

VILNIUS UNIVERSITY

RENATAS AŠKINIS

DNA repair system gene expression of the importance of providing patients with the IB - IIIA stages of non-small-cell lung cancer, post-operative treatment

Summary of Doctoral Dissertation
Biomedical Sciences, Medicine (06B)

Vilnius, 2017

The Doctoral Dissertation was prepared at Vilnius University in 2012-2016.

Scientific supervisor: Prof. dr. Saulius Cicėnas (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B)

Doctoral Dissertation will be defended at the Board of Medical Sciences of Vilnius University:

Chairman: prof. dr. Habil. Arvydas Ambrozaitis (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B)

Members:

prof. dr. Vytautas Jonas Sirvydis (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B)

prof. dr. Dainius Characiejus (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B)

dr. Violeta Kvedarienė (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06 B)

dr. Mirosław Kozłowski (Białystok Medical Academy, Poland, medicine)

The Dissertation will be defended at the public meeting of the Board of Medical Sciences of Vilnius University on 27th of September 2017 in the Hall of National Cancer Institute. Address: Santariskiu 1.

The summary of the Doctoral Dissertation has been sent on 27th of August, 2017.

The dissertation is available at the Library of Vilnius University (Universiteto str. 3, LT-01122, Vilnius, Lithuania).

Disertacija rengta 2012-2016 metais Vilniaus universitete.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Renatas Aškinis

**DNR taisymo sistemos genų raiškos svarba numatant pacientų, sergančių
IB – IIIA stadijų nesmulkialąsteliu plaučių vėžiu, pooperacinį gydymą**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06B)

Vilnius, 2017

Disertacija rengta 2012 – 2016 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinikoje.

Mokslinis vadovas – prof. dr. Saulius Cicėnas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B).

Disertacija ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje:

Pirmininkas: prof. habil. dr. Arvydas Ambrozaitis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Nariai:

prof. habil. dr. Vytautas Jonas Sirvydis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

prof. dr. Dainius Characiejus (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

dr. Violeta Kvedarienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

dr. Mirosław Kozłowski (Bialystoko medicinos akademija, Lenkija, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Disertacija bus ginama viešame Vilniaus universiteto Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 rugsėjo 27 d. Nacionalinio Vėžio instituto auditorijoje. Adresas: Santariškių 1, Vilnius LT-08660).

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2017 m. rugpjūčio 27 dieną.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje (Universiteto g. 3, LT-01122, Vilnius, Lietuva) ir VU interneto svetainėje adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

ABBREVIATIONS

DNA: deoxyribonucleic acid

ECG: electrocardiogram

ERCC1: Excision Repair Cross-Complementing Group 1

G1: well-differentiated tumour

G2: moderately-differentiated tumour

G3: poor-differentiated tumour

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer

NCI: National Cancer Institute

PE: Platinum based chemotherapy with Etoposide

RRM1: Ribonucleoside-Diphosphate Reductase Subunit M1

TNM (Tumor, Node, Metastasis): cancer staging notation system

VUOI: Institute of Oncology, University of Vilnius

INTRODUCTION

The lung cancer morbidity rates in Lithuania and worldwide are on the rise. Lithuania is third in Europe based on lung cancer morbidity rates, and highest morbidity rates are observed in the Northern America and Northern and Western Europe. The mortality rate of lung cancer among men in Lithuania is as high as 80.4 in 100,000 residents and makes it a leading cause among cancer deaths in Lithuania; respectively, women make 16.0 in 100,000 residents and place fourth. The five-year survival rate of patients irrespective of treatment in Lithuania makes 9% of cases while worldwide it's 15% to 20% of cases. The modern treatment such as radical surgery and adjuvant chemotherapy has reached its limits, i.e. irrespective of drug combinations and their composition, treatment efficacy is only 20%. Tumour progression and resistance to treatment are two biggest barriers to the improvement of treatment outcomes of non-small cell lung cancer. Since majority of chemotherapy drugs affect DNA, scientific research is targeted at finding markers tied to DNA stability and DNA damage repair system. Mutations are harmful to DNA chains thus DNA damage repair systems are vital to survival. After analysing already completed clinical trials including ERCC1 and RRM1 genes, treatment based on their expression levels and positive results obtained, and after taking into consideration the controversial data obtained from these trials, additional molecular research is needed to establish gene expression of DNA damage repair system. This would allow to plan molecular tumour testing and personalized post-operative treatment of cancer patients by choosing chemotherapy as optimum treatment regimen in case of cancer progression to ensure best treatment outcomes and predicting potential further course of disease.

AIM OF THE STUDY

To evaluate the significance of expression and polymorphism of DNA damage repair system ERCC1 and RRM1 genes in a tumour, blood and bronchial mucus, to plan post-operative treatment for patients with IB to IIIA stage (1aN0-1M0, T1bN0-1M0, T2aN0-1M0, T2bN0-1M0, T3N0-1M0 and T1a-3N2(isolated)M0) non-small cell lung cancer and to predict potential cancer progression or relapse.

OBJECTIVES OF THE STUDY

1. To evaluate the impact of ERCC1 and RRM1 expression on time to progression or relapse after post-operative chemotherapy in patients with early-stage non-small cell lung cancer.
2. To evaluate the prognostic significance of ERCC1 and RRM1 expression after post-operative chemotherapy and for better response to treatment.
3. To examine ERCC1 and RRM1 polymorphisms (ERCC1 codon 118 and RRM1 -37A→C and -524C→T) in blood, bronchial mucus and tumour in patients with non-small cell lung cancer in terms of likeliness of cancer progression.

SCIENTIFIC NOVELTY AND PRACTICAL BENEFITS OF THE STUDY

Analysis and evaluation of DNA damage repair system gene expression in a tumour, blood and bronchial mucus would allow to plan personalized post-operative treatment for patients and also treatment after cancer progression. Publications of previous clinical trials with inclusion of ERCC1 and RRM1 genes and using their expressions to choose treatment regimen claim positive treatment results. Nevertheless, data obtained from these trials on ERCC1 and RRM1 expressions in tumour and blood and their polymorphisms is rather controversial, and there are no research on the expression of those genes in bronchial mucus. No ERCC1 and RRM1 gene expression evaluations has been performed in Lithuania before. Therefore, for choosing an optimum treatment regimen it is important to evaluate ERCC1 and RRM1 gene expressions. Study into the DNA damage repair system with ERCC1 and RRM1 expression identification and analysis of the results should help to improve personalized post-operative treatment of patients, make cancer progression mechanisms related to potential resistance to adjuvant chemotherapy and post-treatment progression of non-small cell lung cancer clearer and chose more accurate personalized treatment regimen based on the expression of the above genes. This would allow to improve treatment outcomes, i.e. to prolong overall survival or time to progression, and to plan an adequate treatment in case of progression.

METHODS

The study was carried out at the Clinic of Internal Diseases, Family Medicine and Oncology of the Faculty of Medicine of the University of Vilnius. There were 80 patients enrolled in the study who contacted the National Cancer Institute (NCI), were treated at the Department of Surgery and Oncology and then monitored at the consultation clinic of the NCI.

The study protocol was assessed and approved by Vilnius Regional Biomedical Research Ethics committee on 08/05/2012 No. 158200-05-455-141 (Appendix I) with a supplement dated 03/07/2012 No. 158200-455-PP1-22 (Appendix II). It's a perspective, exploratory study on patients who had their first occurrence of IB to IIIA stage non-small cell lung cancer in years 2012-2015 and were seeking treatment at NCI (known as the Institute of Oncology of the University of Vilnius at the beginning of the study). A total of 80 patients were enrolled in the study. Upon admission patients were subject to complete outpatient or inpatient physical examination (blood tests, urine tests, ECG, pulmonary function test, bronchial endoscopy, imaging (radiology) tests (chest x-ray and/or CAT scan), ultrasound). Only those patients were enrolled in this study who were tested using the 7th edition of lung cancer TNM staging approved by IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) in 2009 and whose treatment could be started with surgery. The patients had to sign a consent to take part in the study "The importance of DNA repair system gene expression in planning post-operative treatment for patients with IB to IIIA stage non-small cell lung cancer". The scope of surgery was chosen individually for each patient based on location of cancerous process and its spread. Such lung resections as anatomical segmentectomy, lobectomy or pneumonectomy were performed. Extended lymphadenectomy (lymph node dissection) was performed on all patients. After surgically removing a tumour, a pathologist would microscopically identify the tumour in a sample and would take its fragment while venous blood and bronchial mucus samples were taken in the surgery room. All this material was collected with a purpose of establishing ERCC1 and RRM1 expression and polymorphism in the samples. After radical surgery, all patients received post-operative platinum-based adjuvant chemotherapy with Etoposide. All study participants received 4

courses of adjuvant chemotherapy. After 4 courses of adjuvant chemotherapy (4 months after surgical treatment) each patient had their blood drawn from a vein to establish ERCC1 and RRM1 expression. Patients with no cancer progression were subject to monitoring, and 1 year after surgery those patients had their blood drawn from a vein again to obtain ERCC1 and RRM1 expression values. If cancer progression was observed during monitoring phase, patients received secondary chemotherapy and/or radiation therapy and had their blood drawn from a vein to establish ERCC1 and RRM1 expression. The following data was collected and evaluated during the study: patient's life history and case history (age, duration of smoking), tumour histological type, tumour differentiation grade, survival rate until cancer progression, ERCC1 and RRM1 gene expression at the start of anticancer treatment and after the completion of adjuvant treatment (4 months after surgery) and 1 year after surgery or if cancer progression was detected. Changes in ERCC1 and RRM1 expression and polymorphisms were compared to the course of disease and response to treatment.

RESULTS

Study participants (n=80) were grouped based on their sex, age, smoking status, tumour localisation, tumour morphology, tumour differentiation grade, stage of cancer, tumour size, damage to lymphatic system, surgery type, course of disease, post-operative and post-chemotherapy complications (Table 1).

Table 1. Patients according to clinical characteristics

Parameter	Number of patients n (%)
Gender	
Men	74 (92)
Women	6 (8)
Age	
≤ 63 years	40 (50)
> 63 years	40 (50)
Smoking	
Smoker	71 (89)
Dont smoker	9 (11)
Tumour lokalization	
Central tumour	25 (31)
Peripheral tumour	55 (69)
Tumour Histology	
Adenocarcinoma	31 (39)
Squames cell carcinoma	49 (61)
Tumour differentiation grade	
G1	6 (8)
G2	24 (30)
G3	50 (62)
Stage	
IB stage	30 (37)
IIA stage	24 (30)
IIB stage	12 (15)
IIIA stage	14 (18)
Tumour size	
T1A	2 (2)
T1B	6 (8)
T2A	45 (56)
T2B	11 (14)
T3	15 (19)
T4	1 (1)
Limphnodes	
N0	46 (58)
N1	25 (31)
N2	9 (11)
Operation type	
Bilobectomy	3 (4)
Lobectomy	54 (67)
Pneumonectomy	16 (20)
Segmentectomy	7 (9)
Disease progress	
Progress	16 (20)
Stable disease	64 (80)
Postoperative complication	
Pneumonia	2 (2)
Air leak	5 (6)
Wound hematoma	3 (4)
Complications after chemotherapy	
I-II grade nausea	60 (75)
I-II grade leukocitopenia	8 (10)

Male patients formed the largest group of patients (92%). Based on age the patients were grouped in 2 groups, 40 patients each: ≤ 63 years and > 63 years. Almost 90% of the patients had been smoking in the past. Peripheral tumour was identified in 69% of patients. Adenocarcinoma (39%) or squamous cell carcinoma (SCC) (61%) were distinguished morphologically. Poor-differentiated (G3) carcinoma was diagnosed in 62% of patients. IB and IIA stage non-small cell lung cancer was diagnosed in 67% of patients. T2A tumours were confirmed in 56% of patients. In 31% and 11% of patients the tumour has spread into N1 and N2 level lymph nodes respectively while in 58% of patients' lymph nodes were not damaged. The scope of the surgery was decided after evaluating the size and location of tumour: lobectomy, pneumonectomy, anatomical segmentectomy was performed respectively on 67%, 20% and 9% of patients while only 3 patients (4%) received bilobectomy. After the treatment cancer progression was observed in 20 patients (25%) while remission was observed in the rest of the patients. When starting post-operative chemotherapy after radical surgery, 10 patients (12%) experienced post-operative complications that did not contribute to longer hospitalisation and were treated conservatively, without additional surgical intervention and posing no danger to further post-operative therapy. During post-operative chemotherapy 68 patients (83%) experienced grade I to II non-life threatening complications thus no need to interrupt the treatment. The low and high values of ERCC1 and RRM1 expressions were clustered with the most widely used K-Means clustering algorithm. Statistically significant more common low RRM1 expression in tumour was observed in case of absence of metastasis to regional lymph nodes ($p=0.047$). The correlation between ERCC1 expression in tumour and tumour localisation was very weak but statistically significant. Likelihood to observe low ERCC1 expression in tumour is higher with peripheral tumour diagnosis ($r=0.187$, $p=0.049$). Also, a weak reverse correlation was observed between ERCC1 expression in tumour and histological type of tumour ($r=-0.202$, $p=0.036$). Likelihood to observe high ERCC1 expression in tumour decreases in case of adenocarcinoma. Analysis of cancer progression using Kaplan-Meier method demonstrated that only RRM1 expression in tumour is related to progression depending on tumour size. In patients with T1B tumour and

low RRM1 expression in tumour time to progression was longer in comparison to patients with the same size tumour and high RRM1 expression (Table 2).

Table 2. Probability of progression according to the expression of ERCC1 and RRM1 in tumour.

Parameter	ERCC1 expression in tumour	RRM1 expression in tumor
	p (log-rank)	
Gender		
Male	0,665	0,552
Women	–	–
Age		
≤ 63 years	0,717	0,385
>63 years	0,635	0,102
Smoking		
Smoker	0,816	0,776
Dont smoker	0,580	–
Tumour localization		
Central tumour	0,644	0,416
Peripheral tumour	0,491	0,624
Tumour Histology		
Adenocarcinoma	0,821	0,743
Squames cell carcinoma	0,886	0,589
Tumour differentiation grade		
G1	–	–
G2	0,137	0,472
G3	0,807	0,838
Stage		
IB	0,194	0,719
IIA	0,185	0,588
IIB	0,188	0,727
IIIA	0,689	0,203
Tumor size		
T1A	–	–
T1B	–	0,025
T2A	0,437	0,570
T2B	0,136	0,464
T3	0,313	0,549
T4	–	–
Lymphnodes		
N0	0,248	0,902
N1	0,473	0,995
N2	–	0,372

A statistically significant correlation between the course of disease and ERCC1 expression in blood ($p=0.023$) was observed, i.e. low expression was more common when the course of disease was stable. The correlation analysis demonstrated very weak reverse correlation ($r=-0.192$, $p=0.044$) between smoking and ERCC1 expression in blood (high ERCC1 expression is more common in smokers), very weak reverse correlation ($r=-0.197$, $p=0.04$) between the differentiation grade of tumour and ERCC1 expression in blood (more common low ERCC1 expression with well-differentiated carcinoma), and weak reverse correlation ($r=-0.254$, $p=0.011$) between the course of disease and ERCC1 expression in blood (more common high ERCC1 expression with the stable course of disease). Analysis of cancer progression using Kaplan-Meier method demonstrated that ERCC1 expression in blood is correlated to patients younger than 63 years when time to progression is shorter with high ERCC1 expression. Also, in patients with peripheral tumours and low ERCC1 expression time to progression is shorter in comparison to patients with non-small cell lung cancer and high ERCC1 expression. Similar correlation was observed between T1B and T2A tumours and ERCC1 expressions in blood: faster cancer progression is more likely with high expression in patients with T1B size tumour or with low expression in patients with T2A tumour (table 3).

Table 3. Probability of progression according to the expression of ERCC1 and RRM1 in blood.

Parameter	ERCC1 expression in blood	RRM1 expression in blood
	p (log-rank)	
Gender		
Men	0,063	0,149
Women	0,157	0,655
Age		
≤ 63 years	0,014	0,789
>63 years	0,803	0,110
Smoking		
Smoker	0,054	0,231
Dont smoker	–	0,510
Tumour localization		
Central tumour	0,565	0,998
Peripheral tumour	0,022	0,120
Tumour Histology		
Adenocarcinoma	0,123	0,256
Squames cell carcinoma	0,112	0,354
Tumour differentiation grade		
G1	0,352	0,502
G2	0,224	0,400
G3	0,116	0,343
Stage		
IB	0,119	0,178
IIA	0,146	0,800
IIB	0,583	0,513
IIIA	0,073	0,230
Tumour size		
T1A	–	–
T1B	0,025	0,157
T2A	0,041	0,276
T2B	0,202	–
T3	0,562	0,153
T4	–	–
Lymphnodes		
N0	0,168	0,156
N1	0,154	0,995
N2	0,164	0,372

There is no statistically significant distribution between ERCC1 and RRM1 expressions in bronchial mucus and clinical characteristics of patients. A statistically significant correlation between ERCC1 and RRM1 expressions in bronchial mucus and clinical characteristics of the patients was established by correlation analysis. Analysis of cancer progression using Kaplan-Meier method demonstrated that ERCC1 and RRM1 expression is not correlated to clinical characteristics of patients (Table 4).

Table 4. Probability of progression according to the expression of ERCC1 and RRM1 in bronchial mucus.

Parameter	ERCC1 expression in bronchial mucus	RRM1 expression in bronchial mucus
	p (log-rank)	
Gender		
Men	0,381	0,328
Women	–	0,655
Age		
≤ 63 years	0,342	0,356
>63 years	0,955	0,813
Smoking		
Smoker	0,496	0,474
Dont smoker	–	0,510
Tumour localization		
Central tumour	0,400	0,290
Peripheral tumour	0,577	0,640
Tumour Histology		
Adenocarcinoma	0,442	0,444
Squames cell carcinoma	0,531	0,904
Tumour differentiation grade		
G1	–	0,820
G2	0,945	0,415
G3	0,328	0,628
Stage		
IB	0,433	0,710
IIA	0,733	0,667
IIB	0,573	–
IIIA	–	0,876
Tumour size		
T1A	–	–
T1B	–	0,655
T2A	0,469	0,607
T2B	0,853	0,644
T3	0,911	0,197
T4	–	–
Lymphnodes		
N0	0,429	0,500
N1	0,473	0,367
N2	–	0,707

A statistically significant distribution between the stage of disease and ERCC1 expression in blood 12 months after the start of treatment (p=0.033) was observed, i.e. low expression was more common at early stages of disease when compared to high expression. Also, a statistically significant distribution between the stage of disease and ERCC1 expression in blood 4 months after the start of treatment (p=0.0331) and ERCC1 expression in blood 12 months after the start of treatment (p=0.016) was observed, i.e. low expression was more common when the course of disease was stable in comparison with high expression.

The correlation analysis demonstrated weak correlation ($r=0.203$, $p=0.036$) between tumour differentiation grade and ERCC1 expression in blood 4 months after the start of treatment (low ERCC1 expression is more common at a lower grade of tumour differentiation), weak reverse correlation ($r=-0.334$, $p=0.002$) between the stage of disease and ERCC1 expression in blood 12 months after the start of treatment (more common high ERCC1 expression at early stages of disease), and weak reverse correlation ($r=-0.213$, $p=0.035$) between the condition of lymph nodes and ERCC1 expression in blood 12 months after the start of treatment (more common high ERCC1 expression with no damage to lymph nodes). Also, a weak reverse correlation was observed between the course of disease and ERCC1 expression in blood 4 months ($r=-0.404$, $p=0.001$) and 12 months ($r=-0.281$, $p=0.008$) after the start of treatment (high ERCC1 expression when the course of disease is stable). Analysis of cancer progression using Kaplan-Meier method demonstrated that in women with low ERCC1 expression in blood 4 months and 12 months after the start of treatment time to progression was shorter. The same was observed in patients under 63 years, i.e. time to progression was shorter with lower ERCC1 expression. In patients with T2A tumour and low ERCC1 expression after 4 and 12 months, time to progression was shorter in comparison to patients with non-small cell lung cancer and high ERCC1 expression. Also, in case of N1 pathology, shorter time to progression is observed with lower ERCC1 expression 4 months after the start of treatment (Table 5).

Table 5. Probability of progression according to the expression of ERCC1 after 4 and 12 months.

Parameter	ERCC1 expression after 4 months	ERCC1 expressions after 12 months
	p (log-rank)	
Gender		
Men	0,147	0,460
Women	0,025	0,025
Age		
≤ 63 years	0,031	0,220
>63 years	0,625	0,747
Smoking		
Smoker	0,052	0,317
Dont smoker	–	–
Tumour localization		
Central tumour	0,562	0,782
Peripheral tumour	0,094	0,208
Tumour Histology		
Adenocarcinoma	0,196	0,554
Squames cell carcinoma	0,077	0,127
Tumour differentiation grade		
G1	–	–
G2	0,218	0,223
G3	0,111	0,661
Stage		
IB	0,104	0,104
IIA	0,065	0,337
IIB	0,696	0,412
IIIA	0,203	0,179
Tumor size		
T1A	–	0,317
T1B	–	–
T2A	0,006	0,004
T2B	–	0,432
T3	0,929	0,210
T4	–	–
Lymphnodes		
N0	0,710	0,507
N1	0,041	0,278
N2	0,372	0,212

A statistically significant distribution between the course of disease and RRM1 expression in blood 4 months after the start of treatment ($p=0.001$) and RRM1 expression in blood 12 months after the start of treatment ($p=0.001$) was observed, i.e. low expression was more common when the course of disease was stable in comparison to high expression. The correlation analysis demonstrated a weak reverse correlation ($r=-0.205$, $p=0.035$) between age and RRM1 expression in blood 4 months after the start of treatment (high RRM1 expression is more common at a younger age) and weak correlation ($r=0.200$, $p=0.045$) between age and RRM1 expression in blood 12 months after the start of treatment (low RRM1 expression is more common at a younger age). Also, a weak reverse correlation ($r=-0.367$, $p=0.001$) between the course of disease and RRM1 expression in blood 4 months after the start of treatment (high RRM1 expression is more common when the course of disease is stable) and weak correlation ($r=0.473$, $p=0.001$) between the course of disease and RRM1 expression in blood 12 months after the start of treatment (low RRM1 expression is more common when the course of disease is stable) was observed. Analysis of cancer progression using Kaplan-Meier method demonstrated that in male patients time to progression was shorter with low RRM1 expression in blood 4 months and 12 months after the start of treatment. In patients under 63 years with low RRM1 expression time to progression was shorter. The same was observed in patients under 63 years with low RRM1 14 and 12 months after the start of the treatment, i.e. time to progression was shorter. In smokers low RRM1 expression after 4 and 12 months was correlated to shorter time to progression. Shorter time to progression was also observed in patients with peripheral tumours and low RRM1 expression after 4 and 12 months. In patients with squamous cell carcinoma (SCC) and low RRM1 expression, shorter time to progression was observed irrespective of treatment duration while in case of adenocarcinoma with low RRM1 expression cancer progression manifested only after 12 months. In patients with G2 tumour with low RRM1 expression after 4 and 12 months, time to progression is shorter compared to high expression while in those with G3 tumour and low RRM1 expression after 12 months the progression would be faster. In patients with IIA stage non-small cell lung cancer and low RRM1 expression after 4 months likeliness of cancer progression is higher than in those with high RRM1 expression in blood.

While in patients with IB, IIA and IIIA stage non-small cell lung cancer and low RRM1 expression after 12 months likelihood of cancer progression is higher than in those with high RRM1 expression. In patients with T2A tumour cancer progression would be more common with low RRM1 expression after 12 months as well as in those with no damage to lymph nodes as compared to patients with non-small cell lung cancer and high RRM1 expression (Table 6).

Table 6. Probability of progression according to the expression of RRM1 after 4 and 12 months.

Parameter	RRM1 expression after 4 months	RRM1 expression after 12 months
	p (log-rank)	
Gender		
Men	0,013	0,001
Women	0,157	0,157
Age		
≤ 63 years	0,079	0,005
>63 years	0,031	0,033
Smoking		
Smoker	0,007	0,001
Dont smoker	0,510	0,475
Tumour localization		
Central tumour	0,210	0,149
Peripheral tumour	0,015	0,002
Tumour Histology		
Adenocarcinoma	0,052	0,007
Squames cell carcinoma	0,017	0,007
Tumour differentiation grade		
G1	–	–
G2	0,027	0,030
G3	0,116	0,008
Stage		
IB	0,433	0,046
IIA	0,015	0,044
IIB	0,480	0,535
IIIA	0,063	0,024
Tumour size		
T1A	–	–
T1B	0,655	0,617
T2A	0,087	0,003
T2B	0,079	–
T3	0,168	0,202
T4	–	–
Lymphnodes		
N0	0,143	0,046
N1	0,055	0,059
N2	0,164	0,075

There is no statistically significant distribution between ERCC1 (codon 118 C/T) polymorphism in blood and clinical characteristics of patients. A statistically significant distribution was observed between differentiation grade of tumour and RRM1 ($p=0.05$) polymorphic variants. In case of G1 differentiated tumour, CC variant was common, while with G2 and G3 differentiated tumour CA polymorphism was more common. Also, a statistically significant distribution of polymorphic variants between stages of cancer was observed; CA polymorphism is more common in IB, IIB and IIIA stages while CC polymorphism is more common in IIA stage cancer ($p=0.002$). A statistically significant distribution was also observed between smoking and RRM1 ($p=0.028$) polymorphic variants. In smokers, C/T polymorphism is the most common. The correlation analysis demonstrated weak reverse correlation between smoking and RRM1 (-37A→C) polymorphism ($r=-0.211$, $p=0.030$) and (-524C→T) polymorphism ($r=-0.238$, $p=0.017$), and very weak correlation between tumour localisation and RRM1 (-524C→T) polymorphism ($r=0.197$, $p=0.040$). Also, a weak reverse correlation was observed between differentiation grade of tumour and RRM1 (-37A→C) polymorphism ($r=0.258$, $p=0.010$), and a weak correlation between cancer stage and ERCC1 (codon 118 C/T) polymorphism ($r=0.214$, $p=0.029$). A weak correlation was observed between the condition of lymph nodes and ERCC1 (codon 118 C/T) polymorphism ($r=0.191$, $p=0.046$), and a weak correlation between the condition of lymph nodes and RRM1 (-37A→C) polymorphism ($r=0.211$, $p=0.030$). Analysis of cancer progression using Kaplan-Meier method demonstrated that with ERCC1 (codon 118 C/T) polymorphism in blood time to progression in patients under 63 years is shorter than that with CT variant. The same was observed with RRM1 (-37A→C) polymorphism and T3 tumour with CA variant and RRM1 (-524C→T) polymorphism with CT variant with damaged N2 lymph nodes (Table 7).

Table 7. Probability of progression according to the polymorphism of ERCC1 codon 118 C/T, RRM1 -37A→C and RRM1-524C→T.

Parameter	ERCC1 (118 codon C/T) polymorphism	RRM1 (-37A→C) polymorphism	RRM1 (-524C→T) polymorphism
	(p log-rank)		
Gender			
Men	0,281	0,440	0,130
Women	0,607	0,317	0,480
Age			
≤ 63 years	0,035	0,905	0,506
>63 years	0,974	0,606	0,108
Smoking			
Smoker	0,250	0,954	0,169
Dont smoker	0,241	0,078	0,212
Tumour localization			
Central tumour	0,412	0,663	0,185
Peripheral tumour	0,280	0,679	0,107
Tumour Histology			
Adenocarcinoma	0,141	0,482	0,346
Squames cell carcinoma	0,168	0,986	0,396
Tumour differentiation grade			
G1	0,393	0,762	0,416
G2	0,389	0,150	0,504
G3	0,051	0,907	0,171
Stage			
IB	0,409	0,469	0,403
IIA	0,325	0,324	0,752
IIB	0,683	0,105	0,542
IIIA	0,070	0,953	0,091
Tumour size			
T1A	-	-	-
T1B	0,317	0,480	0,480
T2A	0,347	0,845	0,499
T2B	0,138	0,330	0,653
T3	0,146	0,006	0,283
T4	-	-	-
Lymphnodes			
N0	0,430	0,531	0,265
N1	0,419	0,469	0,682
N2	0,940	0,815	0,033

Multi-factor analysis using Cox Proportional Hazards Regression Analysis was carried out to find out what factors have the most influence on cancer progression in patients with non-small cell lung cancer. This analysis was taking into consideration patient's clinical characteristics and ERCC1 expression in tumour, blood and bronchial mucus; RRM1 expression in tumour, blood and bronchial mucus; and ERCC1 (codon 118 C/T) polymorphism, RRM1 (-37A→C) polymorphism and RRM1 (-524C→T) polymorphism.

The results of the study demonstrate that ERCC1 expression in blood after 4 months, RRM1 expression in blood after 12 months and RRM1 (-524C→T) polymorphism are independent prognostic factors for survival of patients with non-small cell lung cancer while other factors had no influence on the survival. The obtained data demonstrates that ERCC1 and RRM1 expression in patients with non-small cell lung cancer is related to clinical pathological characteristics of patients and might be an independent prognostic factor with regards to course of the disease (Table 8).

Table 8. Multivariate analysis of the factors affecting the survival of patients with non-small cell lung cancer

Parameter	Risk Ratio	95% PI	p
Gender	0,629	0,326 - 1,212	0,166
Age	0,107	0,506 - 1,069	0,107
Smoking	0,651	0,392 - 1,082	0,098
Tumour localisation	0,814	0,559 - 1,187	0,286
Tumour Hystology	1,128	0,997 - 1,276	0,055
Tumour differentiation grade	0,983	0,723 - 1,336	0,911
Stage	1,082	0,850 - 1,378	0,522
Tumour size	0,991	0,821 - 1,196	0,925
Lymphnodes	0,988	0,759 - 1,287	0,929
<i>ERCC1</i> expression in tumour	1,020	0,957 - 1,086	0,546
<i>RRM1</i> expression in tumour	0,990	0,925 - 1,058	0,762
<i>ERCC1</i> expression in blood	0,925	0,715 - 1,197	0,554
<i>RRM1</i> expression in blood	0,934	0,759 - 1,149	0,517
<i>ERCC1</i> expression in bronchial mucus	0,958	0,827 - 1,109	0,563
<i>RRM1</i> expression in bronchial mucus	1,005	0,906 - 1,115	0,927
<i>ERCC1</i> expression in blood after 4 months	0,733	0,573 - 0,938	0,013
<i>ERCC1</i> expression in blood after 12 months	0,850	0,688 - 10,049	0,131
<i>RRM1</i> expression in blood after 4 months	0,678	0,491 - 0,937	0,019
<i>RRM1</i> expression in blood after 12 months	0,678	0,483 - 0,952	0,025
<i>ERCC1</i> (118 codon C/T) gene polymorphism	0,931	0,703 - 1,234	0,620
<i>RRM1</i> (-37A→C) gene polymorphism	1,291	0,928 - 1,798	0,130
<i>RRM1</i> (-524C→T) gene polymorphism	1,363	1,023 - 1,816	0,035

CONCLUSION

1. Shorter time to cancer progression or relapse after treatment (radical resection and 4 post-operative courses of adjuvant platinum-based chemotherapy with Etoposide) is directly related only to high ERCC1 and RRM1 expression in blood after post-surgical treatment.

2. Low ERCC1 and RRM1 expression in blood after post-operative chemotherapy is directly related to better prognosis of disease and better response to post-operative treatment.

3. Only *RRM1* (-524C→T) polymorphism in blood is related to cancer progression after post-operative chemotherapy.

RESEARCH PUBLICATIONS AND PRESENTATIONS

- Diana Schveigert, Saulius Cicenias, Jaroslav Bublevic, Renatas Askinis, Virginijus Sapoka, Janina Didziapetriene “The role of genetic and other biomarkers in NSCLC prognosis”. Central European Journal of Medicine. Cent. Eur. J. Med. • 9(3) • 2014 • 382-390 DOI: 10.2478/s11536-013-0290-2
- Renatas Aškinis, Arnoldas Krasauskas, Sigitas Zaremba, Saulius Cicėnas, Ankstyvųjų stadijų nesmulkiąstelio plaučių vėžio chirurginio gydymo rezultatai [Surgical treatment outcomes of early-stage non-small cell lung cancer]. LIETUVOS CHIRURGIJA 2016, 15 (2-3), p. 84-89; ISSN 1392-0995
- R. Aškinis, D. Schveigert, S. Cicenias. Implication of DNA repair system genes expression and polymorphisms in resected NSCLC. 6th Baltic Congress of Oncology “Multidisciplinary approach in Baltic State”. 03-04/10/2014, Vilnius, Lithuania. The book of abstract, 2014:16.
- Renatas Aškinis, Saulius Cicėnas, Pooperaciniai DNR taisymo sistemos genų raiškos tyrimai ligoniams, sergantiems ankstyvųjų stadijų nesmulkiąsteliu plaučių vėžiu [Post-operative examinations of DNA repair system gene expressions in patients with early-stage non-small cell lung cancer]. Bendrosios praktikos Lietuvos gydytojo priedas [Appendix for Lithuanian General Practitioners] 2015; ISBN 1392-3218.

- R. Aškinis. VIII-a Lietuvos ERS (European Respiratory Society) narių konferencija [The 8th Conference of Lithuanian ERS Members). “Intervencinės pulmonologijos ir alergologijos naujovės 2014” [Latest Developments in Interventional Pulmonology and Alergology 2014]. Rusnė, 6-7 June, 2014. Presentation “Post-operative examinations of expressions and polymorphisms of DNA repair system genes patients with early-stage lung cancer”.
- R. Aškinis. The 8th Convention of Oncologists and Radiologists of CIS countries. Russia, Kazan, 16-18/09/2014. Presentation “Examinations of expressions and polymorphisms of DNA repair system genes patients with early-stage lung cancer”.
- R. Aškinis, D. Schveigert, S. Cicenas. Implication of DNA repair system genes expression and polymorphisms in resected NSCLC. 6th Baltic Congress of Oncology “Multidisciplinary approach in Baltic State”. 03-04/10/2014, Vilnius, Lithuania.
- R. Aškinis. The 17th Convention of the Lithuanian Association of Chest and Heart Surgeons. Kaunas, 16/10/2015. Presentation “Post-operative examinations of DNA repair system gene expressions in patients with early-stage non-small cell lung cancer”.

SUMMARY IN LITHUANIAN

SANTRUMPOS

DNR – deoksiribonukleino rūgštis;

EKG – elektrokardiograma;

ERCC1 – (angl. Excision Repair Cross-Complementing Group 1) iškirpimo atstatymo kryžminio papildymo grupė 1;

G1 – gerai diferencijuotas navikas;

G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas;

G3 – blogai diferencijuotas navikas;

IASLC – (International Association for the Study of Lung Cancer) tarptautinė plaučių vėžio tyrimų asociacija;

NVI – Nacionalinis Vėžio Institutas;

PE – Platinos pagrindo su Etopozidu chemoterapijos schema;

RRM1 – (angl. Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M1) ribonukleotidreduktazės grupė M1;

TNM (angl. tumor, node, metastazes) piktybinių navikų išplitimo įvertinimo sistema;

VUOI – Vilniaus universiteto Onkologijos institutas.

IVADAS

Sergamumas plaučių vėžiu Lietuvoje ir pasaulyje didėja. Europoje Lietuva užima III-ą vietą pagal plaučių vėžio susirgimo atvejus o didžiausias sergamumas stebimas Šiaurės Amerikoje bei šiaurės ir Vakarų Europoje. Mirtingumas nuo plaučių vėžio vyrams Lietuvoje siekia 80,4/100 000 gyventojų ir užima I-ą vietą tarp mirusių Lietuvoje nuo vėžio, atitinkamai moterų – 16,0/100 000 gyventojų ir užima IV-ą vietą. Ligonų 5 m. gyvenimo trukmė nepriklausomai nuo gydymo būdo, Lietuvoje siekia 9% atvejų, o pasaulyje – 15-20% atvejų. Šiuolaikinis gydymas radikali operacija ir adjuvantinė chemoterapija pasiekė savo galimybių ribas nepriklausomai nuo vaistų derinio bei jų sudėties, gydymo efektyvumas siekia 20%. Naviko progresavimas ir atsparumas gydymui yra didžiausios kliūtys nesmulkiaštelio plaučių vėžio gydymo rezultatų pagerinimui. Kadangi dauguma chemoterapinių preparatų veikia DNR, todėl moksliniai tyrimai yra nukreipti ieškant žymenų, susijusių su DNR stabilumu ir DNR pažaidų taisymo sistema. Mutacijos yra žalingos DNR grandinei, todėl DNR pažaidų taisymo sistemos yra gyvybiškai svarbios išgyvenimui. Išanalizavus jau atliktus klinikinius tyrimus, kai įtraukti *ERCCI* ir *RRMI* genai bei pagal jų raišką parinktas gydymas ir gauti palankūs rezultatai, taip pat atsižvelgiant į prieštarigus autorių duomenis tikslinga atlikti papildomus molekulinis tyrimus DNR pažaidų taisymo sistemos genų raiškai nustatyti. Taip būtų planuojama naviko molekulinė diagnostika, individualus ligonių pooperacinis gydymas parenkant optimaliausią gydymo schemą po ligos progresavimo taikant chemoterapiją, siekiant geriausių gydymo rezultatų ir prognozuojant galimą tolesnę ligos eigą.

DARBO TIKSLAS

Įvertinti DNR pažaidų reparacijos sistemos genų *ERCCI* ir *RRMI* raiškos ir jų polimorfizmo reikšmę navike, kraujyje ir bronchų sekrete, numatant pacientų, sergančių IB – IIIA stadijų (T1aN0-1M0, T1bN0-1M0, T2aN0-1M0, T2bN0-1M0, T3N0-1M0 bei T1a-3N2(pavienių)M0) nesmulkiaštelio plaučių vėžiu, pooperacinį gydymą bei numatyti galimą ligos progresavimą ar atkrytį.

DARBO UŽDAVINIAI

1. Įvertinti *ERCCI* ir *RRMI* genų raiškos svarbą sergančiųjų ankstyvų stadijų nesmulkiaštelio plaučių vėžiu laikui iki ligos progresavimo ar atkryčio po pooperacinio chemoterapinio gydymo.
2. Įvertinti *ERCCI* ir *RRMI* genų raiškos reikšmę po pooperacinio chemoterapinio gydymo ligos prognozei bei geresniam atsakui į gydymą.
3. Ištirti *ERCCI* ir *RRMI* genų polimorfizmus (*ERCCI* 118 kodono ir *RRMI* -37A→C ir -524C→T) sergančiųjų nesmulkiaštelio plaučių vėžiu kraujyje, bronchų sekrete ir navike dėl ligos progresavimo tikimybės.

DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTIŠKĖ NAUDA

Išanalizavus ir įvertinus DNR pažaidų taisymo sistemos genų raiškos tyrimus navike, kraujyje bei bronchų sekrete būtų planuojamas pacientų individualus pooperacinis gydymas bei gydymas po ligos progresavimo. Pasaulio literatūroje aprašomi klinikiniai tyrimai, kai įtraukus *ERCCI* ir *RRMI* genus bei pagal jų raišką parinkus gydymą gauti palankūs rezultatai. Vertinant *ERCCI* ir *RRMI* genų raišką navike ir kraujyje bei jų polimorfizmą autorių duomenys yra priešaringi, minėtų genų raiškos tyrimų skrepliuose nėra. Lietuvoje *ERCCI* ir *RRMI* genų raiškos tyrimai anksčiau atlikti nebuvo. Todėl parenkant optimaliausią gydymo schemą tikslinga atlikti *ERCCI* ir *RRMI* genų raiškos tyrimus. Atlikus DNR pažaidų taisymo sistemos tyrimus identifikuojant *ERCCI* ir *RRMI* raišką ir išanalizavus rezultatus – turėtų pagerėti pacientų individualus pooperacinis gydymas, aiškės ligos eigos progresavimo mechanizmai dėl galimo atsparumo adjuvantinei chemoterapijai ir po to sekančiam nesmulkiaštelio plaučių vėžio progresavimui bei bus parenkama tikslesnė individualaus gydymo schema pagal minėtų genų raišką. Tuo būtų įmanoma pagerinti gydymo rezultatus – pailginti bendrą išgyvenamumą arba išgyvenamumo laiką iki ligos progresavimo, taip pat planuoti adekvatų gydymą atsiradus ligos progresavimui.

DARBO METODIKA

Tyrimas atliktas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinikoje. Į tyrimą įtraukta 80 pacientų, kurie kreipėsi į Nacionalinį Vėžio Institutą (NVI), gydyti krūtinės chirurgijos ir onkologijos skyriuje bei po to stebėti Nacionalinio Vėžio Instituto konsultacinėje poliklinikoje.

Tyrimo protokolą įvertino ir patvirtino Vilniaus regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas 2012-05-08 d., Nr.158200-05-455-141 (I priedas) su papildymu 2012-07-03 Nr. 158200-455-PP1-22 (II priedas). Tai perspektyvinis, žvalgomasis tyrimas, kurio metu buvo įtraukiami pacientai, 2012 – 2015 metais pirmą kartą susirgę IB – IIIA stadijų nesmulkiašteliniu plaučių vėžiu ir gydymui atvykę į NVI (tyrimo pradžioje gydymo įstaigos pavadinimas buvo VUOI (Vilniaus universiteto Onkologijos institutas)). Viso į tyrimą įtraukta 80 ligonių. Ligoniu atvykus ambulatoriškai arba stacionare taikytas pilnas ištyrimas (atliekami kraujo tyrimai, šlapimo tyrimai, EKG (elektrokardiograma), kvėpavimo funkcinių rodiklių įvertinimas, endobronchinis ištyrimas, radiologinis ištyrimas (krūtinės rentgenologinis tyrimas ir/arba kompiuterinės tomografijos tyrimas), ultragarsinis tyrimas). Į tyrimą buvo įtraukiami tik tie ligoniai, kuriems atlikus tyrimus pagal 2009 metais IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) patvirtintą 7-ąją plaučių vėžio TNM (angl. tumor, node, metastazes) klasifikaciją gydymą buvo galima pradėti nuo operacijos, ligoniai pasirašydavo rašytinį sutikimą dalyvauti tyrime „DNR reparacijos sistemos genų raiškos svarba numatant pacientų, sergančių IB – IIIA stadijų nesmulkiašteliniu plaučių vėžiu, pooperacinį gydymą“. Operacijos apimtis buvo nustatoma individualiai kiekvienam ligoniui pagal navikinio proceso vietą bei išplitimą. Atliekamos plaučio rezekcijos buvo anatominė segmentektomija, lobektomija, arba pulmonektomija. Visiems ligoniams atlikta išplėstinė limfadenektomija. Operacijos metu pašalinus naviką gydytojas patologas preparate mikroskopiškai nustatydamo naviką ir iš jo paimdamo fragmentą, kraujas iš venos bei skrepliai iš bronchų buvo imami operacinėje. Visa ši medžiaga skirta *ERCC1* bei *RRM1* genų raiškai ir jų polimorfizmui šiuose mėginiuose nustatyti. Visiems ligoniams po radikalaus operacinio gydymo buvo taikoma adjuvantinė pooperacinė chemoterapija pagal schemą platinos preparatas ir etopozidas. Visi tyrime dalyvavę ligoniai gavo 4 adjuvantinės chemoterapijos

kursus. Po 4 adjuvantinės chemoterapijos kursų (4 mėnesiai po chirurginio gydymo) kiekvienam ligoniui pakartotinai imtas kraujo tyrimas iš venos *ERCC1* ir *RRM1* genų raiškai nustatyti. Nesant progresavimo ligoniui taikytas stebėjimas, 1 metai po operacinio gydymo pakartotinai imtas kraujo tyrimas iš venos *ERCC1* ir *RRM1* genų raiškai nustatyti. Stebėjimo metu nustačius ligos progresavimą skirta antros eilės chemoterapija arba/ir radioterapija, imtas kraujo tyrimas iš venos *ERCC1* ir *RRM1* genų raiškai nustatyti. Tyrimo metu rinkta ir įvertinta paciento ligos ir gyvenimo anamnezė (amžius, rūkymo stažas), naviko histologinis tipas, naviko diferenciacijos laipsnis, išgyvenamumas iki ligos progresavimo, *ERCC1* ir *RRM1* genų raiška pradedant priešnavikinį gydymą, baigus adjuvantinį gydymą (4 mėnesiai po operacijos) bei 1 metai po operacinio gydymo arba nustačius ligos progresavimą. *ERCC1* ir *RRM1* genų raiškos ir polimorfizmų pokyčiai lyginti su ligos eiga ir atsaku į gydymą.

DARBO REZULTATAI

Tyrime dalyvavę pacientai (n=80) buvo suskirstyti į grupes pagal lytį, amžių, rūkymą, naviko lokalizaciją, naviko morfologiją, naviko diferenciacijos laipsnį, ligos stadiją, naviko dydį, limfinių mazgų pažeidimą, operacijos tipą, ligos eigą, pooperacines komplikacijas bei komplikacijas po chemoterapijos. Didžiausią pacientų grupę sudarė vyrai (92%). Sergantieji pagal amžių suskirstyti į 2 lygias grupes po 40 pacientų: ≤ 63 metų ir > 63 metų. Beveik 90% pacientų rūkę. Periferinis navikas identifikuotas 69% pacientų. Morfologiškai nustatyta adenokarcinoma (39%) arba plokščialąstelinė karcinoma (61%). 62% pacientų nustatyta blogai diferencijuota (G3) karcinoma. IB ir IIA stadijų nesmulkiaūsteliu plaučių vėžiu sirgo 67% pacientų. 56% pacientų buvo patvirtintas T2A naviko dydis. 31% pacientų nustatytas naviko plitimas į N1 lygio limfinius mazgus, 11% navikas buvo išplitęs į N2 lygio limfinius mazgus, o 58% pacientų limfiniai mazgai nebuvo pažeisti. Įvertinus naviko dydį ir vietą buvo parinkta operacijos apimtis: 67% pacientų atlikta lobektomija, 20% - pulmonektomija, 9% - anatominė segmentektomija ir tik 3 pacientams (4%) atlikta bilobektomija. 20 pacientų (25%) po gydymo buvo nustatytas ligos progresavimas, o likusiems stebėta ligos remisija. Po radikalių operacijų prieš pradedant pooperacinę chemoterapiją 10 pacientų (12%) stebėtos pooperacinės komplikacijos, kurios neprailgino gulėjimo stacionare laiko ir buvo išgydytos

konservatyviai be papildomo chirurginio įsikišimo bei nekėlė grėsmės tolesniam pooperaciniam gydymui. Pooperacinės chemoterapijos metu 68 pacientams (83%) stebėtos I – II laipsnio komplikacijos, kurios gyvybei pavojaus nekėlė ir gydymo dėl to nutraukti nereikėjo. Mažos ir didelės raiškos *ERCC1* ir *RRM1* genų reikšmės buvo klasterizuotos naudojant plačiausiai naudojamą k-vidurkių (angl. *K-Means*) klasterizavimo algoritmą. Pastebėta, kad statistiškai reikšmingai dažniau maža *RRM1* raiška navike nustatyta nesant metastazių sritiniuose limfiniuose mazguose ($p=0,047$).

Nustatytas labai silpnas, bet statistiškai reikšmingas ryšys tarp *ERCC1* raiškos navike ir naviko lokalizacijos. Tikimybė nustatyti mažą *ERCC1* raišką navike yra didesnė diagnozavus periferinį naviką ($r=0,187$, $p=0,049$). Taip pat nustatytas silpnas atvirkštinis ryšys tarp *ERCC1* raiškos navike ir naviko histologinio tipo ($r=-0,202$, $p=0,036$). Tikimybė nustatyti didelę *ERCC1* raišką navike mažėja esant adenokarcinomai. Atlikta ligos progresavimo analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad tik *RRM1* raiška navike susijusi su ligos progresavimu priklausomai nuo naviko dydžio. Pacientams, kuriems buvo nustatytas T1B dydžio navikas ir maža *RRM1* raiška navike, laikotarpis iki ligos progresavimo buvo ilgesnis, palyginti su tais pacientais, kuriems buvo nustatytas tokio paties dydžio navikas ir didelė *RRM1* raiška. Nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp ligos eigos ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje ($p=0,023$), tai yra dažniau nustatyta maža geno raiška palyginus su didele esant stabiliai ligos eigai. Atlikus koreliacinę analizę nustatytas atvirkštinis labai silpnas ryšys ($r=-0,192$, $p=0,044$) tarp rūkymo ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje (rūkantiems *ERCC1* raiška dažniau bus didelė), labai silpnas ryšys ($r=0,197$, $p=0,04$) tarp naviko diferenciacijos laipsnio ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje (esant gerai diferencijuotai karcinomai *ERCC1* raiška dažniau bus maža), atvirkštinis silpnas ryšys ($r=-0,254$, $p=0,011$) tarp ligos eigos ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje (esant stabiliai ligos eigai *ERCC1* raiška dažniau bus didelė). Atlikta ligos progresavimo analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad *ERCC1* raiška kraujyje susijusi su jaunesniais nei 63 metų pacientais, kuomet laikas iki ligos progresavimo esant didelei *ERCC1* raiškai yra trumpesnis. Taip pat sergantiesiems periferiniu naviku ir esant mažai *ERCC1* raiškai laikas iki ligos progresavimo yra trumpesnis lyginant didele *ERCC1* raiška sergantiesiems nesmulkiaūsteliu plaučių vėžiu. Lygiai taip pat nustatytos sąsajos tarp

T1B ir T2A navikų su *ERCC1* raiška kraujyje – esant didelei raiškai tikėtinas greitesnis ligos progresavimas sergantiesiems T1B dydžio naviku bei esant mažai raiškai tikėtinas greitesnis ligos progresavimas sergantiesiems T2A dydžio naviku. Nėra statistiškai reikšmingo pasiskirstymo tarp *ERCC1* ir *RRM1* genų raiškos bronchų sekrete ir pacientų klinikinių charakteristikų. Atlikus koreliacinę analizę nenustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp *ERCC1* ir *RRM1* genų raiškos bronchų sekrete ir pacientų klinikinių charakteristikų. Atlikta ligos progresavimo analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad *ERCC1* ir *RRM1* raiška nesusijusi su pacientų klinikinėmis charakteristikomis. Nustatytas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp ligos stadijos ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje po 12 mėnesių nuo gydymo pradžios ($p=0,033$), tai yra dažniau nustatyta maža geno raiška palyginus su didele esant mažesnei ligos stadijai. Taip pat stebimas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp ligos eigos bei *ERCC1* geno raiškos kraujyje po 4 mėnesių nuo gydymo pradžios ($p=0,001$) ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje po 12 mėnesių nuo gydymo pradžios ($p=0,016$), tai yra dažniau nustatyta maža geno raiška palyginus su didele esant stabiliai ligos eigai. Atlikus koreliacinę analizę nustatytas silpnas ryšys ($r=0,203$, $p=0,036$) tarp naviko diferenciacijos laipsnio ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje po 4 mėnesių nuo gydymo pradžios (esant mažesniai naviko diferenciacijos laipsniui *ERCC1* raiška dažniau bus maža), atvirkštinis silpnas ryšys ($r=-0,334$, $p=0,002$) tarp ligos stadijos ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje po 12 mėnesių nuo gydymo pradžios (esant mažai stadijai *ERCC1* raiška dažniau bus didelė), atvirkštinis silpnas ryšys ($r=-0,213$, $p=0,035$) tarp limfinių mazgų būklės ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje po 12 mėnesių nuo gydymo pradžios (nesant limfinių mazgų pažeidimo *ERCC1* raiška dažniau bus didelė). Taip pat nustatytas atvirkštinis silpnas ryšys tarp ligos eigos ir *ERCC1* geno raiškos kraujyje po 4 ($r=-0,404$, $p=0,001$) ir 12 ($r=-0,281$, $p=0,008$) mėnesių nuo gydymo pradžios (esant stabiliai ligos eigai *ERCC1* raiška dažniau bus didelė). Atlikta ligos progresavimo analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad *ERCC1* raiška kraujyje moterims po 4 mėnesių ir 12 mėnesių nuo gydymo pradžios laikas iki ligos progresavimo esant mažai *ERCC1* raiškai yra trumpesnis. Lygiai tas pats stebima su jaunesniais nei 63 metų pacientais, kada laikas iki ligos progresavimo ir esant mažai *ERCC1* raiškai yra trumpesnis. Sergantiesiems T2A naviku ir esant mažai *ERCC1* raiškai po 4 mėnesių ir 12 mėnesių laikas iki ligos progresavimo yra

trumpesnis lyginant su didele *ERCC1* raišką turinčiais sergančiais nesmulkiaūsteliu plaučių vėžiu. Taip pat ir esant N1 patologijai po 4 mėnesių nuo gydymo pradžios nustatoma mažą *ERCC1* raišką nustatomas trumpesnis laikas iki ligos progresavimo. Nustatytas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp ligos eigos bei *RRM1* geno raiškos kraujyje po 4 mėnesių nuo gydymo pradžios ($p=0,001$) ir *RRM1* geno raiškos kraujyje po 12 mėnesių nuo gydymo pradžios ($p=0,001$), tai yra dažniau nustatyta maža geno raiška palyginus su didele esant stabiliai ligos eigai. Atlikus koreliacinę analizę nustatytas atvirkštinis silpnas ryšys ($r=-0,205$, $p=0,035$) tarp amžiaus ir *RRM1* geno raiškos kraujyje po 4 mėnesių nuo gydymo pradžios (esant mažesniai amžiui *RRM1* raiška dažniau bus didelė), silpnas ryšys ($r=0,200$, $p=0,045$) tarp amžiaus ir *RRM1* geno raiškos kraujyje po 12 mėnesių nuo gydymo pradžios (esant mažesniai amžiui *RRM1* raiška dažniau bus maža). Taip pat nustatytas atvirkštinis silpnas ryšys ($r=-0,367$, $p=0,001$) tarp ligos eigos ir *RRM1* geno raiškos kraujyje po 4 mėnesių nuo gydymo pradžios (esant stabiliai ligos eigai *RRM1* raiška dažniau bus didelė) ir silpnas ryšys ($r=0,473$, $p=0,001$) tarp ligos eigos ir *RRM1* geno raiškos kraujyje po 12 mėnesių nuo gydymo pradžios (esant stabiliai ligos eigai *RRM1* raiška dažniau bus maža). Atlikta ligos progresavimo analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad *RRM1* raiška kraujyje po 4 mėnesių ir 12 mėnesių nuo gydymo pradžios vyriška lytimi sergantiesiems laikas iki ligos progresavimo esant mažai *RRM1* raiškai yra trumpesnis. Jaunesniems nei 63 metų pacientams su maža *RRM1* raiška laikas iki ligos progresavimo yra trumpesnis. Tas pats stebima vyresniems nei 63 metų pacientams *RRM1* tyrime po 4 mėnesių ir po 12 mėnesių, kai nustatomas trumpesnis laikas iki ligos progresavimo esant mažai raiškai. Rūkantiems po 4 ir 12 mėnesių *RRM1* maža raiška susijusi su trumpesniu laiku iki ligos progresavimo. Periferiniu naviku sergantiesiems ir esant mažai *RRM1* raiškai po 4 ir 12 mėnesių stebimas trumpesnis laikas iki ligos progresavimo. Sergant plokščialąsteline karcinoma esant mažai *RRM1* raiškai stebimas trumpesnis laikas iki ligos progresavimo nepriklausomai nuo gydymo laiko, kai tuo tarpu adenokarcinomos atveju ligos progresavimas greičiau pasireiškia tik po 12 mėnesių esant mažai *RRM1* raiškai. Esant G2 naviko diferenciacijai laikas iki ligos progresavimo po 4 mėnesių ir po 12 mėnesių esant mažai *RRM1* raiškai yra trumpesnis lyginant su didele raiška, tuo tarpu esant G3 naviko diferenciacijai liga

progresuotų greičiau esant mažai *RRMI* raiškai po 12 mėnesių. Sergantiesiems IIA stadija nesmulkiaūsteliu plaučių vėžiu ir esant mažai *RRMI* raiškai po 4 mėnesių ligai progresuoti yra didesnė tikimybė nei su didele *RRMI* raiška kraujyje. Tuo tarpu IB, IIA ir IIIA stadijomis sergantiesiems nesmulkiaūsteliu plaučių vėžiu esant mažai *RRMI* raiškai po 12 mėnesių ligos progresavimo tikimybė didesnė nei nustačius didelę *RRMI* raišką. Sergantiesiems T2A naviku ligos progresavimas būtų dažnesnis nustačius mažą *RRMI* raišką po 12 mėnesių, kaip ir nesant limfinių mazgų pažeidimo, lyginant su sergančiais nesmulkiaūsteliu plaučių vėžiu ir nustačius didelę *RRMI* raišką. Statistiškai reikšmingo pasiskirstymo tarp *ERCC1* (118 kodono C/T) geno polimorfizmo kraujyje ir pacientų klinikinių charakteristikų nėra. Nustatytas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp naviko diferenciacijos laipsnio bei *RRMI* ($p=0,05$) polimorfizmo variantų. Esant G1 diferenciacijos laipsnio navikui dažniau nustatytas CC variantas, o esant G2 ir G3 diferenciacijos laipsniui – CA polimorfizmo variantas. Taip pat statistiškai reikšmingai polimorfizmo variantai pasiskirstė tarp ligos stadijų, CA polimorfizmo variantas dažniau identifikuotas esant IB, IIB ir IIIA stadijomis, o CC polimorfizmo variantas – IIA ligos stadijos ($p=0,002$). Taip pat nustatytas statistiškai reikšmingas pasiskirstymas tarp rūkymo bei *RRMI* ($p=0,028$) polimorfizmo variantų. Rūkantiems didžiausias yra CT polimorfizmo variantas. Atlikus koreliacinę analizę nustatytas atvirkštinis silpnas ryšys tarp rūkymo ir *RRMI* (-37A→C) geno polimorfizmo ($r=-0,211$, $p=0,030$) bei (-524C→T) geno polimorfizmo ($r=-0,238$, $p=0,017$), labai silpnas ryšys tarp naviko lokalizacijos ir *RRMI* (-524C→T) geno polimorfizmo ($r=0,197$, $p=0,040$). Taip pat nustatytas atvirkštinis silpnas ryšys tarp naviko diferenciacijos laipsnio ir *RRMI* (-37A→C) geno polimorfizmo ($r=0,258$, $p=0,010$), silpnas ryšys tarp ligos stadijos ir *ERCC1* (118 kodono C/T) geno polimorfizmo ($r=0,214$, $p=0,029$). Tarp limfinių mazgų būklės ir *ERCC1* (118 kodono C/T) geno polimorfizmo nustatytas labai silpnas ryšys ($r=0,191$, $p=0,046$), o tarp limfinių mazgų būklės ir *RRMI* (-37A→C) geno polimorfizmo nustatytas silpnas ryšys ($r=0,211$, $p=0,030$). Atlikta ligos progresavimo analizė Kaplano-Majerio metodu parodė, kad esant *ERCC1* (118 kodono C/T) polimorfizmui kraujyje laikas iki ligos progresavimo jaunesniems nei 63 metų amžiaus yra trumpesnis esant CT variantui, lygiai tas

pats stebima esant *RRMI* (-37A→C) polimorfizmui bei T3 navikui su CA variantu ir *RRMI* (-524C→T) polimorfizmo CT variantui su N2 pažeistais limfiniais mazgais.

Atlikta daugiaveiksmė analizė, pritaikant proporcingų rizikų regresinę analizę Kokso (angl. Cox) metodu, norint išsiaiškinti kurie veiksniai turi didžiausią įtaką pacientų, sergančių nesmulkiąsteliu plaučių vėžiu, ligos progresavimui. Analizė įvertino pacientų klinikines charakteristikas bei *ERCCI* geno raišką navike, kraujyje, bronchų sekrete; *RRMI* raišką navike, kraujyje ir bronchų sekrete, bei *ERCCI* (118 kodono C/T) polimorfizmą, *RRMI* (-37A→C) polimorfizmą ir *RRMI* (-524C→T) polimorfizmą. Gauti rezultatai rodo, kad *ERCCI* geno raiška kraujyje po 4 mėn., *RRMI* geno raiška kraujyje po 4 mėn., *RRMI* geno raiška kraujyje po 12 mėn., *RRMI* (-524C→T) geno polimorfizmas yra nepriklausomi sergančiųjų nesmulkiąsteliu plaučių vėžiu pacientų išgyvenamumo prognoziniai veiksniai, o kiti veiksniai išgyvenamumui įtakos neturėjo. Iš pateiktų duomenų matyti, kad tirtų *ERCCI* ir *RRMI* raiška, sergant nesmulkiąsteliu plaučių vėžiu yra susijusi su klinikinėmis patologinėmis pacientų charakteristikomis, gali būti nepriklausomu veiksniumi prognozuojant ligos eigą.

IŠVADOS

1. Trumpesnis laikas iki ligos progresavimo ar atkryčio po gydymo (atliktos radiklios rezekcinės operacijos bei po to skirtų 4 kursų adjuvantinės PE chemoterapijos) yra tiesiogiai priklausomas tik nuo didelės *ERCCI* ir *RRMI* genų raiškos kraujyje po pooperacinio chemoterapinio gydymo.

2. Maža *ERCCI* ir *RRMI* genų raiška kraujyje po pooperacinio chemoterapinio gydymo yra tiesiogiai priklausoma geresnei ligos prognozei bei geresniam atsakui į pooperacinį gydymą.

3. Tik *RRMI* (-524C→T) geno polimorfizmas kraujyje susijęs su ligos progresavimu po pooperacinio chemoterapinio gydymo.

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI

- Diana Schveigert, Saulius Cicenias, Jaroslav Bublevic, Renatas Askinis, Virginijus Sapoka, Janina Didziapetriene “The role of genetic and other biomarkers in NSCLC prognosis”. Central European Journal of Medicine. Cent. Eur. J. Med. • 9(3) • 2014 • 382-390 DOI: 10.2478/s11536-013-0290-2
- Renatas Aškinis, Arnoldas Krasauskas, Sigitas Zaremba, Saulius Cicėnas, Ankstyvųjų stadijų nesmulkiąstelio plaučių vėžio chirurginio gydymo rezultatai. LIETUVOS CHIRURGIJA 2016, 15 (2-3), p. 84-89; ISSN 1392-0995
- R. Aškinis, D. Schveigert, S. Cicenias. Implication of DNA repair system genes expression and polymorphisms in resected NSCLC. 6th Baltic Congress of Oncology “Multidisciplinary approach in Baltic State”. 2014 10 03-04, Vilnius, Lithuania. The book of abstract, 2014:16.
- Renatas Aškinis, Saulius Cicėnas, Pooperaciniai DNR taisymo sistemos genų raiškos tyrimai ligoniams, sergantiems ankstyvųjų stadijų nesmulkiąsteliu plaučių vėžiu. Bendrosios praktikos Lietuvos gydytojo priedas 2015; ISBN 1392-3218.
- R. Aškinis. VIII-as Lietuvos ERS (European Respiratory Society) narių konferencija. „Intervencinės pulmonologijos ir alergologijos naujovės 2014“. Rusnė, 2014 birželio 6-7 d. Skaitytas pranešimas „Pooperaciniai DNR reparacijos sistemos genų raiškos ir polimorfizmo tyrimai ligoniams, sergantiems ankstyvųjų stadijų plaučių vėžiu“.
- R. Aškinis. VIII-as NVS šalių onkologų ir radiologų suvažiavimas. Rusija, Kazanė, 2014 09 16-18. Pristatytas stendinis pranešimas „DNR reparacijos sistemos genų raiškos ir polimorfizmo tyrimai ligoniams, sergantiems ankstyvųjų stadijų plaučių vėžiu“.
- R. Aškinis, D. Schveigert, S. Cicenias. Implication of DNA repair system genes expression and polymorphisms in resected NSCLC. 6th Baltic Congress of Oncology “Multidisciplinary approach in Baltic State”. 2014 10 03-04, Vilnius, Lithuania.
- R. Aškinis. Lietuvos krūtinės ir širdies chirurgų draugijos XVII suvažiavimas. Kaunas, 2015 10 16. Skaitytas žodinis pranešimas tema „Pooperaciniai DNR taisymo sistemos

genų raiškos tyrimai ligoniams, sergantiems ankstyvųjų stadijų nesmulkiaūsteliu plaučių vėžiu“.

CURRICULUM VITAE

Name: Renatas

Surname: Askinis

Date of Birth: 1974-05-19

Address:

Home: Ukmerges St. 306a-25, Vilnius

Office: Santariskiu St. 1, Vilnius

Nationality: Lithuanian

Telephone: +37052786749

Email: raskinis@yahoo.com

Professional Improvement:

2002 - up to date: Belarus, Russia, Poland, Germany, Czech Republic, France, Estonia, Turkey, USA, South Korea, Sweden, the Netherlands, Greece, Italy, Croatia, Switzerland, Denmark, Portugal, Great Britain.

Education:

1981-1989	Vilnius XXXI secondary school
1983-1988	B. Dvarionas music school
1989-1992	Vilnius LXII secondary school
1992-1998	Vilnius University Medical Faculty
1998-1999	Primary residency
1999-2003	General surgery residency
2003-2005	Thoracal surgery residency

Work Experience:

1994.02.07-1994.06.30	Vilnius City Mental Health Center - Nursing support worker VGPUL - Nursing support worker
1994.10.01-1995.06.01	VU „Red Cross” Hospital – nurse
1996.07.02-1998.07.31	Emergency Station – paramedic
1998.08.01-1999.06.30	Emergency Station – physician
2002.05.23-2005.07.03	VU Ontological Institute – physician assistant
2005.07.04 - up to date	National Cancer Institute – thoracic surgeon oncologist
2017.03. 15 - up to date	National Cancer Institute – head of thoracic surgery and oncology department