)	p-value
Gender			p = 1.0
Males	5	5	
Females	1	1	
Age			p = 0,078
Mean (limits)	61.5 (54–77)	51.5 (49–70)	
ECOG performance status			p = 0.446
0	1	1	
1	0	2	
2	4	2	
3	1	1	
4	0	0	
Stage			p = 0.565
III A	1	0	
III B	2	2	
IV	3	4	
Treatment dose/interval deviations due to toxicity			p = 0.079
No	2	5	
Yes	4	1	
Best response to received treatment			p = 0.301
CR	0	0	
PR	6	4	
SD	0	1	
PD	0	1	

Patient parameter	Long-term survivors (OS > 9.6 months, n = 6)	Short-term survivors (OS ≤ 9.6 months, n = 6)	p-value
Disease progression type			p = 0.601
Local	2	1	
Distant	2	3	
Combined	1	2	
No progression (as of 01.10.2018)	1	0	

CR – complete response; PR – partial response; SD – stable disease; PD – progressive disease; OS – overall survival

Table 3.22. Survival and Received Treatment Data for the 12 Patients Analysed for Survival and Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes

Patient ID	Survival in months (days)	Survival in months (days)	Received treatment
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) as of 01.10.2018		5 PE → RT (56/50.4 Gy) → PCI (36 Gy)

CE – Carboplatin/Etoposide; PE – Cisplatin/Etoposide; RT – radiation therapy; CAV – Cyclophosphamide/(doxorubicin)Adriamycin/Vincristine; WBRT – whole brain radiation therapy; PCI – prophylactic cranial irradiation

The mean values of the mRNA expression levels for each Shh pathway associated gene (*Gli1*, *SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) were compared between the pre-treatment study tumour biopsy samples from the patients of the short-term and long-term survival groups.

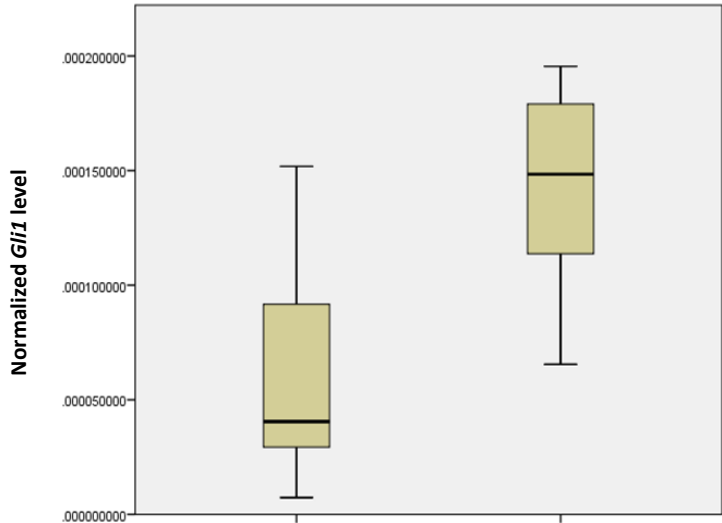
The mean expression of the key Hedgehog pathway target gene and the signalling pathway activity marker *Gli1* in the 6 small cell lung cancer

patients in the long-term survival group (OS > 9.6 months) was 0.000141757 ± 0.000038223. The pre-treatment mean *Gli1* mRNA expression in the 6 patients of the short-term survival group (OS ≤ 9.6 months) was 0.000060198 ± 0.000016324 respectively. The mean *Gli1* expression values 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) (Table 3.23, Figure 3.201).

Table 3.23. Comparison of Mean Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes Between Short-term Survivor (OS ≤ 9.6 Months) and Long-term Survivor (OS > 9.6 Months) Pre-treatment Study Tumour Biopsy Samples

Gene	Mean expression level values in the pre-treatment biopsies of the 12 SCLC depending on the survival group				Evaluation of difference
	Short-term survivors (OS ≤ 9.6 months)		Long-term survivors (OS > 9.6 months)		
	Mean value and 95% CI		Mean value and 95% CI		
<i>N-MYC</i>	0.016264	-0.007006 to 0.060377	0.042949	-0.003721 to 0.057092	2.6 (p = 0.1)
<i>Gli1</i>	0.000060	0.000016 to 0.000147	0.000142	0.000016 to 0.000147	2.3 (p = 0.0196)
<i>Twist1</i>	0.003897	-0.001798 to 0.006485	0.006241	-0.001770 to 0.006458	1.6 (p = 0.233)
<i>ZEB2</i>	0.019992	-0.009917 to 0.034784	0.032425	-0.009893 to 0.034760	1.6 (p = 0.243)
<i>HHIP1</i>	0.000619	-0.000696 to 0.000741	0.000642	-0.000691 to 0.000736	1.04 (p = 0.946)
<i>ZEB1</i>	0.008411	-0.007233 to 0.007438	0.008514	-0.006344 to 0.006550	1.01 (p = 0.972)
					Higher expression in the short-term survival group (number of times)
	Mean value and 95% CI		Mean value and 95% CI		
<i>Smo</i>	0.031924	-0.062936 to 0.018025	0.009469	-0.058077 to 0.013166	3.37 (p = 0.190)
<i>PTCH1</i>	0.074138	-0.127133 to 0.029657	0.0254	-0.118672 to 0.021196	2.9 (p = 0.152)
<i>BCL2</i>	0.063502	-0.088504 to 0.015920	0.027210	-0.084603 to 0.012019	2.3 (p = 0.142)
<i>SUFU</i>	0.008958	-0.007238 to 0.002349	0.006513	-0.007118 to 0.002229	1.3 (p = 0.271)
<i>BMI1</i>	0.099527	-0.070536 to 0.058079	0.093298	-0.067628 to 0.055171	1.06 (p = 0.826)

OS – overall survival; SCLC – small cell lung cancer; 95% CI – 95% confidence interval; *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



Short-term survivors group **Long-term survivors group**
OS ≤ 9.6 months **OS > 9.6 months**

OS – overall survival

LC145	0.000029349	± 0.000007678	LC130	0.000195451	± 0.000043416
LC137	0.000091706	± 0.000055107	LC127	0.000179067	± 0.000118971
LC146	0.000151824	± 0.000000007	LC134	0.000169819	± 0.000023397
LC102	0.000007320	± 0.000000880	LC139	0.000113689	± 0.000000022
LC171	0.000034052	± 0.000021570	LC121	0.000127038	± 0.000004607
LC135	0.000046939	± 0.000012702	LC126	0.000065476	± 0.000038924

Two-tailed independent samples t-test: p = 0.0196, 95% CI: 0.000016 to 0.000147

Figure 3.201. *Gli1* mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group

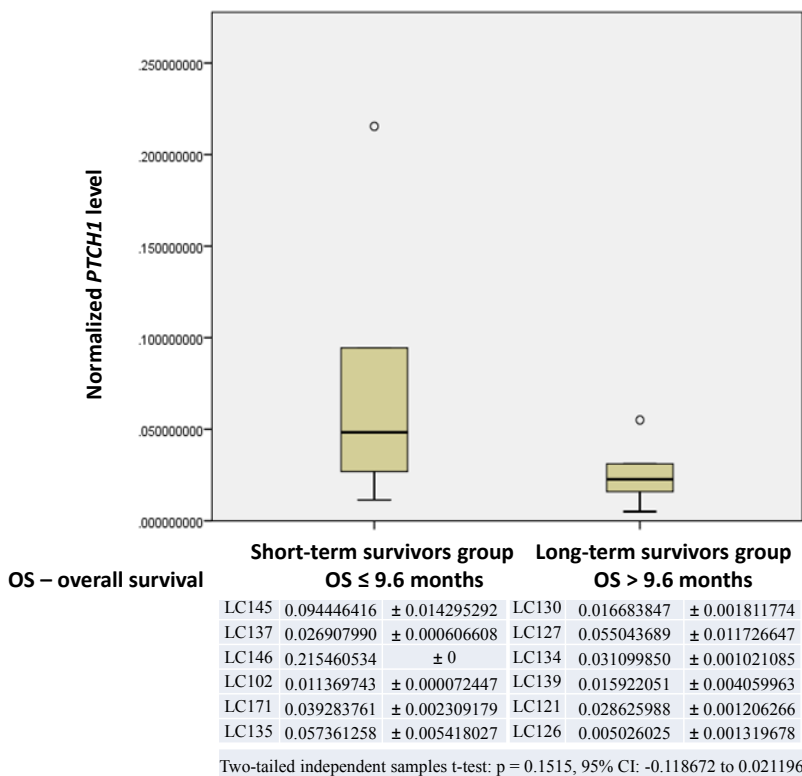


Figure 3.202. *PTCH1* mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group

The expression levels for the other Hedgehog pathway associated genes (*SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) are not statistically significantly different between the pre-treatment study tumour biopsy samples of the short-term and long-term survival patient groups (Figures 3.202–3.211).

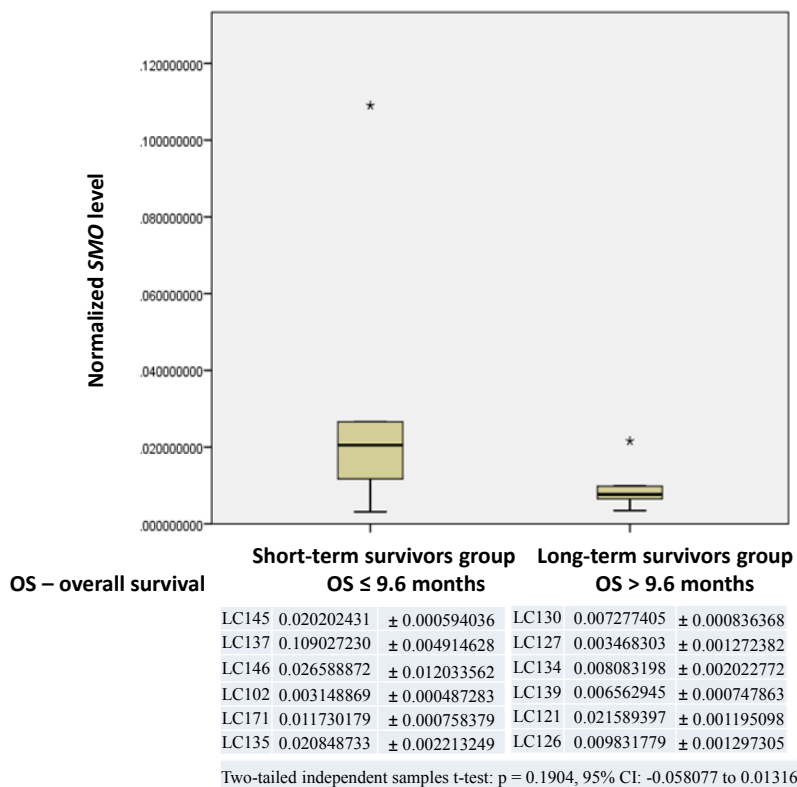
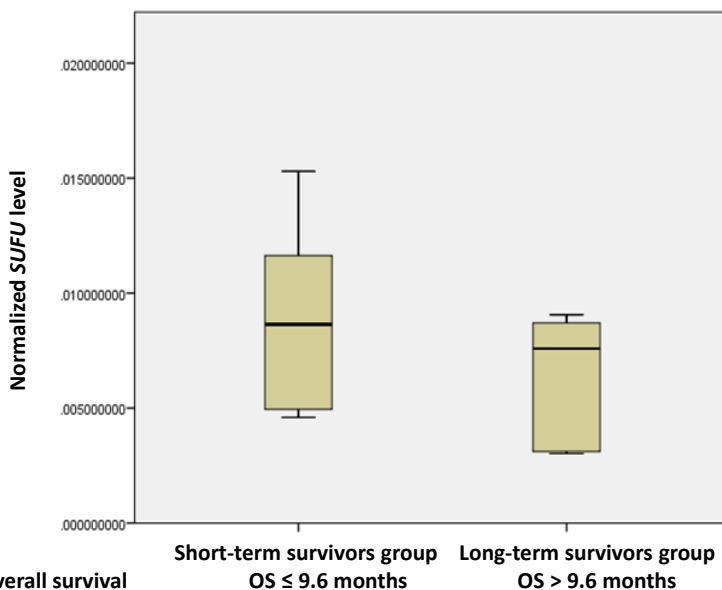


Figure 3.203. SMO mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group



OS – overall survival

LC145	0.015297724	± 0.002426543	LC130	0.008707436	± 0.000669377
LC137	0.011631138	± 0.000490123	LC127	0.009062734	± 0.000004448
LC146	0.006217903	± 0.002974407	LC134	0.007288810	± 0.000876702
LC102	0.004944124	± 0.000329323	LC139	0.003020828	± 0.000414737
LC171	0.011058726	± 0.000016262	LC121	0.007889118	± 0.002049026
LC135	0.004595684	± 0.000002256	LC126	0.003109543	± 0.000048768

Two-tailed independent samples t-test: p = 0.2709, 95% CI: -0.007118 to 0.002229

Figure 3.204. *SUFU* mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group

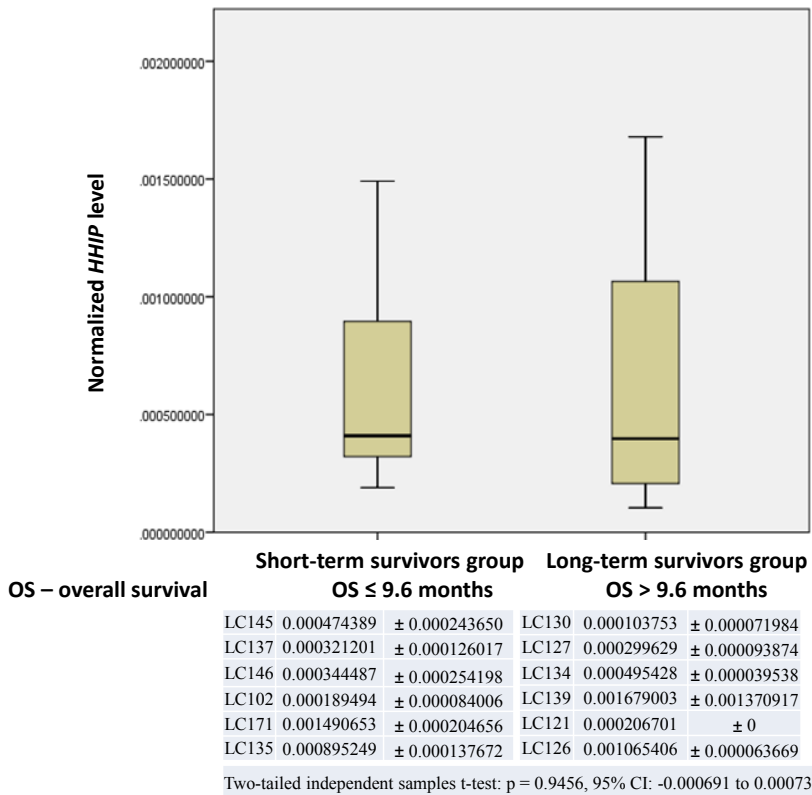


Figure 3.205. *HHIP* mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group

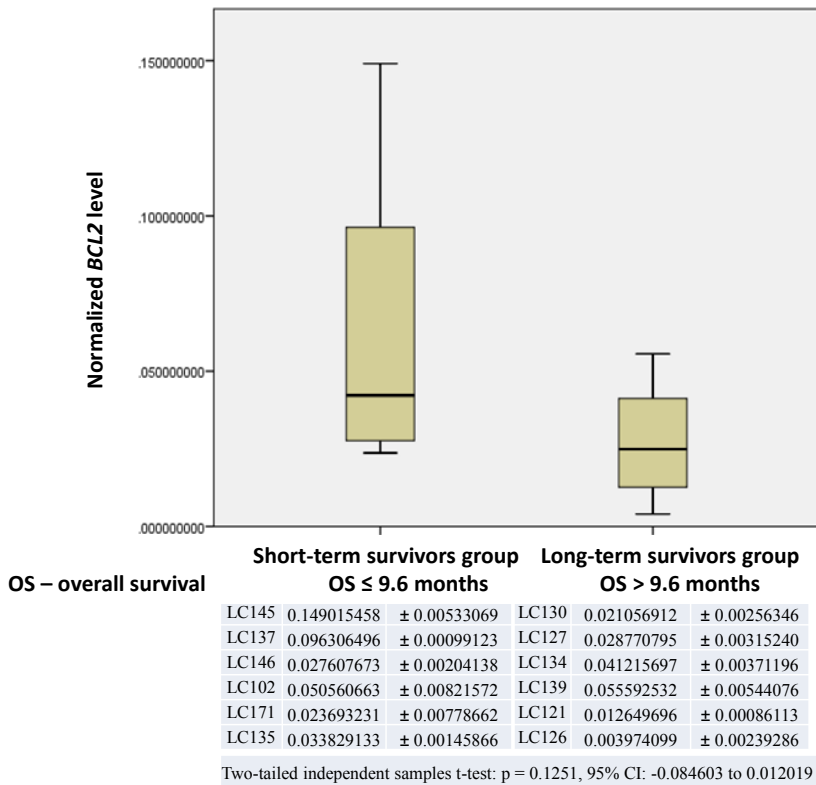
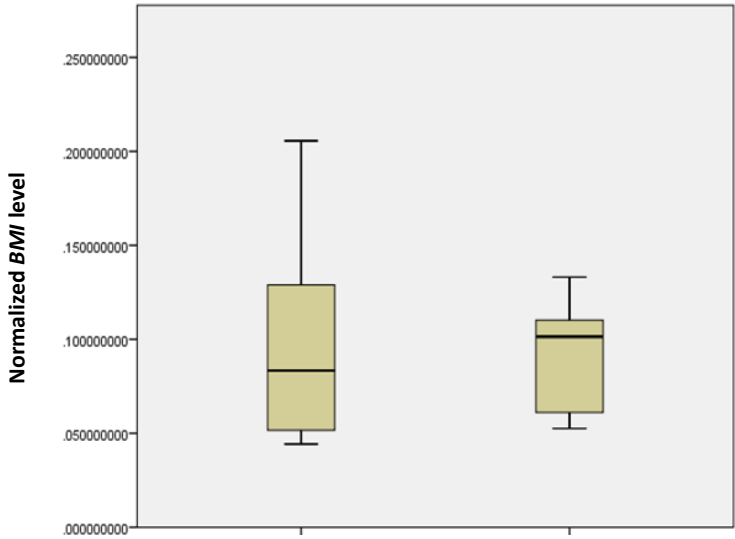


Figure 3.206. *BCL2* mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group



OS – overall survival	Short-term survivors group		Long-term survivors group	
	OS ≤ 9.6 months		OS > 9.6 months	
LC145	0.128991475	± 0.004740666	LC130	0.108642625 ± 0.042279440
LC137	0.205574735	± 0.004936653	LC127	0.110186426 ± 0.015662472
LC146	0.084690401	± 0.033456332	LC134	0.094214428 ± 0.006828276
LC102	0.051651239	± 0.002833931	LC139	0.133050930 ± 0.010358272
LC171	0.081953123	± 0.015412849	LC121	0.052591530 ± 0.005608601
LC135	0.044300493	± 0.005673193	LC126	0.061104768 ± 0.006069655

Two-tailed independent samples t-test: p = 0.8257, 95% CI: -0.067628 to 0.055171

Figure 3.207. *BMI1* mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group

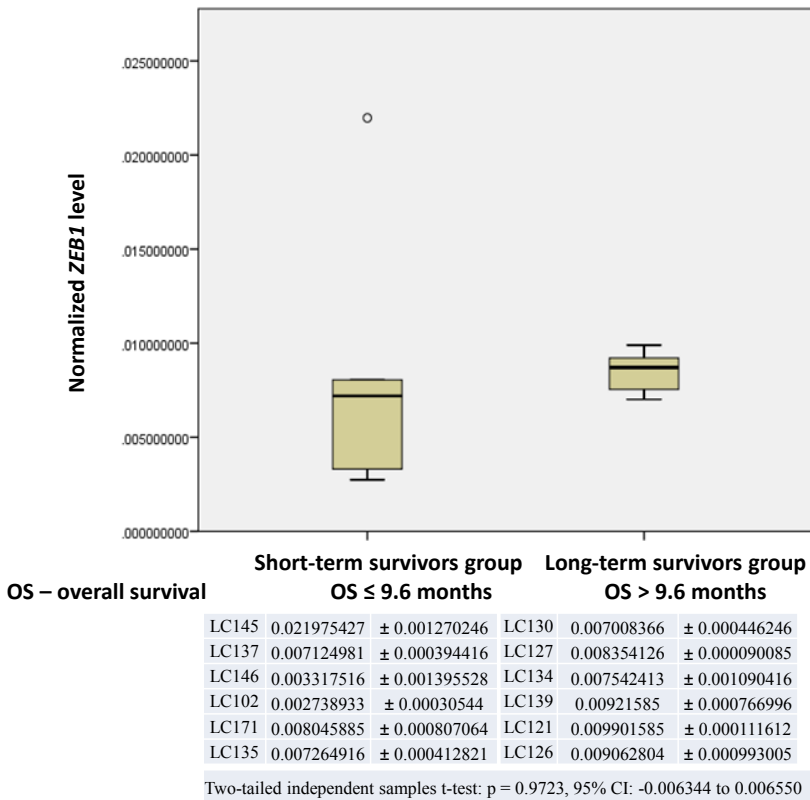


Figure 3.208. ZEB1 mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group

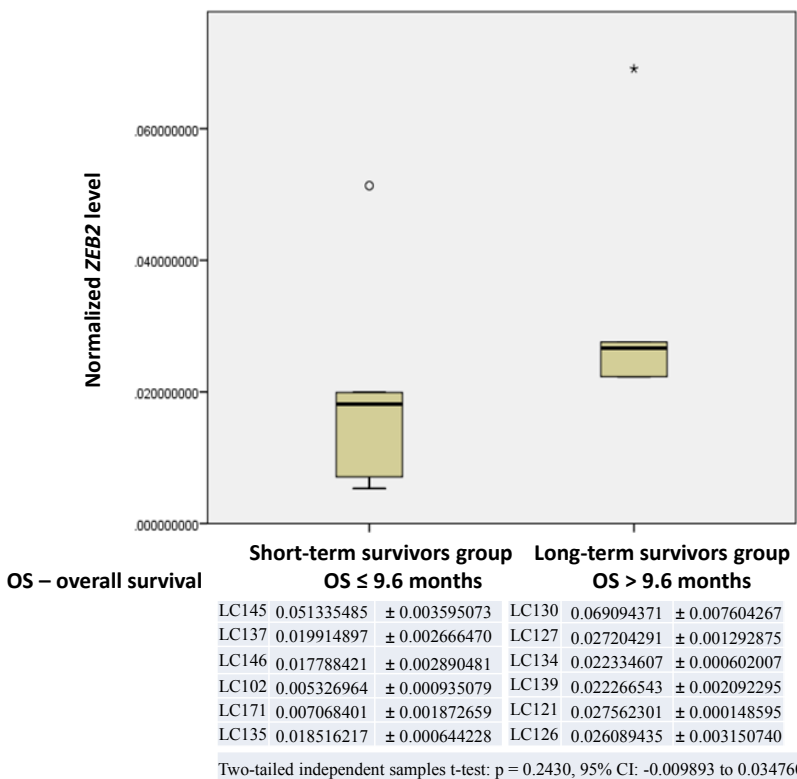


Figure 3.209. *ZEB2* mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group

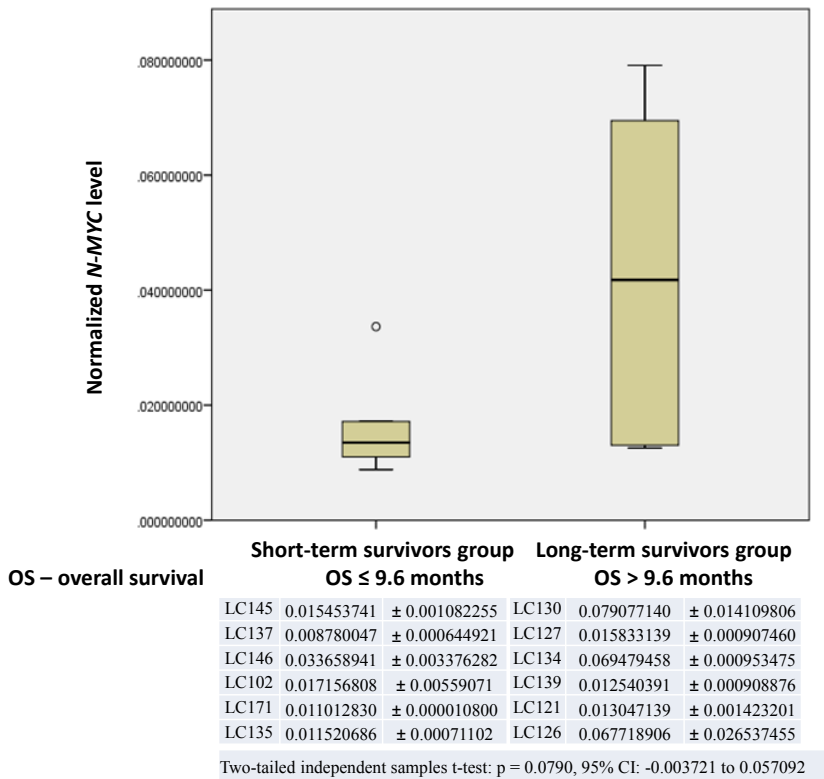
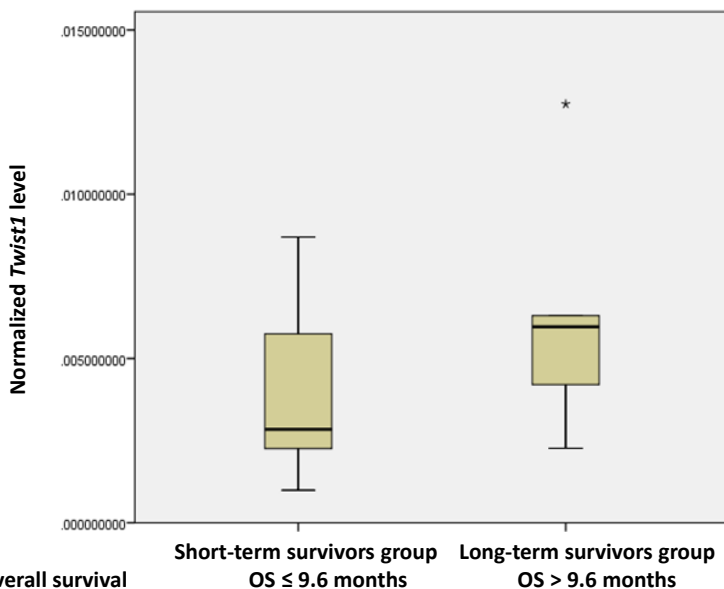


Figure 3.210. N-MYC mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group



OS – overall survival

	Short-term survivors group OS ≤ 9.6 months		Long-term survivors group OS > 9.6 months	
LC145	0.008695354	± 0.000166200	LC130	0.012744288 ± 0.000724193
LC137	0.002923860	± 0.000047291	LC127	0.002267573 ± 0.000406793
LC146	0.005752802	± 0.000739508	LC134	0.004203714 ± 0.000187434
LC102	0.000992411	± 0.000071926	LC139	0.006304072 ± 0.000788918
LC171	0.002760105	± 0.000327957	LC121	0.005806505 ± 0.001617827
LC135	0.002256888	± 0.000027653	LC126	0.006118291 ± 0.001221279

Two-tailed independent samples t-test: p = 0.2330, 95% CI: -0.001770 to 0.006458

Figure 3.211. *Twist1* mRNA Values for SCLC Patients Depending on Survival Group

3.3. Comparison of Hedgehog Pathway Associated Gene Expression Between Matched Pre-treatment and Relapsed Biopsies

The expression of the Hedgehog pathway associated genes was compared between matched biopsies in a small sub-population (3 patients) of stage III/IV small cell lung cancer patients with good quality pre-treatment and relapsed study tumour biopsy samples. The demographic, clinical and survival data for this sub-population of patients are presented in Table 3.31, compared with the data for the study patients for whom no matched gene expression analysis was carried out. The sub-population was non-equivalent based on the patient performance status parameters. No statistically significant differences were found based on patient gender, age, disease stage, received specific treatment, radiologically confirmed best response to the received treatment, deviations in the doses and intervals of the received chemotherapy, type of disease progression and survival data.

Table 3.31. Demographic and Clinical Data for the Sub-population of 3 SCLC Patients for Whom a Comparison Was Made Between the Expression of the Hedgehog Pathway Associated Genes in Matched Pre-treatment and Relapsed Tumour Biopsies. In the comparative analysis with the patients for whom no matched gene expression analysis was carried out, the Student (t-test) or the Chi-squared (χ^2) test was used depending on the type of the variables

Patient parameter		Patients included in matched gene expression analysis (n = 3)	Patients not included in matched gene expression analysis (n = 17)	p-value
Gender	Males	3	13	p = 0.348
	Females	0	4	
Age	Mean (limits)	60 (49-77)	56.9 (47-70)	p = 0.759
ECOG performance status				p = 0.048
	0	2	1	
	1	0	7	
	2	1	7	
	3	0	2	
Stage				p = 0.822
	III A	0	2	
	III B	1	5	
	IV	2	10	

Patient parameter	Patients included in matched gene expression analysis (n = 3)	Patients not included in matched gene expression analysis (n = 17)	p-value
Treatment dose/interval deviations due to toxicity			p = 0.212
No	1	12	
Yes	2	5	
Received treatment			p = 0.948
Chemotherapy only	1	6	
Chemotherapy and radiation therapy	2	11	
Best response to treatment			p = 0.093
CR	0	2	
PR	2	13	
SD	0	2	
PD	1	0	
Disease progression type			p = 0.075
Local	1	4	
Distant	0	8	
Combined	2	1	
NK	0	2	
No progression (as of 01.10.2018)	0	2	
Survival Median PFS (months)	6.7	25.8	p = 0.469
Median OS (months)	11	28.2	p = 0.506

CR – complete response; PR – partial response; SD – stable disease; PD – progressive disease; NK – not known; PFS – progression-free survival; OS – overall survival

The mRNA levels for each Shh pathway associated gene (*Gli1*, *SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BMI1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) were compared between the pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) study tumour biopsy samples of the same patient by applying a paired two sample t-test. The mean values obtained for each of the Shh pathway associated gene expression levels were also compared between all of the pre-treatment and relapsed samples by calculating the 95% confidence interval.

In the pre-treatment and relapsed tumour biopsy samples of the same patient, the level of *Gli1* (the key Hedgehog pathway activity marker) was lower at relapse, with no statistically significant difference achieved however ($p = 0.0529$, 95% CI: -0.0002023 to 0.000003115 , two-sided paired two sample t-test).

2.9 times lower expression of *Gli1* was observed at relapse, based on evaluation of the mean values in all of the pre-treatment and relapsed samples (Figure 3.301, Table 3.32).

Table 3.32. Comparison of Mean Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes in the Pre-treatment and Relapsed Disease Samples of All 3 Patients

Gene	Mean expression level values in the pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) disease biopsies of 3 SCLC patients				Evaluation of difference in expression
	Pre	Mean values 95% CI	Rel	Mean values 95% CI	Reduction of expression in Rel biopsies (number of times)
<i>Gli1</i>	0.000153	0.000088 to 0.0002173	0.000053	-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>	0.000284	0.000109 to 0.0004582	0.000130	-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
	Pre	Mean values 95% CI	Rel	Mean values 95% CI	Increase of expression in Rel biopsies (number of times)
<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>BMI1</i>	0.08249	0.0108 to 0.1542	0.09763	-0.02615 to 0.2214	0.8

SCLC – small cell lung cancer; 95% CI – 95% confidence interval; *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

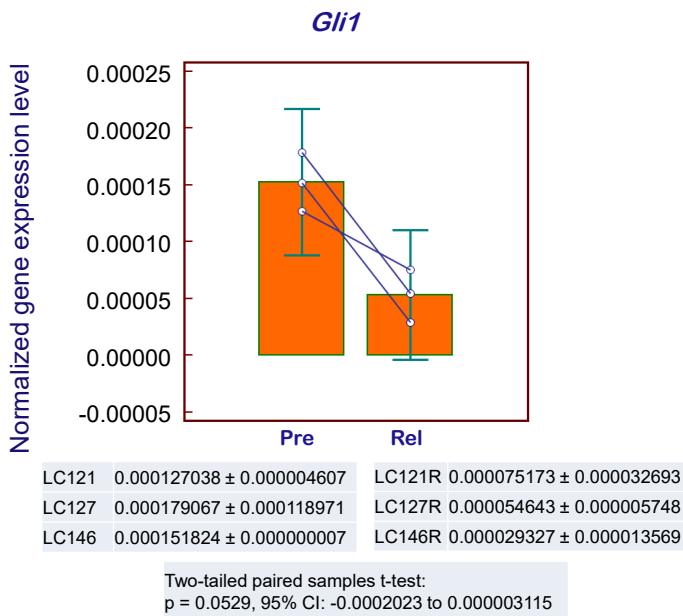


Figure 3.301. *Gli1* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

A reduced expression of 6 Hedgehog pathway associated genes (*PTCH1*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1* and *ZEB1*) was observed during relapse. Compared to pre-treatment sample, the expression of these genes in the matched biopsies was respectively 2.6, 2.2, 1.9, 1.8, 1.2 and 1.1 times lower in the Rel sample with no statistically significant difference (respectively p = 0.4252, p = 0.1268, p = 0.2480, p = 0.1169, p = 0.1480 and p = 0.7595) (Figures 3.302–3.307, Table 3.32).

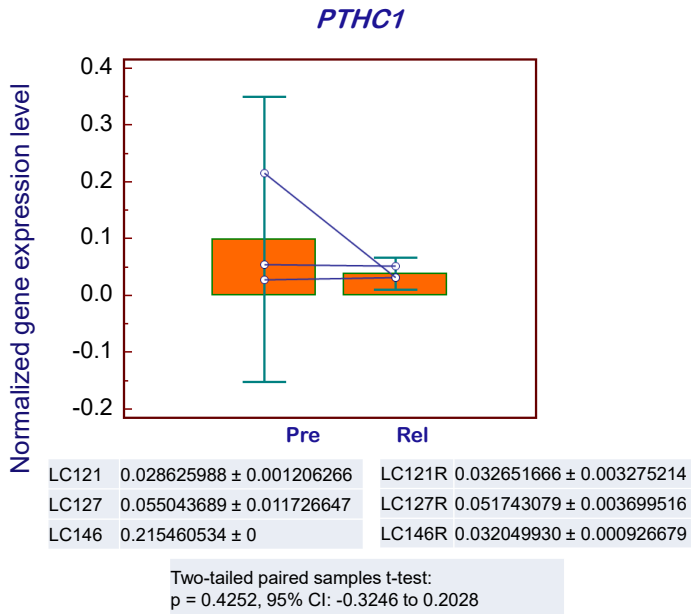


Figure 3.302. *PTHC1* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

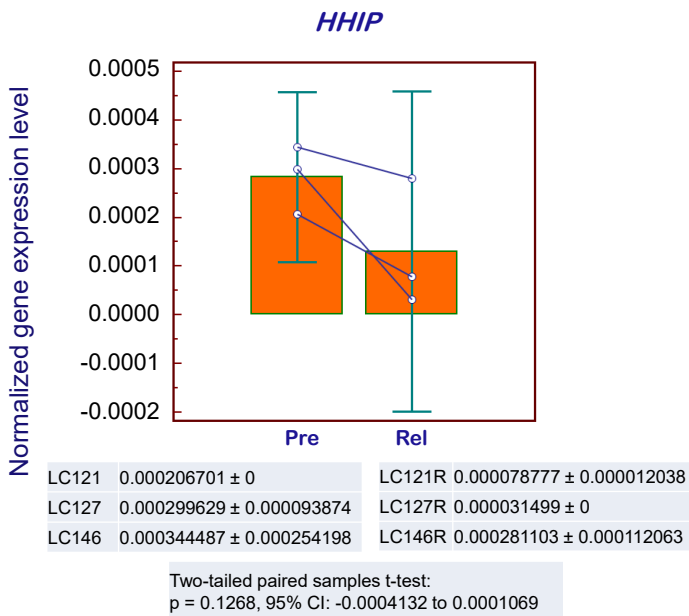


Figure 3.303. *HHIP* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

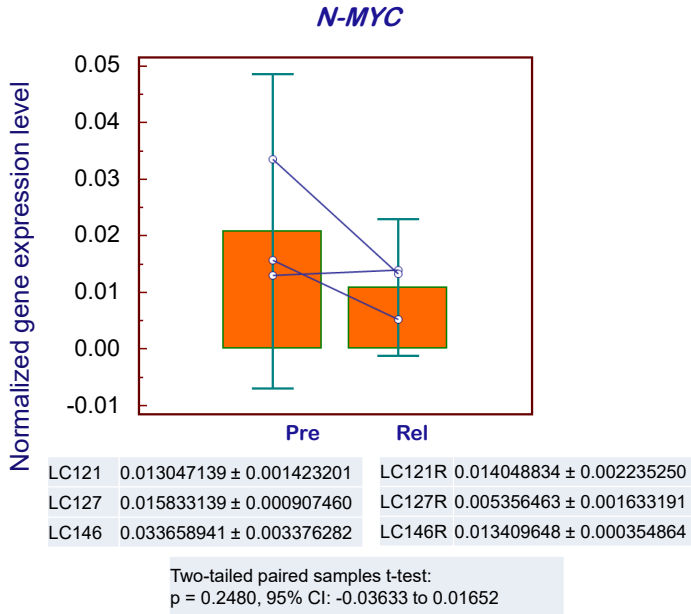


Figure 3.304. *N-MYC* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

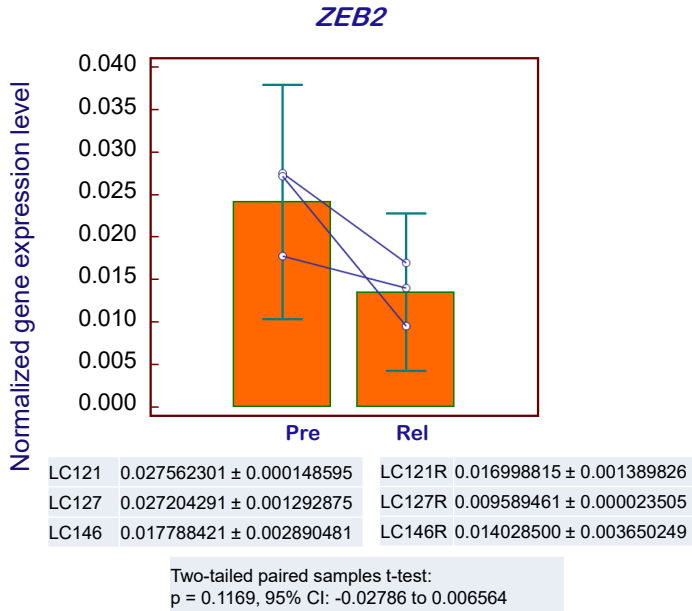


Figure 3.305. *ZEB2* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

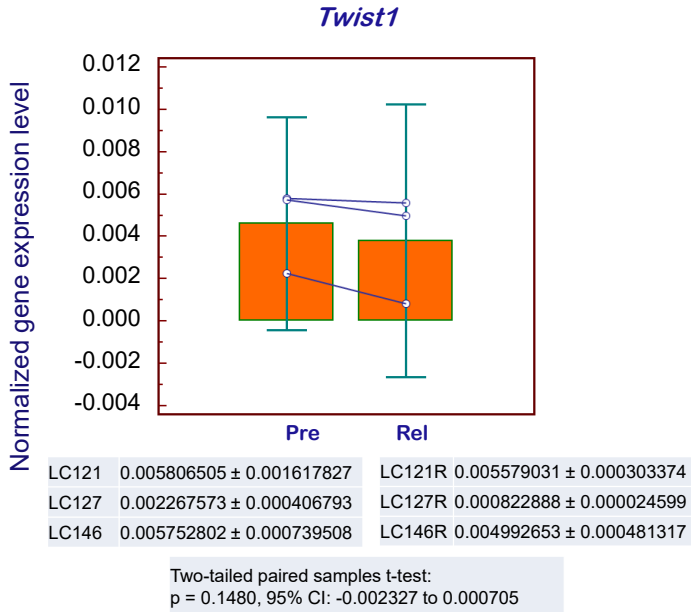


Figure 3.306. *Twist1* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

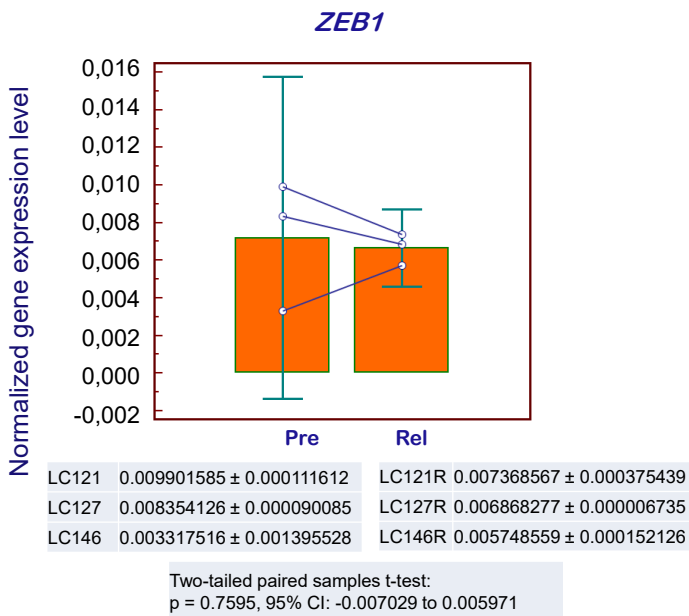


Figure 3.307. ZEB1 mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

A 1.8 times lower expression was observed in the relapsed disease biopsy sample for the *Gli* activator *SMO*, with no statistically significant difference ($p = 0.4111$) (Figure 3.308, Table 3.32).

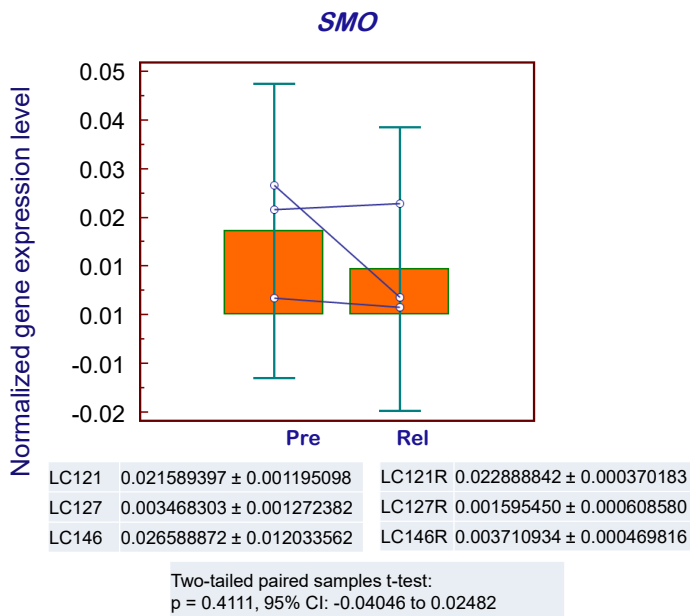


Figure 3.308. *SMO* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

Only the Hedgehog pathway inhibitor *SUFU* and two Shh inducible genes, the *BCL2* and *BM11*, showed a 0.8, 0.9 and 0.8 times higher expression in the Rel biopsy, as compared with the pre-treatment sample. The increase was not statistically significant, with respective p = 0.3074, p = 0.7921 and p = 0.3822 (Figures 3.309–3.311, Table 3.32).

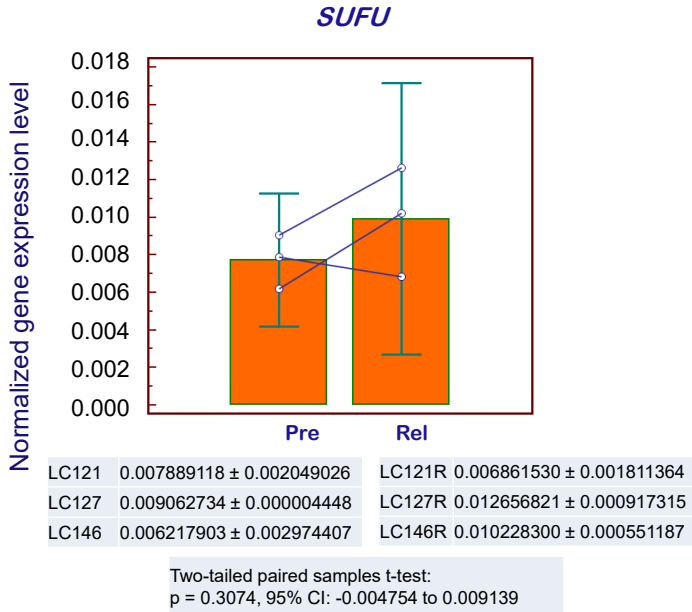


Figure 3.309. *SUFU* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

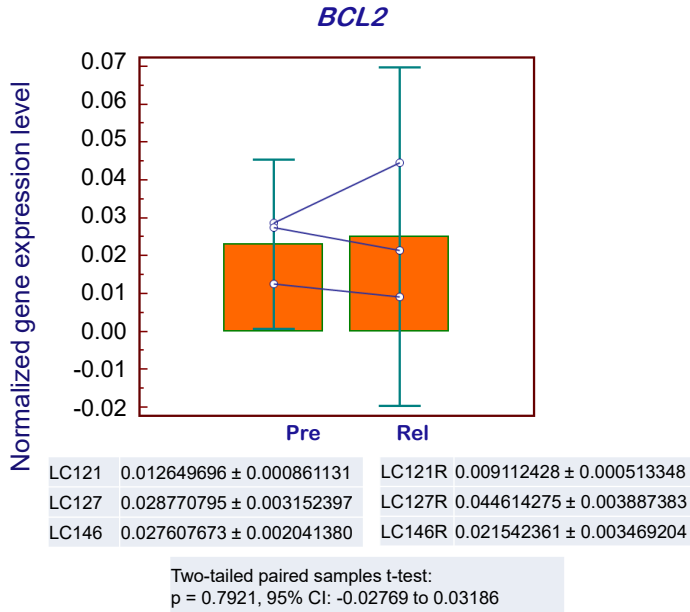


Figure 3.310. *BCL2* mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

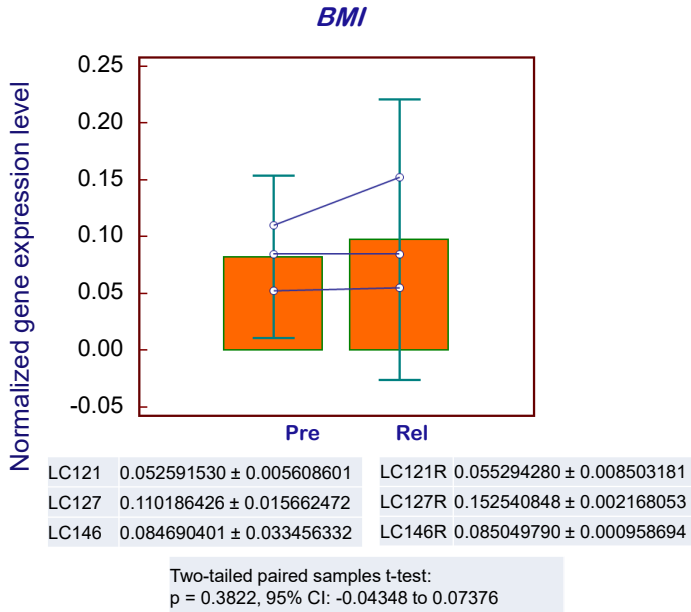


Figure 3.311. BMI mRNA values in matched pre-treatment (Pre) and relapsed (Rel) SCLC biopsy samples (connected with lines); the bars show the mean mRNA values for all patients

4. DISCUSSION

4.1. Analysis of Prognostic Clinical Factors in Small Cell Lung Cancer Patients at Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital

One of the tasks for the Doctoral Thesis was collection of information regarding the clinical parameters and treatment results of the small cell lung cancer patient population in Latvia, which has not been published in any source until now. Considering the high sensitivity of SCLC to chemotherapy and frequent disease remissions after the initiation of cancer therapy, the determination and evaluation of the prognostic clinical factors are of particular relevance in making decisions regarding the benefits and risks of the specific treatment in first-time patients. Early identification of the patients with a long estimated survival would be highly worthwhile. Small cell lung cancer patients surviving for more than 2-3 years are considered to be long-term survivors ([Tartarone et al., 2014](#), [Lewiński and Żuławski, 2003](#)). Large numbers of publications on the studies that analyse the demographic, tumour-related and patient-related prognostic clinical factors can be found in the literature from the past 40 years. However, the attempts to define a common prognostic algorithm or a nomogram model have not been successful until now because the data for several parameters are controversial. The largest amounts of evidence exist for the extent of the disease and the patient performance status ([Albain et al., 1990](#), [Hong et al., 2010](#)). Several other clinical and laboratory factors with a negative prognostic role in the studies have also been described, such as weight loss, age below 60 years, male gender, metastases in the brain or lymph nodes, pre-treatment lymphopenia, a high neutrophil-to-lymphocyte or platelet-to-lymphocyte ratio, and high levels of LDH ([Suzuki et al., 2019](#), [Brueckl et al., 2006](#)). Prognostic relevance has also been described for the type and number of concomitant conditions, where cardiovascular conditions have negative effects, whereas concomitant gastrointestinal diseases have positive effects ([Aarts et al., 2015](#)). Observations suggesting a better oncological prognosis for SCLC patients with paraneoplastic neurological syndromes are of interest ([Iams et al., 2019](#), [Maddison et al., 2017](#)).

The data for the patients analysed in this Doctoral Thesis revealed no correlations between the survival time and the patient age, time until the initiation of the treatment, and the side of the lungs affected by the tumour. The analysis confirmed the female gender and a good patient performance status as independent prognostic factors for longer overall survival. It is interesting that the stage of the disease was not found to be an independent prognostic factor and has been of statistical significance only in the univariate Cox regression analysis.

A possible explanation for this might be that a part of limited-stage SCLC patients have already had asymptomatic brain metastases and, accordingly, extensive-stage disease, because brain CT or MRI examination was not yet indicated for patients with no symptoms in the ESMO guidelines at that time (Felip et al., 2005). This potentially undiscovered sub-population of extensive-stage patients might also explain the lower median overall survival for the analysed patients: 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. In the published literature data primarily from patients in clinical trials, where, contrary to real-life situation, radiological examination of the brain was performed upon their enrolment, the median overall survival and the 5-year survival were higher – 16-24 months and 14% for the limited stage and 6-12 months for the extensive stage respectively, with practically no long-term survivors (Huber and Tufman, 2012).

In extensive-stage SCLC, brain metastases occur in approximately one third of the patients and are a factor for a poor prognosis. Their untoward effects may be partially neutralised by using consolidating prophylactic cranial irradiation (PCI) that reduces the risk of symptomatic brain metastases considerably and extends the total survival time for the limited-stage SCLC patients in whom the disease has had a good response to combined radiation and chemotherapy. Based on a comparison with the literature data, poorer survival results may therefore also be explained by the insufficiently frequent use of PCI in the limited-stage patients enrolled in this study, i.e., only 9 out of 44 patients with achieved complete/partial response have received it.

Another factor that may explain the poorer survival for the limited-stage patients in this retrospective analysis is practically total use of radiation therapy sequently to completed chemotherapy instead of using it concurrently with chemotherapy. Only 1 patient has received concomitant radiation and chemotherapy where the systemic therapy potentiates the local anti-cancer effect of the radiation therapy. This can be explained by the relatively immature published data at that time regarding the superiority of concomitant chemoradiation over the subsequent approach and also the lack of a modern radiation therapy equipment in the hospital. It is specifically due to the progress in the radiation therapy technologies that it has been possible to improve the outcomes of the SCLC treatment over the past 3 decades. State-of-the-art technologies with 3D conformal or intensity-modulated radiation therapy allow to administer higher doses of radiation with less side effects, and concomitant radiation and chemotherapy currently allows to achieve the 5-year survival in up to ~30% of the patients (Faivre-Finn et al., 2017). Following the acquisition of the state-of-the-art linear accelerator in 2010, the numbers of the lung cancer patients receiving concomitant radiation and chemotherapy have increased rapidly at the Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital. It should be noted that the extension of the survival occurs on the account

of an increased toxicity, and the patient selection and the supportive therapy play a crucial role during the treatment. The author of the Doctoral Thesis has analysed toxicity and efficacy data available for 37 lung cancer patients who received concomitant radiation and chemotherapy at the Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital between years 2011 and 2014. The data were presented during the 6th Baltic Oncology Congress in 2014.

Only limited stage (with no distant metastases) or extensive stage (with distant metastases) was evaluated as a prognostic patient survival time factor in the Doctoral Thesis. Limited small cell lung cancer is a heterogeneous disease which includes an early stage disease with an isolated, operable lung tumour with no metastases in the mediastinal lymph nodes and any distant organs (TNM stage I-II) and also locally advanced disease with an inoperable primary tumour or metastases in the mediastinal lymph nodes and no metastases in any distant organs (TNM stage III). Although stage I-II SCLC is found in only approximately 15% of patients (Salem et al., 2019), one of the potential limitations in this study is the lack of an analysis of limited-stage SCLC patient subgroups based on the TNM classification – namely, the influence of stages I, II and III on the survival. 3 of the study patients in the early limited-stage disease group underwent radical operative therapy – 1 pneumonectomy, 1 lobectomy, and 1 marginal resection of lung.

4.2. Expression of Hedgehog Pathway Associated Genes as a Prognostic Factor in Small Cell Lung Cancer

When planning the treatment tactics for SCLC patients, a very important addition to the prognostic clinical factors would be evaluation of the parameters associated with the molecular biology of the tumour, which might influence the course of the disease and the response to the treatment. Currently, only immunohistochemical assessment of the neuroendocrine markers (CD56, synaptophysin, chromogranin A) during histological examination can be used in the routine practice, and, based on their presence or absence on the cell surface, the disease can be classified as the “classical” or “variant” subtype. The variant subtype is primarily resistant to platinum-based chemotherapy and radiation therapy, and, therefore, with a much poorer prognosis. In 2019, the Rudin et al. group of researchers succeeded in finding a molecular basis for these distinct forms of SCLC not in the mutations of particular genes, but in the different expression levels of the specific transcription factors ASCL1 (*achaete-scute homologue 1*) and NeuroD1 (*neurogenic differentiation factor 1*). The classical type of SCLC had typically high levels of ASCL1 activity, whereas the variant type had high levels of NeuroD1 activity. Based on an evaluation of a prevailing expression of ASCL1, NeuroD1 and two additional relevant transcription regulators, YAP1 (*yes-associated protein 1*) and POU2F3 (*POU class 2 homeobox 3*), the researchers suggested that small cell lung cancer should

be divided into 4 molecular subtypes – SCLC-A, SCLC-N, SCLC-Y and SCLC-P (Rudin et al., 2019). The prognostic relevance of this molecular division has not been validated yet, it has also been suggested from other research teams that the molecular subtypes should be determined and grouped slightly differently (Baine et al., 2020, Wooten et al., 2019, Simpson et al., 2020). In any case, signals have been currently obtained regarding the potential biomarker role of various key transcription regulators that, in the future, might help individually tailor the treatment of SCLC patients depending on the specific vulnerability of the molecular subtype of their tumours (Poirier et al., 2020, Schwendenwein et al., 2021).

In this Doctoral Thesis, the author compared the mRNA expression of the major Hedgehog pathway target gene and the key transcription factor *Gli1* as well as other associated genes (*SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BM11*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) between the pre-treatment study tumour biopsy samples of the short-term survivor (OS \leq 9.6 months) and long-term survivor (OS $>$ 9.6 months) groups of stage III/IV SCLC patients. The mean *Gli1* expression values 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 pathway associated genes (*SMO*, *SUFU*, *PTCH1*, *HHIP*, *BCL2*, *BM11*, *ZEB1*, *ZEB2*, *N-MYC*, *Twist1*) are not statistically significantly different between the pre-treatment study tumour biopsy samples of the short-term and long-term survival patient groups.

The prognostic relevance of *Gli1* has been described in several studies and meta-analyses of breast cancer (Wang et al., 2017), gastric cancer (Jian-Hui et al., 2016), lung adenocarcinoma and squamous cell lung cancer (Berardi et al., 2014, Cui et al., 2017), hepatobiliary tumours, cervical cancer, rhabdomyosarcoma, colon cancer, ovary cancer, bladder cancer, oesophageal cancer, squamous cell head and neck cancer and pancreatic cancer (Cheng et al., 2016). Higher levels of *Gli1* expression were more commonly found in the advanced stages of the disease and was associated with an untoward prognosis. *Gli1* positivity did not correlate with a shorter survival time for intracranial tumours only. Right the opposite, lower levels of *Gli1* expression in glioblastoma cell nuclei were of a negative prognostic relevance (Kim et al., 2017). Regarding the prognostic role of *Gli1* for lung adenocarcinoma patients, there is a study which demonstrated a longer survival time in patients with *Gli1*-positive tumours (Kim et al., 2013). Only one study evaluating the prognostic role of the expression of the *Gli1*, *PTCH1*, *SHH* and *SMO* proteins in small cell lung cancer can be found for now. This study involved immunohistochemical examination of formalin-fixed, paraffin-embedded tumour biopsy samples from 36 extensive-stage SCLC patients and correlation of the data with patient survival. High levels of *Gli1*, *PTCH1*, *SHH* and *SMO* expression were found in 12 (33.3%), 5 (13.9%), 5 (13.9%) and 6 (16.7%) samples respectively. Increased expression of only Sonic

Hedgehog signal protein SHH was statistically significantly associated with poorer survival (Lim et al., 2019).

Small cell lung cancer is a specific malignancy with some commonly observed critical genetic and epigenetic alterations that cause ligand-independent activation of the Hedgehog signalling pathway and higher levels of Gli1 activity. Overexpression of *Gli1* may be caused by, for example, bi-allelic activation of the TP53 gene, which what has been observed in almost all of these cases of SCLC (Mazzà et al., 2013, George et al., 2015). Another commonly observed molecular aberration that causes activation of *Gli1* is inhibition of the NOTCH signalling pathway due to high expression of the DLK1 (*Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1*) ligand-independent inhibitor, which was observed in 77% of the 110 SCLC tumour samples. Inactivating gene mutations in NOTCH signalling pathway were also observed in 25% of these tumour samples (George et al., 2015). Neuroendocrine tumours and also small cell lung cancer typically have high levels of DLL3 (*Delta-like ligand 3*) expression. DLL3 is an inhibiting NOTCH ligand which facilitates endosomal/lysosomal degradation of both activating NOTCH transmembrane receptors and the activating membrane ligand DLL1 (Chapman et al., 2011, Serth et al., 2015). NOTCH signals reduce the expression of Gli1 via HES/HEY family proteins (Katoh and Katoh, 2009), therefore enhanced Gli1 functions are possible at reduced NOTCH activity. Additional studies demonstrated inhibition of the cell cycle, reduced tumour growth and metastatic potential as well as reduced neuroendocrine cell markers at NOTCH activation. Overall, this demonstrates the tumour suppressor properties of the NOTCH signalling pathway (Hassan et al., 2014). Deletion of tumour suppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), an endogenous inhibitor of AKT, may lead to excessive activation of the oncogenic PI3K/AKT/mTOR signalling pathway in small cell lung cancer cells with a secondary increased ligand-independent expression of GLI1 (Pietrobono et al., 2019). PTEN inactivating mutations are described in 10-18% of small cell lung cancer samples (Yokomizo et al., 1998). However, activating mutations or amplifications of other PI3K/AKT/mTOR signalling pathway components (*PIK3CA*, *AKT2*, *AKT3*, *RICTOR*, *mTOR*) are more commonly observed (Umemura et al., 2014, Ross et al., 2014).

The finding of this Doctoral Thesis with higher levels of *Gli1* expression in the long-term survival small cell lung cancer patients is potentially indicative of a lower burden of mutations and epigenetic aberrations and, therefore, maintenance of a high Gli1 activity that is typical in small cell lung cancer. As the numbers of genetic and epigenetic changes in the tumour cells increase, the initially high *Gli1* expression may lower and, accordingly, suggest a more aggressive course of the disease and resistance to the cancer therapy. The research demonstrated an increased expression of the Sonic Hedgehog signalling pathway key target gene *Gli1* as a potential positive prognostic biomarker of small cell lung cancer as opposed to its negative prognostic relevance in other tumours.

Given the small number of patients in the study, validation of the obtained results requires further research.

A substantial limitation in the Doctoral Thesis is the evaluation of gene expression on the mRNA level instead of the protein level. Quantitative mRNA data do not always reflect the actual protein expression due to the very short mRNA half-life, ribosome occupancy factor, and also possible post-transcriptional regulation (for example, due to MicroRNA induced translational repression or mRNA destabilization) (Payne, 2015).

Another potential drawback in this Doctoral Thesis is the inclusion of only locally advanced limited-stage (TNM stage III) and extensive-stage (TNM stage IV, i.e., SCLC with metastases in distant organs) patients in the analysis. This may be explained by the restricted options for fibrobronchoscopic tumour biopsy in early stage disease (TNM stage I-II) patients, where such biopsies are usually collected surgically.

The differences in the received treatment in the long-term and short-term survival groups of patients (Table 3.22) can be explained by a better response to the received chemotherapy in the long-term survival group – partial response in all of the 6 patients, as compared to 4 patients in the short-term survival group. Thus, subsequent radiation therapy could be used in more than a half of the patients, and also consolidating prophylactic cranial irradiation (PCI) in a half of the patients.

4.3. Comparison of Hedgehog Pathway Associated Gene Expression Between Matched Pre-treatment and Relapsed Biopsies

While reviewing the literature data, the author of the Doctoral Thesis found no publications regarding any studies of a similar design, and this part of the research may therefore be considered as the first report of a direct comparison between the expression of the Hedgehog pathway components and the associated genes in matched pre-treatment and relapsed biopsies from the same small cell lung cancer patient. Pre-clinical research of small cell lung cancer is mainly based on experiments with cell lines and xenografts due to limited availability of tumour samples (Hamilton et al., 2012). Data obtained *in vitro* do not always reflect the actual tumour situation *in vivo* because, in the process of making cell lines/xenografts from the cancer cells obtained from the patient, irreversible gene expression changes may occur in the latter (Daniel et al., 2009). With regard to the Hedgehog signalling pathway, there are studies which demonstrated considerably higher mean expression of *Gli1* in small cell lung cancer biopsies, as compared to that observed in cell lines (Pedersen et al., 2003, Vestergaard et al., 2006). An advantage of this Doctoral Thesis is that the mRNA expression of the Hedgehog signalling pathway genes was assessed in fresh tumour biopsies (*in vivo*).

2.9 times lower expression of the key Hedgehog signalling pathway activity marker *Gli1* was observed in the relapsed disease biopsy sample. However, the difference did not reach statistical significance ($p = 0.0529$).

A reduced expression of 6 Hedgehog pathway associated genes (*PTCH1*, *HHIP*, *N-MYC*, *ZEB2*, *Twist1* and *ZEB1*) was observed during relapse. Compared to the pre-treatment sample, the expression of these genes in the matched biopsies was respectively 2.6, 2.2, 1.9, 1.8, 1.2 and 1.1 times lower, also statistically insignificant (respectively $p = 0.4252$, $p = 0.1268$, $p = 0.2480$, $p = 0.1169$, $p = 0.1480$ and $p = 0.7595$), and 1.8 times lower expression was observed in the relapsed disease biopsy sample for the Gli activator *SMO*, without statistically significant difference ($p = 0.4111$).

Only the Hedgehog pathway inhibitor *SUFU* and two Shh inducible genes, the *BCL2* and *BM11*, showed a 0.8, 0.9 and 0.8 times higher expression in the Rel biopsy sample, as compared with the pre-treatment level. The increase was also not statistically significant, with respective $p = 0.3074$, $p = 0.7921$ and $p = 0.3822$.

Cancer stem cells may be the basis for the development or relapse of a malignant tumour and evolution of resistance. Many researchers have linked the altered activity of the Hedgehog signalling pathway with the functioning and survival of the normal lung neuroendocrine stem cells and, respectively, the stem cells of small cell lung cancer, thus making it the potential therapeutic target. Promising preclinical data were obtained that suggested a synergistic role between the canonical Hedgehog pathway inhibitors and chemotherapy in the chemo-resistant subpopulation of small cell lung cancer cells. However, no positive results were obtained in the clinical trial with the addition of SMO inhibitors (Vismodegib, LDE-225, BMS-833923 and LY2940680) in the treatment of small cell lung cancer patients.

A possible explanation for the failure might be a non-canonical activation of Hedgehog pathway associated signal proteins. An example of ligand-independent *Gli1* activation would be the overexpression of *Gli1* observed in TP53 deficiency. In a study with human medulloblastoma cell lines and *Ptc*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts, their exposure to DNA-damaging cytotoxic medications initially induced expression of p53 and subsequent downregulation of *Gli1* through its p53-dependent ubiquitination and degradation (Mazzà et al., 2013). This dependency may be crucial in small cell lung cancer where bi-allelic inactivation of *TP53* and *RB1* genes is observed in nearly all patients (George et al., 2015). Ligand-independent activation of the Hedgehog signalling pathway may also occur in the presence of activating mutations and amplifications in other signalling pathways (RAS-RAF-MEK or PI3K/AKT/mTOR). For instance, in studies with melanoma, prostate cancer and human glioma cells, oncogenic mutations of *H-RAS* or *N-RAS*, or *AKT1* potentiate the *Gli1* function by enhancing its transcriptional activity and nuclear localisation as well as reducing *SUFU*-dependent degradation (Stecca et al., 2007). *C-MYC* is also an oncogene

that may activate Gli1 independently from the ligands of the Hedgehog signalling pathway. It is commonly overexpressed in small cell and also non-small cell lung cancers (Wistuba et al., 2001). C-MYC directly binds to the *Gli1* promoter and activates its transcription. Neutralisation of C-MYC by small molecule inhibitors reduced the levels of *Gli1* mRNA and induced apoptosis in the experiments with Burkitt lymphoma cell lines (Yoon et al., 2013). Inhibition of the NOTCH signalling pathway is another commonly observed molecular mechanism for the activation of Gli1 in small cell lung cancer cells.

Given multiple potential ligand-independent interactions in association with the Hedgehog signalling pathway, lower levels of *Gli1* expression in a relapsed disease biopsy sample may reflect further dysregulation of various signalling pathways and/or epigenetic processes occurring in the tumour. In this case, accumulation of additional genetic/epigenetic changes in the tumour during the treatment decreases the initially high Gli1 levels, which is characteristic in small cell lung cancer and may be explained by a few critical molecular deviations, such as the frequently observed TP53 deficiency or reduced activity of the NOTCH signalling pathway.

A possible limitation in this part of the study might be the inclusion of primary resistant patient in the analysis. In one patient, his small cell lung cancer did not respond to the anticancer therapy, which might suggest that resistance-associated molecular changes were present already in the pre-treatment sample.

This Doctoral Thesis was the first attempt of resolving the lack of matched small cell lung cancer biopsies from the same patient in order to be able to study the changes in the cancer cells before the treatment and in the event of disease relapse/progression. Unfortunately, the fibrobronchoscopy procedure to obtain a sample of the progressing tumour was possible in only 5 out of the 20 patients, and both pre-treatment and relapsed samples were of good quality in only 3 of them. The main reasons for such a low re-biopsy rate were only extra-thoracic progression of the disease and refusal of the patients to undergo repeated invasive procedures. Problems were also caused by the small sizes of the tumour biopsy samples obtained during fibrobronchoscopies and the exclusion of a considerable part of the patients from the analysis due to the lack of cancer cells in the sample.

The study data suggest decreased activity of a majority of the Hedgehog signalling pathway components in the relapsed small cell lung cancer tissue. However, the difference did not reach statistical significance. Thus, activation of the Hedgehog signalling pathway might not be a universal mechanism for small cell lung cancer relapses and the development of resistance. A larger number of patients would be necessary to validate the results obtained in this study and implement them in clinical practice. A longer timeframe for the collection of small cell lung cancer biopsy samples or inclusion of additional sites in the tissue collection programme might be a solution to this issue.

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 signalling pathway components in relapsed small SCLC 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.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

Taking into account the most relevant prognostic clinical factors, i.e., patient gender, performance status and disease stage, is recommended while planning the treatment of small cell lung cancer patients.

PUBLICATIONS AND REPORTS ON THE TOPIC OF THE DOCTORAL THESIS

Scientific publications in the sources included in the international databases:

1. Kozirovskis, Viktors, Zandberga, Elina, 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).

Scientific articles in peer-reviewed sources published abroad:

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.

Presentations at international conferences:

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 (an oral report).

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 (an oral report).
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 (a stand report).
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> (an oral report).
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 (a stand report).
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 (an oral report).

ACKNOWLEDGEMENTS

This Doctoral Thesis would not be possible without the altruistic involvement of and support from many people. I would like to thank all of my colleagues involved in the research study and the patients in particular for their understanding and patience.

I am most grateful to my doctoral advisor, Prof. Gunta Purkalne, for her gentle, yet persistent, motivation, support and professional orientation. The active effort of Prof. Gunta Purkalne has not only facilitated the development of the medical oncology on the national level in Latvia, but also deeply influenced my personal growth.

I am truly thankful to my thesis research advisor, Prof. Uldis Vikmanis, for the opportunity to prepare and defend the Thesis under his guidance. Thank you for your patience and trust.

My special thanks to the lead researcher of the Latvian Centre of Biomedical Research and Studies, Associate Professor Aija Linē and molecular biologist Elina Zandberga for their invaluable support in the molecular genetic part of the project.

I am most grateful to the bronchoscopy specialist of Pauls Stradins Clinical University Hospital, Dr. Melita Magone, and the laboratory cytologist, Dr. Romalda Grigaliniča, for their accuracy and extra work with the study patients.

I am grateful to Professor Jānis Gardovskis and Professor Īzaks Rašals for their valuable advice and suggestions during the preparation of the Doctoral Thesis, and to Professor Valdis Pīrāgs for the constant encouragement and ideas in difficult moments during the preparation of the Thesis.

Thanks to my colleagues at the Oncology Clinic of Pauls Stradins Clinical University Hospital, Dr. Med. Aija Geriņa-Bērziņa, Dr. Med. Elīna Sīviņa, Dr. Linda Jurginauska, and Dr. Sigita Hasnere, for their support and ability to encourage when necessary. Thanks to the colleagues at Riga East Clinical University Hospital, Dr. Eva Vecvagare and Dr. Ieva Fleija, for their help in the recruitment of the patients for the study.

I am truly thankful to the Secretary of Promotion Council of University of Latvia – Assoc. Professor Līga Plakane for her practical guidance in the process of promotion.

Thanks to my family for the understanding and support. Special thanks to my spouse Signe for her input in the editing of this Thesis.

BIBLIOGRAPHY

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. CHENG, J., GAO, J. & TAO, K. 2016. Prognostic role of Gli1 expression in solid malignancies: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 6, 22184.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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., JOVANOVIĆ, D., KONTIC, M., WRIGHT, G. M., RUSSELL, P. A., SOLOMON, B., KOCH, I., LINDNER, M., MUSCARELLA, L. A., LA TORRE, A., FIELD, J. K., JAKOPOVIĆ, M., KNEZEVIĆ, 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-CEPEDES, 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.
15. HAMILTON, G., ULSPERGER, E., GEISSLER, 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
 19. HUBER, R. M. & TUFMAN, A. 2012. Update on small cell lung cancer management. *Breathe*, 8, 314.
 20. 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.
 21. 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.
 22. YOON, J. W., GALLANT, M., LAMM, M. L., IANNACCONI, S., VIEUX, K. F., PROYTCHIEVA, M., HYJEK, E., IANNACCONI, P. & WALTERHOUSE, D. 2013. Noncanonical regulation of the Hedgehog mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt lymphoma. *Mol Cancer Res*, 11, 604–15.
 23. 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.
 24. 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.
 25. KATOH, Y. & KATOH, M. 2009. 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-GsPKA signals. *Int J Oncol*, 35, 187–92.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. LEWIŃSKI, T. & ŻULAWSKI, M. 2003. Small cell lung cancer survival: 3 years as a minimum for predicting a favorable outcome. *Lung Cancer*, 40, 203–213.

30. 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.
31. MADDISON, P., GOZZARD, P., GRAINGE, M. J. & LANG, B. 2017. Long-term survival in paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology*, 88, 1334–1339.
32. 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.
33. 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.
34. PAYNE, S. H. 2015. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci*, 40, 1–3.
35. PASCA DI MAGLIANO, M. & HEBROK, M. 2003. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*, 3, 903–11.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. 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.

50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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, 313–7.
55. WISTUBA, II, GAZDAR, A. F. & MINNA, J. D. 2001. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol*, 28, 3–13.
56. 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.
57. 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.
58. ZELEN, M. 1973. Keynote address on biostatistics and data retrieval. *Cancer Chemother Rep* 3, 4, 31–42.

