

PhD SCHOOL

---

PhD THESIS - ABSTRACT

# Inflammatory response associated to lung tumor proliferation and vitamin D and K-dependent proteins

---

PhD Candidate **Andreea Crintea**

---

Scientific Coordinator Prof. dr. **Alexandra Crăciun**

---

CLUJ-NAPOCA 2022



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STATE OF THE ART</b>	
<b>1. Lung cancer. Types of lung cancer</b>	17
<b>2. Inflammatory response in lung cancer patients</b>	19
2.1. Chitotriosidase and neopterin – markers of inflammation	19
2.1.1. Vitamin D and K-dependent proteins in inflammation	20
2.1.1.1. VDR and inflammatory markers	22
2.1.1.2. MGP and inflammatory markers	22
2.1.1.3. Gas6 and inflammatory markers	22
<b>3. Vitamin D</b>	23
3.1. Vitamin D metabolism	23
3.2. Vitamin D-dependent proteins	24
3.2.1. VDR in lung cancer pathology	25
<b>4. Vitamin K</b>	26
4.1. Vitamin K metabolism	26
4.2. Vitamin K-dependent proteins	26
4.2.1. MGP in lung cancer pathology	27
4.2.2. Gas6 in lung cancer pathology	28
<b>5. Epidermal growth factor receptor in pulmonary pathology</b>	29
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Working hypothesis/objectives</b>	33
<b>2. Study 1. The first assessment of MGP, Gas6 and EGFR serum levels after the first chemotherapy dose in lung cancer patients</b>	37
2.1. Introduction	37
2.2. Objectives	39
2.3. Material and methods	39
2.4. Results	41
2.5. Discussion	47
2.6. Conclusions	50
<b>3. Study 2. Assessing the specific tumoral markers, inflammatory status, and vitamin D metabolism before and after the first chemotherapy cycle for lung cancer patients</b>	51
3.1. Introduction	51
3.2. Objectives	53
3.3. Material and methods	53
3.4. Results	55
3.5. Discussion	58
3.6. Conclusions	62
<b>4. Study 3. Gene expression of vitamin D and K-dependent proteins in lung cancer</b>	63
4.1. Introduction	63
4.2. Objectives	65
4.3. Material and methods	65
4.4. Results	68
4.5. Discussion	74
4.6. Conclusions	78

<b>5. General discussions</b>	79
<b>6. General conclusions</b>	83
<b>7. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	85
<b>REFERENCES</b>	87

**Key words:** inflammatory response, lung tumor proliferation, vitamin D and K-dependent proteins

# INTRODUCTION

Inflammation and oxidative stress are involved in the development of a wide variety of pathological conditions, including cancer.

Among all types of cancer, lung cancer causes fatality most frequently at global level, still maintaining high incidence percentages worldwide. Between the numerous risk factors for lung cancer are included tobacco smoking, dust inhalation, chronic respiratory diseases, and genetic factors. The chronic inflammation is considered a key factor that increases the risk of gene mutations and lung tumorigenesis, by producing cytokines, cytotoxic mediators, and reactive oxygen species (ROS) by inflammatory cells. In animal models with chemicals-induced lung cancer and pre-cancerous lesions it was showed that chronic inflammation significantly enhances lung carcinogenesis, and the inhibition of inflammation suppresses the cancer progression and reduces the tumor size.

Therefore, antioxidant mechanisms might have an important protective role against the inflammatory component associated to cancer.

The antioxidative vitamins are preventing increased cytokine production and are limiting the tissular damage. Deficiencies of vitamins from B group (B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>) and of vitamin E, reduce the number of lymphoid cells and produce dysfunctionalities in the cell mediated immune response. The lipid-soluble vitamin E have potent antioxidant properties and is between the most active and efficient nutrients able to regulate the immune function. The vitamin E is found in higher concentration in immune cells compared to other cells in blood.

Vitamin K (VK) is a multifunctional group of micronutrients which has been shown also to exert an anti-inflammatory effect and a protective effect against oxidative stress by blocking the generation of ROS. The oxidative stress is involved in several age-related conditions and a high VK status can also have a protective role in the inflammatory processes associated with age-related diseases. VK is an essential cofactor for the synthesis of vitamin K-dependent proteins (VKDPs). VKDPs contain  $\gamma$ -carboxyl groups which have been found in the majority of human immune cells, and contribute to the regulation of inflammatory mediators and cytokines, being therefore involved in the inflammatory response mechanisms and immune responses.

Vitamin D (VD) regulates calcium homeostasis, anti-microbial response and inflammation. The vitamin D receptors (VDRs) are expressed in several immune cells, including macrophages, and are regulating the transcription of many different genes, including those coding the anti-microbial peptides.

Few studies have researched the role of VD- and VK-dependent proteins in lung cancer and very few have addressed the way in which the inflammatory status was modified by the serum levels of chitotriosidase (CHT) and neopterin (NEO) in lung cancer patients before and after chemotherapy or emphasizing the gene expression of VK and VD-dependent proteins such as growth arrest specific 6 (Gas6), matrix Gla protein (MGP) or VDR in lung cancer.

This thesis presents the expression of VD- and VK-dependent proteins in lung cancer in relation to the changes of inflammatory status.

In light of the previous findings in the literature, all three studies of this thesis focused on the changes of the inflammatory response associated to lung tumor proliferation in relation with VD- and VK-dependent proteins.

In the first study, we focused to study the serum levels of VKDPs such as MGP, Gas6, and epidermal growth factor receptor (EGFR) before the first cycle of chemotherapy and after that.

For the second study, the objectives expanded, and the aims were to address the changes of the inflammatory status through serum levels of CHT and NEO. Another objective was to evaluate serum levels of specific tumor markers and VD metabolism status assessed by VDR and, 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) after the first cycle of chemotherapy.

For the third study, the attention shifted towards protein expression after chemotherapy in lung cancer patients, in order to emphasize a possible connection between relative gene expression (FC) and smoking status, treatment duration and tumor status as evaluated by computed tomography (CT).

To our knowledge, this research yielded:

- The first pilot study to evaluate the VD- and VK-dependent proteins after chemotherapy in lung cancer patients;

- The first pilot study to evaluate the inflammatory status, VD metabolism and specific tumoral markers after chemotherapy in lung cancer patients;
- The first pilot study to evaluate the connection between gene expression of VD- and VK-dependent proteins in relation with smoking status, treatment duration or CT evaluation.

# PERSONAL CONTRIBUTION

## Working hypothesis/objectives

Several studies highlighted the vital role of VD signaling in maintaining a healthy immune system and also showed that VD regulation contributes to controlling cellular proliferation or differentiation.

The stromal microenvironment of tumor cells has an essential cellular component. In the light of the affirmation mentioned above, several recent studies support that VD supplementation is associated with reduced cancer risk and a favorable prognosis.

Conversely, the link between inflammatory response and tumor proliferation is very well established: chronic inflammation favors tumor progression and the resistance to chemotherapy. Depending upon the factors involved, it is possible that the inflammation displays opposing effects, either promoting or suppressing tumoral progression. Also, the therapy-induced inflammation can also facilitate tumoral angiogenesis and metastasis.

Moreover, (gene) expression of VKDPs, is involved in the inflammation process and linked to tumoral aggressiveness in lung cancer.

Very few studies have focused on establishing a link between VD- and VK-dependent proteins in inflammatory processes and lung cancer. The modulation of the inflammatory response associated with lung tumor proliferation by VD- and VK-dependent proteins after chemotherapy has not been extensively researched.

We hypothesized that, as lung cancer interferes with the inflammatory pathway, the determination of both VD- and VK-dependent proteins involved in the inflammatory response in lung tumors could increase the understanding of tumoral proliferation and response to chemotherapy. Those two could contribute as biological markers and help to identify new therapeutic targets and ways of tumoral progression.

This thesis aimed to determine a connection between some of the most important VD- and VK-dependent proteins and lung cancer and how the modulation of the inflammatory response can be associated with lung cancer progression.

The research had three primary objectives:

- Highlighting the effects of chemotherapy on VD- and VK-dependent proteins;
- Studying the association between VD- and VK-dependent proteins and inflammatory response;
- Exploring gene expression for VDR, MGP, GAS6, and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in lung cancer after chemotherapy.

In order to confirm the aforementioned hypotheses, the first study was conducted to assess the levels of Gas6, MGP, EGFR, and VK<sub>1</sub> pre- and post-treatment. We have focused on determining whether the serum concentration of MGP, Gas6, or EGFR after chemotherapy could be affected by the various stages of the disease. We also wanted to emphasize pre- and post-treatment variation of the inflammatory markers such as CHT and NEO.

The general and specific objectives of the three studies compiled in this thesis are presented below.

### ***Study 1. The first assessment of MGP, Gas6 and EGFR serum levels after the first chemotherapy dose in lung cancer patients***

#### **General objective:**

Studying serum MGP, Gas6, and EGFR concentrations, associated with lung tumor proliferation before and after the first chemotherapy cycle. MGP and Gas6 are VKDPs, which have an anti-inflammatory and antiproliferative effect. Thus, a measurable connection could be established or refuted.

#### **Specific objectives:**

##### **Main objective:**

Evaluation of VKDPs and EGFR in lung cancer.

**Secondary objectives:**

- To establish whether serum MGP, Gas6, and EGFR concentrations are changed in comparison with a healthy reference population or after one treatment cycle.
- To determine if there is a correlation among VKDPs (MGP, Gas6), and VK<sub>1</sub> serum levels after one chemotherapy cycle.
- To determine whether there is a correlation between EGFR and VKDPs serum levels after one chemotherapy cycle.

***Study 2. Assessing the specific tumoral markers, inflammatory status and vitamin D metabolism before and after the first chemotherapy cycle for lung cancer patients*****General objective:**

Studying the changes in tumor markers or VD metabolism as assessed by VDR and 25(OH)D<sub>3</sub> following one cycle of chemotherapy in lung cancer, as well as the changes in inflammatory status as reflected by serum concentrations of CHT and NEO.

**Specific objectives:****Main objective:**

To investigate changes in serum levels of CHT, NEO, neuron specific enolase (NSE), squamous cell carcinoma antigen (SCCA), VDR, and 25(OH)D<sub>3</sub> after one cycle of chemotherapy.

**Secondary objectives:**

- To establish the amplitude of changes in serum levels of tumoral markers NSE, and SCCA in a response to one cycle of chemotherapy.
- To establish whether serum levels of inflammatory markers are changed in response to one cycle of chemotherapy.
- To establish whether serum levels of VDR and 25(OH)D<sub>3</sub> are modified in response to one cycle of chemotherapy.

***Study 3. Gene expression of vitamin D and K-dependent proteins in lung cancer*****General objective:**

Studying the protein expression of VDR, MGP, GAS6, and VEGFA in lung cancer patients after chemotherapy.

**Specific objectives:****Main objective:**

To investigate the expression for VDR, MGP, GAS6, and VEGFA before and after chemotherapy.

**Secondary objectives:**

- To establish whether gene expression for VDR, MGP, GAS6, and VEGFA are changed in response to chemotherapy.
- To determine if there is a correlation between gene expression for VDR, MGP, GAS6, and VEGFA and smoking status.
- To determine if treatment duration correlates with expression of the VDR, MGP, GAS6, and VEGFA genes.
- To determine whether there is a correlation between gene expression for VDR, MGP, GAS6, and VEGFA as evaluated by CT.

# General methodology

## ***Serum VK<sub>1</sub>, Gas6, MGP, EGFR, CHT, NEO, NSE, SCCA, 25(OH)D<sub>3</sub>, and VDR assessment***

For serum VK<sub>1</sub>, Gas6, MGP, EGFR, CHT, NEO, NSE, SCCA, 25(OH)D<sub>3</sub>, and VDR, venous blood was collected by venipuncture from all patients before and after chemotherapeutic treatment. All samples were collected in separator gel test tubes. Prior to analysis, the samples were centrifuged and aliquots of serum were stored at minus 80°C. Serum VK<sub>1</sub>, Gas6, MGP, EGFR, NSE, SCCA, 25(OH)D<sub>3</sub>, and VDR levels were measured using ELISA assay (MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA). An ELISA for the quantification of serum levels of NEO (FineTest, Wuhan, Hubei, China), was performed strictly following the manufacturers' instructions. A microplate reader was used to determine the optical density (Stat Fax 2100 Awerness Technology, Palm City, FL, USA). A fluorometric method using an artificial substrate was used to measure the enzymatic activity of CHT.

## ***RNA extraction and quantity and quality control***

Total RNA from blood was extracted and isolated according to the TRI Reagent (Ambion, Austin, TX, USA) protocol. RNA concentrations and quality were assessed using NanoDrop 1000 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Total RNA concentration was ranged to 1500 ng for gene expression evaluation and the quality control of the total RNA was evaluated by Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for real-time quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) validation step.

## ***Gene expression evaluation***

Total RNA was transcribed into complementary DNA (cDNA) using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) for gene expression evaluation. We used a SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) for gene expression. The cDNA synthesis was performed using a 20 µl of Reverse Transcription Mixture containing 0.8 µl of dNTPs (100 mM), 500 ng of total RNA and 1 µl of MultiScribe Reverse Transcriptase, 2 µl Reverse Transcription Buffer, 0.25 µl of RNase Inhibitor according to High-Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) protocol. The cDNA mixture was incubated in PCR tubes for 10 minutes at 25°C, 120 minutes at 37°C, and 5 minutes at 85°C. qRT-PCR was performed in a total volume of 20 µl using 2.5 µl of cDNA (diluted 1:5 with Nuclease-free water), 10 µl SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and 0.1 µl (10 µM) for each primer (Forward and Left) in ViiA7 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) PCR system. The reactions were set up as follows: initial step include the UNG incubation for 2 minutes at 50°C, and polymerase activation at 95°C for 2 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 second, annealing/extension of primers at 60°C for 30 seconds. The relative expression level was calculated using  $-\Delta\Delta CT$ .



# Results

## ***Study 1. The first assessment of MGP, Gas6 and EGFR serum levels after the first chemotherapy dose in lung cancer patients***

The white blood cells post-treatment values were significantly lower compared to the pre-treatment values (5.2 vs 8.13 x 10<sup>9</sup>/l; p = 0.007). We also noticed a significant increase in total bilirubin and calcium levels in the post-treatment group, 0.51 vs 0.41 mg/dl (p = 0.014) and 9.5 vs 9.3 mg/dl (p = 0.019), respectively.

The concentration of serum Gas6, EGFR, VK<sub>1</sub>, and MGP in lung cancer patients before and after chemotherapy were compared. Gas6, EGFR, VK<sub>1</sub>, and MGP pre-treatment values were slightly higher than post-treatment values but without significant statistical differences. Our determinations highlight VK<sub>1</sub> as a predictor factor for Gas6 post-treatment values. Besides, the post-treatment values of Gas6 are influenced by age and smoking. Furthermore, our analysis indicated that pre-treatment values of MGP and VK<sub>1</sub>, were predictors for MGP post-treatment values. Moreover, the post-treatment values of MGP are influenced by age and smoking. According to our findings, MGP and EGFR (R<sup>2</sup> = 0.405) were the independent factors influencing the Gas6 values after treatment.

## ***Study 2. Assessing the specific tumoral markers, inflammatory status and vitamin D metabolism before and after the first chemotherapy cycle for lung cancer patients***

Our 20 samples of lung cancer were stratified in groups who followed a seven-day treatment scheme and who followed a three-week treatment scheme and we assessed the general status of the enrolled patients pre- and post- chemotherapy. We observed that pre- and post-treatment values for CHT, VDR and 25(OH)D<sub>3</sub> did not show statistically significant variations. Moreover, the post-treatment values of NSE were lower compared to pre-treatment values (14.37 vs. 17.10 ng/ml, p = 0.031) and we observed a similar tendency in NEO levels (1.44 vs. 1.17 ng/ml, p = 0.069). The variations of circulating SCCA, CHT, NEO, VDR and 25(OH)D<sub>3</sub>, before and after treatment, did not illustrate a statistical significance in our groups.

## ***Study 3. Gene expression of vitamin D and K-dependent proteins in lung cancer***

We collected blood samples from 18 lung cancer patients and we assessed the gene expression of GAS6, MGP, VDR and VEGFA in patients before and after chemotherapeutical treatment. Pre- and post-treatment gene expression values of GAS6, MGP, VDR and VEGFA did not show statistically significant variation.

We compare the pre- and post-treatment values of relative gene expression in lung cancer patients depending on lung cancer type, treatment duration, CT evaluation or smoking status. Depending on lung cancer type, relative gene expression values of VDR did reach statistical significance in AD patients (p = 0.0156), and relative gene expression values of MGP also did show statistically significant variation in SqCC patients (p = 0.0313). FC for GAS6 and VEGFA did not reach statistical significance. Our results highlighted that relative gene expression for VDR gene can be influenced by treatment duration, VDR expression being inversely correlated with treatment duration. We found a significant difference between patients who followed a seven-day treatment scheme, compared to those who followed the three-weeks treatment scheme (p = 0.0129). Moreover, our results highlighted that FC of MGP gene reached significant statistical differences (p = 0.0158). On the contrary, FC of GAS6 and VEGFA, did not reach statistical significance. Additionally, CT evaluation and only VDR gene expression bring relevant information regarding remission and stationary status in lung cancer patients (p = 0.0420). Finally, pre-treatment correlations between gene expression and smoking status were performed. VDR relative gene expression was significantly higher in patients that had never smoked compared to those that are smokers/have smoked (p = 0,0434) and it is also important to note that the relative gene expression of MGP in patients that were smokers was significantly higher than in patients that were nonsmokers and/or former smokers (p = 0,0416).

# Conclusions

The three studies included in the present thesis yielded essential aspects on the modulation of the inflammatory response associated with lung tumor proliferation by VD and VK-dependent proteins.

## ***Study 1. The first assessment of MGP, Gas6 and EGFR serum levels after the first chemotherapy dose in lung cancer patients***

1. Between VKDPs, the pre-treatment values of MGP correlate strongly with the VK<sub>1</sub> level.
2. The post-treatment value of EGFR is a stronger independent factor that correlates positively with the Gas6 post-treatment values.
3. No change in the serum of these proteins in the serum samples after one chemotherapy dose was indicated by our study.
4. Based on RECIST 1.1 criteria, these proteins (MGP, Gas6, and EGFR) could not be markers for response to treatment in patients treated with Cisplatin.

## ***Study 2. Assessing the specific tumoral markers, inflammatory status, and vitamin D metabolism before and after the first chemotherapy cycle for lung cancer patients***

1. Serum levels of NSE in lung cancer patients were decreased following the first chemotherapy cycle compared to pre-treatment values.
2. The post-treatment NEO values were lower but only marginally statistically.
3. The circulating levels of CHT, SCCA, VD, and VDR did not change significantly in response to the first cycle of chemotherapy.
4. To our knowledge, the present study is the first one that evaluates the serum levels of CHT, NEO, NSE, SCCA, VDR, and 25(OH)D<sub>3</sub> in lung cancer patients after the initial cycle of chemotherapy.

## ***Study 3. Gene expression of vitamin D and K dependent functional proteins in lung cancer***

1. We observed that VDR gene expression was negatively influenced by duration of chemotherapy, smoking status, and cancer evolutive stage, although our study did not include a large number of patients.
2. MGP expression was higher post-treatment only in SqCC patients, with a positive correlation between level increase and treatment duration, smoking status, and cancer evolutive stage.
3. We did not register any statistically significant modification in GAS6 and VEGFA gene expression.

# Originality and innovative contributions of the thesis

In general, starting from the multitude of studies focused on the modulation of the inflammatory response associated with lung tumor proliferation and the role of VD- and VK-dependent proteins, this thesis comprised three studies concentrated on:

- Evaluating circulating MGP, Gas6, and EGFR after chemotherapy treatment in patients with lung cancer
- Assessing the specific tumoral markers, inflammatory status, and VD metabolism before and after chemotherapy treatment in lung cancer patients
- Gene expression of MGP, Gas6, VDR, and VEGFA in lung cancer patients

This thesis centred on serum concentrations of VD- and VK-dependent proteins using the ELISA technique in patients with lung cancer, coupled with the assessment of specific tumoral markers (NSE, SCCA), inflammatory status (CHT, NEO), and VD metabolism before and after chemotherapy treatment using ELISA technique and enzymatic methods.

This study brings supplementary data on NSE's usefulness as a serum TM in lung cancer treatment response. Significant results are found in patients with NSCLC, sustaining the value of NSE as a follow-up marker in lung cancer treatment.

Further, four genes (MGP, Gas6, VDR, and VEGFA), were selected for gene expression profile analysis by qRT-PCR.

## Original contribution of this thesis

The data obtained represents preliminary results that can offer new original contribution of this thesis:

- We were able to evaluate, for the first time, serum levels of VD- and VK-dependent proteins and EGFR in lung cancer patients undergoing chemotherapy treatment;
- This thesis evaluated for the first-time serum levels of CHT, NEO, NSE, SCCA, VDR, and 25(OH)D<sub>3</sub> in lung cancer patients after one cycle of chemotherapy;
- Moreover, for the first time, this thesis evaluated gene expression for MGP, Gas6, VDR, and VEGFA in lung cancer patients after one cycle of chemotherapy;

Another original contribution of this work is the fact that this is the first pilot study which evaluated the connection between the gene expression of VD- and VK-dependent proteins in relation with toxic factors such as smoking, or treatment duration, CT evaluation.

There are certain limitations of the present study to be considered.

## Study limitations

- The study design was observational and the parameters levels were assessed only after the first cycle of chemotherapy;
- The sample size was relatively small, and further studies are required for the evaluation of the parameters after more than one cycle of chemotherapy;
- Different stages of the disease may influence the serum concentration or gene expression of researched parameters after the first dose of chemotherapy. The patients' individual tumor characteristics could be responsible for the fluctuation of biomarker values and their consequent non-significance.

This thesis may contribute to a better understanding of the modulation of the inflammatory response associated with lung tumor proliferation by VD- and VK-dependent proteins, considering that this research has opened opportunities for future studies in the field.

ȘCOALA DOCTORALĂ

---

TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

# Răspunsul inflamator asociat cu proliferări tumorale pulmonare și protein dependente de vitamina D și K

---

Student doctorand **Andreea Crintea**

---

Conducător științific Prof. dr. **Alexandra Crăciun**

---



# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Cancerul pulmonar. Tipuri de cancer pulmonar</b>	17
<b>2. Răspunsul inflamator la pacienții cu cancer pulmonar</b>	19
2.1. Chitotriosidaza și neopterină – markeri ai inflamației	19
2.1.1. Proteine dependente de vitamina D și K în inflamație	20
2.1.1.1. VDR și markerii inflamatori	22
2.1.1.2. MGP și markerii inflamatori	22
2.1.1.3. Gas6 și markerii inflamatori	22
<b>3. Vitamina D</b>	23
3.1. Metabolismul vitaminei D	23
3.2. Proteine dependente de vitamina D	24
3.2.1. VDR în patologia pulmonară	25
<b>4. Vitamina K</b>	26
4.1. Metabolismul vitaminei K	26
4.2. Proteine dependente de vitamina K	26
4.2.1. MGP în patologia pulmonară	27
4.2.2. Gas6 în patologia pulmonară	28
<b>5. Epidermal growth factor receptor în patologia pulmonară</b>	29
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	33
<b>2. Studiu 1. Prima evaluare a nivelurilor serice de MGP, Gas6 și EGFR după prima doză de chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar</b>	37
2.1. Introducere	37
2.2. Obiective	39
2.3. Material și metodă	39
2.4. Rezultate	41
2.5. Discuții	47
2.6. Concluzii	50
<b>3. Studiu 2. Evaluarea markerilor tumorali specifici, a statusului inflamator și a metabolismului vitaminei D înainte și după primul ciclu de chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar</b>	51
3.1. Introducere	51
3.2. Obiective	53
3.3. Material și metodă	53
3.4. Rezultate	55
3.5. Discuții	58
3.6. Concluzii	62
<b>4. Studiu 3. Expresia genică a proteinelor dependente de vitamina D și K în cancerul pulmonar</b>	63
4.1. Introducere	63
4.2. Obiective	65
4.3. Material și metodă	65
4.4. Rezultate	68
4.5. Discuții	74
4.6. Concluzii	78

<b>5. Discuții generale</b>	79
<b>6. Concluzii generale</b>	83
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	85
<b>REFERINȚE</b>	87

**Cuvinte cheie:** răspuns inflamator, proliferări tumorale pulmonare, proteine dependente de vitamina D și K

# INTRODUCERE

Inflamația și stresul oxidativ sunt implicate în dezvoltarea unei largi varietăți de afecțiuni patologice, inclusiv cancerul.

Dintre toate tipurile de cancer, cancerul pulmonar cauzează cel mai frecvent decese, având în continuare o incidență ridicată la nivel mondial. Printre numeroșii factori de risc pentru cancerul pulmonar se numără fumatul, inhalarea prafului, bolile respiratorii cronice și factorii genetici. Inflamația cronică este considerată un factor cheie care crește riscul mutațiilor genetice și apariția tumorilor pulmonare, prin producerea de citokine, mediatori citotoxici și specii reactive ale oxigenului (SRO) de către celulele inflamatorii. La modelele animale cu cancer pulmonar indus de substanțe chimice și leziuni pre-canceroase s-a demonstrat că inflamația cronică crește semnificativ carcinogeneza, iar inhibarea inflamației suprimă progresia cancerului și reduce dimensiunea tumorii.

Prin urmare, mecanismele antioxidante pot avea un rol protector important împotriva componentei inflamatorii asociate cancerului.

Vitaminele antioxidante previn producerea crescută de citokine și limitează deteriorarea metabolică. Deficiențe ale vitaminelor din grupul B (B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>) și ale vitaminei E reduc numărul de celule limfoide și produc disfuncționalități în imunitatea mediată celular.

Vitamina E are proprietăți antioxidante puternice și este printre nutrienții cei mai activi și mai eficienți, capabili să regleze apărarea imunitară. Vitamina E se găsește într-o concentrație mai mare în celulele imuno-competente, comparativ cu alte celule din sânge.

Vitamina K (VK) reprezintă un grup multifuncțional de micronutrienți despre care s-a demonstrat, de asemenea, că exercită un efect antiinflamator și un efect protector împotriva stresului oxidativ, prin blocarea producerii de SRO. Stresul oxidativ este implicat în mai multe afecțiuni legate de vârstă, iar un nivel ridicat de VK poate avea, de asemenea, un rol protector în procesele inflamatorii asociate îmbătrânirii. VK este un cofactor esențial pentru sinteza proteinelor dependente de această vitamină (VKDP). VKDP conțin grupări  $\gamma$ -carboxil la nivelul resturilor de acid glutamic. Aceste proteine sunt prezente în majoritatea celulelor imuno-competente și contribuie la reglarea sintezei mediatorilor inflamatori și a citokinelor, fiind astfel implicate în mecanismele de răspuns inflamator și în răspunsul imun.

Vitamina D (VD) reglează homeostazia calciului, răspunsul antimicrobian și inflamația. Receptorii vitaminei D (VDRs) sunt exprimați în mai multe celule ale sistemului imun, inclusiv macrofage și reglează transcrierea mai multor gene diferite, inclusiv cele care codifică peptidele antimicrobiene.

Puține studii au cercetat rolul proteinelor dependente de VD și VK în cancerul pulmonar și foarte puține au abordat modul în care statusul inflamator a fost evidențiat de concentrațiile serice ale chitotrioxidazei (CHT) și neopterinei (NEO) la pacienții cu cancer pulmonar, înainte și după chimioterapie, sau în funcție de exprimarea genică a proteinelor dependente de VK și VD, cum ar fi growth arrest specific 6 (Gas6), proteina Gla matriceală (MGP) sau VDR.

Această teză prezintă expresia proteinelor dependente de VD și VK în cancerul pulmonar și asocierea acestora cu modificările statusului inflamator.

În pofida rezultatelor puțin numeroase din literatura de specialitate, toate cele trei studii ale acestei teze s-au concentrat asupra modificărilor răspunsului inflamator asociat proliferării tumorilor pulmonare și a asocierilor dintre markerii sindromului inflamator și proteinele dependente de VD și VK.

În primul studiu ne-am concentrat asupra studierii concentrațiilor serice ale VKDP, cum sunt MGP, Gas6 și receptorul pentru factorul de creștere epidermică (EGFR), înainte și după primul ciclu de chimioterapie.

Pentru al doilea studiu, obiectivele s-au extins spre evaluarea modificărilor statusului inflamator prin măsurarea concentrațiilor serice de CHT și NEO. Un alt obiectiv a fost acela de a evalua concentrațiile serice ale markerilor tumorali specifici și metabolismul VD, evidențiat prin concentrațiile serice ale VDR și 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>), după primul ciclu de chimioterapie.

Pentru al treilea studiu, atenția s-a îndreptat către analiza expresiei proteinelor post-chimioterapie, pentru a sublinia o posibilă legătură între expresia genelor și statutul de fumător, durata tratamentului și statusul tumoral, evaluate prin tomografie computerizată (CT).

Contribuțiile acestei cercetări sunt următoarele:

- Este primul studiu pilot de evaluare post-chimioterapie a proteinelor dependente de VD și VK, la pacienții cu cancer pulmonar;
- Este primul studiu pilot de evaluare post-chimioterapie a statusului inflamator, a metabolismului VD și a markerilor tumorali specifici la pacienții cu cancer pulmonar;
- Este primul studiu pilot de evaluare post-chimioterapie a legăturii dintre expresia genică a proteinelor dependente de VD și VK și statusul de fumător, durata tratamentului sau evaluarea CT.



# CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

## Ipoteza de lucru/obiective

Mai multe studii au subliniat rolul important al căii de semnalizare a VD în menținerea unui sistem imunitar sănătos și au arătat, de asemenea, că reglarea VD contribuie la controlul proliferării sau diferențierii celulare.

Micromediul tumoral al celulelor stromale are o componentă celulară esențială. Având în vedere afirmațiile de mai sus, mai multe studii recente susțin faptul că administrarea VD este asociată cu reducerea riscului de cancer și cu o prognoză favorabilă.

Dimpotrivă, legătura dintre răspunsul inflamator și proliferarea tumorilor este foarte bine stabilită: inflamația cronică favorizează progresia tumorii și rezistența la chimioterapie. În funcție de factorii implicați, este posibil ca inflamația să prezinte efecte adverse, fie stimulând, fie suprimând progresia tumorală. De asemenea, inflamația indusă de tratament poate facilita angiogeneza și metastazarea.

În plus, exprimarea (genică) a VKDP este implicată în procesul inflamator și este legată de agresivitatea tumorală în cancerul pulmonar.

Foarte puține studii s-au concentrat asupra stabilirii unei legături între proteinele dependente de VD și VK în procesele inflamatorii și cancerul pulmonar. Modularea răspunsului inflamator asociat cu proliferarea tumorii pulmonare de către proteinele dependente de VD și VK după chimioterapie nu a fost studiată pe scară largă.

Am presupus că, pe măsură ce cancerul pulmonar interferează cu calea inflamatorie, determinarea atât a proteinelor dependente de VD cât și a proteinelor dependente de VK implicate în răspunsul inflamator în tumorile pulmonare ar putea spori înțelegerea proliferării tumorale și răspunsul la chimioterapie. Acestea două ar putea contribui ca markeri biologici și ar putea ajuta la identificarea noilor ținte terapeutice și a modalităților de progresie tumorală.

Această teză a avut ca scop determinarea unei legături între unele dintre cele mai importante proteine dependente de VD și VK și cancerul pulmonar și modul în care modularea răspunsului inflamator poate fi asociată cu progresia cancerului pulmonar.

Cercetarea a avut trei obiective principale:

- Evidențierea efectelor chimioterapiei asupra proteinelor dependente de VD și VK;
- Stabilirea unei legături dintre proteinele dependente de VD și VK și răspunsul inflamator;
- Explorarea expresiei genice pentru VDR, MGP, GAS6, și factorul de creștere vasculară A (VEGFA) în cancerul pulmonar după chimioterapie.

Pentru a confirma ipotezele menționate mai sus, primul studiu a fost efectuat pentru a evalua nivelurile de Gas6, MGP, EGFR și VK<sub>1</sub> înainte și după tratament. Ne-am preocupat dacă concentrația serică de MGP, Gas6 sau EGFR după chimioterapie ar putea fi afectată de diferitele stadii ale bolii. Am vrut, de asemenea, să subliniem variația pre și post-tratament a markerilor inflamatori, cum ar fi CHT și NEO.

Obiectivele generale și specifice ale celor trei studii compilate în această teză sunt prezentate mai jos.

### ***Studiu 1. Prima evaluare a nivelurilor serice de MGP, Gas6 și EGFR după prima doză de chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar***

#### **Obiectiv general:**

Studiul concentrației serice de MGP, Gas6 și EGFR asociate cu proliferarea tumorilor pulmonare înainte și după primul ciclu de chimioterapie. Aceste proteine (MGP, Gas6) sunt VKDP, care au un efect antiinflamator și antiproliferativ. Astfel, ar putea fi stabilită sau respinsă o legătură măsurabilă.

#### **Obiective specifice:**

#### **Obiectiv principal:**

Evaluarea VKDP (MGP, Gas6) și EGFR în cancerul pulmonar.

**Obiective secundare:**

- Analiza eventualelor variații ale valorilor serice ale MGP, Gas6 și EGFR la pacienți, în comparație cu populația sănătoasă de referință și cu modificările după un prim ciclu de chimioterapie
- Determinarea eventualelor corelații între valorile markerilor tumorali MGP, Gas6 și concentrațiile plasmatiche ale VK<sub>1</sub> după un prim ciclu de chimioterapie
- Determinarea eventualelor corelații între EGFR și valorile concentrațiilor VKDP după un prim ciclu de chimioterapie.

***Studiu 2. Evaluarea markerilor tumorali specifici, a statusului inflamator și a metabolismului vitaminei D înainte și după primul ciclu de chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar*****Obiectiv general:**

Studierea statusului inflamator reflectat de concentrațiile serice ale CHT și NEO și a modului în care markerii tumorali specifici sau metabolismul VD evaluat prin VDR și 25(OH)D<sub>3</sub> au fost modificați după un ciclu de chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar.

**Obiective specifice:****Obiectiv principal:**

Investigarea modificărilor concentrațiilor serice ale CHT, NEO, enolaza neuron specifică (NSE), antigenul cancerului cu celule scuamoase (SCCA), VDR și 25(OH)D<sub>3</sub> după primul ciclu de chimioterapie.

**Obiective secundare:**

- Stabilirea amplitudinii modificărilor concentrațiilor serice ale markerilor tumorali NSE și SCCA ca răspuns la primul ciclu de chimioterapie
- Stabilirea eventualelor modificări ale valorile serice ale markerilor inflamatori ca răspuns la primul ciclu de chimioterapie
- Stabilirea eventualelor modificări ale valorile serice ale VDR și 25(OH)D<sub>3</sub> ca răspuns la primul ciclu de chimioterapie.

***Studiu 3. Expresia genică a proteinelor dependente de vitamina D și K în cancerul pulmonar*****Obiectiv general:**

Studiul exprimării proteinelor VDR, MGP, GAS6 și VEGFA la pacienții cu cancer pulmonar post-chimioterapie.

**Obiective specifice****Obiectiv principal:**

Investigarea expresiei genice a VDR, MGP, GAS6, și VEGFA înainte și după chimioterapie.

**Obiective secundare:**

- Stabilirea eventualelor variații ale exprimării genelor pentru VDR, MGP, GAS6 și VEGFA, ca răspuns la chimioterapie
- Stabilirea unei eventuale asocieri între expresia genică a VDR, MGP, GAS6 și VEGFA și statutul de fumător
- Determinarea eventualelor corelații între expresia genică a VDR, MGP, GAS6 și VEGFA și durata tratamentului
- Determinarea eventualelor corelații între expresia genică a VDR, MGP, GAS6 și VEGFA și evaluarea prin CT.

# Metodologie generală

## ***Evaluarea serică a VK<sub>1</sub>, Gas6, MGP, EGFR, CHT, NEO, NSE, SCCA, 25(OH)D<sub>3</sub>, și VDR***

Pentru analiza serică a VK<sub>1</sub>, Gas6, MGP, EGFR, CHT, NEO, NSE, SCCA, 25(OH)D<sub>3</sub>, și VDR, sângele venos a fost colectat prin venipunctură la toți pacienții înainte și după tratamentul chimioterapic. Toate probele au fost colectate în tuburi cu gel separator. Înainte de analiză, probele au fost centrifugate și alicotele de ser au fost depozitate la -80°C. Nivelurile serice de VK<sub>1</sub>, Gas6, MGP, EGFR, NSE, SCCA, 25(OH)D<sub>3</sub>, și VDR au fost măsurate printr-un kit ELISA (MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA). Pentru cuantificarea nivelurilor serice de NEO (FineTest, Wuhan, Hubei, China), un kit ELISA a fost utilizat, respectând cu strictețe instrucțiunile producătorilor. Un cititor de plăci a fost folosit pentru determinarea densității optice (Stat Fax 2100 Awerness Technology, Palm City, FL, USA). Pentru măsurarea activității enzimatică a CHT a fost utilizată o metodă fluorimetrică care utilizează un substrat artificial.

## ***Extracția ARN-ului, controlul cantității și calității***

ARN-ul total din sânge a fost extras și izolat conform protocolului TRI Reagent (Ambion, Austin, TX, SUA). Concentrațiile și calitatea ARN-ului au fost evaluate cu ajutorul spectrofotometrului NanoDrop 1000 UV-VIS (Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Concentrația ARN-ului total a fost de 1500 ng pentru evaluarea expresiei genice, iar controlul calității ARN-ului total a fost evaluat cu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SUA) pentru etapa de validare qRT-PCR.

## ***Evaluarea expresiei genice***

ARN-ul total a fost transcris în ADN complementar (ADNc) utilizând High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) pentru evaluarea expresiei genice. Pentru expresia genică am folosit SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Sinteza ADNc a fost efectuată utilizând 20 μl de amestec de transcriere inversă conținând 0,8 μl de dNTP (100 mM), 500 ng de ARN total și 1 μl de revers-transcriptază MultiScribe, 2 μl de buffer revers-transcriptază, 0,25 μl de Inhibitor de ribonuclează, conform protocolului kitului High-Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Amestecul cADN a fost incubat în tuburile PCR timp de 10 minute la 25° C, 120 de minute la 37°C și 5 minute la 85°C. qRT-PCR a fost efectuat într-un volum total de 20 μl folosind 2,5 μl de ADNc (dilatat 1:5 cu apă fără nuclează), 10 μl SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) și 0,1 μl (10 μM) din fiecare primer în ViiA7 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) PCR. Reacțiile au fost stabilite după cum urmează: etapa inițială include incubarea UNG timp de 2 minute la 50°C și activarea polimerazei la 95°C timp de 2 minute, urmată de 40 de cicluri de denaturare la 95°C timp de 1 secundă, alinierea primerilor la 60°C timp de 30 de secunde. Nivelul de exprimare a fost calculat utilizând - ΔΔCT.

## Rezultate

### ***Studiu 1. Prima evaluare a nivelurilor serice de MGP, Gas6 și EGFR după prima doză de chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar***

Valorile post-tratament ale leucocitelor au fost semnificativ mai mici în comparație cu valorile pre-tratament (5,2 vs 8,13 x 10<sup>9</sup>/l; p = 0,007). De asemenea, am observat o creștere semnificativă a bilirubinei totale și a nivelurilor de calciu în grupul post-tratament, 0,51 vs 0,41 mg/dl (p = 0,014) și respectiv 9,5 vs 9,3 mg/dl (p = 0,019).

Au fost comparate concentrațiile serice de Gas6, EGFR, VK<sub>1</sub> și MGP la pacienții cu cancer pulmonar înainte și după chimioterapie. Valorile pre-tratament pentru Gas6, EGFR, VK<sub>1</sub> și MGP au fost ușor mai mari decât valorile post-tratament, dar fără diferențe statistice semnificative. Determinările noastre evidențiază VK<sub>1</sub> ca factor predictor pentru valorile post-tratament ale Gas6. În plus, valorile post-tratament ale Gas6 sunt influențate de vârstă și de fumat. Mai mult decât atât, analiza noastră a indicat că valorile MGP și VK<sub>1</sub> pre-tratament au fost predictorii pentru valorile MGP post-tratament. Valorile post-tratament ale MGP sunt influențate de vârstă și fumat. Conform constatărilor noastre, MGP și EGFR (R<sup>2</sup> = 0,405) au fost factorii independenți care influențează valorile Gas6 după tratament.

### ***Studiu 2. Evaluarea markerilor tumorali specifici, a statusului inflamator și a metabolismului vitaminei D înainte și după primul ciclu de chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar***

Cele 20 de eșantioane de cancer pulmonar au fost stratificate în grupuri care au urmat o schemă de tratament de șapte zile respectiv care au urmat o schemă de tratament de trei săptămâni evaluându-se starea generală a pacienților înscriși înainte și după chimioterapie. Am observat că valorile pre- și post-tratament pentru CHT, VDR și 25(OH)D<sub>3</sub> nu au prezentat variații semnificative din punct de vedere statistic. Mai mult decât atât, valorile post-tratament ale NSE au fost mai mici în comparație cu valorile pre-tratament (14,37 vs. 17,10 ng/ml, p = 0,031), observând o tendință similară în cazul nivelurilor de NEO (1,44 vs. 1,17 ng/ml, p = 0,069). Variațiile SCCA, CHT, NEO, VDR și 25(OH)D<sub>3</sub> circulante, înainte și după tratament, nu au ilustrat o semnificație statistică în grupurile noastre.

### ***Studiu 3. Expresia genică a proteinelor dependente de vitamina D și K în cancerul pulmonar***

Am recoltat probe de sânge de la 18 pacienți diagnosticați cu cancer pulmonar și am evaluat expresia genelor GAS6, MGP, VDR și VEGFA înainte și după tratamentul chimioterapeutic. Valorile expresiei genice pre- și post-tratament pentru GAS6, MGP, VDR și VEGFA nu au prezentat variații semnificative statistic.

Am comparat apoi valorile pre- și post-tratament ale expresiei genice la pacienții cu cancer pulmonar, în funcție de tipul de cancer pulmonar, durata tratamentului, evaluarea CT sau statusul de fumător. În funcție de tipul de cancer pulmonar, valorile expresiei genice pentru VDR au prezentat semnificație statistică la pacienții cu AD (p = 0,0156), iar valorile expresiei genice pentru MGP au arătat, de asemenea, variații semnificative din punct de vedere statistic la pacienții cu SqCC (p = 0,0313).

Expresia pentru GAS6 și VEGFA nu a prezentat semnificație statistică. Rezultatele noastre au evidențiat faptul că expresia genică a VDR poate fi influențată de durata tratamentului, fiind invers proporțională cu durata tratamentului. Am găsit o diferență semnificativă între pacienții care au urmat o schemă de tratament de șapte zile și cei care au urmat o schemă de tratament de trei săptămâni (p = 0,0129). Mai mult, rezultatele noastre au evidențiat faptul că valorile expresiei genice a MGP au prezentat diferențe statistice semnificative (p = 0,0158), spre deosebire de valorile expresiei genice a GAS6 și VEGFA. În plus, evaluarea CT și expresia genei VDR aduc informații relevante cu privire la remisie și la starea staționară a pacienților cu cancer pulmonar (p = 0,0420). În cele din urmă, au fost determinate corelații pre-tratament între expresia genelor și statusul de fumător. Expresia genică a VDR a fost semnificativ mai mare la pacienții care nu au fumat niciodată, comparativ cu cei care sunt fumători/au fumat (p = 0,0434) și este, de asemenea, important de reținut faptul că expresia genică a MGP la pacienții care au fost fumători a fost semnificativ mai mare decât la pacienții care erau nefumători și/sau foști fumători (p = 0,0416).

# Concluzii

Cele trei studii incluse în prezenta teză au prezentat aspecte esențiale privind modularea răspunsului inflamator asociat cu proliferări tumorale pulmonare de către proteinele dependente de vitaminele D și K.

## ***Studiu 1. Prima evaluare a nivelurilor serice de MGP, Gas6 și EGFR după prima doză de chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar***

1. Valorile MGP post-tratament se corelează cu nivelul VK<sub>1</sub>.
2. Valoarea post-tratament a EGFR este un factor independent mai puternic, care se corelează pozitiv cu valorile Gas6 post-tratament.
3. Studiul nostru nu a indicat nicio modificare a concentrației serice acestor proteine după o doză de chimioterapie.
4. Pe baza criteriilor RECIST 1.1, aceste proteine (MGP, Gas6 și EGFR) nu ar putea fi markeri pentru răspunsul la tratament la pacienții tratați cu Cisplatină.

## ***Study 2. Assessing the specific tumoral markers, inflammatory status, and vitamin D metabolism before and after the first chemotherapy cycle for lung cancer patients***

1. Nivelurile serice ale NSE la pacienții cu cancer pulmonar au scăzut după primul ciclu de chimioterapie comparative cu valorile pre-tratament.
2. Valorile post-tratament ale NEO sunt mai mici însa marginal semnificative din punct de vedere statistic.
3. Nivelurile circulante ale CHT, SCCA, VD și VDR nu s-au modificat semnificativ ca răspuns la primul ciclu de chimioterapie.
4. Prezentul studiu este primul care evaluează nivelurile serice ale CHT, NEO, NSE, SCCA, VDR și 25(OH)D<sub>3</sub> la pacienții cu cancer pulmonar după un ciclu de chimioterapie.

## ***Studiu 3. Expresia genică a proteinelor dependente de vitamina D și K în patologia pulmonară***

1. Expresia genei VDR a fost influențată de durata tratamentului, statusul de fumător și stadiul evolutive al bolii, însă studiul nostru nu a inclus un număr mare de pacienți
2. Gena MGP s-a exprimat mai mult post-tratament la pacienții cu SqCC; este o corelație pozitivă între nivelurile expresiei genice și durata tratamentului, statusul de fumător și stadiul evolutiv al bolii.
3. Nu s-a observat nicio modificare semnificativă din punct de vedere statistic în expresia genelor GAS<sup>^</sup> și VEGFA.

# Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

În general, pornind de la multitudinea de studii axate pe modularea răspunsului inflamator asociat cu proliferarea tumorilor pulmonare și rolul proteinelor dependente de VD și VK, această teză a cuprins trei studii axate pe:

- Evaluarea MGP, Gas6 și EGFR circulante după chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar
- Evaluarea markerilor tumorali specifici, statusul inflamator și metabolismul VD înainte și după chimioterapie la pacienții cu cancer pulmonar
- Expresia genică a MGP, Gas6, VDR și VEGFA la pacienții cu cancer pulmonar

Această teză este centrată pe concentrațiile serice ale proteinelor dependente de VD și VK utilizând tehnica ELISA la pacienții cu cancer pulmonar, împreună cu evaluarea markerilor tumorali specifici (NSE, SCCA), statusului inflamator (CHT, NEO) și metabolismului VD înainte și după chimioterapie, utilizând tehnica ELISA și metode enzimatiche.

Acest studiu aduce informații suplimentare privind utilitatea NSE ca marker tumoral în răspunsul la tratamentul cancerului pulmonar. La pacienții cu NSCLC se obțin rezultate semnificative, susținând importanța NSE ca marker de urmărire în tratamentul cancerului pulmonar.

În plus, patru gene (MGP, Gas6, VDR și VEGFA) au fost selectate pentru analiza profilului expresiei genice prin qRT-PCR.

## Contribuția originală a tezei

The data obtained represents preliminary results that can offer new original contribution of this thesis:

- S-a putut evalua pentru prima dată, concentrațiile serice ale proteinelor dependente de VD și VK și EGFR la pacienții cu cancer pulmonar după chimioterapie;
- Această teză a evaluat pentru prima dată concentrațiile serice de CHT, NEO, NSE, SCCA, VDR și 25(OH)D<sub>3</sub> la pacienții cu cancer pulmonar după un ciclu de chimioterapie;
- Pentru prima dată, această teză a evaluat expresia genică a MGP, Gas6, VDR și VEGFA la pacienții cu cancer pulmonar după un ciclu de chimioterapie;

O altă contribuție originală a acestei teze este faptul că acesta este primul studiu pilot care a evaluat legătura dintre expresia genică a proteinelor dependente de VD și VK și factori toxici, precum fumatul sau durata tratamentului, evaluarea CT.

Există anumite limitări ale studiului ce trebuie luate în considerare.

## Limitările studiului

- Designul studiului este observațional, iar concentrațiile parametrilor au fost evaluate numai după primul ciclu de chimioterapie;
- Talia eșantionului a fost relativ mică și sunt necesare studii suplimentare pentru evaluarea parametrilor după mai mult de un ciclu de chimioterapie;
- Diferitele stadii ale bolii pot influența concentrația serică sau expresia genică a parametrilor studiați după prima doză de chimioterapie. Caracteristicile tumorale ale pacienților pot fi responsabile pentru variațiile concentrațiilor biomarkerilor.

Această teză poate contribui la o mai bună înțelegere a răspunsului inflamator asociat cu proliferări tumorale pulmonare și proteine dependente de VD și VK, având în vedere faptul că această cercetare a deschis oportunități pentru studii viitoare.