

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Jokic M. Vera

*Ispitivanje kliničkih i genetičkih prediktivnih faktora
efikasnosti terapije inhibitorima tirozin kinaza
pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom
pluća*

Doktorska disertacija

Beograd, 2022. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Jokic M. Vera

*Assessment of clinical and genetic predictive factors
in the effectiveness of tyrosine kinase inhibitor
therapy in patients with advanced lung
adenocarcinoma*

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022

Mentor:

Prof. dr Katarina Savić Vujović,

Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

Dr sc. Milena Čavić, Viši naučni saradnik

Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Članovi komisije:

1. Doc. dr Branislava Medić, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

2. Dr sc. Radmila Janković, Naučni savetnik, Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

3. Prof. dr Bojan Zarić, Institut za plućne bolesti Vojvodine Sremska Kamenica, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je izrađena na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) u Beogradu. Istraživanja predstavljena u disertaciji su realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III41026.

Zahvaljujem se:

Svojoj mentorki Doc. dr Katarini Savić Vujović na nesebičnom prenošenju znanja, prijateljskim savetima, razumevanju, podsticaju i velikoj podršci prilikom izrade doktorke disertacije.

Svom komentoru, dr Mileni Čavić, mom uzoru bez čije neiscrpne pomoći i posvećenosti nauci izrada ove disertacije ne bi bila moguća.

Članovima komisije, Doc. Dr Branislavi Medić i Dr Radmili Janković na dragocenoj podršci.

Prof. dr Bojanu Zariću na uvek iskrenim savetima i motivaciji da uvek stremim boljem.

Dr Jeleni Spasić koja me je uvela u svet lečenja i istraživanja karcinoma pluća, neiscrpno i nesebično prenela kliničko i istraživačko znanje i bila pravi prijatelj.

Prof. dr Milici Prostran za šansu koju mi je dala da napredujem naučno i razumevanju u životnim izazovima.

Doc. Dr Tatjani Potpari zato što me je uvela u svet nauke i pokazala kako je moguće biti u isto vreme dobar kliničar i izvrstan naučnik.

Prof, dr Zoranu Bukumiriću i dr Nemanji Stanić za veliku pomoć prilikom statističke obrade rezultata.

Dr Ivani Minić, mom kliničkom mentoru u Dnevnoj bolnici za hemioterapiju, koja mi je pokazala da se znanje množi deljenjem i da je u lečenju onkoloških pacijenata pored znanja neophodno imati i zadržati ljudskost i human pristup.

Svojim kolegama i prijateljima Dr Ivani Božović Spasojević, dr Zorici Tomašević, dr Zoranu Tomaševiću, dr Jeleni Oblaković Babić, dr Kristini Šerović, dr Aleksandri Pušici, dr Marini Čalamać, medicinskim sestrama i divnim administratorokama Duci, Bilji, Dušanki i Sneži iz Dnevne bolnice za hemioterapiju i Klinike za medikalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije zato što su mi dali šansu da budem deo njihovog tima i znanje i podršku u svakodnevnom radu. Zahvalna sam jer su mi pokazali da jak tim i posvećenost lečenju dovode do značajnog poboljšanja kvaliteta života onkoloških bolesnika bez obzira na uslove lečenja.

Svim pacijentima Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije koji su bili deo ovog istraživanja, ali i onima koji su se lečili ili se i dalje leče u Dnevnoj bolnici za hemioterapiju i na IORSu, jer je ova doktorska disertacija pisana sa željom da se njima omogući duži, kvalitetniji i dostojanstven život.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj užoj i široj porodici sestrama Jeleni, Mileni i Nataši, tetkama Slobodanki, Milanki i Olgici i babi Radmili na безусловnoj ljubavi, veri, razumevanju i podršci koju mi pružaju celog života.

Tati Mići na roditeljskoj požrtvovanosti, razumevanju i ljubavi koju mi je preneo prema nauci i pomaganju drugima. Ova doktorska disertacija je oda njegovom radu i borbi sa rakom pluća.

Mami Oliveri na ljubavi, veri i nadi kao osnovnim postulatima življenja, bezrezervnoj podršci, osloncu i temelju za naredna pokoljenja.

Sestri blizakinji Nadi mojoj drugoj polovini od začeca pa zavek.

Suprugu Bokiju, jer me voli, razume, podržava i ceni moj naučni rad i požrtvovanost u medicini.

Sinu Mihajlu kom posvećujem ovu doktorsku disertaciju sa željom da ima dobar primer ispred sebe, ali da nađe svoj način i put do sreće, uspeha i zadovoljstva čime god se u životu bavio.

Ispitivanje kliničkih i genetičkih prediktivnih faktora efikasnosti terapije inhibitorima tirozin kinaza pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća

Uvod: Karcinom pluća predstavlja globalni javno zdravstveni problem. U 2020. godini je u svetu od karcinoma pluća obolelo je 2 206 771 osoba oba pola, a umrlo 1 796 144. Petogodišnje preživljavanje pacijenata obolelih od svih tipova karcinoma pluća veoma je nisko i pored uvođenja ciljane i imunoterapije u lečenje i iznosi oko 19% za pripadnike oba pola, dok je kod pacijenata koji boluju od EGFR pozitivnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća, kao i kod onih sa ostalim mutacijama za koje postoji ciljana terapija, petogodišnje preživljavanje nešto bolje i iznosi 5% - 50%. Terapija inhibitorima tirozin kinaza (TKI) koji blokiraju receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) je prva linija u lečenju pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* mutiranim nesitnoćelijskim karcinomom pluća (NSCLC). Iako je efikasnija od hemioterapije većina pacijenata nakon 9-11 meseci razvije rezistenciju. Mehanizmi rezistencije na EGFR TKI su različiti, a njihovo poznavanje ključno je u donošenju odluke o najboljoj specifičnoj terapiji, proceni odgovora na terapiju i u razvoju novih lekova.

Cilj: Ispitivanje demografskih karakteristika pacijenata i karakteristika tumora kao prediktivnih faktora efikasnosti EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća (korelacija sa ukupnim preživljavanjem (*overall survival* - OS), preživljavanjem bez progresije bolesti (*progression free survival* - PFS), pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola) kao i ispitivanje tipa i zastupljenosti mutacija u genu EGFR kao prediktivnih faktora EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća (korelacija sa OS, PFS, pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola). Ispitivanje nivoa ekspresije gena IGF-1R, E-kadherina, N-kadherina i okcludina kao prediktivnih faktora EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim EGFR mutiranim NSCLC (korelacija sa OS, PFS, pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola).

Metodologija: Istraživanje je sprovedeno u periodu od 2013. godine do 2021. godine na grupi od 101 pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća (klinički stadijum IIIb i IV, performans status 0, 1 ili 2) kod kojih je potvrđeno prisustvo mutacija u *EGFR* genu i koji su bili lečeni ili su i dalje na terapiji inhibitorima tirozin kinaza na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Dijagnoza uznapredovalog adenokarcinoma pluća postavljena je u skladu sa kriterijumima osmog izdanja Internacionalne asocijacije za istraživanje karcinoma pluća (IASLC). Pacijenti su tretirani EGFR inhibitorima tirozin kinaza prve generacije u prvoj liniji do progresije ili neprihvatljive toksičnosti. Analizirani su demografski podaci (pol i starost pacijenata), kliničke manifestacije bolesti, pušački status, performans status, TNM stadijum bolesti pri postavljanju dijagnoze, gradus tumora, lokalizacija inicijalnih metastaza, komorbiditeti, hematološki parametri, prisustvo bola pri dijagnozi i tokom terapije, tip EGFR mutacije, dužina primene TKI, odgovor na terapiju (SD – stabilizacija bolesti, PR – parcijalna regresija, CR – kompletna regresija, PD – progresija bolesti), preživljavanje bez progresije bolesti (eng. Progression Free Survival, PFS), ukupno preživljavanje (eng. Overall survival, OS,) toksičnost na TKI i rezistencija na terapiju. Toksičnost na TKI se procenjivala prema kriterijumima 5.0 verzije CTCAE – Common Terminology Criteria for Adverse Events. Prisustvo bola pri dijagnozi i tokom terapije prijavljivana je korišćenjem Pain – Related Patient - Reported Outcomes. Pacijentima je uzeta krv pre otpočinjanja primene TKI, a rezultati kompletne krvne slike sa leukocitarnom formulom dobijeni su iz elektronskih medicinskih kartona pacijenata. Analizirani su hematološki parametri: odnos neutrofila i limfocita (NLR), trombocita i limfocita (PLR), trombocita i monocita (PMR), limfocita i monocita (LMR) i neutrofila i monocita (NMR). Nivo bola procenjen je primenom dve metode – numeričkom skalom za procenu bola (NRS) i verbalnom deskriptivnom skalom (VDS) pre otpočinjanja terapije inhibitorima tirozin kinaza, kao i tokom primene ovih lekova.

Iz parafinskih kalupa izolovane su DNK i RNK. Iz DNK je analizirana mutacija u genu *EGFR* (egzoni 18-21), a iz RNK je analizirana ekspresija gena *IGF-1R*, *N-kadherin*, *E-kadherin* i *okcludin*.

Nivo ekspresije mRNK gena *IGF-1R*, *N-kadherin*, *E-kadherin* i *okludin* analiziran je kvantitativnom metodom PCR u realnom vremenu (qRT-PCR).

Rezultati: Prosečna starost naših ispitanika bila je 61,7 ($\pm 11,1$) godina, više od polovine pacijenata bilo je ženskog pola (65,3%). Najveći broj ispitanika (81,1%) inicijalno je bilo dobrog opšteg stanja – ECOG 1, dok su polovinu grupe činili pušači (48,5). Većina pacijenata u našoj studiji dijagnostikovana je u metastatskom stadijumu bolesti (91%). Medijana ukupnog preživljavanja pacijenata u našoj studiji je 21 mesec (15,2-26,7 CI 95%). Medijana PFS u celoj grupi bila je 10 meseci (7,4-12,5 CI 95%). Pacijenti ženskog pola imali su duži PFS u poređenju sa pacijentima muškog pola uz postignutu statističku značajnost. Srednji PFS bio je značajno duži kod pacijenata sa *ex19del* i *L858R* mutacijom nego kod pacijenata sa ređim mutacijama kao što su *ex20Ins*, *L861Q*. *EGFR* mutacije su češće detektovane kod pacijenata ženskog pola ($p < 0,001$), a dva najčešća tipa mutacija (88%) bili su delecija egzona 19 i tačkasta mutacija *L858R* u egzonu 21 za koje je karakteristično da pokazuju najveću senzitivnost na TKI. Samo 12% pacijenata imalo je neki od retkih tipova *EGFR* mutacija, kao što su *L861Q* (2%), *G719X* (4%) i insercije (5,9%). Dva pacijenta bili su dupli mutanti. Od svih analiziranih hematoloških parametara koristeći ROC vrednost iz naše studije i iz literaturnih podataka pacijenti sa $NLR > 2,9$ su češće imali znakove toksičnosti na primenu *EGFR* TKI, naročito paronihiju ($p = 0,060$) i dijareju ($p = 0,035$). Pacijenti sa $LMR < 2,5$ značajno su manje imali registrovanu paronihiju ($p = 0,031$) i dijareju (0,007), dok su pacijenti sa $PLR > 190$ imali češće paronihiju ($p = 0,058$), dijareju ($p = 0,044$) i hiperbilirubinemiju ($p = 0,077$). Većina pacijenata (84%) je inicijalno ostvarila povoljan odgovor na terapiju u vidu stabilizacije bolesti (SD) ili parcijalne regresije (PR). Samo 2 bolesnika imala su kompletnu regresiju bolesti. Neželjeni efekti terapije detektovani su kod 73 (72%) pacijenata lečenih sa TKI, dok je 97 % njih ispoljilo maksimalnu toksičnost gradusa 2. Najčešći neželjeni efekti TKI bili su kožni raš (63%), paronihija (24%), dijareja (33%), poremećaj parametara funkcije jetre (19%), očna toksičnost (6%) i bubrežna slabost (4%). Ni kod jednog pacijenta terapija TKI nije prekinuta u potpunosti usled razvoja neželjenih efekata, niti je registrovan gradus 4 toksičnosti. Najčešće su registrovani neželjeni efekti gradusa 1 i 2, dok se gradus 3 kožnog raša ispoljio kod 4 pacijenta, paronihije kod 4 pacijenta, a skok transaminaza kod 5 pacijenta. U trenutku postavljanja dijagnoze bol je registrovan kod 41 (41 %) pacijenata i bio je značajno povezan sa prisustvom metastaza ($p < 0,001$). Analiza prisustva bola kod pacijenata sa metastatskim lezijama na različitim lokalizacijama pokazala je da je bol češće prisutan kod pacijenata sa koštanim metastazama i metastazama u nadbubežnim žezdama. Različiti tipovi *EGFR* mutacija nisu bili značajno povezani sa prisustvom bola ($p = 0,351$) kada je vršeno poređenje najčešćih *EGFR* mutacija (egzon 19 delecija, *L858R* tačkasta mutacija u egzonu 21) naspram retkih mutacija (*L861Q*, *G719X*, egzon 20 insercija, *S768I*, dupli mutanti). Pacijenti koji su imali bol inicijalno lečeni su primenom analgetika i palijativne radijacione terapije u analgetske svrhe. Nakon 3 meseca od primene *EGFR* TKI registrovano je da je kod 20% pacijenata došlo do smanjenja nivoa bola u odnosu na inicijalni nivo merenja ($p = 0,011$), kao i da je registrovano statistički značajno poboljšanje nivoa bola ($p < 0,001$). Šest pacijenata koji imali bol su u međuvremenu razvili ovaj simptom usled progresije bolesti uprkos primeni *EGFR* TKI. Kod 21 postignuta je adekvatna kontrola bola tokom primene terapije *EGFR* TKI, iako je kod 17 pacijenata tokom praćenja registrovana progresija bolesti. Pokazano je da su pacijenti čiji su tumori imali niže nivoe ekspresije *IGF-1R* i *N-kadherina* statistički značajno imali duži PFS u odnosu na pacijente sa višim nivoom ekspresije ovog gena ($p < 0,001$). Pacijenti sa nižim nivoom ekspresije *IGF-1R* i višim nivoima ekspresije *E-kadherina* statistički značajno češće imali kompletan ili parcijalni odgovor na terapiju u odnosu na pacijente sa višim nivoom ekspresije ovog gena ($p = 0,04$). Pokazana je statistički značajna povezanost povišene ekspresije *IGF-1R* sa pojavom rezistencije na *EGFR* TKI kod pacijenata ($p < 0,001$). Takođe je pokazana statistički značajna povezanost između povišene ekspresije *N-kadherina* sa pojavom rezistencije na *EGFR* TKI kod pacijenata. Međutim, kod pacijenata sa sniženim nivoom ekspresije *E-kadherina* pokazana je statistička povezanost sa pojavom rezistencije na terapiju *EGFR* TKI.

Zaključak: Pacijenti ženskog pola imaju duži PFS u poređenju sa pacijentima muškog pola i češće su ispoljavali toksičnost na primenu *EGFR* TKI. Pacijenti sa $NLR > 2,9$ češće su imali znakove

toksičnosti na primenu EGFR TKI, naročito dijareju, pacijenti sa LMR<2,5 značajno ređe imali registrovanu paronihiju i dijareju, dok su pacijenti sa PLR>190 imali češće i hiperbilirubinemiju. Srednji PFS je bio značajno duži kod pacijenata sa čestim mutacijama ex19del i L858R mutacijama nego kod pacijenata sa ređim mutacijama kao što su ex20Ins, L861Q and G719X.-Pacijenti čiji su tumori inicijalno imali niže nivoe ekspresije gena IGF-1R i N-kadherina imali su duži PFS u odnosu na pacijente sa višim nivoima ekspresije ovih gena. Pacijenti čiji su tumori inicijalno imali niže nivoe ekspresije IGF-1R češće su imali kompletan ili parcijalni odgovor na terapiju. Pacijenti sa povišenom ekspresijom gena IGF-1R češće su razvijali rezistenciju na terapiju EGFR TKI. Pacijenti sa povišenom ekspresijom gena N-kadherin češće su razvijali rezistenciju na terapiju EGFR TKI, dok su pacijenti sa sniženom ekspresijom gena E-kadherin češće razvijali rezistenciju na terapiju EGFR TKI.

Ključne reči: adenokarcinom pluća, *EGFR*, inhibitori tirozin kinaza, rezistencija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Farmakologija/onkologija

Assessment of clinical and genetic predictive factors in the effectiveness of tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with advanced lung adenocarcinoma

Introduction: Lung cancer has been a global public health problem for decades. In 2020, 2,206,771 people of both genders became were diagnosed with lung cancer in the world, and 1,796,144 died. The five-year survival of patients with all types of lung cancer is very low (19%), despite the use of targeted and immunotherapy, while in patients with EGFR-positive non-small cell lung cancer (NSCLC), five-year survival is slightly better (5% - 50%). Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase (TKI) inhibitor therapy is the first line in the treatment of patients with advanced EGFR mutated NSCLC. Although it is more effective than chemotherapy, most patients develop resistance after 9-11 months. The are different mechanisms of resistance to EGFR TKI and understanding of them is crucial in deciding on the best therapy, assessing response to therapy and developing new drugs.

Aim: To assess the demographic characteristics of patients and the characteristics of tumors as predictive factors for the effectiveness of *EGFR* TKI therapy in patients with advanced *EGFR* mutated adenocarcinoma of the lung (correlation with overall survival (OS), progression free survival (PFS), toxicity and cancer pain). Assessment of the type and prevalence of mutations in the *EGFR* gene as predictive factors of *EGFR* TKI therapy in patients with advanced *EGFR* mutated lung adenocarcinoma (correlation with OS, PFS, resistance, toxicity and cancer pain). Assessment of IGF-1R, E-cadherin, N-cadherin and occluding gene expression levels as predictive factors of *EGFR* TKI therapy in patients with advanced *EGFR* mutated NSCLC (correlation with OS, PFS, resistance, toxicity and cancer pain).

Methodology: The research was conducted in the period from 2013 to 2021. in a group of 101 patients with advanced lung adenocarcinoma (clinical stage IIIb and IV, performance status 0, 1 or 2) in whom the presence of mutations in the EGFR gene was confirmed and who were treated or are still on tyrosine kinase inhibitor therapy at the Institute for Oncology and Radiology of Serbia. The diagnosis of advanced lung adenocarcinoma was made in accordance with the criteria of the eighth edition of the International Association for Lung Cancer Research (IASLC). Patients were treated with first generation EGFR inhibitors of tyrosine kinases in first line of therapy to progression or unacceptable toxicity. Demographic data (sex and age of patients), clinical manifestations of the disease, smoking status, performance status, TNM stage of the disease at diagnosis, tumor grade, localization of initial metastases, comorbidities, hematological parameters, presence of pain at diagnosis and during therapy, EGFR type were analyzed. mutations, length of TKI use, response to therapy (SD - disease stabilization, PR - partial regression, CR - complete regression, PD - disease progression), progression-free survival (PFS), overall survival. Overall survival, OS, TKI toxicity and resistance to therapy. Toxicity on TKI was assessed according to the criteria of version 5.0 of the CTCAE - Common Terminology Criteria for Adverse Events. The presence of pain at diagnosis and during therapy was reported using Pain - Related Patient - Reported Outcomes. Patients had their blood taken before starting TKI, and the results of a complete blood count with a leukocyte formula were obtained from the patient's electronic medical records. Haematological parameters were analyzed: ratio of neutrophils and lymphocytes (NLR), platelets and lymphocytes (PLR), platelets and monocytes (PMR), lymphocytes and monocytes (LMR) and neutrophils and monocytes (NMR).

The level of pain was assessed using two methods - numerical scale for pain assessment (NRS) and verbal descriptive scale (VDS) before starting therapy with tyrosine kinase inhibitors, as well as during the use of these drugs.

DNA and RNA were isolated from paraffin molds. A mutation in the EGFR gene (exons 18-21) was analyzed from DNA, and the expression of the IGF-1R, N-cadherin, E-cadherin, and occludin genes was analyzed from RNA. The expression level of the mRNA of the IGF-1R, N-cadherin, E-cadherin and occludin genes was analyzed by real-time quantitative PCR (qRT-PCR).

Results: The average age of our patients was 61.7 (\pm 11.1) years, more than half of the patients were female (65.3%). The largest number of patients (81.1%) was initially in good general condition - ECOG 1, while half of the group consisted of smokers (48.5). The majority of patients in our study were diagnosed in the metastatic stage of the disease (91%). The median overall patient survival in our study was 21 months (15.2–26.7 CI 95%). The median PFS in the whole group was 10 months (7.4-12.5 CI 95%). Female patients had longer PFS compared to male patients with achieved statistical significance. The mean PFS was significantly longer in patients with ex19del and L858R mutations than in patients with rarer mutations such as ex20Ins, L861Q. EGFR mutations were more frequently detected in female patients ($p < 0.001$), and the two most common types of mutations (88%) were exon 19 deletion and L858R point mutation in exon 21, which are characterized by the highest sensitivity to TKI. Only 12% of patients had some of the rare types of EGFR mutations, such as L861Q (2%), G719X (4%) and insertions (5.9%). Two patients were double mutants. Of all the analyzed hematological parameters using the ROC value from our study and from the literature, patients with NLR $>$ 2.9 were more likely to have signs of toxicity to EGFR TKI, especially paronychia ($p = 0.060$) and diarrhea ($p = 0.035$). Patients with LMR $<$ 2.5 had significantly less registered paronychia ($p = 0.031$) and diarrhea (0.007), while patients with PLR $>$ 190 had more frequent paronychia ($p = 0.058$), diarrhea ($p = 0.044$) and hyperbilirubinemia ($p = 0.044$). = 0.077). The majority of patients (84%) initially achieved a favorable response to therapy in the form of disease stabilization (SD) or partial regression (PR). Only 2 patients had complete disease regression. Side effects of therapy were detected in 73 (72%) patients treated with TKI, while 97% of them showed maximum toxicity of grade 2. The most common side effects of TKI were skin rash (63%), paronychia (24%), diarrhea (33%).), impaired liver function parameters (19%), ocular toxicity (6%) and renal failure (4%). In none of the patients was TKI therapy completely discontinued due to the development of side effects, nor was a toxicity grade 4 registered. The most common side effects were grade 1 and 2, while grade 3 skin rash occurred in 4 patients, paronychia in 4 patients, and transaminase spikes in 5 patients. At the time of diagnosis, pain was registered in 41 (41%) patients and was significantly associated with the presence of metastases ($p < 0.001$). Analysis of the presence of pain in patients with metastatic lesions at different localizations showed that pain is more common in patients with bone metastases and metastases in the adrenal glands. Different types of EGFR mutations were not significantly associated with the presence of pain ($p = 0.351$) when comparing the most common EGFR mutations (exon 19 deletions, L858R point mutation in exon 21) versus rare mutations (L861Q, G719X, exon 20 insertions, S768I, double mutants). Patients who had pain were initially treated with analgesics and palliative radiation therapy for analgesic purposes. After 3 months from the application of EGFR TKI, it was registered that in 20% of patients there was a decrease in pain levels compared to the initial level of measurement ($p = 0.011$), and that a statistically significant improvement in pain levels was registered ($p < 0.001$). Six patients who had pain in the meantime developed this symptom due to disease progression despite the use of EGFR TKI. Adequate pain control was achieved in 21 patients during EGFR TKI therapy, although disease progression was registered in 17 patients during follow-up. It was shown that patients whose tumors had lower levels of IGF-1R and N-cadherin expression had statistically significantly longer PFS compared to patients with higher levels of expression of this gene ($p < 0.001$). Patients with lower levels of IGF-1R expression and higher levels of E-cadherin expression were statistically significantly more likely to have a complete or partial response to therapy compared to patients with higher levels of expression of this gene ($p = 0.04$). There was a statistically significant association between elevated IGF-1R expression and the occurrence of EGFR TKI resistance in patients ($p < 0.001$). There was also a statistically significant association between increased N-cadherin expression and the occurrence of EGFR TKI resistance in patients. However, in patients with reduced levels of E-cadherin expression, a statistical association was shown with the occurrence of resistance to EGFR TKI therapy.

Conclusion: Female patients have longer PFS compared to male patients and were more likely to show toxicity to EGFR TKI. Patients with NLR $>$ 2.9 were more likely to show signs of EGFR TKI

toxicity, especially diarrhea, patients with LMR <2.5 were significantly less likely to have registered paronychia and diarrhea, while patients with PLR > 190 were more likely to have hyperbilirubinemia. The mean PFS was significantly longer in patients with frequent ex19del mutations and L858R mutations than in patients with rarer mutations such as ex20Ins, L861Q and G719X. Patients whose tumors initially had lower levels of IGF-1R and N-cadherin gene expression had longer PFS compared to patients with higher levels of expression of these genes. Patients whose tumors initially had lower levels of IGF-1R expression were more likely to have a complete or partial response to therapy. Patients with increased IGF-1R gene expression were more likely to develop resistance to EGFR TKI therapy. Patients with increased N-cadherin gene expression were more likely to develop resistance to EGFR TKI therapy, while patients with decreased E-cadherin gene expression were more likely to develop resistance to EGFR TKI therapy.

Key words: lung adenocarcinoma, EGFR, tyrosine kinase inhibitors, resistance

Scientific field: Medicine

Specific scientific field: Pharmacology / oncology

Sadržaj

1.UVOD	1
1.1 EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA PLUĆA	1
1.2 ETIOPATOGENEZA KARCINOMA PLUĆA	3
1.3 PRIMARNA PREVENCIJA I SKRINING KARCINOMA PLUĆA.....	4
1.3.1 Prestanak pušenja	4
1.3.2 Smanjenje pušenja.....	4
1.3.3 Sekundarna prevencija (skrining) karcinoma pluća.....	4
1.4 KLINIČKA PREZENTACIJA KARCINOMA PLUĆA I KANCERSKI BOL	4
1.4.1 Kancerski bol	6
1.5 DIJAGNOSTIČKA EVALUACIJA.....	6
1.5.1 Anamneza i klinički pregled	7
1.5.2 Procena opšteg stanja bolesnika.....	7
1.5.3 Laboratorijske analize	7
1.5 Kardio-pulmonalna funkcija	8
1.5.5 Neinvazivne dijagnostičke metode	8
1.5.5.1 Radiografija pluća	8
1.5.5.2 CT grudnog koša.....	9
1.5.5.3 PET-CT	9
1.5.5.4 Dodatna dijagnostika u metastatskoj bolesti.....	9
1.5.6 Minimalno-invazivni dijagnostički postupci	10
1.5.6.1 Bronhoskopija	10
1.5.6.2 Endobronijalni i endoezofagealni ultrazvuk medijastinalnih limfnih čvorova.....	10
1.5.6.3 Transtorakalna iglena biopsija pluća.....	11
1.5.7 Invazivni dijagnostički postupci	11
1.5.7.1 Medijastinoskopija/torakoskopija	11
1.6 PATOHISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA	11
1.6.1 Imunohistohemija (IHC).....	13
1.7 TNM KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA (8. IZDANJE)	13
1.8 MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA NESITNOĆELIJSKOG KARCINOMA PLUĆA	15
1.8.1 <i>EGFR</i>	17
1.8.2 <i>ALK</i>	19
1.8.3 <i>PD-L1</i>	20
1.9 LEČENJE KARCINOMA PLUĆA PO STADIJUMU BOLESTI.....	21

1.9.1 RESEKTABILNI NCLC (STADIJUM I-III A)	22
1.9.1.1 Hirurgija.....	22
1.9.1.2 Radikalna radioterapija	24
1.9.1.3 Postoperativna radioterapija (PORT).....	24
1.9.1.4 Adjuvantna hemioterapija	24
1.9.1.5 Adjuvantna ciljana terapija	24
1.9.1.6 Neoadjuvantna i adjuvantna imunoterapija.....	25
1.9.2 NERESKTABILNI LOKALNO UZNAPREDOVALI NSCLC	25
1.9.2.1 Hemioradioterapija.....	25
1.9.2.2 Neoadjuvantna hemioterapija	26
1.9.2.3 Durvalumab.....	26
1.9.3 METASTATSKI NSCLC (IV STADIJUM)	26
1.9.3.1 Sistemska imunoterapija	27
1.9.3.2 Targetabilne mutacije.....	28
1.9.3.2.1 ALK pozitivni NSCLC	28
1.9.3.2.2 ROS1 pozitivni NSCLC.....	29
1.9.3.2.3 BRAF pozitivni NSCLC	29
1.9.3.3 Uloga radioterapije u lečenju pacijenata sa NSCLC u IV stadijumu.....	29
1.9.3.4 Endobronhijalna brahiterapija.....	29
1.9.3.5 WBRT i SRS u lečenju metastaza na mozgu.....	30
1.9.3.6 Uloga hirurgije u lečenju pacijenata sa NSCLC u IV stadijumu	30
1.9.3.7 Suportivna terapija i palijativna nega.....	30
1.10 EGFR TKI	30
1.10.1 Mehanizam dejstva	30
1.10.2 Neželjeni efekti EGFR TKI	33
1.11 REZISTENCIJA NA EGFR TKI	35
1.11.1 Mehanizmi rezistencije na EGFR TKI (slika 7) su:.....	36
1.11.2 T790M.....	36
1.11.3 C797.....	37
1.11.4 L747S, D761Y, T854A.....	37
1.11.5 MET amplifikacija	37
1.11.6 HGF.....	37
1.11.7 AXL	37
1.11.8 Hedgehog (Hh).....	37
1.11.9 AKT	38
1.11.10 PTEN.....	38

1.11.11 KRAS mutacija	38
1.11.12 PIK3CA.....	38
1.11.13 BIM.....	38
1.11.14 CRKL.....	38
1.11.15 Ostali mehanizmi	38
1.12 HEMATOLOŠKI PREDIKTIVNI PARAMETRI.....	38
1.13 EMT PROCES I ZNAČAJ U REZISTENCIJI NA <i>EGFR</i> TKI.....	39
1.13.1 IGF-1R	40
1.13.2 E-kadherin.....	42
1.13.3 N-kadherin	42
1.13.4 Okludin.....	44
2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA	46
3. MATERIJAL I METODE	47
3.1 Pacijenti.....	47
3.2 Procena nivoa bola i antidolorozna terapija.....	47
3.3 Određivanje hematoloških parametara.....	48
3.4 Materijal za analizu	48
3.5 Izolovanje DNK i RNK i dobijanje Cdnk.....	48
3.5.1 Izolovanje DNK iz parafinskih uzoraka pomoću RNeasy FFPE Kit-a (QIAGEN) –.....	48
3.6 Izolovanje RNK iz parafinskih uzoraka pomoću RNeasy FFPE Kit-a (QIAGEN).....	49
3.7 Detekcija mutacija u genu <i>EGFR</i>	49
3.8 Sinteza komplementarne cDNK iz RNK	50
3.9 Analiza ekspresije gena.....	50
Statističke metode	50
4 REZULTATI.....	52
4.1 Ispitivanje uticaja demografskih karakteristika ispitivane grupe pacijenata na preživljavanje ...	52
4.2 Detekcija mutacija u <i>EGFR</i> genu i uticaj na preživljavanje	55
4.3 Uticaj hematoloških parametara na PFS, OS i toksičnost terapije.....	57
4.4 Ispitivanje pojave progresije na prvu liniju TKI.....	58
4.5 Ispitivanje neželjenih efekata primene <i>EGFR</i> TKI.....	59
4.6 Ispitivanje prisustva i efikasnosti lečenja kancerskog bola	61
4.7 Ispitivanje nivoa ekspresije gena <i>IGF-1R</i> , <i>E-kadherin</i> , <i>N-kadherin</i> i <i>okludin</i>	65
5. DISKUSIJA	67
6. ZAKLJUČCI.....	74
7. LITERATURA.....	75

1. UVOD

1.1 EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA PLUĆA

Karcinom pluća predstavlja globalni javno zdravstveni problem uprkos naporima koji su usmereni ka smanjenju i prekidu pušenja duvana, ranom otkrivanju ove bolesti, razvoju minimalno invazivne dijagnostike i terapije, kao i primeni novih terapijskih modaliteta. Od karcinoma pluća je u 2020. godini obolelo 2 206 771 osoba oba pola, a umrlo 1 796 144 (1). Petogodišnje preživljavanje pacijenata obolelih od svih tipova karcinoma pluća veoma je nisko (19%) i pored uvođenja ciljane i imunoterapije u lečenje (1).

Kod pacijenata koji boluju od EGFR pozitivnog nesitnoćelijskog karcinoma pluća, kao i kod onih sa ostalim mutacijama za koje postoji ciljane terapija, petogodišnje preživljavanje je nešto bolje i iznosi 5% - 50% (2).

Najveća incidencija oboljevanja od karcinoma pluća kod muškaraca prisutna je u Istočnoj Aziji (Kina, Japan, Republika Koreja) i u Istočnoj Evropi sa najvećom starosno standardizovanom stopom (ASR) od 77,4 na 100 000 muškaraca u Mađarskoj (2). Među ženskom populacijom karcinom pluća predstavlja vodeći uzročnik smrti od maligniteta u 28 zemalja u svetu (2).

Porast petogodišnjeg preživljavanja obolelih od nesitnoćelijskog karcinoma pluća sa 18% na 25% prvi put je posle mnogo vremena zabeležen u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) u periodu od 2009. do 2015. godine (3) uz istovremeni blagi pad u oboljevanju u muškoj populaciji staroj uzrasta od 35 do 64 godine. Međutim, COVID-19 pandemija dovela je do novih izazova u dijagnostici i lečenju pacijenata sa malignim bolestima zato što su zdravstveni sistemi u čitavom svetu bili u potpunosti usmereni prema lečenju pacijenata obolelih od COVID-19, što je dovelo do dijagnostikovanja karcinoma pluća i drugih maligniteta u uznapredovalim stadijumima sa mnogo težom kliničkom slikom. Pravi uticaj pandemije COVID-19 virusom na epidemiologiju i prognozu malignih bolesti biće jasniji nakon dužeg praćenja obolelih od maligniteta, a pretpostavke su da će dovesti do pada incidencije i porasta mortaliteta (1).

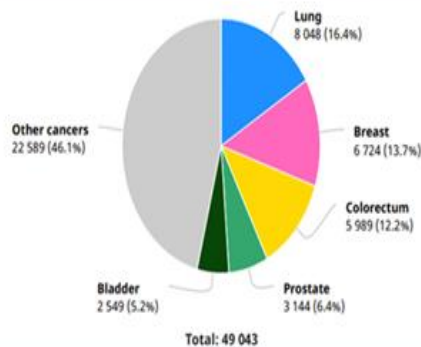
Naša zemlja takođe beleži dramatičan porast u oboljevanju i umiranju od karcinoma pluća u poslednjoj deceniji. Prema izveštaju SZO u 2020. godini je od karcinoma pluća u Srbiji obolelo 8048 osoba oba pola (16,4 % svih maligniteta), od čega 5409 (21,2 %) muškaraca i 2639 (11,2 %) žena, što ukazuje na dalji trend porasta broja obolelih i umrlih (1). Srbija je po oboljevanju karcinoma pluća na 18. mestu u Evropi, ali po umiranju na nezavidnom 2. mestu odmah posle Mađarske. Karcinom pluća i u našoj zemlji kod muškaraca predstavlja najčešće dijagnostikovani maligni tumor sa najvećim mortalitetom ispred karcinoma kolorektuma i prostate. Kod žena je karcinom bronha i pluća je drugi po učestalosti uzrok oboljevanja od malignih bolesti posle karcinoma dojke, a prvi po učestalosti uzrok umiranja (4). U Srbiji je u 2020. godini od karcinoma bronha i pluća umrlo čak 7084 osoba, što čini 40% svih smrti od malignih bolesti u 2020. Godini (slika 1) (5). Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje karcinoma (IACR) iz 2020. godine starosno standardizovana stopa (ASR) pojave karcinoma pluća u Srbiji je 47,3 na 100 000 što našu zemlju svrstava u grupu zemalja sa visokim rizikom od umiranja i oboljevanja od malignih bolesti (6). Ovi rezultati najverovatnije su posledica kombinovanog efekta raširene upotrebe duvana, vrlo niskih troškova duvana, odsustva nacionalnog skrining programa za karcinom pluća i ograničene dostupnosti lekova.

Serbia

Source: Globocan 2020



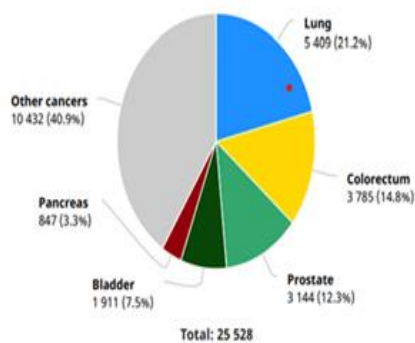
Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



Geography



Number of new cases in 2020, males, all ages



Numbers at a glance

Total population

8 737 370

Number of new cases

49 043

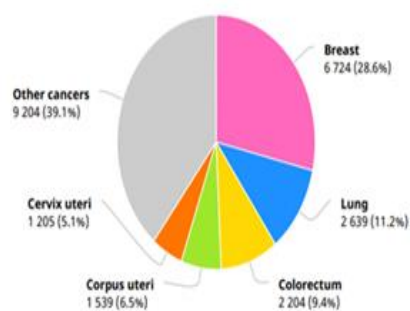
Number of deaths

28 107

Number of prevalent cases (5-year)

125 246

Number of new cases in 2020, females, all ages



Data source and methods

Incidence

Country-specific data source: Central Serbia Cancer Registry

Method: Estimated from national mortality estimates by modelling, using mortality:incidence ratios derived from cancer registry data in neighbouring countries

Slika 1. Prikaz epidemiologije karcinoma pluća u Srbiji u 2020. godini

Izvor Globocan 2020. Preuzeto iz <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheets.pdf>

1.2 ETIOPATOGENEZA KARCINOMA PLUĆA

Postoji veliki broj poznatih faktora rizika za nastanak karcinoma pluća. Najznačajniji je pušenje duvana (2), zato što u duvanskom dimu postoje karcinogeni kao što su nitrozamini, benzopiren diol epoksid i drugi (8). Najveći broj obolelih od karcinoma pluća su pušači (85-90%) (8). Broj popušanih cigareta i dužina pušačkog staža su najbitniji parametri za procenu rizika za nastanak ovog oboljenja (8).

Od posledica pušenja duvana u 20. veku prevremeno je umrlo 100 miliona ljudi uglavnom u zemljama sa visokim prihodom po stanovniku, a procenjuje se da će u 21. veku prevremeno umreti čak 1 bilion ljudi ukoliko se nastavi sadašnji trend pušenja duvana i to većinom u srednje razvijenim i nerazvijenim zemljama (9). U Srbiji cigarete puši više od trećine stanovništva (oko 37% muškaraca i 31,6% žena) (10). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije u našoj zemlji u 2016. godini je bilo 2,5 miliona pušača, a smatra se da će u budućnosti njih 1,2 miliona prevremeno imati smrtni ishod (11).

Elektronske cigarete su u poslednjoj deceniji dobile na popularnosti kao alternativa klasičnim cigaretama naročito kod pušača, iako ne postoje jasni dokazi da su elektronske cigarete efikasne u odvikavanju od pušenja duvana. One ne sadrže duvan, ali sadrže derivate nikotina (nitrozononikotin, nitrozamin keton) koji izaziva zavisnost kao i razne druge toksične supstance u tečnom agregatnom stanju kao što su propilen glikol, biljni glicerol, akrolein, acetaldehid i formaldehid koji tokom kompleksnog procesa prolaze koji se dešava u uređaju za elektronsko pušenje mogu postati potencijalni onkogeni, ili su već poznati onkogeni kao aldehidi. Dugoročni efekat korišćenja elektronskih cigareta na ljude još uvek nije poznat, obzirom da toksikološko ispitivanje pre stupanja ovog proizvoda na tržište nije učinjeno (12). Takođe, pojedinačan efekat elektronskih cigareta na zdravlje je teško proceniti obzirom da elektronske cigarete najčešće koriste aktivni pušači koji pokušavaju da se odviknu od pušenja cigareta ili pak bivši pušači. Postoje podaci da korišćenje elektronskih cigareta kod miševa izaziva pojavu adenokarcinoma pluća i urotelijalne hiperplazije mokraćne bešike (13), ali jasni dokazi o tome da li su elektronske cigarete faktor rizika za nastanak karcinoma pluća kod ljudi ne postoje.

Osobe koje puše tomopis i lulu takođe imaju povećan rizik od nastanka karcinoma pluća, ali je rizik i dalje manji u odnosu na osobe koje konzumiraju cigarete (14). Rizik od nastanka karcinoma pluća kod osoba koje puše marihuanu i kokain i dalje je nerazjašnjen.

U poslednje vreme sve češće se govori o pojavi karcinoma pluća kod nepušača, pa duvan nije jedini uzročnik ove bolesti. Karcinom pluća je ova multifaktorijalna bolest i nastaje kao posledica sinergističkog dejstva različitih faktora rizika. Drugi poznati mogući karcinogeni su azbest, radon, arsen, hrom, berilijum, nikl, kadmijum, čađ, zagađenost vazduha, ingestija beta karotena, policiklični ugljovodonici, azotni oksidi, insekticidi, herbicidi i drugi (3, 15, 16). Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP), idiopatska pulmonarna fibroza, tuberkuloza, sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS), tuberkuloza, alfa-1 antitripsin deficijencija, prethodna radijaciona terapija grudnog koša, hemioterapija, žuta rasa, pozitivna porodična i lična anamneza na malignitete takođe predstavljaju nezavisne faktore rizika za nastanak karcinoma pluća (3, 16).

Osobe koje su u prvom stepenu srodstva sa obolelim od karcinoma pluća su u povišenom riziku za nastanak ovog malignog tumora, što je naročito izraženo u porodicama sa obolelim u nekoliko generacijai kod pojave ovog maligniteta u mlađem životnom dobu (17). Ostali genetski faktori i dalje nisu dovoljno istraženi, ali postoje podaci iz nekoliko studija koji ukazuju na to da su pacijenti sa određenim genskim lokusima podložniji nastanku karcinoma pluća, kao što su CHRNA3, CHRNA5, TERT, BRCA2, CHECK2 i HLA lokus (18). Zna se da osobe kod kojih je registrovana delecija hromozoma 3p, 5q, 9p, 11p i 17p kao i mutacija p53 usled kumulativnog efekta ovih mutacija mogu razviti karcinom pluća (19).

1.3 PRIMARNA PREVENCIJA I SKRINING KARCINOMA PLUĆA

1.3.1 Prestanak pušenja

Prestanak pušenja jedna je od najefikasnijih mera smanjenja rizika od nastanka ove maligne bolesti. Pokazano je da dugogodišnji pušači u odnosu na nepušače imaju 10-30 puta veći rizik da tokom života obole od karcinoma pluća, dok je rizik kod osoba koje žive sa pušačem (tzv. pasivni pušači) veći za 20-30% (3). SZO je 2003. godine usvojila Konvenciju o kontroli pušenja duvana koja podrazumeva podizanje cena duvana i poreza na duvan, kao i prisustvo poruka upozorenja na pakovanjima cigareta. U našoj zemlji se prevalencija pušenja može značajno smanjiti u narednih 15 godina ukoliko se primene mere SZO koje podrazumevaju porast poreza na duvan sa 61% na 75%, smanjenje broja pušača među mladima, uvođenje novih zakona i njihovo pravilno sprovođenje, intenzivna kampanja protiv pušenja preko sredstava javnog obraćanja, kao i sprečavanje reklamiranja, promocija i sponzorisanja cigareta uz uključivanje slikovnih zdravstvenih upozorenja na duvanskim proizvodima uz intenzivnu promociju programa prestanka pušenja (4, 5). Za odvikavanje od nikotina mogu se koristiti nikotinski flasteri, lozenge, žvakaće gume, inhalatori, nazalni sprej, a od lekova bupropion i varenciklin (3).

1.3.2 Smanjenje pušenja

Kod osoba kod kojih nije moguće postići potpuni prekid pušenja i smanjenje broja cigareta može dovesti do određenih benefita obzirom na kumulativni efekat pušenja duvana.

1.3.3 Sekundarna prevencija (skrining) karcinoma pluća

Primena niskodozne kompjuterizovane tomografije (LDCT) za skrining karcinoma pluća dovela je do pada mortaliteta od ove bolesti. Direktni efekat sprovođenja programa ranog otkrivanja karcinoma pluća je dijagnostikovanje pacijenata u ranom stadijumu bolesti kada je moguće sprovesti hirurško lečenje (10). U našoj zemlji ne postoji nacionalni program za skrining karcinoma pluća, niti se on izvodi u okvirima kliničke studije, pa je neophodno njegovo uvođenje primenom LDCT u svakodnevnu kliničku praksu.

Rendgen grudnog koša, analiza sputuma, biomarkeri, pozitron emisiona tomografija (PET) se ne preporučuju kao pouzdane metode skrininga karcinoma pluća. Štetni efekti primene LDCT-a su lažno pozitivni rezultati zbog kojih je potrebno izvođenje invazivne dijagnostike i izlaganje potencijalno karcinogenim dozama zračenja tokom dugoročnog praćenja pacijenata.

Prema najnovijim preporukama evropskog Udruženja medikalnih onkolog, LDCT se preporučuje za skrining karcinoma pluća kod osoba kod kojih postoji visok rizik za pojavu ovog maligniteta (7). Potencijalni kandidati za skrining su osobe starosti od 55 do 74 godine, aktuelni ili bivši teški pušači (≥ 30 paklica-godina ili ≤ 15 godina od prestanka pušenja) (8, 11). U najnovijim smernicama Radne grupe za prevenciju Sjedinjenih Američkih Država (U.S. Preventive Services Task Force) (mart 2021. godine) ciljna grupa za skrining karcinoma pluća, primena LDCT proširena je na osobe starosti od 50 do 80 godina koji su aktuelni pušači, prestali sa pušenjem u poslednjih 15 godina ili puše više od 20 paklica-godina (10).

1.4 KLINIČKA PREZENTACIJA KARCINOMA PLUĆA I KANCERSKI BOL

Zbog odsustva simptoma u ranoj fazi bolesti najveći broj pacijenata sa karcinomom pluća se u Srbiji, ali i svetu dijagnostikuje u odmaklom stadijumu kada je moguće primeniti samo palijativne metode lečenja. Oko 10% pacijenata koji boluju od karcinoma bronha i pluća nema simptome i kod njih se karcinom pluća otkriva slučajno različitim radiološkim metodama kao što je radiografija pluća (12).

Najveći broj pacijenata sa karcinomom pluća (oko 90%) ima jedan ili više simptoma koji mogu biti opšti ili lokalni - specifični. Simptomi koji se javljaju kod pacijenata mogu nastati usled prisustva primarnog tumora na plućima, intratorakalnog ili ekstratorakalnog širenja malignog procesa ili mogu nastati kao posledica paraneoplastičnog sindroma (5).

Najčešći simptom kod pacijenata sa karcinomom pluća koji se javlja kod 50-75% pacijenata je kašalj. Česti simptomi zbog kojih se oboleli javljaju lekaru su otežano disanje (20-45%), hemoptizije, bol (38%) i promuklost (13). Opšti simptomi kao što su slabost, malaksalost, gubitak apetita, gubitak u telesnoj masi, rekurentne respiratorne infekcije i febrilnost su često udruženi sa lokalnim simptomima. Petogodišnja stopa preživljavanja viša je kod pacijenata kod kojih su prisutni opšti simptomi (18%) u odnosu na lokalne simptome (12%) (tabela 1).

Tabela 1. Simptomi i znakovi karcinoma pluća usled lokalnog efekta bolesti

<i>Simptomi karcinoma pluća usled prisustva primarnog tumora</i>	<i>Znakovi karcinoma pluća usled prisustva primarnog tumora</i>
kašalj	sniženi disajni zvukovi i dispnea
dispnea	sniženi srčani tonovi i uvećana srčana senka
hemoptizije	disfagija
gubitak apetita	elevirana hemidijafragma
gubitak telesne mase	promuklost
bol u grudima ili rebrima	pleuritični bol u grudima
slabost i malaksalost	ptoza, mioza, facijalna anhidroza
batičasti prsti	bol u ramenu i gubitak mišićne mase u nivou C8-T3 nervnog korena

C8-T3 – od osmog vertikalnog pršljenja do osmog torakalnog pršljenja

Usled regionalnog širenja bolesti nesitnoćelijski karcinom pluća može se prezentovati pojavom pleuralnog zadebljanja ili malignog pleuralnog izliva u oko 20% bolesnika (15). Mogu biti prisutni i znaci sindroma gornje šuplje vene (SVC) koji se manifestuju pojavom edema i pletore lica uz dilatirane vene vrata i naglašen venski crtež na grudnom košu. SVC najčešće nastaje usled opstrukcije gornje šuplje vene malignim tumorom. Pancoast sindrom nastaje zbog rasta tumora pluća u gornjem sulku prvog rebra i karakteriše se pojavom Hornerovog sindroma (ptoza, mioza i anhidroza), bolom u ramenu i atrofijom mišića šake.

Ekstratorakalne metastaze kod NSCLC najčešće su prisutne na kostima, mozgu, jetri i nadbubrežnim žezdama. Metastaze na kostima kod NSCLC su prisutne kod oko petine bolesnika. Češće su osteoklastične od osteoblastičnih metastaza i na njih se sumnja kada se pacijent žali na lokalizovani bol u kostima koji je često praćen povišenim vrednostima alkalne fosfataze (ALP) i kalcijuma (Ca). Indikacija za sprovođenje palijativne radioterapije je prisustvo osteoklastičnih metastaza na kostima koje se prezentuju bolom. Metastaze na jetri najčešće nisu simptomatske, osim kad su multiple i velikog dijametra usled čega se prezentuju bolom ispod desnog rebarnog luka, a kada su asimptomatske najčešće se uočavaju na CT-u ili se sumnja na njih postavlja nakon registrovanih povišenih vrednosti jetrinih enzima u laboratorijskim vrednostima (AST, ALT, gama GT, ukupni i direktni bilirubin). Metastaze u CNS-u mogu se prezentovati fokalnim neurološkim simptomima, kao i simptomima povišenog intrakranijalnog pritiska kao što su mučnina, povraćanje i glavobolja, epileptičkim napadom, konfuzijom, komom ili promenama mentalnog statusa kao što je delirijum. Metastaze na nadbubrežnim žezdama su uglavnom asimptomatske, dok se metastatski uvećane supraklavikularne i cervikalne limfni čvorovi najčešće mogu palpirati (tabela 2).

Tabela 2. Simptomi i znakovi karcinoma pluća usled udaljenih metastaza

Jetra	Slabost, gubitak apetita, gubitak telesne mase, hepatomegalija
--------------	--

Kosti	Bol, prelom, povišena alkalna fosfataza
Limfni čvorovi	Limfadenopatija
Mozak	Glavobolja, epileptički napadi, mučnina i povraćanje, promena mentalnog statusa
Nadbubrežne žlezde	Adrenalna insuficijencija
Koža	Subkutani nodusi

Simptomi i znakovi paraneoplastičnog sindroma prisutni su kod oko 10% pacijenata, češće se javljaju kod mikrocelularnog karcinoma pluća. Pod paraneoplastičnim sindromom podrazumevamo grupu kliničkih poremećaja koji nisu posledica direktne invazije i opstrukcije tumora, kao ni metastatske bolesti, ali nastaju usled prisustva malignog procesa u organizmu (14). Paraneoplastični sindromi koji su udruženi sa NSCLC su hiperkalcemija, sindrom neadekvatne sekrecije antidiuretskog hormona (SIADH), neurološki poremećaji, hipertrofička osteoartropatija, dermatomiozitis, polimiozitis i Kušingov sindrom (tabela 3).

Tabela 3. Paraneoplastični sindromi udruženi sa karcinomom pluća

Sistemska - anoreksija, kaheksija, gubitak telesne mase, slabost i malaksalost, febrilnost	
Batičasti prsti	češće se javljaju kod NSCLC
Hiperkalcemija	ektopična produkcija PTHrp
Hiponatrijemija	sindrom neadekvatne sekrecije antidiuretskog hormona (SIADH) ili ektopična produkcija ANP
Paraneoplastični encefalitis	promene mentalnog stanja
Kušingov sindrom	ektopična produkcija adrenokortikotropnog (ACTH) hormona
Hipertrofična osteoartropatija	Trijada batičasti prsti, artralgijska i osificirajući periostitis
Mišićna slabost	Lambert-Eaton mijastenički sindrom

NSCLC – nesitnoćelijski karcinom pluća; PTHrp – paratiroidnom hormone srodan protein; SIADH – sindrom neadekvatnog lučenja antidiuretskog hormona; ANP- atriumski natriuretski peptid; ACTH - adrenokortikotropni hormon

1.4.1 Kancerski bol

Bol je neprijatno senzorno i emocionalno iskustvo koje nastaje zbog aktuelnog ili potencijalnog oštećenja tkiva i prisutan je kod više od polovine pacijenata sa karcinomom pluća. Dobro je poznato da prisustvo ovog simptoma negativno utiče na kvalitet života pacijenata i dužinu preživljavanja, pa je adekvatna kauzalna i simptomatska terapija bola pacijenata sa karcinomom pluća od suštinskog značaja (15). Ovaj simptom se može pojaviti usled direktnog rasta tumora, kao i u sklopu regionalnog ili metastatskog širenja maligne bolesti (15). Metastaze u kostima predstavljaju jedno od najčešćih mesta metastatskog širenja LC. Javljaju se i kod pacijenata sa NSCLC koji imaju pisutne mutacije receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR), a prisustvo metastaza na kostima kod ovih pacijenata obično su povezane sa kraćim preživljavanjem. Druga dva česta uzroka bola kod pacijenata sa karcinomom pluća su pancoast tumor i zahvatanje struktura grudnog koša (15).

1.5 DIJAGNOSTIČKA EVALUACIJA

Plan za dijagnostičku evaluaciju pacijenta sa suspektnim karcinomom pluća zavisi od simptoma i individualnih karakteristika pacijenta (opšte stanje i komorbiditeti), veličine i lokalizacije tumora, stepena proširenosti bolesti, tehničkih mogućnosti i principa rada na nivou države i institucije (16).

Postoje koraci koje je neophodno ispoštovati kako bi se dobila tačna i precizna dijagnoza koja je ključna u donošenju odluke o modalitetu lečenja koje će se primeniti (tabela 5).

1.5.1 Anamneza i klinički pregled

Prvi korak u evaluaciji pacijenta koji imaju simptome i znakove koji ukazuju na postojanje primarnog malignog procesa na plućima podrazumeva uzimanje anamneze i klinički pregled. Detaljno uzeta anamneza sa precizno opisanim karakterom i trajanjem tegoba je ključna u daljem planiranju dijagnostičke obrade pacijenta. Klinički pregled je od izuzetne koristi u dobijanju dodatnih informacija radi otkrivanja metastaza. Poznavanje komorbiditeta neophodno je u proceni podobnosti pacijenta za sprovođenje invazivne dijagnostike i primene specifičnog onkološkog lečenja, dok podaci iz lične anamneze kao što su sekundarni malignitet i pojava malignih u porodici mogu ukazati na potrebu za sprovođenjem genetskog testiranja.

1.5.2 Procena opšteg stanja bolesnika

Opšte stanje pacijenta se rangira na osnovu ECOG (Eastern Cooperation Oncology Group) performans skora koji predstavlja skalu koja se koristi u proceni uticaja maligne bolesti na funkcionalnost pacijenta i svakodnevne životne aktivnosti, prognozu bolesti, procenu progresije maligne bolesti kao i procenu podobnosti za sprovođenje specifičnog onkološkog lečenja. Detaljan prikaz ECOG performans statusa nalazi se u Tabeli 4.

Tabela 4. ECOG performans skor

Gradus	ECOG performans skor
0	Asimptomatski, potpuno aktivan, sposoban da obavlja sve aktivnosti kojima se bavio pre bolesti, bez restrikcija
1	Simptomatski, ali potpuno pokretan pacijent, ograničen u sprovođenju napornih fizičkih aktivnosti, ali sposoban da obavlja poslove u sedećem položaju ili poslove koji nisu preterano zahtevni npr. lagane kućne poslove, kancelarijske poslove
2	Simptomatski, <50% vremena tokom dana provodi u krevetu, pokretan pacijent koji je sposoban da se sam brine o sebi, ali je nesposoban izvršavati bilo kakve radne aktivnosti; nije vezan za krevet; > 50% budnog vremena nije ograničen na krevet ili stolicu
3	Simptomatski, >50% vremena tokom dana provodi u krevetu, ali nije vezan za krevet, sposoban da brine o sebi uz ograničenja, provodi 50% ili više budnog vremena u krevetu ili stolici
4	Vežan za krevet, u potpuno neposoban da se brine o sebi, u potpunosti ograničen na krevet ili stolicu
5	Mrtav

ECOG PS – Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status

1.5.3 Laboratorijske analize

Krvna slika sa leukocitarnom formulom i biohemijski parametri u krvi su laboratorijske analize koje se rutinski rade pri postavljanju dijagnoze malignog tumora i pre otpočinjanja onkološke terapije. Tumorski markeri kod karcinoma pluća nemaju kliničkog značaja te se ne preporučuju u standardnoj evaluaciji pacijenta. Na osnovu krvne slike sa leukocitarnom formulom i ostalih hematoloških parametara moguće je izvršiti inicijalnu procenu inflamatornog statusa pacijenta. Parametre funkcije bubrega (urea, kreatinin), jetre (AST, ALT, GGT, ukupni i direktni bilirubin) i kostiju (ALP) je neophodno raditi pri postavljanju dijagnoze maligne bolesti radi procene funkcije navedenih organa i

u proceni proširenosti bolesti. Ovi parametri su takođe značajni pre otpočinjanja bilo koje onkološke terapije. Pored navedenih analiza, savetuje se i provera vrednosti elektrolita, naročito kalcijuma, jer se povišene vrednosti serumskog kalcijuma često registruju kod pacijenata sa malignitetom i mogu ukazati na postojanje metastaza na kostima ili biti posledica paraneoplastičnog sindroma (PTHrp).

1.5.4 Kardio-pulmonalna funkcija

Procena kardio-pulmonalne funkcije naročito je bitna u planiranju hirurškog lečenja karcinoma pluća u vidu lobektomije ili pneumonektomije, kao i pre sprovođenja invazivne dijagnostike. Kod pacijenata kod kojih se planira primena potencijalno kardiotoksične onkološke terapije potrebna je procena srčane funkcije ehokardiografskim pregledom sa određivanjem ejsione frakcije (EF), dok se koronarografija i/ili test opterećenjem mogu savetovati kod pacijenata kod kojih prethodno postoji dokazana koronarna bolest ili kod kojih se sumnja na postojanje iste (5).

Spirometrija i difuzioni kapacitet su ključni u proceni preoperativnog rizika a parametri od najvećeg značaja su FEV1 i DLCO. Prema algoritmu Americal College of Chest Physician (ACCP), ukoliko su vrednosti FEV1 i DLCO ≥ 80 nije potrebna dalja dijagnostika i smatra se da pacijent spada u grupu sa malim rizikom od nastanka postoperativnih komplikacija (5). Ukoliko je vrednost FEV1 i DLCO ≤ 80 potrebno je pacijenta uputiti na dalju dijagnostičku evaluaciju kako bi se izvršila procena postoperativne funkcije pluća (PPO) ili pacijenta uputiti na kardiopulmonarni test opterećenjem (5).

1.5.5 Neinvazivne dijagnostičke metode

1.5.5.1 Radiografija pluća

Često predstavlja prvu radiološku metodu koja se radi kod pacijenata kod kojih se sumnja na postojanje karcinoma pluća zbog relativno niske cene i široke dostupnosti rendgenskog aparata. Obzirom da radiografijom pluća nije moguće precizno odrediti karakteristike primarnog tumora kao ni stadijum bolesti neophodna je sprovesti dalju dijagnostičku obradu.

Tabela 5. Dijagnostičke procedure kod pacijenata u otkrivanju karcinoma pluća

Opšte stanje pacijenta	Anamneza
	Fizikalni pregled
	Komorbidity
	ECOG PS ^a
Laboratorijske analize	Krvna slika
	Biohemijske analize (parametri funkcije jetre, bubrega i kostiju)
Kardio-pulmonalna funkcija	Spirometrija - FVC ^b , FEV1 ^c , DLCO ^d
	EKG ^e
<i>opciono u slučaju indikacija</i>	<i>Test opterećenjem</i>
	<i>Ehokardiografija srca sa EF^f</i>
	<i>Koronarna angiografija</i>
Radiološka dijagnostika	Radiografija pluća
	CT grudnog koša ^g

	PET-CT ^h
	Magnetna rezonanca mozga
<i>opciono u slučaju indikacija</i>	<i>Scintigrafija skeleta</i>
	<i>CT mozga sa kontrastom</i>
Invazivni dijagnostički postupci	Bronhoskopija
	EBUS/EUS medijastinalnih limfnih čvorova ⁱ
	CT-vođena biopsija
	Transtorakalna iglena biopsija pluća
<i>opciono u slučaju indikacija</i>	<i>Cervikalna medijastinoskopija</i>
	VATS

^a ECOG PS – Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; ^b FVC – forsirani vitalni kapacitet; ^c FEV1 – forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; ^d DLCO – difuzioni kapacitet za ugljen monoksid; ^e EKG – elektrokardiografija; ^f EF - ejecciona frakcija; ^g CT - kompjuterizovana tomografija; ^h PET-CT - Pozitron emisiona tomografija kompjuterizovana tomografija; ⁱ EBUS – endobronhijalni ultrazvuk, EUS - endoezofagealni ultrazvuk.

Tabela pripremljena u skladu sa ESMO preporukama iz 2021. godine za rani i lokalni uznapredovali karcinom pluća (15)

1.5.5.2 CT grudnog koša

Kompjuterizovana tomografija (CT) grudnog koša je neinvazivna radiološka procedura koja se preporučuje kod svih pacijenata kod kojih se sumnja na postojanje primarnog malignog procesa na plućima (17). Uz prikaz struktura grudnog koša neophodno je prikazati i strukture gornjeg dela abdomena, pre svega jetre i nadbubrežnih žlezdiu u svrhu otkrivanja potencijalnih metastaza (18). Prilikom snimanja preporučuje se korišćenje intravenskog kontrastnog sredstva radi diferenciranja vaskularnih struktura od primarnog tumora ili uvećanih metastatskih limfnih čvorova. Na osnovu CT snimka grudnog koša i gornjeg sprata abdomena moguće je proceniti veličinu primarnog tumora (T), stepen zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i postojanje potencijalnih metastaza (M) čime se inicijalno može utvrditi klinički stadijum bolesti i planirati dalja dijagnostička evaluacija (18).

1.5.5.3 PET-CT

Smernice Evropskog udruženja za medicinsku onkologiju (ESMO) i Američkog društva za kliničku onkologiju (ASCO) iz 2021. godine navode da je potrebno razmotriti primenu pozitron emisione tomografije integrisane sa kompjuterizovanom tomografijom (PET-CT) kod pacijenata sa uznapredovalim karcinomom pluća (15, 24). Kod ovih pacijenata PET-CT može biti koristan u diferencijaciji malignih lezija od benignih na nadbubrežnim žlezdama, jetri i kostima (36, 37).

1.5.5.4 Dodatna dijagnostika u metastatskoj bolesti

Scintigrafija skeleta, CT mozga sa kontrastom ili MRI mozga najčešće se ne rade rutinski već kod pacijenata sa prisutnim suspektnim simptomima (bol u kostima, mučnina, povraćanje, glavobolja itd.), kao i kod onih sa odstupanjima u kliničkom pregledu i abnormalnostima u laboratorijskim analizama.

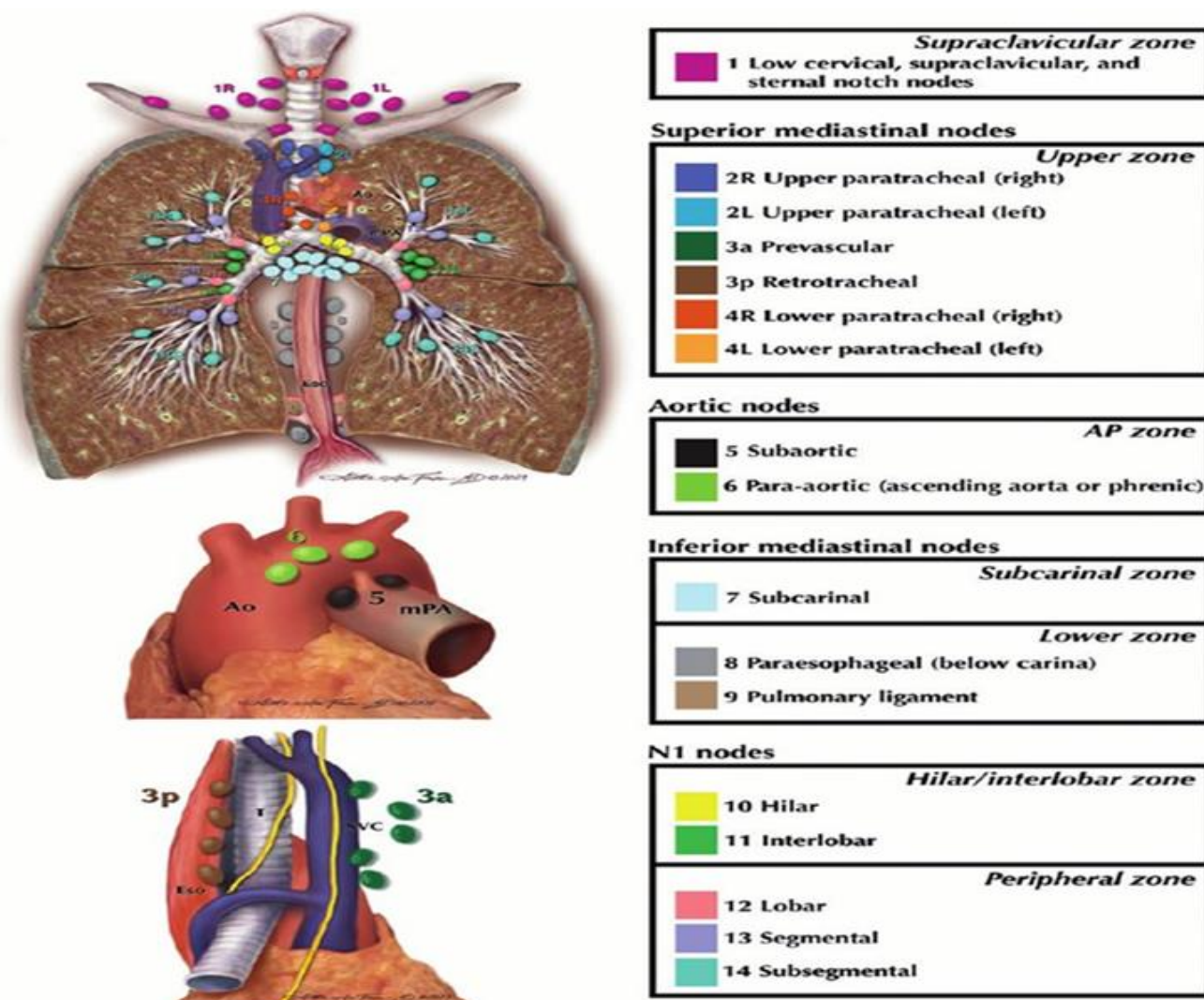
1.5.6 Minimalno-invazivni dijagnostički postupci

1.5.6.1 Bronhoskopija

Predstavlja minimalno invazivnu proceduru koja se koristi u dijagnostikovanju karcinoma pluća, ali i u terapijske svrhe. Bronhoskopija se koristi za uzimanje uzorka tkiva puća kod suspektnih centralno pozicioniranih velikih lezija na plućima koje su prethodno uočene na CT snimku grudnog koša ili rendgenskom snimku pluća. Može se koristiti i kod lezija koje vrše opstrukciju disajnih puteva. Bronhoskopski se može vršiti ispiranje bronhija (lavaža), bronhijalno četkanje, kao i endobronhijalna i transbronhijalna biopsija (23). Sprovodi se u kratkotrajnoj opštoj anesteziji ili bez anestezije.

1.5.6.2 Endobronhijalni i endoezofagealni ultrazvuk medijastinalnih limfnih čvorova

Efikasnost i preciznost bronhoskopije u dijagnostičke svrhe povećava se istovremenom primenom endobronhijalnog (EBUS) ili endoezofagealnog ultrazvuka (EUS) (21). EBUS i EUS se u kombinaciji sa transbronhijalnom iglenom aspiracijom (EBUS-TBNA) ili aspiracijom tankom iglom (EUS-FNA) mogu koristiti u određivanju statusa zahvaćenosti medijastinalnih limfnih čvorova na pozicijama 2R/L, 4R/L, 7, 10, 11, 12, ali ne i na pozicijama 5 i 6 (slika 2) (25). Evaluacija limfnih čvorova na pozicijama 3a, 5, 6, 8, 9, otežana je primenom EBUSa, te se u tim slučajevima može koristiti EUS koji je koristan i u vizuelizaciji leve nadbubrežne žlezde, celijačnih limfnih čvorova i jetre (25).



Slika 2. Mapa limfnih čvorova Internacionalnog udruženja za istraživanje karcinoma (IASLC)

Preuzeto iz El-Sherief et al. International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) Lymph Node Map: Radiologic Review with CT Illustration (26)

1.5.6.3 Transtorakalna iglena biopsija pluća

Transtorakalna iglena biopsija pluća (TTNB) izvodi se perkutano, najčešće uz CT vođenje, a predstavlja metodu izbora uzimanja uzorka tkiva pluća kod periferno pozicioniranih tumora. Ova metoda se može koristiti i u biopsiji limfnih čvorova, kao i u situacijama kada ne postoji drugi način za uzorkovanje tumorskog tkiva. Senzitivnost i specifičnost ove metode su jako visoki (oko 90%), ali je pneumotoraks česta komplikacija ove procedure (25).

1.5.7 Invazivni dijagnostički postupci

1.5.7.1 Medijastinoskopija/torakoskopija

Postoje i invazivniji hirurški pristupi koji se ređe koriste u dijagnostikovanju karcinoma pluća, kao što su video-asistirana torakoskopska hirurgija (video-assisted thoracoscopic surgery - VATS) i cervikalna medijastinoskopija koja je ranije bila zlatni standard u određivanju statusa limfnih čvorova. Obe se izvode u opštoj anesteziji, a morbiditet i mortalitet su u oba slučaja su niski (25).

1.6 PATOHISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA

Patohistološka podela karcinoma pluća je na nesitnoćelijski (NSCLC) i sitnoćelijski karcinom (SCLC). NSCLC je prisutan kod oko 85% pacijenata, a SCLC kod 15% obolelih. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je 2015. godine objavila novu klasifikaciju epitelijalnih tumora pluća koja se od prethodne iz 2004. godine najviše razlikuje u podeli tumora na osnovu imunohistohemijskih karakteristika. Na ovaj način naglašen je značaj molekularog testiranja tumora pluća u cilju primene i razvoja personalizovane onkološke terapije.

Prema novoj SZO patohistološkoj klasifikaciji iz 2015. godine epitelijalne tumore pluća delimo na 7 različitih grupa i to adenokarcinom, skvamocelularni karcinom, neuroendokrini karcinom, sarkomatoidni karcinom, adenoskvamocelularni, krupnoćelijski i difuznu idiopatsku pulmonalnu neuroendokrinu ćelijsku hiperplaziju (31). Kao novi entiteti uvedeni su i termini adenokarcinom *in situ* i minimalno invazivni adenokarcinom (17). Skvamocelularni karcinom pluća podeljen je na keratinizovani, nekeratinizovani i bazaloidni (tabela 6) (27).

Sitnoćelijski i krupnoćelijski karcinom pluća sada su grupisani u grupu pod nazivom neuroendokrini karcinomi pluća (17). Bazaloidni tip krupnoćelijskog karcinoma pluća postao je podgrupa skvamocelularnog karcinoma, dok limfoepiteliomu sličan krupnoćelijski karcinom pluća sada spada u grupu drugih ili neklasifikovanih karcinoma pluća (NOS) (17). I u ovoj grupi sitnoćelijski i rabdoidni kacinomi su postali samo citološke deskriptivne karakteristike, a ne zasebna patohistološka podgrupa.

Tabela 6. Klasifikacija epitelijalnih tumora pluća SZO iz 2004. i 2015. godine – uporedni prikaz

	SZO klasifikacija 2015. godina	SZO klasifikacija 2004.godina
Adenokarcinom	lepidični	<i>mešoviti</i>
	acinarni	acinarni
	papilarni	papilarni
	mikropapilarni	bronhioalveolarni (nemucinozni i mucinozni)
	Solidni	solidni
	invazivni mucinozni (mešoviti invazivni mucinozni i nemucinozni)	mešoviti, nemucinozni ili mucinozni ili nedeterminisani

	koloidni	
	fetalni	
	enterični	
	minimalno invazivni	
	preinvazivni (atipična adenomatozna hiperplazija, adenokarcinom <i>in situ</i> – ne-mucinozni i mucinozni)	
Skvamocelularni karcinom pluća	keratinizovani	sitnoćelijski
	nekeratinizovani	svetloćelijski
	bazaloidni	bazaloidni
		papilarni
Neuroendokrini karcinomi	sitnoćelijski karcinom	
	krupnoćelijski neuroendokrini karcinom	
	karcinoid (tipični i atipični)	
Sarkomatoidni karcinom	pleomorfni	pleomorfni
	vretenastoćelijski	vretenastoćelijski
	gigantocelularni	gigantocelularni
	karcinosarkom	karcinosarkom
	plućni blastom	plućni blastom
Adenoskvamozni karcinom		Adenoskvamozni karcinom
Krupnoćelijski karcinom		neuroendokrini tip
		kombinovan i sa drugim krupnoćelijskim karcinomima
		bazaloidni
		limfoepiteliomu sličan
		svetloćelijski tip
		sa rabdoidnim fenotipom
Difuzna idiopatska pulmonarna neuroendokrini ćelijska hiperplazija		Difuzna idiopatska pulmonarna neuroendokrini ćelijska hiperplazija

SZO - Svetska zdravstvena organizacija.

1.6.1 Imunohistohemija (IHC)

Nakon patohistološke analize u slučajevima dokaznog malignog tumora pluća pristupa se imunohistohemijskim analizama (IHC) kojima se preciznije može odrediti više detalja i tačna podgrupa karcinoma pluća (17). Kada je tumorsko tkivo pozitivno na p40 najverovatnije se radi o skvamocelularnom karcinomu pluća, a ukoliko je prisutna pozitivnost na TTF-1 najverovatnije je reč o adenokarcinomu (27). Koišćenjem IHC moguće je razlikovati i primarni tumor od metastatskog žarišta, a ova tehnika korisna je i u diferencijaciji neuroendokrinih tumora pluća koji su najčešće pozitivni na hromogranin, sinaptofizin i NCAM (CD56) (27).

1.7 TNM KLASIFIKACIJA KARCINOMA PLUĆA (8. IZDANJE)

TNM sistem za određivanje stadijuma maligne bolesti koristi se od 1970. godine i pored patohistološkog i imunohistohemijskog nalaza ključan je u određivanju prognoze maligne bolesti i donošenju odluke o daljem lečenju (28). Stadijum bolesti se na osnovu TNM sistema određuje prema veličini primarnog tumora (T1-4), zahvaćenosti limfnih čvorova malignim procesom (N1-3) i prisustva udaljenih metastaza (M0-1) (tabela 7 i 8). Od januara 2018. godine u primeni je 8. izdanje TNM klasifikacije karcinoma pluća nastalo zbog velikog napretka u dijagnostici i terapiji karcinoma pluća u poslednjoj deceniji. Ovo izdanje nastalo je na predlog Internacionalne asocijacije za istraživanje karcinoma (IACR) u cilju preciznog određivanja stadijuma maligne bolesti i optimizacije onkološkog tretmana (29). Najveće promene u 8. izdanju u odnosu na 7. izdanje TNM klasifikacije za karcinom pluća nastale su usled reklasifikacije i subklasifikacije stadijuma veličine primarnog tumora (T) i prisustva udaljenih metastaza (M). Step en zahvaćenosti limfnih čvorova (N) ostao je nepromenjen u odnosu na 7. izdanje zato što je adekvatno korelirao sa prognozom (28).

T stadijum se određuje na osnovu veličine primarnog tumora u najvećem dijametru i zahvaćenosti okolnih struktura (29). Najveći dijametar za T2 stadijum u 8. izdanju iznosi 5cm, a ne 7cm kao ranije. Tumori koji su veći od 5cm, a manji od 7cm sada su označeni kao T3 stadijum prema prognozi, a ne kao T2b (29).

M stadijum u TNM klasifikaciji označava prisustvo udaljenih metastaza koje se mogu podeliti na intratorakalne i ekstratorakalne. U 8. izdanju TNM klasifikacije stadijum M1b podeljen je na M1b i M1c na osnovu broja ekstratorakalnih metastaza. Podela je izvršena zato što je dokazano da broj ekstratorakalnih metastaza utiče na prognozu bolesti (29).

Pojedinačne promene u klasifikaciji T i M stadijuma doveli su i do promena u grupisanju TNM stadijuma, pa je prvi put do sada I stadijum podeljen na IA1, IA2 i IA3. U skladu sa tim nastupila je promena i IV stadijuma koji je podeljen na IVA i IVB. Takođe je u 8. izdanje uvršten i stadijum IIIC kod kog je N3, ali M0 radi ukazivanja na lošiju prognozu pacijenata sa ovim stadijumom maligne bolesti u odnosu na stadijum IIIA i IIIB (29).

Tabela 7. TNM klasifikacija karcinoma pluća

Primarni tumor (T)	
Tx	primarni tumor nije utvrđen, ili je pozitivan nalaz malignih ćelija u sputumu ili ispirku bronhija, bez vizualizacije radiološkim tehnikama i bronhoskopijom
T0	primarni tumor nije evidentan
Tis	carcinoma in situ
T1	tumor 3 cm ili manji u najvećem dijametru, okružen plućnim tkivom ili visceralnom pleurom, bez bronhoskopski vidljive invazije proksimalno od lobarnih bronha, lokalizovan van glavnog bronhija
T1a (mi)	Minimalno invazivni adenokarcinom

T1a	tumor 1 cm ili manji u najvećem dijametri
T1b	tumor veći od 1 cm, ali ne više od 2 cm u najvećem dijametri
T1c	tumor veći od 2 cm, ali ne više od 3 cm u najvećem dijametri
T2	tumor veći od 3 cm, ali manji od 5 cm, ili tumor koji ima neku od sledećih karakteristika <ul style="list-style-type: none"> • zahvata glavni bronh bez obzira na udaljenosti od karine traheje • zahvata visceralnu pleuru • udružen je sa atelektazom ili opstruktivnim pneumonitisom koji se širi na hilarnu regiju, zahvata deo ili cela pluća
T2a	tumor veći od 3 cm, ali manji od 4 cm u najvećem dijametri
T2b	tumor veći od 4 cm, ali manji od 5 cm u najvećem dijametri
T3	tumor veći od 5 cm, ali manji od 7cm u najvećem dijametri ili tumor koji je udružen odvojenim nodusima u istom režnju istog plućnog krila kao primarni tumor ili direktno zahvata neku od sledećih struktura: zid grudnog koša (uključujući parijetalnu pleuru i tumor gornjeg sulkusa), frenični nerv ili parijetalni perikard.
T4	tumor veći od 7cm u najvećem dijametri ili udružen sa odvojenim nodusima u različitiom režnju istog plućnog krila kao primarni tumor ili tumor koji zahvata neku od sledećih struktura: medijastinum, srce, velike krvne sudove, traheju, rekurentni laringealni nerv, jednjak, kičmene pršljenove i karinu traheje
Regionalni limfni čvorovi (N)	
Nx	metastaze u regionalnim limfnim čvorovima nisu utvrđene
N0	nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1	metastaze u ipsilateralnim peribronhijalnim i/ili ipsilateralnim hilarnim limfnim čvorovima i intrapulmonalni limfni čvorovi uključujući rastom direktno zahvatanje
N2	metastaze u ipsilateralnim medijastinalnim i/ili subkarinealnim limfnim čvorovima
N3	metastaze u kontralateralnim medijastinalnim, kontralateralnim hilarnim, ipsilateralnim ili kontralateralnim skalenskim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima
Udaljene metastaze (M)	
M0	nema udaljenih metastaza
M1	udaljene metastaze prisutne
M1a	odvojeni tumorski nodus(i) u kontralateralnom delu pluća, tumor sa pleuralnim nodusima, maligni pleuralni i perikardni izliv
M1b	Pojedinačna ekstratorakalna metastaza
M1c	Multiple ekstratorakalne metastaze u jednom ili više organa

T – veličina primarnog tumora, N - status limfnih čvorova, M - prisustvo metastaza.

Tabela 8. Stadijumi i grupisanje stadijuma UICC TNM (8. izdanje)

Okultni karcinom	Tx	N0	M0
Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum IA1	T1a(mi)	N0	M0
Stadijum IA2	T1b	N0	M0
Stadijum IA3	T1c	N0	M0
Stadijum IB	T2a	N0	M0
Stadijum IIA	T2b	N0	M0
Stadijum IIB	T1a-c	N1	M0
	T2a-b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadijum IIIA	T1a-c	N2	M0
	T2a-b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Stadijum IIIB	T1a-c	N3	M0
	T2a-b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
Stadijum IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
Stadijum IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b
Stadijum IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c

T – veličina primarnog tumora, N - status limfnih čvorova, M - prisustvo metastaza.

1.8 MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA NESITNOĆELIJSKOG KARCINOMA PLUĆA

Razvoj ciljane i imunoterapije ima za cilj personalizovano lečenje svakog pacijenta (precision medicine), zbog čega je molekularna dijagnostika u poslednjih 15 godina dobila na značaju naročito kod pacijenata sa neoperabilnim lokalno uznapredovalim i metastatskim karcinomom pluća (14). Molekularno testiranje se preporučuje kod pacijenata kod kojih je patohistološki, a potom i imunohistohemijski dokazan adenokarcinom pluća ili se sumnja na njega (14). Ovaj vid testiranja se

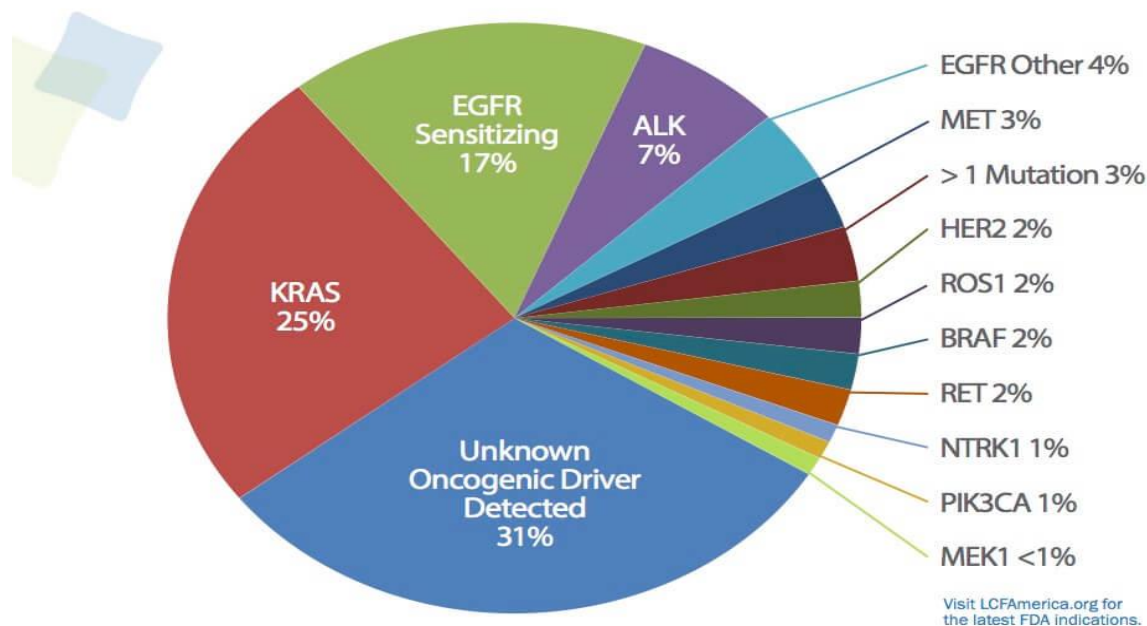
ne preporučuje kod pacijenata sa skvamocelularnim karcinomom pluća, osim kod nepušača, bivših pušača ili osoba koji su pušači sa <15 paklica-godina (41).

Razvoj terapije karcinoma pluća tekao je sporo sve do otkrivanja pogonskih mutacija (driver mutations) 2004. godine, a nakon toga i lekova koji ciljano inhibiraju te mutacije. Postoji nekoliko pogonskih mutacija koje predstavljaju odličnu terapijsku metu (therapeutic target), a to su *EGFR* mutacija, *ALK* rearanžman, *ROS1* rearanžman, *BRAF V600E* tačkasta mutacija, *NTRK* rearanžman, *MET* egzon 14 mutacija, *RET* rearanžman, *HER 2* mutacija, *NTRK1/2/3* genska fuzija i *PDL-1* ekspresija (slika 3) (3). U većini evropskih zemalja obavezno se izvodi testiranje *EGFR* mutacije i rearanžmana u *ALK* i *ROS1* genu (30), dok je u Srbiji o trošku Fonda zdravstvenog osiguranja dostupno testiranje mutacija/ekspresije *EGFR*, *ALK* i *PD-L1*.

Za molekularno testiranje koriste se formalinom fiksirani parafinom ukalupljeni (FFPE) uzorci tkiva dobijeni bronhoskopijom, transbronhijalnom iglenom biopsijom, transtorakalnom iglenom biopsijom, VATS biopsijom ili nekom drugom metodom. U novije vreme, imajući u vidu da se bronhoskopijom najčešće dobije jako mali uzorak, koriste se i uzorci koje ne podrazumevaju primenu FFPE metode (27).

Postoji nekoliko metoda kojima se može vršiti testiranje genetskih alteracija u tumorskom tkivu, a one koje se najčešće koriste i preporučuju su DNK sekvenciranje, DNK i RNK sekvenciranje nove generacije (NGS), reakcija lančane polimerizacije u stvarnom vremenu (real-time PCR), DNK testiranje specifičnog alela, Sanger sekvenciranje, fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) i imunohistohemija (IHC) (27).

Tečna biopsija (liquid biopsy) je metoda koja se može koristiti u molekularnoj dijagnostici NSCLC, ali ima svoja ograničenja. Razvijena je sa idejom da se neinvazivnim putem olakša otkrivanje mutacija za koje postoji ciljano terapija kod pacijenata kod kojih nije moguće dobiti adekvatan uzorak tkiva. Pod tečnom biopsijom podrazumevamo analizu bilo kog tumorskog materijala koji se nalazi u cirkulišućoj krvi ili u drugim telesnim tečnostima (17). Materijal koji se analizira iz tečne biopsije najčešće su cirkulišuće tumorske ćelije (CTC) ili cirkulišuća tumorska DNK (ctDNA). Primena tečne biopsije je od strane FDA i EMA odobrena kod pacijenata kod kojih biopsija tkiva pluća nije moguća ili kod kojih je registrovana progresija na primenu *EGFR* TKI radi otkrivanja *T790M* mutacije (tabela 9) (27).



Slika 3. Genetske alteracije kod karcinoma pluća

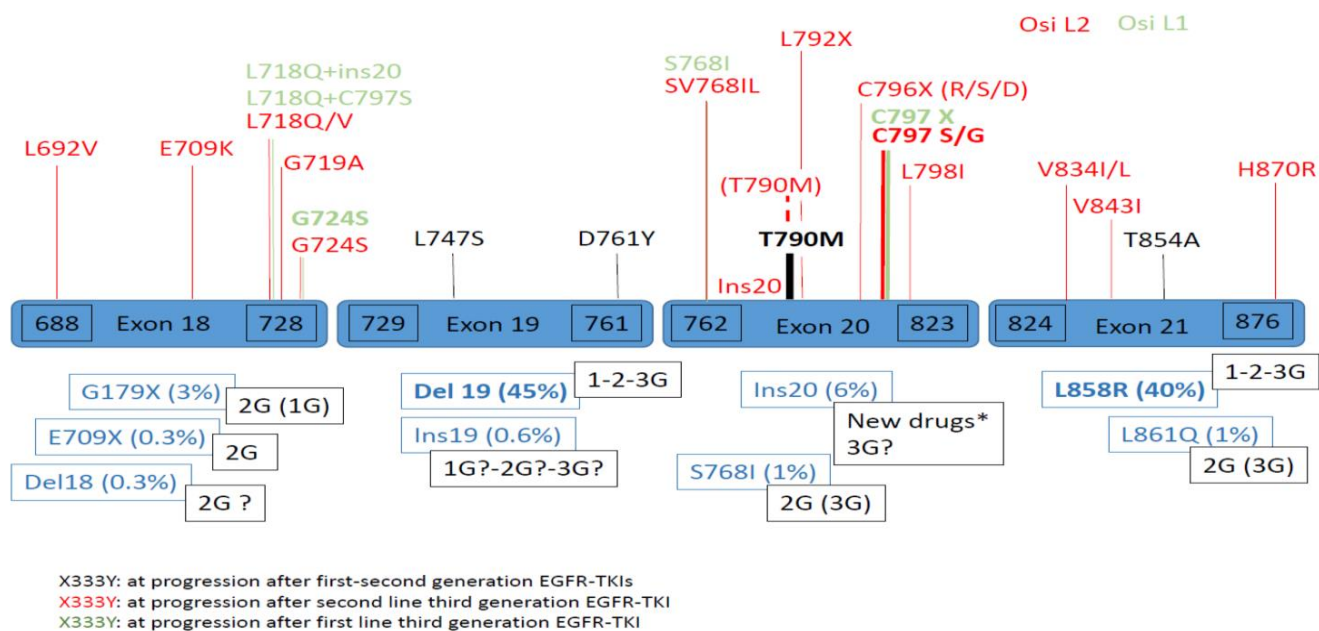
EGFR- receptor epidermalnog faktora rasta; *ALK* - anaplastična limfomna kinaza; *ROS1* – proto-onkogen tirozin-protein kinaza 1; *KRAS* – Kirsten pacov sarcoma virus; *MET* – faktor mezenhimalno-epitelijalne tranzicije; *NTRK 1/2/3* – receptor neurotifičke tirozin kinase; *PIK3CA* – fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaza; *MEK1* – mitogen aktivirana protein kinaza 1.

1.8.1 *EGFR*

Prva targetabilna genetska alteracija koja je otkrivena kod adenokarcinoma pluća je mutacija u receptoru za epidermalni faktor rasta (*EGFR*). Ovaj receptor je postao vrlo atraktivna terapijska meta zato što je *EGFR* često prekomerno eksprimiran u karcinomu pluća. Testiranje na mutaciju u *EGFR* u poslednje vreme preporučuje se kod pacijenata u stadijumu od IB-IIIa nakon biopsije ili operacije radi razmatranja uvođenja inhibitora tirozin kinaza u adjuvantnu terapiju, a ova nalaza se i dalje najčešće izvodi kod pacijenata sa neoperabilnim lokalno uznapredovalim i metastatskim adenokarcinomom pluća (27). Kod pacijenata u ranom stadijumu bolesti *EGFR* mutacije se češće detektuju u I stadijumu bolesti (20-50%), u odnosu na stadijum II i III (5-20%) (31).

EGFR je jedan od četiri člana porodice *ErbB* (*HER*) receptora tirozin kinaza i poznat je pod nazivima *HER1* odnosno *ErbB1*. Ovaj receptor se nalazi na površini svih epitelnih ćelija i odgovoran je za više ćelijskih odgovora uključujući proliferaciju, ćelijsko preživljavanje i supresiju apoptoze. Pri aktivaciji *EGFR* prelazi iz neaktivnog monomera u dimer vezivanjem za vanćelijske faktore rasta poput *EGF*. Dimerizacijom dolazi do autofosforilacije tirozin-kinaznog domena *EGFR* koji pokreće intracelularne signalne kaskade – *RAS-RAF-MEK-ERK*, *PI3K-AKT-mTOR* i *JAK-STAT* (32).

Mutacije u *EGFR* genu su najbolje ispitane onkogene pogonske mutacije i javljaju se prosečno kod oko 10-20% pacijenata obolelih od adenokarcinoma pluća u populaciji belaca, a kod Azijata kod čak 40-60% obolelih. Ova mutacija češće je prisutna kod nepušača i žena. Najčešće *EGFR* mutacije kod pacijenata sa NSCLC nalaze se u egzonima 18-21 koji kodiraju tirozin kinazni deo receptora, a lokalizacija aminokiselina takođe može biti korisna prilikom klasifikacije ovih mutacija i to od 688 do 728 za egzon 18, 729 do 761 za egzon 19, 762 do 823 za egzon 20 i preko 824 za egzon 21 (slika 4) (31).



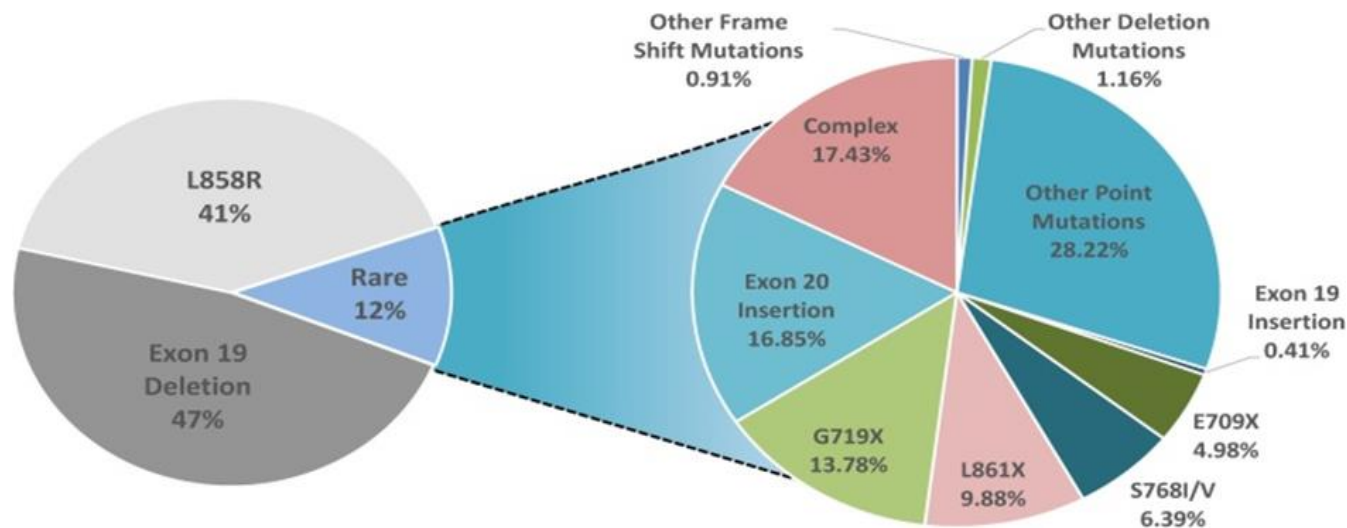
Slika 4. *EGFR* mutacije

Preuzeto iz Reita, D. et al. Mechanism of EGFR-TKI Resistance in *EGFR*-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Application to Biological Diagnostic and Monitoring. *Cancers* **2021**, *13*, 4926. <https://doi.org/10.3390/cancers13194926>

Procenjuje se da oko 85-90% *EGFR* mutacija čine delecija u egzonu 19 (*ex19del*) i tačkasta mutacija *L858R* u egzonu 21 (slika 4) (31). Mutacije *ex19del* i *L858R* povezane su sa najboljim odgovorom na ciljanu terapiju *EGFR TKI* zato što dovode do konformacione promene *EGFR* proteina. Ova promena omogućava optimalno kompetitivno vezivanje inhibitora za ATP-vezujući deo tirozin kinaznog domena, čime se prekida ATP-om indukovana signalna kaskada koja dovodi do prekomerne proliferacije ćelija (31). Mutacija *L858R* podrazumeva jednu vrstu supstitucije (*c.2573T>G*, *p.L858R*), dok delecija egzona 19 podrazumeva više od 30 različitih vrsta delecija od kojih je najčešća *delE746_A750* (73%), koja zahvata od 9 do 24 nukleotida. Dok delecija koja počinje na poziciji *E747* čini četvrtinu svih poznatih delecija u egzonu 19 (31). Kod pacijenata sa delecijom egzona 19 vreme bez progresije bolesti (PFS) i ukupno preživljavanje su duži u odnosu na pacijente sa *L858R* mutacijom (31).

Insercija egzona 19, *L861Q*, *G719X*, *S768I*, tačkaste mutacije u egzonu 18, 20 i 21 i kompleksne mutacije spadaju u retke *EGFR* mutacije koje čine preostalih 10% poznatih *EGFR* mutacija (31). Kompleksne *EGFR* mutacije su multiple mutacije u jednom uzorku, a mogu se naći u istom ili različitim egzonima (31). Imajući u vidu da se radi o retkim mutacijama podaci su oskudni, ali je primećeno da kod ovih pacijenata postoji češća pojava a metastaza u CNS-u, dok je stepen odgovora na terapiju inhibitorima tirozin kinaza različit (17).

Insercije i in-frame duplikacije su najčešće prisutne mutacije egzona 20 *EGFR* i pokazuju različiti odgovor na terapiju (27). Od svih mutacija egzona 20 *EGFR* najčešće registrovana je *T790M*. *T790M* predstavlja glavni uzrok pojave primarne i sekundarne rezistencije na TKI i kao većina drugih egzon 20 *EGFR* alteracija sa izuzetkom *p.A763_Y764insFQEA* i *p.A763_Y764insLQEA* udružena je sa lošim odgovorom na *EGFR TKI* terapiju (slika 5) (17).



Slika 5. Shematski prikaz poznatih retkih mutacija u *EGFR* genu

Preuzeto iz Harrison et al. (2020) Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer .

Testiranje *EGFR* mutacije se u Srbiji sprovodi od 2011. godine od kada je testirano preko 6000 pacijenata od kojih je 10% imalo *EGFR* mutaciju. Na IORS-u se testiranje *EGFR* vrši tehnikom real-time PCR (Cobas, Roche Diagnostics) iz bioptičkih uzoraka tkiva i tečne biopsije.

1.8.2 ALK

Rearanžmani u *ALK* (anaplastična limfomna kinaza) fuzionom genu se javljaju kod 2-5% pacijenata sa adenokarcinomom pluća (17). *ALK* je najčešće udružen sa *EML4* (engl. echinoderm microtubule-associated protein-like 4) i spada u tirozin kinazne receptore. Rearanžman u *ALK* genu dovodi do disregulacije ćelijskog ciklusa, a pacijenti sa ovom genetskom alteracijom pokazuju odgovor na terapiju *ALK* inhibitorima tirozin kinaza (27). Metode koje se koriste za otkrivanje rearanžmana u *ALK* genu su FISH, ISH i NGS. U Srbiji se izvodi testiranje *ALK* rearanžmana samo u okviru kliničke studije metodom imunohistohemije (klon D5F3, Ventana), dok je u većini razvijenih zemalja *ALK* testiranje obavezno kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim ili metastatskim adenokarcinomom pluća.

Tabela 9. Targetabilne mutacije u uznapredovalom ili metastatskom karcinomu pluća i dostupna ciljana terapija prema NCCN vodiču iz 2022. godine

<i>Mutacija</i>	<i>Metoda</i>	<i>Dostupna terapija</i>
<i>EGFR mutacije (egzon 19 delecija ili L858R)</i>	<i>Bilo koji dostupni validirani metod koji prolazi proces eksterne kontrole kvaliteta</i>	PRVA LINIJA 1. Afatinib 2. Erlotinib 3. Dacomitinib 4. Gefitinib 5. Osimertinib 6. Erlotinib+Ramucirumab 7. Erlotinib+Bevacizumab (neskvamozni) NAREDNE LINIJE 1. Osimertinib
<i>EGFR egzon 20 insercija</i>		NAREDNE LINIJE 1. Amivantamab-vmjw 2. Mobocertinib
<i>EGFR 768I, L861Q i/ili G719X</i>		PRVA LINIJA 1. Afatinib 2. Erlotinib 3. Dacomitinib 4. Gefitinib 5. Osimertinib NAREDNE LINIJE 1. Osimertinib
	<i>FISH</i> <i>IHC</i>	PRVA LINIJA 1. Alectinib 2. Brigatinib 3. Ceritinib 4. Crizotinib

<i>ALK rearanžman</i>	NGS	5. Lorlatinib NAREDNE LINIJE 1. Alectinib 2. Brigatinib 3. Ceritinib 4. Lorlatinib
<i>ROS1 rearanžman</i>	<i>FISH</i> <i>IHC</i> NGS	PRVA LINIJA 1. Crizotinib 2. Ceritinib 3. Entrectinib NAREDNE LINIJE 1. Lorlatinib 2. Entrectinib
<i>BRAF V600E mutacije</i>	<i>Bilo koji dostupni validirani metod koji prolazi proces eksterne kontrole kvaliteta</i>	PRVA LINIJA 1. Dabrafenib/Trametinib 2. Dabrafenib 3. Vemurafenib NAREDNE LINIJE 1. Dabrafenib/Trametinib
<i>KRAS mutacija G12 C</i>		NAREDNE LINIJE 1. Sotorasib
<i>MET preskakanje egzona 14</i>	<i>IHC</i> RNK NGS	1. Capmatinib 2. Crizotinib 3. Tepotinib
<i>RET rearanžman</i>	<i>FISH</i> <i>RT-PCR</i> DNK NGS	1. Selpercatinib 2. Pralsetinib 3. Cabozantinib
<i>NTRK 1/2/3</i>	<i>FISH</i> <i>IHC</i> RNK NGS	PRVA LINIJA/NAREDNE LINIJE 1. Larotrectinib 2. Entrectinib

EGFR- receptor epidermalnog faktora rasta; *ALK* - anaplastična limfomna kinaza; *ROS1* – proto-onkogeno tirozin-protein kinaza 1; *KRAS* – Kirsten pacov sarcoma virus; *MET* – faktor mezenhimalno-epitelijalne tranzicije; *NTRK 1/2/3* – receptor neurotifičke tirozin kinaze.

1.8.3 *PD-L1*

Ligand programirane ćelijske smrti (*PD-L1*) je transmembranski protein koji se nalazi na površini malignih ćelija, dok se protein programirane ćelijske smrti nalazi na T ćelijama celularnog imunog odgovora (40). Uloga *PD-1* u normalnom imunom odgovoru je inhibicija imunog odgovora i razvoj

tolerancije na sopstvene ćelije u cilju sprečavanja nastanka autoimunih bolesti, dok u malignoj bolesti interakcija *PD-1* i *PD-L1* omogućava efikasno izbegavanje imunološkog odgovora domaćina. Zbog navedenih karakteristika ovi molekuli su postali efikasna meta za razvoj imunoterapije u obliku monoklonskih antitela koji omogućavaju ponovnu aktivaciju imunog odgovora protiv malignih ćelija (41). Prisutnost *PD-L1* na malignim ćelijama određuje se imunohistohemijom (IHC) na osnovu broja ćelija koja pokazuju pozitivnost (engl. TPS-tumor proportion score) (27). Iako prema najnovijim preporukama *PD-L1* nije idealan biomarker njegova vrednost služi za razlikovanje *PD-L1* pozitivnih tumora od *PD-L1* negativnih. Pacijenti sa tumorima pluća čija je *PD-L1* ekspresija $\geq 50\%$ su kandidati za primenu pembrolizumaba koji spada u inhibitore *PD-1* (tabela 10) (27). Za primenu nivolumaba koji takođe spada u inhibitore *PD-1* ili atezolizumaba koji spada u inhibitore *PD-L1* u prvoj ili narednim linijama nije potrebno da vrednost ekspresije *PD-L1* bude $\geq 50\%$ (27). U Srbiji se testiranje *PD-L1* izvodi metodom imunohistohemije (klon 22C3, Dako).

Tabela 10. Dostupna imunoterapija u odnosu na *PD-L1* status prema NCCN vodiču iz 2022.godine

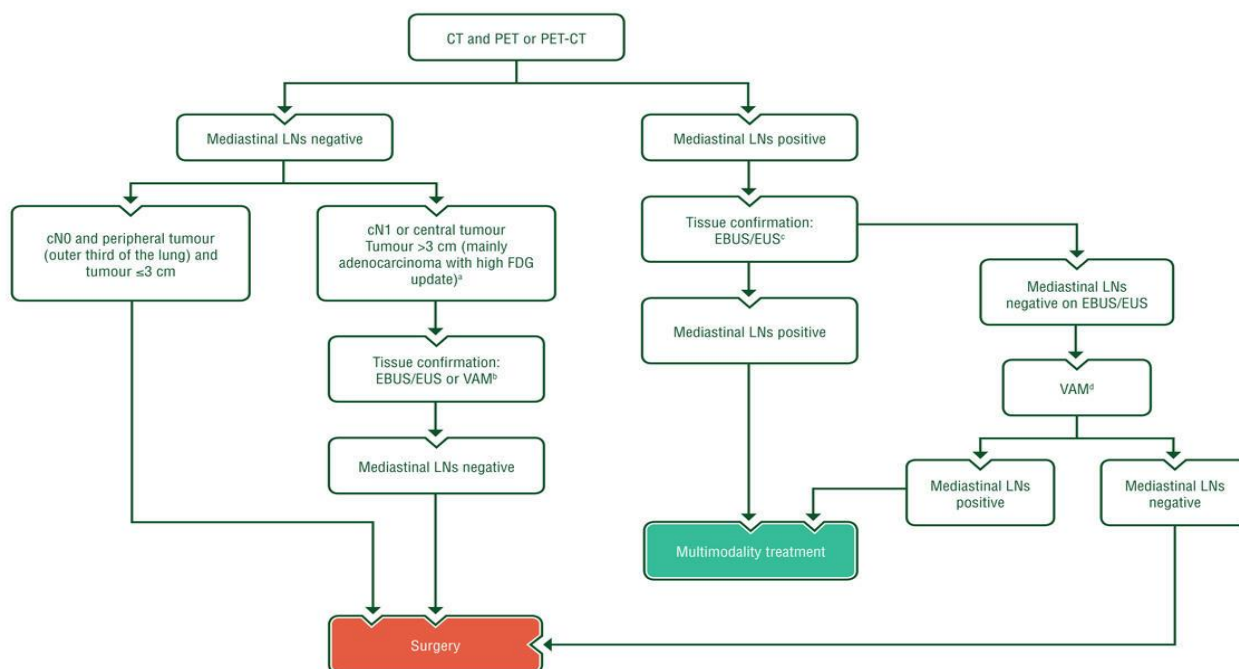
Biomarker	Dostupna terapija
<i>PD-L1</i> $\geq 1\%$	PRVA LINIJA
	Pembrolizumab
	Carboplatin ili cisplatin/pemetrexed/pembrolizumab (neskvamozni)
	Carboplatin/paclitaxel/bevacizumab/atezolizumab (neskvamozni)
	Carboplatin/paclitaxel ili paclitaxel vezan za albumin/pembrolizumab (skvamozni)
	Carboplatin/paclitaxel vezan za albumin/pembrolizumab (skvamozni)
	Carboplatin/paclitaxel vezan za albumin/atezolizumab (neskvamozni)
	Nivolumab/ipilimumab
	Nivolumab/ipilimumab/pemetrexed (carboplatin ili cisplatin) (neskvamozni)
	Nivolumab/ipilimumab/paclitaxel/carboplatin (skvamozni)
<i>PD-L1</i> $\geq 50\%$	PRVA LINIJA (pored iznad navedene terapije)
	Atezolizumab
	Cemiplimab-rwlc

PD-L1 – programirana ćelijskasmrt ligand 1

1.9 LEČENJE KARCINOMA PLUĆA PO STADIJUMU BOLESTI

Izbor adekvatnog modaliteta lečenja zavisi od stadijuma bolesti, histologije i molekularnih karakteristika tumora, opšteg stanja pacijenta, komorbiditeta, dostupnosti terapije i odluke pacijenta (grafikon 1 i 2). Obzirom da se kod najvećeg broja pacijenata tumor dijagnostikuje u odmaklom ili metastatskom stadijumu najčešće se primenjuje multimodalno lečenje koje podrazumeva hirurgiju, radioterapiju i sistemsku terapiju. Odluka o lečenju se u svetu i našoj zemlji donosi na Konzilijumu lekara na kome učestvuju grudni hirurg, radijacioni onkolog i medikalni onkolog uz lekare drugih specijalnosti, a onkološko lečenje se u Srbiji provodi u velikim onkološkim centrima ili onkološkim dispanzerima.

Grafikon 1. ESMO algoritam za stažirane zahvaćenosti lokoregionalnih limfnh čorova kod pacijenata sa nemetastatskim NSCLC



Crvena: operacija; tirkizna: kombinacija tretmana ili drugih sistemskih tretmana; bela: drugi aspekti upravljanja.

CT - kompjuterska tomografija; EBUS - endoskopski ultrazvuk bronhija; EUS - endoskopski ultrazvuk; FDG - fluorodeoksiglukoza; LN - limfni čvor; NPV - negativna prediktivna vrednost; NSCLC - nesitnoćelijski karcinom pluća; PET - pozitronska emisiona tomografija; VAM - video-potpomognuta medijastinoskopija.

1.9.1 RESEKTABILNI NCLC (STADIJUM I-III A)

1.9.1.1 Hirurgija

Hirurško lečenje je terapija izbora kod pacijenata sa karcinomom pluća u ranom stadijumu bolesti (I i II). Hirurgija i radikalna radioterapija u ranom stadijumu vrše se u kurativne svrhe. Međutim samo trećina novodijagnostikovanih pacijenata su kandidati za hirurško lečenje, a čak 25-75% ima veliki rizik za recidiv bolesti nakon operacije zbog prisustva preoperativnih mikrometastaza. Obim hirurške resekcije zavisi od stadijuma bolesti, lokalizacije tumora i kardiopulmonalne rezerve pacijenta. Hirurško lečenje se može izvesti otvorenim ili minimalno invazivnim pristupom. Procedura izbora kod tumora koji su ≥ 2 cm je lobektomija, dok je pneumonektomiju potrebno izvoditi samo kada za to postoje indikacije (npr. proksimalno pozicioniran tumor) i kada je kardiopulmonalna rezerva pacijenta očuvana (34). Sublobarne resekcije, kao što su segmentektomija i klinasta resekcija pluća se preporučuju kod prisutnih promena po tipu mlečnog stakla (engl. ground glass opacities), *in situ* ili minimalno invazivnog adenokarcinoma pluća, kao i kod pacijenata koji nisu kandidati za lobektomiju, a čiji je maksimalni promer tumora ≤ 3 cm (34). Pod kompletnom hirurškom resekcijom podrazumevamo negativne ivice resekcije, odustvo metastaza u najvišem medijastinalnom limfnom čvoru, kao i sistematski sprovedenu disekciju i/ili uzimanje uzoraka (engl. sampling) iz lokoregionalnih limfnih čvorova (42).

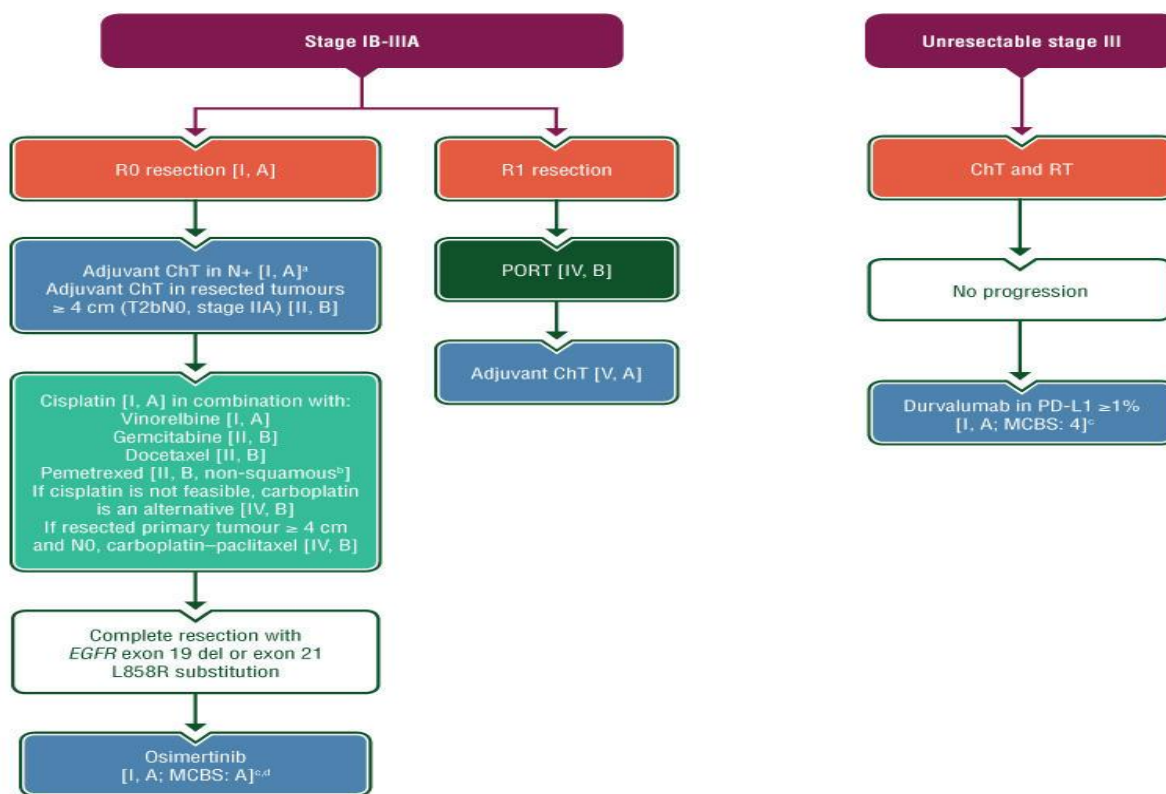
Pacijenti u stadijumu IIIA (T3N1M0) i IIIB (T4N0-1M0) mogu biti kandidati za hirurško lečenje ukoliko je kompletna resekcija tumora moguća (43). Kod ovih pacijenata pre operacije potrebno je

patološki potvrditi status medijastinalnih limfnih čvorova (24). Ukoliko nije nađeno prisustvo malignih ćelija u limfnim čvorovima ovi pacijenti su kandidati za ekstenzivnu en-bloc hiruršku resekciju (42).

Videotorakoskopska (VATS) resekcija pluća može biti opcija kod pacijenata u ranom stadijumu bolesti zato što se ovim pristupom omogućava kraća hospitalizacija, brži oporavak, manja učestalost postoperativnih komplikacija i niži postoperativni mortalitet za razliku od klasične torakotomije (34). Nema razlike u preživljavanju i pojavi lokalnog recidiva kod pacijenata u odnosu na vrstu hirurškog pristupa koji je korišćen (34). Međutim, kod pacijenata kod kojih je učinjena VATS resekcija pluća veća je šansa da će se uspešno kompletirati adjuvantna terapija (34). VATS pristup upravljanjem robotom je i dalje izuzetno skupa metoda koju većina institucija ne može finansijski da priušti, te se zbog toga i dužine procedure trenutno ne preporučuje kao metoda prvog izbora (34).

Uz resekciju pluća u istom aktu potrebno je učiniti i evaluaciju limfnih čvorova (34). Disekcija limfnih čvorova preporučuje se kod pacijenata u stadijumu II i IIIA. Savetuje se uklanjanje bar 6 limfnih čvorova u različitim nivoima. Od toga bar 3 limfna čvora treba da budu u medijastinumu, uključujući subkarinealnu lokalizaciju (desno 2R, 4R, 7 i 8, a levo 4L, 5, 6, 7, 8 i 9) (27).

Grafikon 2. ESMO algoritam sistemske terapije kod pacijenata u ranom stadijumu bolesti (IB-IIIa) i kod pacijenata sa neresektabilnim lokalno uznapredovalim NSCLC (stadijum III)



Ljubičasta: opšte kategorije ili stratifikacija (simptom); crvena: operacija; tamno zelena: radioterapija; plava: sistemska terapija protiv raka; tirkizna: kombinacija tretmana ili drugih sistemskih tretmana; bela: drugi aspekti upravljanja.

ChT - hemioterapija; ESMO - Evropsko udruženje medikalnih onkologa; MCBS ' Magnitude of Clinical Benefit Scale; N+- pozitivan limfni čvor; PD-L1 - programirana smrt-ligand 1; PORT - postoperativna radioterapija; RT - radioterapija.

1.9.1.2 Radikalna radioterapija

Radioterapijsko lečenje u onkologiji zasniva se na principu oštećenja DNK maligne ćelije primenom jonizujućeg zračenja. Radikalna radioterapija ima značajnu ulogu u lečenju pacijenata sa ranim karcinomom pluća kada hirurgija nije moguća (npr. pacijenti stariji od 75 godina ili pacijenti sa lošom disajnom funkcijom) ili u slučajevima kada pacijenti nisu motivisani za hirurško lečenje (27,42). Tada se može primeniti konvencionalna frakcionisana radioterapija ili stereotaktička radioterapija (engl. stereotactic body radiotherapy - SBRT). Konvencionalna frakcionisana radioterapija se sprovodi tokom 6-7 nedelja, ukupna doza zračenja koja se primenjuje je 60-70 Gy u pojedinačnim dozama od po 2Gy.

1.9.1.3 Postoperativna radioterapija (PORT)

Kod pacijenata u stadijumu I ili II kada nije učinjena kompletna hirurška resekcija ili u slučajevima kada je tumor zahvatio zid grudnog koša može se razmotriti postoperativna radioterapija (34). PORT se rutinski ne preporučuje kod pacijenata sa kompletnom resekcijom NSCLC u stadijumu I-IIIa. Kod pacijenata kod kojih nije učinjena kompletna hirurška resekcija radioterapiju je moguće primeniti postoperativno pre hemioterapije (44). Kod takvih pacijenata PORT omogućava bolju lokoregionalnu kontrolu bolesti i smanjuje rizik od pojave lokalnog recidiva (45). Postoperativna radioterapija se ne preporučuje u stadijumu IIIa, ali je potrebno razmotriti je u N2 stadijumu (46).

1.9.1.4 Adjuvantna hemioterapija

Primena adjuvantne hemioterapije preporučuje se kod pacijenata sa NSCLC u stadijumu IIA, IIB i IIIa zato što poboljšava petogodišnje preživljavanje za 4-5%. Adjuvantna hemioterapija se primenjuje 6 do 8 nedelja posle operacije (47). Primena cisplatinskog dubleta sprovodi se u 3 do 6 ciklusa do kumulativne doze cisplatine koja iznosi 300 mg (48). Savetuje se primena cisplatine uz docetaksel ili gemcitabin kod pacijenata sa skvamoznim nesitnoćelijskim karcinomom pluća, dok se kod pacijenata sa neskvamoznim NSCLC preporučuje primena pemetrekseda sa cisplatinom (47). Prema ESMO vodiču iz 2021. godine može se razmotriti i primena vinka alkaloida (vinorelbina) uz cisplatin (48). Kod pacijenata kod kojih postoje kontraindikacije za primenu cisplatine može se razmotriti primena karboplatine (47). Hemioterapija karboplatinom je opcija kod pacijenata u IIA stadijumu (T2bN0) kod kojih je učinjena kompletna resekcija tumora (48).

1.9.1.5 Adjuvantna ciljana terapija

Evropska agencija za lekove (EMA) i agencija za lekove i hranu SAD (eng. FDA - Food and Drug Administration) odobrili su adjuvantnu primenu Osimertiniba kod pacijenata u stadijumu IB-IIIa nakon kompletne resekcije tumora koji imaju *EGFR* deleciju u egzonu 19 ili *EGFR* mutaciju L858R u egzonu 21. Odluka je doneta nakon objavljenih rezultata ADAURA studije koja je ispitala efikasnost i bezbednost Osimertiniba u adjuvantnom setingu nakon kompletne resekcije tumora pluća sa ili bez primene adjuvantne hemioterapije (49). ADAURA studija je multicentrična randomizovana, dvostruko slepa studija faze III u koju je uključeno 682 pacijenta obolelih od *EGFR* pozitivnog NSCLC u stadijumu od IB do IIIa (34). Svi uključeni pacijenti imali su detektovane jednu od dve najčeće mutacije u *EGFR* genu - delecija u egzonu 19 ili L858R u egzonu 21 (46). Svi pacijenti su randomizovani (1:1) na grupu koja će primiti Osimertinib 80 mg jednom dnevno tri godine i placebo grupu koja je praćena nakon operacije i adjuvantne hemioterapije ukoliko su je primili. Prema rezultatima ove studije adjuvantna primena Osimertiniba značajno smanjuje pojavu recidiva bolesti i produžava period preživljavanja bez bolesti (engl. disease free survival-DFS) (34). Navedeni rezultati uočeni su nakon 2 godine praćenja pacijenata, a planirani period praćenja je 3 godine nakon čega će se imati uvid u uticaj primene adjuvantnog Osimertiniba na ukupno preživljavanje (50, 51). Ovo je prvi put da primena adjuvantne ciljane terapije da obećavajuće rezultate, pa je moguće da ovakvi i slični rezultati u budućnosti promene način lečenja pacijenata sa *EGFR* pozitivnim resektabilnim NSCLC (27). U skladu sa rezultatima studije najnovija ESMO preporuka je primena Osimertiniba u adjuvantnom pristupu sa ili bez hrane u dozi od 80 mg jednom dnevno do ukupno tri godine ili do ponovne pojave bolesti ili pojave neprihvatljive toksičnosti terapije kod pacijenata (48).

1.9.1.6 Neoadjuvantna i adjuvantna imunoterapija

Prema najnovijim ESMO preporukama iz 2021. godine primena imunoterapije uz hemioterapiju u adjuvantnom ili neoadjuvantnom pristupu i dalje nije standard u lečenju obolelih od NSCLC-u stadijumu IB-IIIa (48). Ovaj stav o neoadjuvantnoj terapiji zasnovan je na osnovu rezultata neobjavljene studije citirane u najnovijim ESMO preporukama u kojima se navodi da je stopa kompletnog patološkog odgovora veća kod pacijenata kod kojih je uz hemioterapiju u neoadjuvantnom pristupu primenjena i imunoterapija inhibitorima koji deluju na mestima kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa (engl. checkpoint inhibitors) (48). Objavljeni su prvi rezultati CheckMate 816 studije u kojoj je ispitivana neoadjuvantna primena 3 ciklusa Nivolumaba uz hemioterapiju zasnovanu na cisplatinu kod pacijenta u stadijumu IB-IIIa i dobijeni su rezultati da je primena imunoterapije uz hemioterapiju dovela do veće stope patoloških kompletnih odgovora u odnosu na samo hemioterapiju [24.0% prema 2.2%, OR 13.94, 99% CI 3.49-55.75, $P < 0.0001$], ali se definitivni rezultati ove studije i dalje očekuju (48).

Atezolizumab je prvi lek koji je odobren u postoperativnoj primeni kod pacijenata sa resektabilnim NSCLC a pripada grupi imunoterapeutika. Odluka je doneta nakon objavljenih rezultata IMpower010 multicentrične randomizovane studije (52). Primena atezolizumaba u ovoj studiji dovela je do značajnog poboljšanja perioda preživljavanja bez bolesti (engl. disease free survival - DFS) u odnosu na primenu najbolje suportivne terapije (engl. best supportive care – BSC). Rezultati su uočeni kod pacijenata kod kojih je registrovan nivo PD-L1 ekspresije $\geq 1\%$ u stadijumu II-IIIa NSCLC, kao i kod svih randomizovanih pacijenata u stadijumu II-IIIa [medijana DFS 42.3 prema 35.3 meseci, (HR 0.79, 95% CI 0.64-0.96, $P = 0.0205$)] (48).

Za razliku od ESMO preporuka, NCCN u najnovijim preporukama iz 2022. godine savetuje primenu Atezolizumaba u adjuvantnom pristupu nakon kompletne resekcije tumora i adjuvantne hemioterapije kod pacijenata u stadijumu IIB i IIIa ili kod pacijenata u stadijumu IIA kod kojih postoji visok rizik za relaps bolesti i kod kojih se registruje PD-L1 ekspresija $\geq 1\%$ (42). Primena Atezolizumaba savetuje se u dozi od 840 mg svake dve nedelje, 1200 mg svake 3 nedelje ili 1680 mg svake 4 nedelje do ukupno godinu dana (42).

1.9.2 NERESKTABILNI LOKALNO UZNAPREDOVALI NSCLC

1.9.2.1 Hemioradioterapija

Pacijenti sa neresektabilnim karcinomom pluća u stadijumu IIIa i IIIb mogu inicijalno imati neresektabilni tumor ili mogu pripadati toj grupi zato što tumor nije adekvatno odgovorio na indukcionu terapiju. Pacijenti u stadijumu IIIC nisu kandidati za hirurško lečenje, već se kod njih preporučuje primena konkomitantne hemioradioterapije (43). Iako je tumor gornjeg sulkusa (Pancoast) stažiran kao T3 hirurško lečenje inicijalno nije moguće, kao ni kod pacijenata sa N2 stadijumom koji se često otkrije tokom operacije (43).

Primena hemioradioterapije dokazano je efikasnija od primene radioterapije bez hemioterapije (27). Kod ovih pacijenata savetuje se sprovođenje konkomitantne hemioradioterapije (HT-RT) uvek kada je to moguće zbog veće efikasnosti i dužeg ukupnog preživljavanja (53). Mane konkomitante HT-RT su češća pojava neželjenih efekata HT-RT kao što su ezofagitis gradusa 3 i 4, radijacioni pneumonitis i značajno veći mortalitet koji iznosi 10% (17). Kada zbog neadekvatnih tehničkih uslova, lošijeg opšteg stanja pacijenta ili nekih drugih razloga nije moguće sprovesti konkomitantnu HT-RT savetuje se primena sekvencijalne hemioradioterapije. Prema ESMO vodiču za lečenje uznapredovalog NSCLC radioterapiju je potrebno sprovesti u dozi od 60-66 Gy u 30-33 frakcije tokom perioda od 6-7 nedelja uz 2 do 4 ciklusa hemioterapije zasnovane na cisplatinu (17).

Kombinacija citostatika koja se koristi u HT-RT prema ESMO vodiču je cisplatin uz etopozid ili cisplatin uz vinka alkaloida (najčešće cisplatin uz vinorelbin) ili cisplatin uz pemetrexed kod neskvamozne histologije NSCLC (34). Prema NCCN vodiču iz 2022. godine kod neskvamoznog NSCLC moguće je koristiti karboplatinu ili cisplatinu uz pemetrexed u konkomitantnom HT-RT

režimu, ali i paklitaksel uz karboplatinu ili cisplatinu uz etopozid. Kod skvamoznog NSCLC savetuje se primena paklitaksela uz karboplatin ili cisplatinu uz etopozid (42).

1.9.2.2 Neoadjuvantna hemioterapija

Kod pacijenata u stadijumu IIIA (N2) moguće je primeniti indukcionu terapiju pre operacije bez ili sa adjuvantnom terapijom (24) ili neoadjuvantnu konkomitantnu hemioradioterapiju (24). Takođe neoadjuvantnu terapiju je moguće primeniti kod pacijenata sa Pancoast tumorom. Međutim ova terapija nije standard lečenja i odluku o sprovođenju indukciono terapije potrebno je doneti individualno nakon detaljne procene multidisciplinarnog tima.

1.9.2.3 Durvalumab

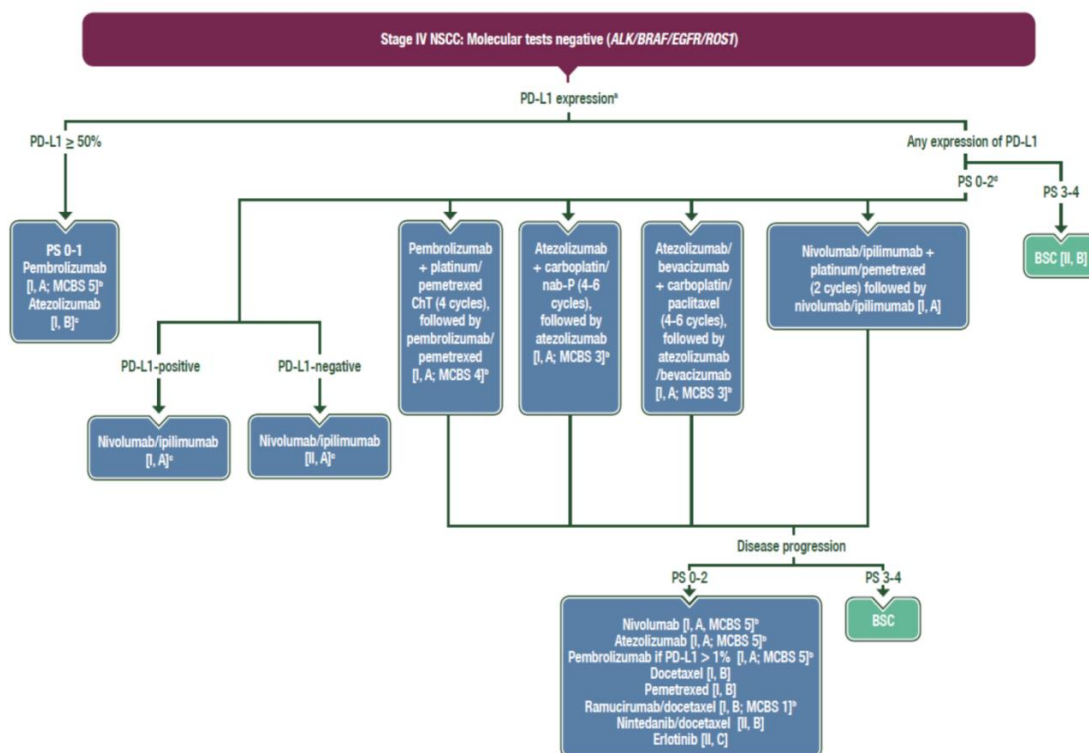
Durvalumab je humano monoklonsko anti PD-L1 antitelo koje kod pacijenata koji su primili konkomitantnu HT-RT produžava ukupno preživljavanje (OS), kao i vreme do progresije bolesti (PFS) (49). PACIFIC studija je randomizovana studija koja je poredila primenu Durvalumaba nakon konkomitantne HT-RT kod pacijenata sa neresektabilnim NSCLC u odnosu na placebo. Durvalumab je primenjen kao konsolidaciona terapija u trajanju od godinu dana kod pacijenata koji nisu imali registrovanu progresiju bolesti u prvih 42 dana od primene konkomitante HT-RT. Na osnovu rezultata ove studije ESMO i NCCN su uključili Durvalumab u imunoterapiju održavanja u trajanju od godinu dana kod pacijenata sa neresektabilnim karcinomom pluća u III stadijumu, dobrog su opšteg stanja (PS 0-1) i nisu progredirali na sprovedenu konkomitantnu HT-RT (54). I dalje važi stav da se Durvalumab može dati bez obzira na status PD-L1 iako postoje naznake da ne postoji benefit kod pacijenata sa PD-L1 ekspresijom < 1%. Pouzdano se zna da durvalumab ne treba koristiti adjuvantno nakon hirurškog lečenja, već samo nakon hemioradioterapije i potrebno je aktivno pratiti potencijalne neželjene efekte imunoterapije (54).

1.9.3 METASTATSKI NSCLC (IV STADIJUM)

Cilj lečenja pacijenata sa metastatskim karcinomom pluća je produžavanje ukupnog preživljavanja i očuvanje kvaliteta života uz primenu terapije čiji su neželjeni efekti tolerabilni. Lečenje se u IV stadijumu karcinoma pluća zasniva se na primeni sistemske terapije kod pacijenata sa performans skorom 0-2 uz suportivnu terapiju i palijativno zbrinjavanje kod pacijenata kod kojih specifično onkološko lečenje nije moguće (38). Prestanak pušenja duvana treba biti deo svih algoritama za lečenje karcinoma pluća zato što je dokazano da produžava ukupno preživljavanje, smanjuje rizik od nastanka komplikacija primenjenog lečenja, a poznato je i da pušenje smanjuje bioraspodivnost erlotiniba (grafikon 3) (55).

Lečenje pacijenata kod kojih su targetabilne mutacije odsutne ili je status nepoznat

Grafikon 3. ESMO Algoritam lečenja pacijenata u IV stadijumu, molekularni testovi negativni



ALK - anaplastična limfomska kinaza; BSC - najbolja suportivna terapija; ChT - hemoterapija; EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta; EMA - Evropska agencija za lekove; IO - imuno-onkologija; Mb - megabaza; MCBSEMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale; nab-P - paklitaksel vezan za albumin; nab-PC - paklitaksel vezan za albumin i karboplatinu; NSCC - karcinom neskvamoznih ćelija; NSCLC – nesitnoćelijski karcinom pluća; PD-1, protein programirane ćelijske smrti 1; PD-L1, ligand 1 programiranećelijske smrti; PS - performans status; TMB - opterećenje tumorskim mutacijama.

1.9.3.1 Sistemska imunoterapija

Revolucija u lečenju karcinoma pluća i drugih malignih tumora desila se 2016. godine uvođenjem imunoterapije u lečenje pacijenata sa metastatskim karcinomom pluća bez mutacije za koje postoji ciljana terapija (tzv. targetabilne mutacije). Pобољшanje vremena do progresije bolesti (PFS), ukupnog preživljanja (OS) uz povoljniji profil neželenih efekata primenom pembrolizumaba u odnosu na primenu standardne hemioterapije zasnovane na platini kod pacijenata sa uznapredovalim NSCLC i ekspresijom PD-L1 \geq 50% prvi put je dokazana u KEYNOTE-024 studiji (56). Ovaj lek u svim aktuelnim preporukama predstavlja zlatni standard u prvoj liniji terapije za lečenje pacijenata sa uznapredovalim NSCLC bez targetabilnih mutacija i ekspresijom PD-L1 \geq 50% bez kontraindikacija za primenu imunoterapije, kao što su teški oblici autoimunih bolesti ili transplantacija organa (55). Pored pembrolizumaba kod pacijenata sa ekspresijom PD-L1 \geq 50% može se primeniti i atezolizumab prema najnovijim ESMO preporukama.

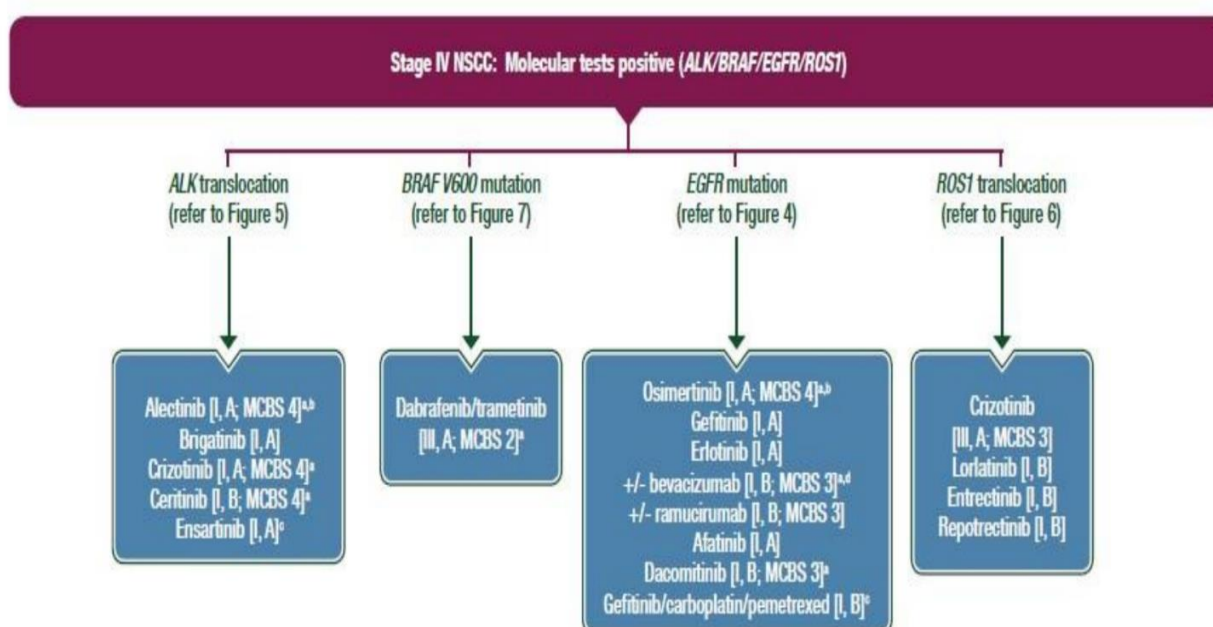
U prvoj liniji terapije pacijenata dobrog opšteg stanja (performans status 0-2) sa neskvamoznim metastatskim adenokarcinomom pluća bez obzira na PD-L1 status, može se primeniti i kombinacija nivolumaba uz ipilimumab, pembrolizumab uz karboplatinu i pemetreksed, atezolizumab uz karboplatinu i nab-paklitaksel, atezolizumab uz bevacizumab uz karboplatinu i paklitaksel ili nivolumab uz ipilimumab uz karboplatinu i pemetreksed.

U drugoj liniji se pored nivolumaba preporučuju i atezolizumab, pembrolizumab (kod pacijenata sa PD-L1:1%), docetaksel, pemetreksed, ramucirumab/docetaksel, nintedanib/docetaksel ili erlotinib zato što primena ovih lekova daje duže ukupno preživljavanje (OS) kod pacijenata u odnosu na primenu hemioterapije.

1.9.3.2 Targetabilne mutacije

Pronalazak targetabilnih mutacija i lekova koji specifično inhibiraju mutacije u malignim ćelijama predstavlja jedan od prvih uspešnih primera personalizovane medicine i visoko selektivne terapije koja je značajno promenila način lečenja NSCLC (grafikon 4). Do tada se lečenje uznapredovalog NSCLC zasnivalo na primeni hemioterapije koja za razliku od ciljane terapije neselektivno deluje na sve ćelije koje se brzo dele, a ne samo maligne ćelije. Primena specifičnih inhibitora kod pacijenata koji su nosioci navedenih mutacija i imaju uznapredovali adenokarcinom pluća doveo je do poboljšavanja ukupnog preživljavanja, produženja vremena do progresije bolesti, boljeg kvaliteta života i smanjene toksičnosti primenjene terapije (32). Zbog svega navedenog u vodiče svih svetskih udruženja koja se bave lečenjem karcinoma pluća uvedeno je molekularno testiranje pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća u cilju poboljšanja ishoda lečenja i personalizacije terapije.

Grafikon 4. ESMO algoritam lečenja pacijenata u stadijumu NSCLC, molekularni testovi pozitivni



^a ESMO-MCBS v1.1 rezultat za novu terapiju/indikaciju koju je odobrila EMA od 1. januara 2016. Skor je izračunat od strane ESMO-MCBS Radne grupe i potvrđen od strane ESMO Komiteta za smernice. ^b Preferirana opcija. ^c Nije odobreno od strane EMA. ^d ESMO-MCBS rezultat za kombinaciju bevacizumaba sa gefitinibom ili erlotinibom. ALK, anaplastična limfomska kinaza; EGFR, receptor epidermalnog faktora rasta; EMA, Evropska agencija za lekove; MCBS, ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale; NSCC, karcinom neskvamoznih ćelija.

1.9.3.2.1 ALK pozitivni NSCLC

Testiranje prisustva *ALK* rearanžmana se preporučuje kod svih pacijenata obolelih od adenokarcinoma pluća u IV stadijumu (57). Genetske alteracije *ALK* onkogene mogu se naći i kod drugih malignih tumora, a rearanžman *ALK* onkogene koji se najčešće registruje je fuzija *ALK* sa nekim od partnera kao što je *EML4*. Prisustvo *ALK* rearanžmana se u zavisnosti od laboratorije može određivati primenom NGS, FISH metode ili IHC, a pacijenti sa *ALK* pozitivnim tumorom su kandidati za terapiju inhibitorima tirozin kinaza koji se daju oralno. U prvoj liniji terapije može se razmotriti primena alectiva, crizotiniba i ceritiniba čija je karakteristika da ima sposobnost penetracije u

centralni nervni sistem (CNS), pa može biti dobra opcija za lečenje pacijenata sa *ALK* pozitivnim adenokarcinomom pluća sa metastazama u CNS-u.

1.9.3.2.2 ROS1 pozitivni NSCLC

ESMO u svojim preporukama iz 2020. godine savetuje primenu Crizotiniba kod pacijenata sa *ROS1* pozitivnim NSCLC, iako su podaci iz studija i dalje oskudni (58), dok NCCN pored crizotiniba preporučuje i entrectinib kao lek izbora u prvoj liniji terapije kod pacijenata sa *RO1* pozitivnim NSCLC u IV stadijumu bolesti (62). Nakon progresije bolesti posle primene crizotiniba u prvoj liniji ESMO savetuje primenu hemioterapije zasnovane na platini u drugoj liniji terapije (57). Nekoliko studija pokazalo je efikasnost primene Crizotiniba kod pacijenata sa rearanžmanom *ROS1* onkogenom, a to su PROFILE 1001, Istočno-Azijska studija koja je obuhvatila najveći broj pacijenata, EURO CROSS studija i EUROS1 studija (57). Primena ceritiniba kod pacijenata sa *ROS1* rearanžmanom ispitivana je u studiji faze II. Lorlatinib je inhibitor tirozin kinaza koji deluje kod pacijenata sa *ALK* i *ROS1* rearanžmanom, a njegov efekat je ispitivan je u studijama najčešće nakon progresije bolesti na prethodnih nekoliko linija terapije uključujući i crizotinib. Entrectinib je u avgustu 2020. odobren od strane Evropske agencije za lekove (EMA) u lečenju pacijenata sa *ROS1* pozitivnim NSCLC u IV stadijumu bolesti, dok je reprotrectinib inhibitor tirozin kinaza novije generacije koji inhibira *ROS1/TRK/ALK*. Njihova efikasnost do sada je ispitivana samo u prekliničkim studijama faze I i II (65).

1.9.3.2.3 BRAF pozitivni NSCLC

BRAF V600 (Val600Glu) mutacija je najčešće ispitivana kod pacijenata sa metastatskim melanomom, ali u retkim slučajevima je prisutna i kod pacijenata sa NSCLC u IV stadijumu bolesti i to najčešće kod pušača (65). Zbog toga su Dabrafenib koji inhibira *BRAF V600* mutaciju u kombinaciji sa Trametinibom koji spada u *MEK* inhibitore registrovani od strane EMA i FDA za ovu indikaciju, nakon čega je predlog o lečenju pacijenata sa NSCLC u IV stadijumu sa *BRAFV600* mutacijom ušao u preporuke za lečenje karcinoma pluća ESMO udruženja i NCCN (65). Dabrafenib/Trametinib kombinacija zajedno inhibira kinaze u *RAS/RAF/MEK/ERK* putu (67), a kod pacijenata koji progrediraju nakon primene ove terapije u prvoj liniji ESMO savetuje primenu hemioterapije zasnovane na platinskom dubletu (67).

1.9.3.3 Uloga radioterapije u lečenju pacijenata sa NSCLC u IV stadijumu

Radioterapija od davnina zauzima značajnu ulogu u palijativnom lečenju pacijenata sa metastatskim nesitnoćelijskim karcinomom pluća i to najčešće u lokalnoj kontroli metastaza. Radioterapija se u svakodnevnoj kliničkoj praksi kod pacijenata sa metastatskim NSCLC koristi u lečenju bolnih koštanih metastaza i kompresije kičmene moždine u cilju ublažavanja bolova, sprečavanja patoloških preloma i poboljšavanja kvaliteta života pacijenta. Još jedna indikacija u kojoj je potrebno primeniti hitno radioterapijsko lečenje je sindrom gornje šuplje vene koji se javlja kod 2% do 4% pacijenata sa NSCLC.

Spoljna zračna terapija (EBRT) pruža ublažavanje bolova kod 60-80% pacijenata nakon RT, pri čemu jedna trećina pacijenata ima potpuno ublažavanje bolova u tretiranoj zoni. Prema ESMO preporukama pojedinačna doza od 8 Gy predstavlja režim izbora kod pacijenata sa bolnim metastazama u kostima. Na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije režimi koji se najčešće koriste za palijativnu antidolornu terapiju zračenjem su jednokratna frakcija sa 8 Gy, kao i dva duža režima u kombinaciji 20 Gy u 5 frakcija ili 30 Gy u 10 frakcija.

1.9.3.4 Endobronhijalna brahiterapija

Endobronhijalna brahiterapija (EBB) može biti značajna palijativna radioterapijska metoda naročito kod pacijenata sa rekurentnom centralnom endobronhijalnom opstrukcijom ili kod pacijenata kod kojih je prethodno primenjena EBRT bez uspeha (55).

1.9.3.5 WBRT i SRS u lečenju metastaza na mozgu

Diseminacija bolesti u CNS često je prisutna kod pacijenata sa adenokarcinomom pluća, a procenjuje se da metastaze na mozgu ima oko polovine pacijenata sa NSCLC (30-64%), dok je taj broj kod pacijenata koji imaju targetabilne mutacije (EGFR i ALK) veći i iznosi (44-66%). Leptomeningealna karcinomatosa je znatno ređi oblik širenja maligne bolesti u centralni nervni sistem (4-7%) i često je udružen sa lošom prognozom bolesti i smrtnim ishodom (55). Radioterapija zauzima značajnu ulogu u palijativnom tretmanu ovih komplikacija osnovne maligne bolesti, najčešće primenom metode zračenja celog mozga (WBRT) ili primenom stereotaksične radioterapije u novije vreme. WBRT se primenjuje najčešće u terapijskom režimu od 20 Gy u 5 seansi ili 30 Gy u 10 frakcija i to kod pacijenata koji su dobrog opšteg stanja i kod kojih se procenjuje da RT može povoljno uticati na dužinu preživljavanja (55). Kod pacijenata sa simptomatskim metastazama na mozgu i/ili postojanjem znakova uvećanog intrakranijalnog pritiska pored RT se savetuje primena deksometazona sa postepenim smanjenjem doze i prekidanjem terapije nakon završetka RT.

Stereotaksična radioterapije je mnogo manje toksična alternativa WBRT, ali se ne može primenjivati kod svih pacijenata, već postoji preporuka da se SRS primenjuje kod pacijenata koji imaju manje od 4 metastaze prečnika manjeg od 3cm (55).

1.9.3.6 Uloga hirurgije u lečenju pacijenata sa NSCLC u IV stadijumu

Hirurgija ima značajnu ulogu u uzimanju uzorka tkiva radi patohistolške potvrde metastatske bolesti, a uvođenjem ciljane terapije i imunoterapije hirurgija je dobila značajno mesto i u lečenju oligometastatske bolesti (69). Od ranije je poznata uloga hirurgije u palijativnom zbrinjavanju komplikacija metastatske bolesti u situaciji kada opšte stanje pacijenta to dozvoljava (70–73).

1.9.3.7 Suportivna terapija i palijativna nega

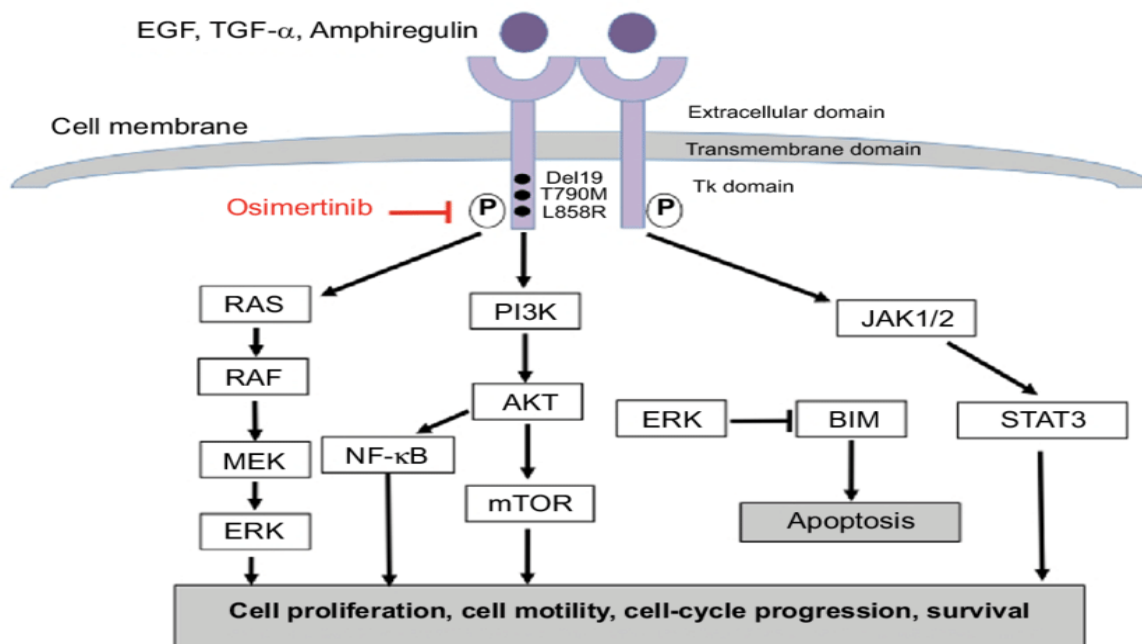
Imajući u vidu da se pacijenti sa karcinomom pluća najčešće dijagnostikuju u simptomatskom uznapređovalom stadijumu, savetuje se integrisana primena suportivne terapije i palijativne nege a u cilju kontrole simptoma i poboljšavanja kvaliteta života. Integracija suportivne terapije važna je od početka onkološkog lečenja.

1.10 EGFR TKI

Prva ciljana molekularna terapija adenokarcinoma pluća koja je uspešno uvedena u kliničku praksu je terapija inhibitorima tirozin kinaza receptora epidermalnog faktora rasta - *EGFR* TKI (*epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor*). *EGFR* TKI predstavljaju standard lečenja u prvoj liniji terapije pacijenata sa *EGFR* mutiranim uznapređovalim adenokarcinomom pluća (43).

1.10.1 Mehanizam dejstva

EGFR se nalazi na površini mnogih zdravih ćelija u organizmu, ali je često eksprimiran i na malignim ćelijama karcinoma pluća, dojke i karcinoma orofaringealne regije. Prekomerna ekspresija *EGFR* kod malignih ćelija pojačava antiapoptotski efekat *RAS* kaskade čime dolazi do nekontrolisane proliferacije malignih ćelija i produžavanja njihovog preživljavanja (32). Lekovi iz grupe *EGFR* TKI primenjuju se oralno (*per os*) i dele se na tri generacije. U prvoj generaciji su gefitinib (Iressa, FDA odobren 2003.) i erlotinib (Tarceva, FDA odobren 2004.) koji spadaju u reverzibilne *EGFR* inhibitore tirozin kinaza jer se reverzibilno vezuju za ATP-vezujuće mesto na enzimu tirozin kinaze čime sprečavaju intracelularnu fosforilaciju enzima inhibirajući dalju signalnu kaskadu i proliferaciju malignih ćelija. U drugoj generaciji su afatinib (Giotrif, FDA odobren 2013.) i dacomitinib koji spadaju u ireverzibilne *EGFR* TKI. U trećoj generaciji je osimertinib (Tagrisso, FDA odobren 2015.) koji spada u pirimidinske ireverzibilne *EGFR* TKI jer se vezuje za cistein na kodonu 797 (C797) i spada u visoko selektivne inhibitore (32).



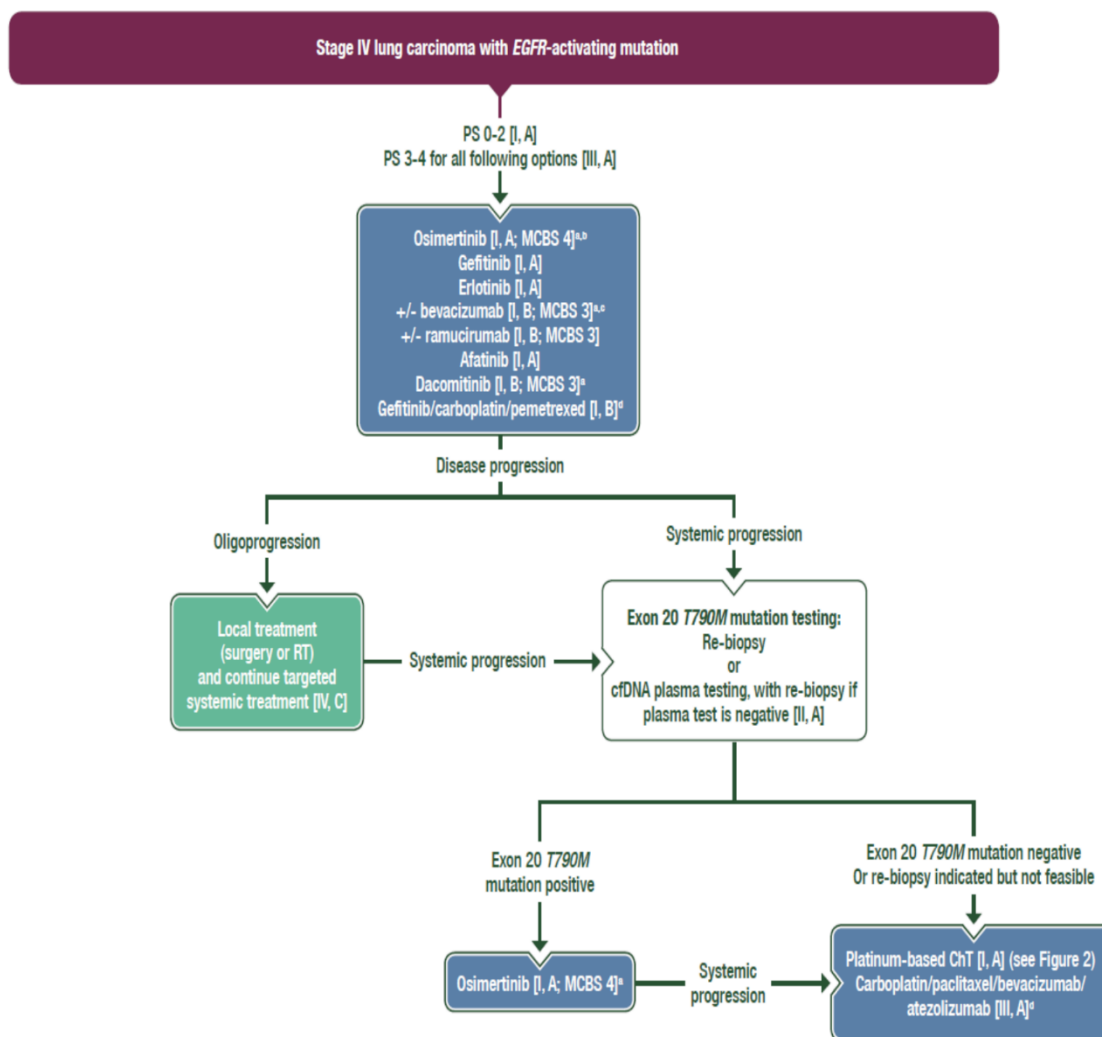
Slika 6. EGFR mutacija

Početna doza Gefitiniba je 250 mg jednom dnevno, a Erlotiniba je 150 mg dnevno (74–78). Erlotinib je potrebno uzimati sat vremena pre ili dva sata posle obroka. Ova dva leka se primarno metabolišupreko jetre (CYP3A4), a izlučuju preko fecesa. Početna doza Afatiniba je 40 mg dnevno, Dacomitiniba 45 mg dnevno, a Osimertiniba 80 g dnevno. Ove doze je moguće redukovati prema protokolu u zavisnosti od tipa i gradusa ispoljenog toksičnog efekta.

Prediktivna moć *EGFR* mutacija dokazana je u multiplim randomizovanim kliničkim studijama faze III koje su poredile lekove iz prve (erlotinib i gefitinib) i druge generacije (afatinib) *EGFR* TKI sa platinskim hemioterapijskim dubletom (74–78). U svim grupama pacijenata, nezavisno od pola, starosti, pušačkog statusa ili performans statusa (PS) registrovano je poboljšanje u ukupnoj stopi odgovora na terapiju (ORR) i poboljšanje u preživljavanju bez progresije bolesti (PFS), ali nijedna od navedenih studija nije pokazala benefit u ukupnom preživljavanju (OS) (79). Za razliku od hemioterapije koja je indikovana samo kod pacijenata čije je opšte stanje zadovoljavajuće *EGFR* TKI je moguće dati i pacijentima koji su lošijeg opšteg stanja (38). Pacijenti sa oligoprogresijom bolesti (progresija samo na jednoj lokalizaciji) mogu biti tretirani lokalnom terapijom (radijaciona terapija ili hirurgija) uz nastavak sistemske primene *EGFR* TKI (80–84).

Nema jasnih smernica da odabratu lek iz prve, druge ili treće generacije *EGFR* TKI, već je odluku potrebno doneti individualno na osnovu karakteristika pacijenata i dostupnosti lekova. Nekoliko studija poredilo je efikasnost lekova iz prve i druge generacije međusobno, ali nisu nađene značajne razlike niti u efikasnosti niti u toksičnosti, iako postoje pojedinačni podaci da je gefitinib generalno najbezbedniji lek, a da afatinib daje češće neželjene efekte, što nije dokazano u svim studijama (85). Međutim, osimertinib je u FLAURA studiji faze III poreden sa gefitinibom i afatinibom kada je pokazano značajno produženje vremena bez progresije bolesti (mPFS 18.9 prema 10,2 meseci; HR 0,46, 95% CI 0,37–0,57, $P < 0.0001$) (27,38), te je u najnovijem ESMO i NCCN vodiču Osimertinib uvršten kao prvi lek izbora u lečenju pacijenata sa uznapredovalim ili metastaskim *EGFR* pozitivnim NSCLC (grafikon 5) (86). Tako je je pokazano da osimertinib ima najbolju penetraciju u centralni nervni sistem u odnosu na sve trenutno dostupne *EGFR* TKI, zbog čega treba biti prva opcija kod pacijenata sa metastazama na CNS-u (55).

Grafikon 5. Terapijski algoritam kod pacijenata u IV stadijumu NSCLC sa EGFR mutacijama



^aESMO-MCBS v1.1 skor za novu terapiju/indikaciju koju je odobrila EMA od 1. januara 2016. Skor je izračunat od strane ESMO-MCBS Radne grupe i potvrđena od strane ESMO Komiteta za smernice.

^b Preferirana opcija. ^cESMO-MCBS rezultat za kombinaciju bevacizumaba sa gefitinibom ili erlotinibom. ^dNije odobreno od strane EMA. ^ecfDNK - DNK bez ćelija; ChT - hemioterapija; EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta; EMA - Evropski lekovi Agencija; MCBS - ESMO-Magnitude of Clinical Benefit Scale; PS - performans status; RT – radioterapija.

U poslednjih nekoliko godina ispitivana je primena kombinacije dualne blokade *EGFR* i vaskularnog endotelnog faktora rasta (*VEGF*) puta u nekoliko studija kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim NSCLC. Na osnovu dosadašnjih ispitivanja većina studija navodi da postoji produženje PFS-a, kao i da su *EGFR* mutirani neskvamozni tumori pluća senzitivniji na *VEGF* inhibiciju u odnosu na skvamocelularne karcinome pluća ili NSCLC bez targetabilnih mutacija. Zbog toga se smatra da je primena *VEGF* inhibitora značajna kod ove podgrupe pacijenata, te da oni mogu imati značajan benefit od ove terapije.

Od *EGFR* TKI ispitivan je Erlotinib u kombinaciji sa Bevacizumabom i Ramucirumabom. U studiji NEJ026 faze III dokazano je da kombinacija erlotiniba sa bevacizumabom u odnosu na mono erlotinib dovodi do produžavanja vremena bez progresije bolesti (PFS) uz prihvatljiv profil toksičnosti, ali produženje ukupnog preživljavanja nije uočeno (87). EMA je odobrila primenu

Erlotiniba uz Bevacizumab u prvoj liniji terapije pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* pozitivnim NSCLC, a brojne studije koje ispituju ova dva leka u kombinaciji su i dalje u toku. U 2021. godini su objavljeni rezultati multicentrične randomizovane studije faze III BEVERLY(88). U studiju je uključeno 160 pacijenata u stadijumu IIIB/IV NSCLC sa aktivirajućim *EGFR* mutacijama. Srednje vreme praćenja pacijenata bilo je 36 meseci, a bevacizumab u kombinaciji sa erlotinibom je značajno povećao PFS (bevacizumab + erlotinib PFS 15,4 meseca vs. mono erlotinib PFS 9,6 meseci) (88). Nije pokazana razlika u dužini ukupnog preživljavanja (OS), dok je analiza podgrupa pokazala da kombinacija bevacizumaba uz erlotinib može biti efikasnija kod pušača u odnosu na nepušače (88). Znakovi toksičnosti u vidu hipertenzije gradusa 3 i više i osipa gradusa 3 i više češće su registrovani kod pacijenata na terapiji bevacizumabom uz erlotinib uz jedan prijavljen smrtni slučaj nastao usled pojave neželjenih efekata kombinovane terapije u vidu intrakranijalnog krvarenja.

Slični rezultati dobijeni su primenom erlotiniba uz ramucirumab koji spada u humane IgG *VEGFR2* antagoniste. U RELAY randomizovanoj studiji faze III ispitivana aktivnost ramucirumaba u kombinaciji sa Erlotinibom kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim NSCLC koji nisu prethodno lečeni. Ponovo je postignuto produženje vremena bez progresije bolesti (PFS) uz prihvatljiv profil neželjenih efekata, ali bez produženja ukupnog preživljavanja (OS) (89).

U 2021. godini objavljeni su i preliminarni rezultati studije koja je ispitivala kombinaciju 4 leka kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim NSCLC primenom osimertiniba uz bevacizumab, cisplatin i pemetreksed. Primarni cilj ove studije bio je intrakranijalni odgovor na terapiju. Reč je o studiji faze II u koju je uključeno 26 pacijenata. Svi pacijenti su evaluirani nakon perioda praćenja od skoro tri godine i rezultati su pokazali da je kod svih na prvom kontrolnom pregledu registrovana parcijalna regresija bolesti (PR) uz smanjenje edema i prihvatljiv profil toksičnosti (90). Ovi rezultati nam ukazuju na mogućnost sistemskog tretmana metastaza na mozgu uz odlaganje radioterapije do trenutka kada je neophodna zbog poznatih neželjenih efekata začenja moždanog tkiva, kao što je radijaciona nekroza.

Trenutno su u toku randomizovane studije koje ispituju primenu osimertiniba uz hemioterapiju i/ili *VEGF* inhibitore, ali još nema potvrde da kombinacija ove terapije dovodi do poboljšanja preživljavanja (OS), kao ni dovoljno podataka da li je toksični profil ove kombinacije lekova prihvatljiv, te se u budućnosti očekuju rezultati novih studija koji bi mogli promeniti način lečenja pacijenata sa *EGFR* mutiranim uznapredovalim NSCLC.

Kod pacijenata koji razviju oligoprogresiju bolesti savetuje se primena lokalne terapije (hirurgija ili RT) uz nastavak sistemskog lečenja primenom *EGFR* TKI. Međutim, kod pacijenata kod kojih je registrovana sistemska progresija bolesti savetuje se ponovna biopsija primarnog tumora i/ili metastaza u cilju detekcije T790M mutacije (55). Kada nije moguće dobiti uzorak tumorskog tkiva moguće je uraditi tečnu biopsiju uz analizu cirkulišuće tumorske DNK. U slučaju negativnog nalaza tečne biopsije opet se savetuje rebiopsija, imajući u vidu da nalaz tečne biopsije može biti lažno negativan (55).

Amivantanab je lek koji je odobren od strane FDA za primenu kod pacijenata sa *EGFR* mutacijom insercija egzona 20. Amivantanab je ispitivan u CHRYSALIS studiji faze 1 (91). Reč je EGFR-MET bispecifičnom antitelu koji se vezuje za ekstracelularni deo oba receptora i time prevazilazi mehanizam rezistencije na TKI (91). Odgovor na amivantanab posle osimertiniba bio je 19%, a uz dodatak lazeritiniba koji predstavlja EGFR TKI treće generacije odgovor na kombinovanu terapiju u CHRYSALIS studiji bio je 36% (91). Na osnovu ovih podataka NCCN je uvrstio amivantanab kao lek izobra kod pacijenata sa insercijom egzona 20. Međutim kod ovih pacijenata u zavisnosti od rezultata ostalih molekulnih analiza može se razmotriti i primena hemioterapije ili imunoterapije.

1.10.2 Neželjeni efekti EGFR TKI

Neželjeni efekti *EGFR* TKI nastaju usled inhibicije *EGFR* u zdravim ćelijama zbog čega se javljaju kod oko 70% pacijenata i najčešće su blagi do umereni (86). U poređenju sa konvencionalnom hemioterapijom *EGFR* TKI ređe uzrokuje mijelosupresiju, mučninu, povraćanje, slabost i

malaksalost. Manje je prijavljenih neželjenih efekata gradusa 3 ili 4, manje prekida terapije usled ispoljenih neželjenih efekata i ređe je potrebna smanjenje doze u odnosu na hemioterapiju. Najčešći i najvažniji neželjeni efekti *EGFR* TKI vezani su za kožu i njene derivate (dlaka, znojne i lojne žlezde) (tabela 11), a od ostalih se javljaju anoreksija, oslabljen apetit, porast vrednosti transaminaza i bilirubina, umor, dijareja, stomatitis, oralni mukozitis, intersticijska bolest pluća i kardiotoksičnost koja se najčešće ispoljava u vidu pada u ejakcionoj frakciji (EF) leve komore (92). Bol može biti neželjeni efekat primene TKI, a podaci o tome se u istraživanjima u novije vreme prikupljaju direktno od pacijenata (PROs – patient reported outcomes) (93).

Tabela 11. CTCAE skala za dermatološku toksičnost nastalu usled primene *EGFR* TKI

<i>Gradus</i>	<i>Simptomi</i>
<i>1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • papule i/ili pustule prisutne na <10% telesne površine, sa ili bez simptoma svraba ili lokalne osetljivosti kože
<i>2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • papule i/ili pustule prisutne na 10-30% telesne površine; sa ili bez simptoma svraba ili lokalne osetljivosti kože, • promene ograničavaju aktivnosti svakodnevnog života
<i>3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • papule i/ili pustule prisutne na >30% telesne površine sa prisutnim umerenim i ozbiljnim simptomima, • promene bolesniku ograničavaju brigu o sebi, • promene udružene sa lokalnom superinfekcijom kože koje zahtevaju primenu oralnih antibiotika
<i>4</i>	<ul style="list-style-type: none"> • papule i/ili pustule na bilo kojoj % telesne površine, mogu biti ili nisu udružene sa simptomima svraba i lokalne osetljivosti kože, • udružene sa masivnom superinfekcijom kože koja zahteva primenu intravenskih antibiotika, • stanje opasno po život;
<i>5</i>	<ul style="list-style-type: none"> • smrtni ishod

Dermatološki znaci toksičnosti nastaju usled inhibicije *EGFR-a* u bazalnoj membrani ćelija dermisa, što utiče na proliferaciju i diferencijaciju keratinocita. Ovaj receptor se nalazi i u ćelijama folikula dlake, znojnih i lojnih žlezda, kao i u epitelu rožnjače i na trepavicama, zbog čega se kao manifestacije dermatološke toksičnosti mogu javiti papulopustulozni osip (osip nalik na akne), eritem, svrab i suvoća kože, povremeno crvenilo lica koje se javlja u naletima, diskoloracija i hiperkeratoza kože, kao i paronihija, alopecija i gubitak dlaka na drugim delovima tela kao što su trepavice (tabela 12) (86). Ove promene najčešće su prisutne na koži glave i trupa, a prema površini kože koju zahvataju i težini kliničke slike na osnovu CTCAE (engl. Common Toxicity for Adverse Events) kriterijuma razlikujemo 4 gradusa na osnovu kojih se određuje tretman (100).

Tabela 12. Preporuke za lečenje papulopustuloznog osipa

<i>Gradus</i>	
<i>1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Bez terapije ili • Lokalna terapija: Topikalni kortikosteroid (Alklometazon 0,05%) uz Fluocinonid 0,05% krem i/ili Klindamicin 1%, • Nastaviti primenu <i>EGFR</i> TKI bez redukcije doze
	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalna terapija: Topikalni kortikosteroid (Alklometazon 0,05%) uz Fluocinonid 0,05% krem i/ili Klindamicin 1% uz

2	<ul style="list-style-type: none"> • Oralni antibiotik iz grupe tetraciklina (Doksiciklin 100 mg dva puta na dan ili Minociklin 100 mg dnevno) • Nastaviti primenu <i>EGFR</i> TKI bez redukcije doze
3 i 4	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalna terapija • Oralni antibiotik iz grupe tetraciklina • Oralni metilprednizolon • Prekid primene <i>EGFR</i> TKI do regresije simptoma i znakova toksičnosti do gradusa 1

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta, TKI – inhibitori tirozin kinaze

Dijareja je drugi najčešći neželjeni efekat terapije *EGFR* TKI, najčešće se javlja u prve dve nedelje primene terapije i uglavnom je blaga do umerena (gradus 1 i 2) (106). Može nastati usled oštećenja mukoze creva ili usled hipersekrecije hlorida u lumen creva. Dijareja gradusa 3 i 4 javlja se kod oko 15% pacijenata najčešće nakon primene *EGFR* TKI druge generacije. Veoma retko je prisutan stepen dijareje koji dovodi do teške dehidracije i akutne bubrežne insuficijencije (108). Gradiranje i terapija dijareje kod pacijenata koji su na ciljanoj terapiji *EGFR* TKI su prikazani u tabeli 13 i 14.

Tabela 13. Gradus dijareje kao neželjenog efekta na *EGFR* TKI

<i>Gradus</i>	<i>Simptomi</i>
1	<4 stolice dnevno
2	4-6 stolica dnevno iznad prosečnog broja stolica
3	>7 stolica dnevno iznad proseka, inkontinencija, indikovana hospitalizacija dijareja koja ograničava aktivnosti svakodnevnog života
4	dijareja opasna po život hitna intervencija neophodna
5	smrtni ishod

Tabela 14. Terapija dijareje kao neželjenog efekta na *EGFR* TKI

<i>Gradus</i>	<i>Terapija</i>
1 ili 2	Antidijarejalna ishrana Loperamid 4mg oralno inicijalno, a nakon toga 2 mg nakon svake tečne stolice do maksimalne doze od 16 mg dnevno Nastaviti primenu <i>EGFR</i> TKI
3 ili 4	Sve gore navedeno za gradus 1 i 2 plus Hospitalizacija i parenteralna rehidracija Obustaviti <i>EGFR</i> TKI do regresije simptoma i znakova toksičnosti do gradusa 1

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta, TKI – inhibitori tirozin kinaze

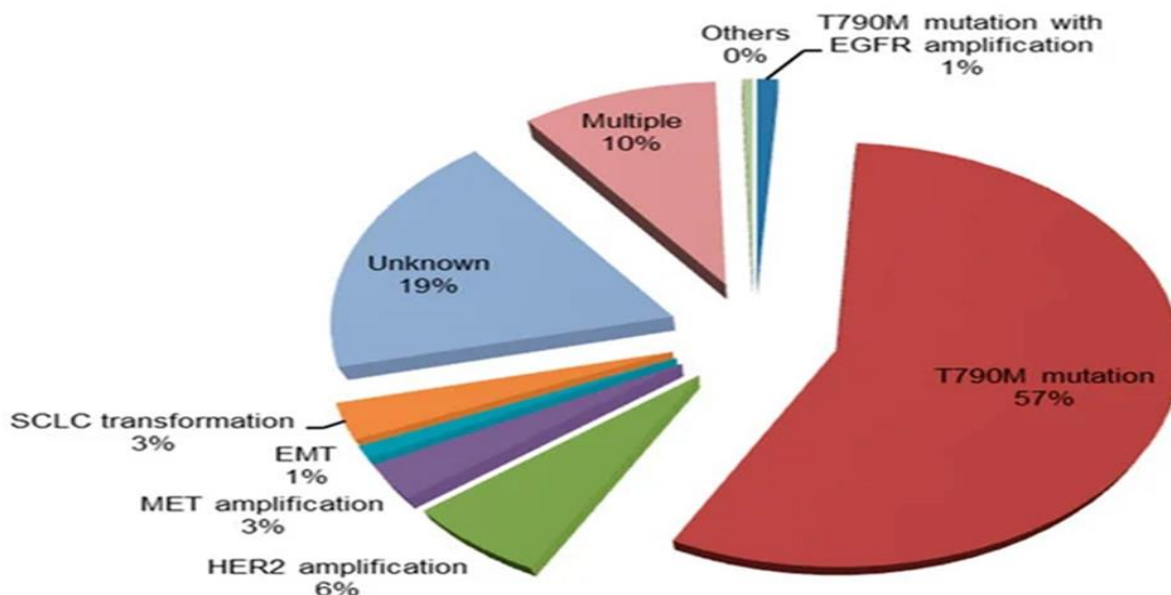
1.11 REZISTENCIJA NA *EGFR* TKI

Poboljšanje ishoda lečenja obolelih sa *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća uvođenjem TKI je nesumnjiv, ali najveći broj pacijenata razvije rezistenciju na ove lekove (42). Rezistencija na *EGFR*

TKI može biti primarna (*de novo*) i stečena. Primarna rezistencija se definiše kao izostanak kliničkog odgovora nakon primene *EGFR* TKI u prvoj liniji koji se može opisati kao izostanak poboljšanja simptoma, neadekvatna kontrola bolesti ili neprodužavanje ukupnog preživljavanja (OS) i javlja se kod 20-30% pacijenata sa *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća. Pod stečenom rezistencijom smatra se pojava progresije bolesti kod pacijenata koji su inicijalno pokazali dobar odgovor na TKI i najčešće se javlja nakon 9-14 meseci. Klinička definicija stečene rezistencije na *EGFR* TKI je sistemska progresija bolesti (prema RECIST ili WHO kriterijumima) nakon kompletne (CR) ili parcijalne regresije (PR) bolesti i/ili nakon 6 ili više meseci stabilne bolesti (SD) nakon tretmana ciljanom terapijom. Poznavanje mehanizama rezistencije i toksičnosti na TKI ključno je u donošenju odluke o najboljoj specifičnoj terapiji, proceni odgovora na terapiju i u razvoju novih lekova.

1.11.1 Mehanizmi rezistencije na *EGFR* TKI (slika 7) su:

- pojava sekundarnih mutacija (*T790M*, *C797S*, *L747S*, *D761Y*, *T854A*)
- aktivacija alternativnih signalnih puteva (*cMet*, *HGF*, *AXL*, *Hh*, *IGF-1R*)
- aberacija nishodnih puteva (*AKT* mutacija, gubitak *PTEN*)
- oštećenje *EGFR*-TKI posredovanog apoptotskog puta (*Bcl2*-sličan i *11-BIM* delecioni polimorfizam)
- histološka transformaciju NSCLC u SCLC
- epitelijalno-mezenhimalna tranzicija (EMT)



Slika 7. Poznati mehanizmi rezistencije na *EGFR* TKI.

Izmenjeno u skladu sa Nagano *et al.* *Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy*. *EGFR*- receptor epidermalnog faktora rasta; *HER2* – receptor humanog epidermalnog faktora rasta; *MET* – faktor mezenhimalno-epitelijalne tranzicije; *EMT*- epitelijalno-mezenhimalna tranzicija; *SCLC* – sitnoćeljski karcinom pluća.

1.11.2 T790M

Najčešći mehanizam stečene rezistencije je pojava mutacije *T790M* u egzonu 20 gena *EGFR*, koja je nađena u više od 50% bolesnika, ali se može javiti i kao mehanizam primarne rezistencije (108). Mutacija *T790M* u egzonu 20 gena *EGFR* sprečava vezivanje lekova iz prve generacije *EGFR* TKI za ATP vezujuće mesto čime se sprečava inhibicija nishodnog signalnog puta, što omogućava malignim ćelijama da nastave da se dele (108). Prvo se mislilo da ova mutacija nastaje sekundarno nakon primene lekova iz grupe *EGFR* TKI, ali je pokazano da ova mutacija može već inicijalno biti prisutna. Zbog takvih saznanja razvijeni su lekovi iz grupe druge i treće generacije *EGFR* TKI kako

bi se prevazišla *T790M* mutacija, međutim dokazano je da i kod inicijalne primene Osimertiniba nakon godinu dana dolazi do razvoja rezistencije (108).

1.11.3 *C797*

Tačkasta mutacija *C797* u nivou ATP-vezujućeg mesta odgovorna je za rezistenciju na Osimertinib koji pripada trećoj generaciji *EGFR* TKI i ireverzibilno se vezuje za ovo mesto (108). Imajući u vidu da se *T790M* mutacija može naći na istom alelu kao i *C797* neophodno je odrediti tačnu lokalizaciju ove dve mutacije pre otpočinjanja terapije Osimertinibom. Ukoliko su *C797* i *T790M* na istom alelu (*cis* pozicija) tumorske ćelije će biti rezistentne na *EGFR* TKI, a ukoliko su mutacije na različitim alelima (*trans* pozicija) tumorske ćelije su osetljive na primenu lekova treće generacije *EGFR* TKI (109).

1.11.4 *L747S, D761Y, T854A*

Ove mutacije spadaju u retke sekundarne mutacije i čine 1-2% svih uzroka stečene rezistencije na *EGFR* TKI (109). *L747S* mutacija je povezana sa rezistencijom na lekove iz prve generacije *EGFR* TKI, ali je pokazano da pacijenti sa *L747S* mutacijom imaju registrovan povoljan terapijski odgovor na primenu lekova iz druge i treće generacije *EGFR* TKI (110). Jedinstven prikaz slučaja pacijenta sa dualnom *L747S* i *G719C* mutacijom pokazao je da je registrovana senzitivnost na primenu Osimertiniba, ali se ne može sa sigurnošću reći da li je ovaj rezultat posledica predominacije *G719C* mutacije koja se vezuje za senzitivnost na *EGFR* TKI (109). Pokazano je da je *T854A* mutacija bila povezana sa izrazito jakom rezistencijom na *EGFR* TKI, dok su *L747S* i *D761Y* mutacije povezane sa slabom rezistencijom na *EGFR* TKI (108).

1.11.5 MET amplifikacija

Drugi najčešći mehanizam stečene rezistencije na *EGFR* TKI je amplifikacija *MET* gena koja je prisutna kod oko 5-10% pacijenata (108). Amplifikacija *MET* gena dovodi do aktivacije *MET* receptora tirozin kinaza čime se aktivira *HGF* i *ERBB3*/fosfoinozitol 3 kinaza (*PI3K*)/protein kinaza B (*AKT*) signalni put što dovodi do proliferacije malignih ćelija i nastanka rezistencije na *EGFR* TKI (108). U ovakvim situacijama lekovi izbora mogu biti crizotinib i capmatinib.

1.11.6 HGF

HGF je specifični ligand *MET* i njegova prekomerna ekspresija dovodi do aktivacije *PI3K/AKT* puta, ali bez angažovanja *ERBB3*. Prokomerna ekspresija *HGF* je loš prognostički faktor kod pacijenata koji se leče primenom *EGFR* TKI, a može biti odgovorna kako za nastanak stečene, tako i primarne rezistencije (111).

1.11.7 AXL

Anekseleto (*AXL*) je receptor tirozin kinaza koji pripada *TAM* familiji i u malignoj bolesti učestvuje u regulaciji mikro sredine i pojavi epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) (111). U novije vreme nađeno je da *AXL* igra značajnu ulogu u razvoju rezistencije na medikalnu onkološku i radijacionu terapiju kod različitih tipova kod karcinoma. Kod pacijenata sa *EGFR* pozitivnim NSCLC pokazana je da je prekomerna ekspresija *AXL* odgovorna za nastanak rezisencije na gefitinib i osimertinib (112).

1.11.8 Hedgehog (Hh)

Hedgehog (Hh) je signalni put koji u fiziološkim uslovima učestvuje u embriogenezi, ćelijskoj prolijeraciji i diferencijaciji, dok njegova aberantna aktivacija dovodi do nastanka karcinogeneze i pojave metastaza indukcijom epitelijalno-mezenhimalne transformacije malignih ćelija i perzistiranjem prisustva ćelija nalik kancerskim matičnim ćelijama (engl. cancer stem-like cell). Takođe, pokazano je da hiperaktivacija Hh signalnog puta može imati ulogu i u pojavi rezistencije na *EGFR* TKI, pa primena Hh inhibitora uz *EGFR* TKI može povećati senzitivnost malignih ćelija na primenjenu terapiju (113, 114).

1.11.9 AKT

Aktivacija *AKT* takođe može biti jedan od mehanizama stečene rezistencije na *EGFR* TKI, ali se javlja udružen sa drugim mehanizmima rezistencije, kao što su *MET* amplifikacija, *T790M* mutacija, prekomerna ekspresija *AXL* ili *FGFR* (108).

1.11.10 PTEN

Fosfataza i tenzin homolog delecija (*PTEN*) je tumor supresorski gen i njegova inaktivacija registrovana je kod brojnih maligniteta (108). Gubitak *PTEN* dovodi do aktivacije *AKT*, a ova pojava je i jedan od mehanizama nastanka primarne i stečene rezistencija na *EGFR* TKI (115). Ovo je dokazano na primeru rezistencije na Erlotinib gde je ovaj mehanizama jedan od registrovanih mehanizama rezistencije u toj studiji (116).

1.11.11 KRAS mutacija

KRAS je najčešće registrovani mutirani onkogen kod svih malignih tumora i predstavlja ključni signalni put za njihov nastanak (76). Mutant *KRAS* pod nazivom *G12C* prisutan je u oko 13% pacijenata sa adenokarcinomom pluća i sadrži amino-kiselinu cistein koja je u pretkliničkim studijama bila glavna meta za razvoj ciljanih inhibitora tirozin kinaza.

1.11.12 PIK3CA

Mutacija *PIK3CA* je loš prognostički faktor preživljavanja za pacijente sa *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća, ali klinički nije dokazano da ova mutacija dovodi do razvoja rezistencija na terapiju *EGFR* TKI (117), iako je u nekoliko pretkliničkih studija to pokazano (118).

1.11.13 BIM

Jedan od najznačajnijih mehanizama dejstva *EGFR* TKI na maligne ćelije je indukcija apoptoze, a *BIM* pripada familiji *Bcl-2* proteina koji regulišu ovaj ćelijski proces. Maligne ćelije NSCLC kod kojih je nivo *BIM* umanjeno pokazuju rezistenciju na *EGFR* TKI.

1.11.14 CRKL

CRKL spada u onkogene i predstavlja deo *RAS/RAF/MAPK* signalnog puta. U jednoj studiji pokazano je da amplifikacija *CRKL* može biti redak uzrok nastanka rezistencije na *EGFR* TKI kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća (119).

1.11.15 Ostali mehanizmi

Kod oko 4% pacijenata kod kojih postoji primarna rezistencija na *EGFR* TKI uočena je *insercija u egzonu 20* (42). Drugi mehanizmi uključuju crosstalk *EGFR* i *IGF1R* puta, *KRAS* i *BRAF* mutacije (u 2-3% slučajeva), *ALK* translokacije (u oko 5% slučajeva), prekomerna ekspresija *HGF* i *FGFR*, ali i sticanje karakteristika matičnih kancerskih ćelija i epitelijalno mezenhimalna transformacija (EMT)

1.12 HEMATOLOŠKI PREDIKTIVNI PARAMETRI

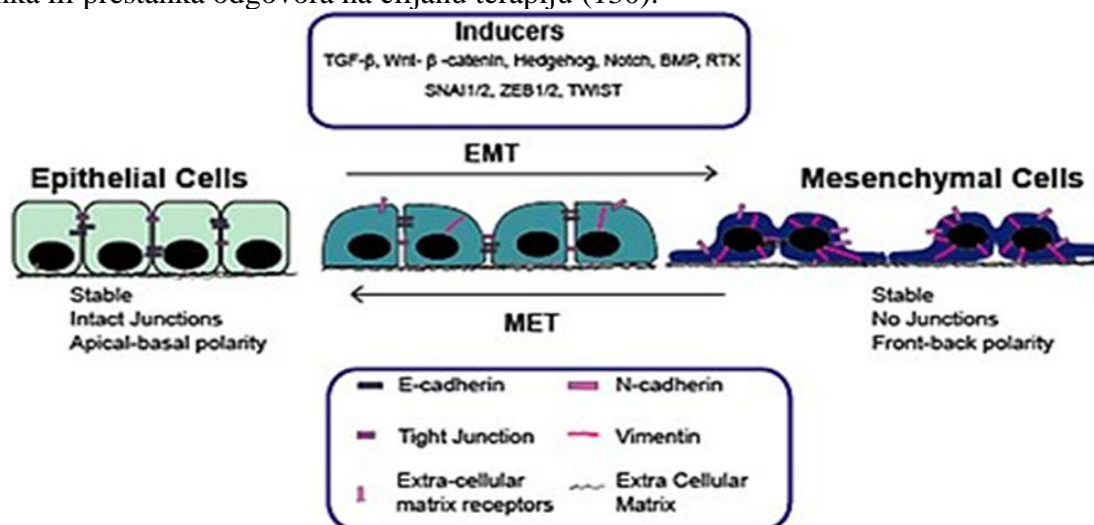
Sve maligne tumore karakteriše prisustvo sistemskog upalnog procesa koji je promenljiv u odnosu na različite faze razvoja maligne bolesti u odnosu na primenjenu terapiju (120). Dobro je poznato, a sada već i dokazano u praksi da imuni odgovor igra izuzetno bitnu ulogu u nastanku i perzistiranju malignog procesa. Inicijalan uvid u parametre imunog odgovora i u tumorsku mikrookolinu imamo na osnovu parametara krvne slike sa leukocitarnom formulom koja se rutinski radi pre početka lečenja *EGFR* TKI i ostale onkološke terapije i predstavlja jeftinu, minimalno invazivnu i obaveznu analizu. Imajući u vidu da je reč o brznoj i široko dostupnoj analizi u poslednje vreme ispitivana je prediktivna vrednost nekoliko hematoloških parametara inflamatornog odgovora organizma pre otpočinjanja primene hemioterapije (121), imunoterapije (122) i ciljane terapije (123, 124). Vrednosti traženih hematoloških parametara dobijani su iz odnosa broja krvnih ćelija, a parametri koji su do sada najčešće ispitivani su odnos neutrofila i limfocita (NLR), odnos trombocita i limfocita (PLR), odnos

trombocita i monocita (PMR), odnos limfocita i monocita (LMR) i odnos neutrofila i monocita (NMR).

Podaci o potencijalnoj prediktivnoj vrednosti sistemskih NLR, NMR, LMR, PLR i PMR zasnovanih na zapaljenju u *EGFR*-TKI su retki i kontradiktorni. Prethodne studije sugerisale su da bi NLR mogao biti potencijalni biomarker ukupnog preživljavanja (OS) (124). U jednoj studiji pokazano je da je NLR značajan prognostički biomarker kod pacijenata sa NSCLC lečenih hemoterapijom, ali ne i kod pacijenata lečenih *EGFR*-TKI. Nekoliko studija pokazalo je da se LMR i PLR mogu koristiti za predviđanje preživljavanja kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća (125), ali i onih koji sugerišu da ne postoji veza između PLR i preživljavanja kod pacijenata lečenih *EGFR* TKI (125, 126).

1.13 EMT PROCES I ZNAČAJ U REZISTENCIJI NA *EGFR* TKI

Epitelijalno-mezenhimalna transformacija (EMT) je potencijalno reverzibilni proces koji je u fiziološkim uslovima neophodan u pravilnom razvoju embriona jer omogućava kolektivnu migraciju ćelija tokom formiranja neuralne cevi i neuralne kreste (127), a takođe ima kritičnu ulogu u procesu zarastanja rana (slika 8) (128). EMT se zasniva na fenotipskoj transformaciji ćelija iz epitelnog u mezenhimalni tip, dok je mezenhimalno-epitelijalna tranzicija (MET) suprotan proces koji podrazumeva fenotipsku promenu od pokretnih mezenhimalnih ćelija do nepokretnih polarizovanih epitelnih ćelija sa funkcijom barijere. EMT se karakteriše gubitkom apiko-bazolateralnog polariteta i međućelijskih kontakata u epitelu, što dovodi do gubitka adhezije epitelnih ćelija i promene u njihovoj citoskeletnoj građi. Fenotipska promena ćelija u EMT procesu nastaje kao posledica izmene u genskoj ekspresiji što dovodi do promena u transkripciji različitih markera na epitelijalnim i mezenhimalnim ćelijama (129). Glavni marker epitelijalnih ćelija je E-kadherin, a mezenhimalnih N-kadherin, vimentin i fibronektin. EMT može biti potencijalno targetabilna meta nakon razvoja rezistencije na *EGFR* TKI, pa je poznavanje jasnog mehanizma EMT neophodno u cilju prevazilaženja potpunog izostanka ili prestanka odgovora na ciljanu terapiju (130).



Slika 8. Epitelijalno-mezenhimalna tranzicija

Pored uloge u fiziološkim procesima EMT ima značajnu ulogu i u patološkim procesima kao što je karcinogeneza, sticanje invazivnog potencijala malignih ćelija i pojava metastaza (128). Poznato je da prisustvo mezenhimalnih markera predstavlja znak loše prognoze kod adenokarcinoma pluća (128), dok je prisustvo E-kadherina kod NSCLC udruženo sa povoljnom prognozom. EMT proces je pored uloge u progresiji maligne bolesti i nastanku metastaza važan i kao jedan od potencijalnih prediktivnih faktora odgovora i rezistencije na ciljanu terapiju *EGFR* TKI, hemioterapiju i radioterapiju.

Ćelije koje prolaze kroz EMT proces karakterišu se gubitkom ekspresije epitelnih markera kao što je E-kadherin, ZO-1 i okcludin, a povećanjem ekspresije mezenhimalnih proteina kao što su vimentin,

fibronektin i N-kadherin. U ovom procesu dolazi i do aktivacije matriks metaloproteinaza (MMP-2, MMP-3, MMP-9) što olakšava kretanje malignim ćelijama i omogućava sticanje invazivnosti čime se olakšava diseminacija bolesti u okolna tkiva i istovremeno stvaranje rezistencije na apoptozu (129). Ovaj komplikovani proces precizno je regulisan interakcijom 3 grupe molekula koje možemo podeliti na efektore, transkripcione faktore i ekstracelularne induktore (129). U efektore spadaju molekuli kao što je E kadherin, u transkripcione faktore spadaju molekuli iz familije Snail, Slug, zinc-finger E box binding (Zeb) i Twist, a molekuli koji izazivaju ili provociraju nastanak EMT procesa su TGF- β i molekuli iz familije faktora rasta (engl. growth factor - GF) (131). Uz TGF- β nekoliko signalnih puteva je uključeno u EMT proces, kao što su Wnt, Notch i Hedgehog (132). Za aktivaciju ovog procesa neophodno je prisustvo unutrašnjeg i/ili ekstracelularnog stimulusa koji dovodi do aktivacije intracelularnog signalnog puta i smanjenja ekspresije E-kadherina (133).

U nekoliko studija dokazano je da EMT može ukazati na invazivniji i agresivniji tip karcinoma pluća ali nema taj značaj u ranim stadijumima bolesti (108). Takođe, inicijalni EMT status je promenljiv imajući u vidu da tumorske ćelije menjaju svoje karakteristike usled različitih faktora kao što je onkološka terapija itd. Usled navedenih promena može doći do reverznog procesa mezenhimalno-epitelijalne tranzicije koji može dovesti do ponovne senzitivnosti malignih ćelija na terapiju primenom *EGFR* TKI (134), što se može iskoristiti u prevazilaženju rezistencije na *EGFR* TKI.

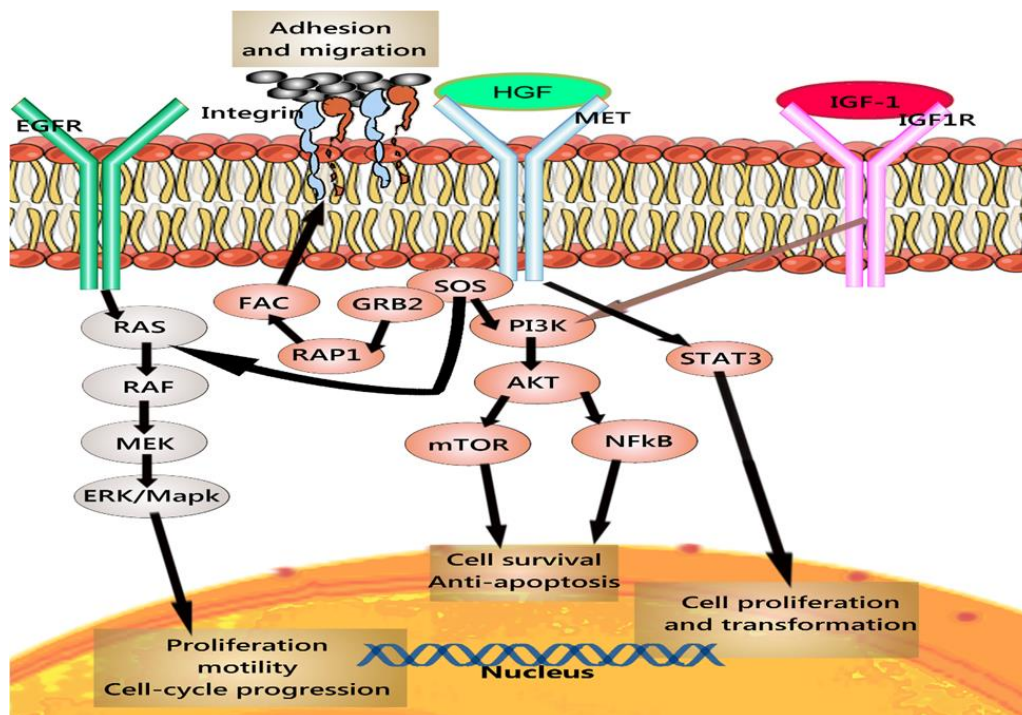
Notch-1 signaling

U nekoliko studija pokazano je da Notch-1 signalni put ima značajnu ulogu u nastanku rezistencije na *EGFR* TKI kod pacijenata sa NSCLC kroz aktivaciju epitelijalno-mezenhimalne tranzicije (135). Aberantna aktivacija Notch-1 signalnog puta dovodi do prekomerne ekspresije transkripcionih faktora Snail, Slug i Zeb čime dolazi do nastanka rezistencije na *EGFR* TKI (135).

TGF- β spada u multifunkcionalne citokine koje stvaraju leukociti i njegova osnovna uloga u organizmu je antitumorska. Međutim, kod pacijenata sa već razvijenim malignitetom. *TGF- β* ima protumorski efekat aktivacijom epitelijalno-mezenhimalne tranzicije i procesa tumorske angiogeneze (133). *TGF- β* indukuje EMT tako što se vezuje za svoj receptor i dovodi do fosforilacije *Smad 2* i *Smad 3* koji nakon formiranja *Smad* familije uz *Smad 4* aktiviraju transkripcione faktore u nukleusu (127). Faktori rasta regulišu EMT proces preko svojih tirozin kinaza receptora što dovodi do aktivacije *PI3K/AKT* puta i *MAP* kinaza i povećane aktivnosti transkripcionih represora kao što su *SNAIL*, *ZEB* i *Twist* čime se menja genska ekspresija koja dovodi do smanjene transkripcije epitelinih markera kao što je E-kadherin i povećane transkripcije mezenhimalnih markera kao što je vimentin. Smanjena ekspresija E-kadherina dovodi do akumulacije β katenina u citoplazmi čime se aktivira alternativni signalni put EMT procesa preko Wnt i transkripcionih faktora TCF/LEF koji se nalaze u nukleusu (127).

1.13.1 IGF-1R

Receptor insulinu sličnog faktora rasta 1 (*IGF-1R*) je heterotetramerični transmembranski protein koji spada u tirozin kinazne receptore, sastoji se od dve ekstracelularne alfa subjedinice i dve transmembranske beta subjedinice i smatra se da ima značajnu ulogu u transformaciji, rastu i preživljavanju malignih ćelija (129). Ovaj receptor ostvaruje svoju ulogu vezujući se svojim ekstracelularnim delom za ligand IGF, čime dolazi do njegove konformacione promene i aktivacije signalne transdukcije. Uloga *IGF-1R* opisana je u malignoj transformaciji ćelija, kao i u ćelijskoj proliferaciji, adheziji i apoptozu (136). Ovaj signalni put predstavlja i jedan od značajnih mehanizama stečene rezistencije na *EGFR* TKI ((77)).



Slika 9. Shematski prikaz adaptora i medijatora MET signala.

“MET put je moduliran molekulima površine ćelije, uključujući HER familiju (HER1, HER2 i HER3) i IGF1R. MET može aktivirati efektorski molekul fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K) i signalizirati preko AKT/protein kinaze B ose, koja aktivira metu osovine rapamicina (mTOR) stimulišući rast ćelija i sintezu proteina. Aktivacija bilo kog PI3K-AKT može aktivirati NF- κ B, koji se zatim može osloboditi i stimulisati transkripciju gena nakon što se translocira u jezgro. MET aktivacija može dovesti do nizvodne aktivacije RAS-MAPK puta. Protein izmenjivača nukleotida Sin of Sevenless (SOS) aktivira onkogeni homolog RAS virusnog sarkoma pacova vezivanjem za GRB2 (GRB2-SOS kompleks). Ovaj kompleks može aktivirati v-raf onkogeni homolog B1 (RAF) kinaze v-raf mišjeg sarkoma, koje sukcesivno aktiviraju MAPK efektor kinazu (MEK), i konačno rezultira aktivacijom protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK). Aktivacija MET citoplazme signalne kaskade mogu dodatno da promene ćelijsku invazivnost, pokretljivost i citoskelet, posredovane preko proteina 1 povezanog sa RAS (RAPI), fokalnog adhezionog kompleksa (FAC) kao i integrinskih veza. MET može dodatno aktivirati nizvodnu osu transduktora signala i aktivatora puta transkripcije 3 (STAT3). STAT3 se može aktivirati fosforilacijom nakon direktnog vezivanja za MET, što rezultira dimerizacijom i translokacijom u jezgro i posledično posreduje u ćelijskoj proliferaciji, transformaciji, kao i tumorigenezi i invaziji“.

Preuzeto od Al-Saad et al (2017). The impact of MET, IGF-1, IGF1R expression and EGFR mutations on survival of patients with non-small-cell lung cancer.

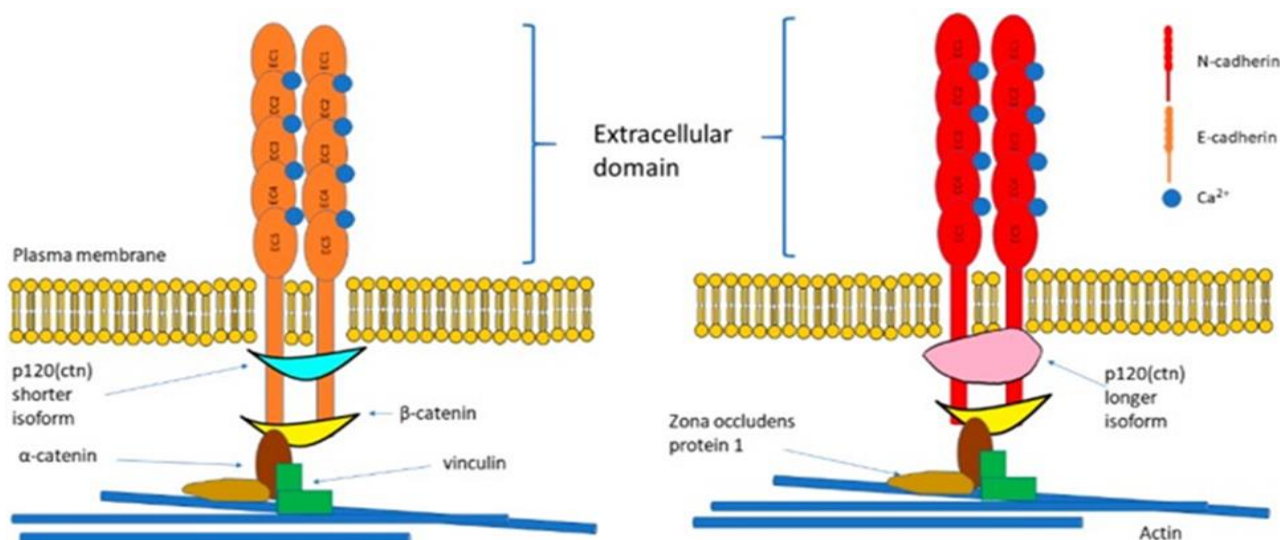
Aktiviran IGF-1R dovodi do fosforilacije PI3K/AKT i MAPK/ERK puta čime se aktivira NF- κ B p65 signalni koji menja gensku ekspresiju i indukuje nastanak EMT procesa, a time i nastanak EMT fenotipa EGFR-mutiranih ćelija (slika 10) (131). U nekoliko studija je dokazano da rezistencija na gefitinib može nastati usled aktivacije IGF-1R na taj način što dovodi do povišene regulacije Snail, Slug i ZEB1/2. Takođe je pokazano da prekomerna ekspresija IGF-1R može biti zaslužna za produženo trajanje EMT procesa kod različitih tipova ćelija. Supresija IGF-1R ili prekomerna ekspresija E-kadherina utiče na preživljavanje malignih ćelija pod uticajem EGR TKI, pa je pokazano da kod IGF-1R zavisnog EMT postoji povećana ekspresija β -katenina koji se pomera sa ćelijske membrane u nukleus, reaguje a transkripcionim faktorima i dovodi do nastanka EMT (133).

1.13.2 E-kadherin

E kadherin je transmembranski protein koji spada u klasične kadherine i uključen u proces međucelijskog povezivanja čime predstavlja metu za represiju transkripcije od strane različitih faktora uključenih u EMT proces (137). Spada u Ca-zavisne proteine zadužene za adheziju ćelija ključnu u diferencijaciji tkiva i održavanju homeostaze u organizmu regulacijom različitih signalnih puteva (130). Ima svoj ekstracelularni domen koji čine 5 subjedinica i citoplazmatski deo koji se vezuje za α i β -katenin čime se formira kadherin-katenin adhezioni kompleks koji se potom vezuje za F-aktin pomoću adaptera kao što su ZO1 (zona occludens protein 1) (130). p120 katenin i β -katenin su čvrsto vezani za E-kadherin kompleks, što sprečava aktivnost Wnt/ β -katenin puta i PI3K puta u epitelnim ćelijama (130).

1.13.3 N-kadherin

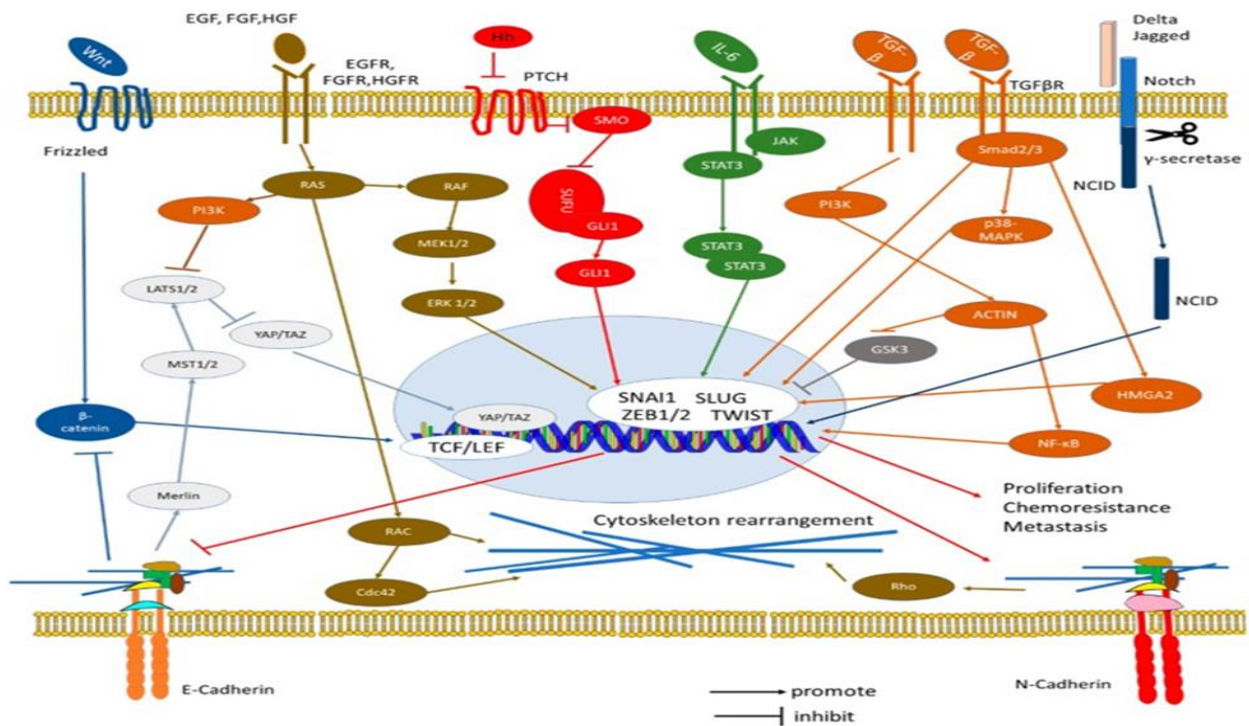
Neuralni kadherin (N-kadherin) je adhezivni molekul koji takođe spada u Ca-zavisne klasične kadherine, prisutan je u neepitelijalnim tkivima kao što su nervne i endotelijalne ćelije, a često je prekomerno eksprimiran u malignim ćelijama tumora pluća (130). U fiziološkim uslovima N-kadherin je odgovoran za međucelijsku adheziju koja je bitna za održavanje stabilnosti tkiva i njihovih dinamičkih procesa, a u nervnom tkivu promoviše proliferaciju i diferencijaciju neuronskih progenitornih ćelija (130). Slične je građe kao E-kadherin s tim što se N-kadherin svojim citoplazmatskim domenom vezuje sa dužom izoformu p120 katenina, dok se E-kadherin vezuje za kraću izoformu p120 katenina (slika 11) (130).



Slika 10. Struktura E-kadherina i N-kadherina. Na slici su prikazani E-kadherin i N-kadherin koji formiraju kadherin-katenin kompleks koji se vezuje za citoskeletni element koji sadrži aktin.

Preuzeto od Loh et al. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges.

Smanjenje nivoa ekspresije E-kadherina u procesu epitelijalno-mezenhimalne tranzicije dovodi do kidanja međucelijskih veza i gubitka polariteta, pa se smatra jednim od glavnih obeležja EMT procesa (130). Takođe je uočeno da agresivniji i invazivniji karcinomi koji su skloni brzom nastanku metastaza imaju niske nivoe ekspresije E-kadherina (130).

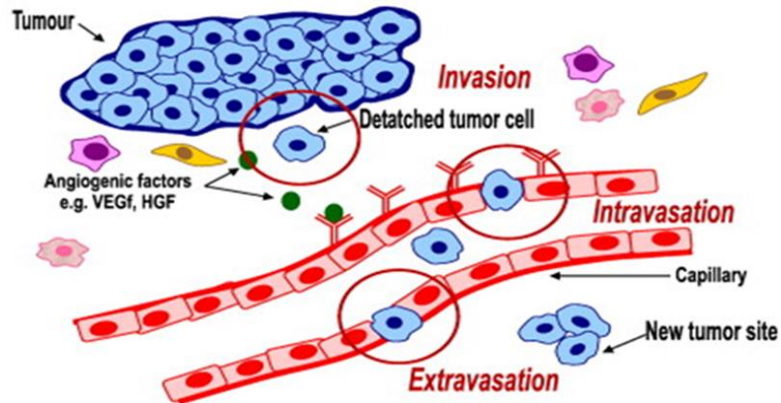


Slika 11. Signalni putevi uključeni u epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju. Komunikacija između mnogobrojnih signalnih puteva uključenih u EMT dovodi do povišene ekspresije EMT transkripcionih faktora kao što su SNAI1, SLUG, TWIST i ZEB1/2, što dovodi do gubitka epitelijalnih karakteristika i sticanja mezenhimalnih karakteristika ćelije. Put Wnt/ β -katenin indukuje EMT interakcijom sa TCF/LEF. Faktori rasta uključujući epidermalni faktor rasta (EGF), FGF i faktor rasta hepatocita (HGF) vezuju se za svoje receptore da bi aktivirali RAS/ERK signalizaciju, RAS/PI3K signalizaciju i RAS/RAC signalizaciju. Aktivacija RAS/RAC puta zatim dovodi do reorganizacije citoskeleta povećanjem ekspresije RAC i Cdc42. Hedgehog (HH)/GLI i Janus kinaza/pretvarač signala i aktivator transkripcionih (JAK/STAT) puteva povećavaju ekspresiju SNAI1 i pokreću EMT program. TGF- β put promovira EMT putem Smad ili non-Smad signalizacije. TGF- β /Smad signalizacija aktivira kompleks Smad2/3 gde kompleks može da interaguje sa transkripcionim faktorima u jezgu da bi pokrenuo EMT, aktivira p38 MAPK put i povećava ekspresiju HMG2A da bi regulisao N-kadherin. Non-Smad signalizacija aktivira PI3K/AKT signaling da izazove EMT potiskivanjem GSK3 i promovisanjem ekspresije NF- κ B. NCID otepljen aktiviranim Notch putem će se translocirati u jezgu da bi povećao ekspresiju SLUG. N-kadherin pojačava ekspresiju RhoA da bi ojačao spoj ćelija-ćelija i sproveo preuređenje citoskeleta. Skraćenice: IL=interleukin; LATS- Veliki supresor tumora; NCID - Urezani intracelularni citoplazmatski domen; Rho - Ras homolog; PAK=Serin/treonin-proteinkinaza; IAP - Da-povezani proteini; MEK=Protein kinaza aktivirana mitogenom; SUFU - Supresor spojenog homologa; GLI 1 - onkogen povezan sa gliomom; JAK - Janus kinaza; STAT - Pretvarač signala i aktivator transkripcije; NF- κ B - Nuclear Factor Kappa-pojačivač lakog lanca aktiviranih B ćelija; HMG2A - Grupa visoke pokretljivosti A2; EGF - Epidermalni faktor rasta. Preuzeto od Loh et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges.

Glavno obeležje EMTa je povišen nivo N-kadherina i snižen nivo E-kadherina (130), a u malignoj bolesti prekomerna ekspresija N-kadherina dovodi do lakše pokretljivosti malignih ćelija, diseminacije bolesti i pojave metastaza. Ovaj molekul uz matriks metaloproteinaze predstavlja metu za aktivaciju transkripcije (83) N-kadherin svoju funkciju ostvaruje putem aktivacije MAPK/ERK puta i aktivacijom PI3K puta, a sam EMT indukuje kroz ErbB put kontrolom nivoa faktora rasta (slika12) (130).

The disruption of the Tight Junction occurs at:

1. Detachment of the tumour cell from the primary tumor
2. Intravasation of the tumor cell through the endothelium
3. Extravasation by the circulating tumor cell



Slika 12. Uloga čvrstih veza i okludina u nastanku metastaza.

Preuzeto iz Martin et al: Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis.

1.13.4 Okludin

Okludini su transmembranski strukturalni proteini koji predstavljaju sastavni deo čvrstih veza (engl. tight junctions ili lat. zonula occludens) (slika13). Čvrste veze locirane su u apikobazalnom delu ćelijske membrane, omogućavaju međucelijsko povezivanje i prave određenu vrstu ćelijske barijere, ali i regulišu međucelijsku permeabilnost (138). Pored okludina u izgradnji čvrstih veza učestvuju i molekuli koji se zovu kladini, tricelulini, kao i adhezioni molekuli u koje spadaju zonulin 1,2 i 3, cingulin, simplekin i aktinski filamenti. Zonulin 1 (ZO-1) ima specifičnu ulogu u formiranju čvrstih veza tokom ćeljske polarizacije, a okludin se akumulira u ZO-1 u epitelijalnim i mezenhimalnim ćelijama (139). Maligna bolest karakteriše se poremećenom ekspresijom okludina i drugih molekula koji učestvuju u stvaranju čvrstih veza, što sve doprinosi nastanku epitelno-mezenhimalne tranzicije (140). Smanjena ekspresija okludina odgovorna je za progresiju bolesti i nastanak metastaza kod karcinoma dojke i ginekoloških karcinoma, ali njegov značaj nije ispitivan kod adenokarcinomu pluća. Imajući u vidu da je tokom metastaziranja tumora neophodno da maligne ćelije prođu kroz EMT koja podrazumeva sticanje mobilnosti pokazano je da smanjen broj čvrstih veza takođe može imati uticaja na diseminaciju maligne bolesti (141). Takođe se smatra da je ekspresija proteina čvrste veze kao što je okludin pod uticajem istih faktora kao i ekspresija proteina odgovornih za EMT, pre svega citokina, faktora rasta i ostalih regulatora, zbog čega tokom EMT procesa dolazi do potpunog nestanka čvrstih veza (141). Iako je poznato da je EMT proces odgovoran za nastanak stečene rezistencije na *EGFR* TKI u NSCLC detaljan proces nije u potpunosti istražen, te je precizno poznavanje mehanizma epitelijalno-mezenhimalne tranzicije neophodno u otkrivanju novih molekularnih mehanizama koji mogu služiti u otkrivanju lekova koji bi prevazišli nastanak rezistencije na *EGFR* TKI.

Ispitivanje mehanizama rezistencije i toksičnosti na inhibitore tirozin kinaza dovelo je do razvoja ciljanih terapeutika narednih generacija koji se bore sa evolutivnom genetičkom selekcijom tumora. Razvoj precizne medicine, sistemskog lečenja i lokalnih ablativnih metoda doveo je do potrebe za formiranjem novih kliničkih algoritama koji će uzimati u obzir nove kliničke i molekularne prediktivne faktore. Iako su određeni mehanizmi rezistencije i toksičnosti na *EGFR* TKI poznati, novi se svakodnevno otkrivaju, a neki su i populaciono specifični. S obzirom na to da i dalje ne postoji konsenzus za njihovo prevazilaženje, neophodna su dodatna istraživanja koja bi omogućila njihovo bolje razumevanje. U Srbiji do sada nije sprovedeno nijedno opsežnije istraživanje o odgovoru

pacijenata obolelih od uznapredovalog adenokarcinoma pluća na *EGFR* TKI, niti o populaciono-specifičnim mehanizmima rezistencije i toksičnosti.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ispitivanje demografskih karakteristika pacijenata i karakteristika tumora (pol, starost, pušački status, prisustvo inicijalnih metastaza, prisustvo bola pri dijagnozi, performans status, gradus tumora, hematološki parametri) kao prediktivnih faktora efikasnosti EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća (korelacija sa ukupnim preživljavanjem (*overall survival* - OS), preživljavanjem bez progresije bolesti (*progression free survival* – PFS), pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola)

Ispitivanje tipa i zastupljenosti mutacija u genu EGFR kao prediktivnih faktora EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća (korelacija sa OS, PFS, pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola)

Ispitivanje nivoa ekspresije gena IGF-1R, E-kadherin, N-kadherin i okludin kao prediktivnih faktora EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća (korelacija sa OS, PFS, pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola).

3. MATERIJAL I METODE

Za istraživanja u okviru ove doktorske disertacije dobijena su odobrenja Naučnog veća (odluka br. 1442-01 od 16.04.2019.) i Etičkog odbora (odluka br. 1590-01 od 24.04.2019.) Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, kao i Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka br. 1550/IX-4 od 25.09.2019.).

3.1 Pacijenti

Istraživanje je sprovedeno u periodu od 2013. do 2021. godine na grupi od 101 pacijenta sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća (klinički stadijum IIIb i IV, performans status 0, 1 ili 2) kod kojih je potvrđeno prisustvo mutacija u *EGFR* genu i koji su bili lečeni ili su i dalje na terapiji inhibitorima tirozin kinaza na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Dijagnoza uznapredovalog adenokarcinoma pluća biće postavljena u skladu sa kriterijumima osmog izdanja Internacionalne asocijacije za istraživanje karcinoma pluća (IASLC). Kriterijumi za uključivanje u studiju podrazumevali su: starost preko 18 godina, klinički i patohistološki potvrđenu dijagnozu uznapredovalog adenokarcinoma pluća, klinički stadijum IIIb i IV, performans status 0, 1 ili 2, potvrđeno prisustvo mutacija u *EGFR* genu i postojanje adekvatnog kliničkog praćenja od minimum godinu dana nakon započinjanja *EGFR* TKI terapije na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Formirana je baza podataka pacijenata na osnovu informacija dobijenih iz centralnog informacionog sistema Heliant koji se koristi na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Pacijenti su tretirani *EGFR* inhibitorima tirozin kinaza prve generacije u prvoj liniji do progresije ili neprihvatljive toksičnosti. Analizirani su demografski podaci (pol i starost pacijenata), kliničke manifestacije bolesti, pušački status, performans status, TNM stadijum bolesti pri postavljanju dijagnoze, gradus tumora, lokalizacija inicijalnih metastaza, komorbiditeti, hematološki parametri, prisustvo bola pri dijagnozi i tokom terapije, tip *EGFR* mutacije, dužina primene TKI, odgovor na terapiju (SD – stabilizacija bolesti, PR – parcijalna regresija, CR – kompletna regresija, PD – progresija bolesti), preživljavanje bez progresije bolesti (eng. Progression Free Survival, PFS), ukupno preživljavanje (eng. Overall survival, OS,) toksičnost na TKI i rezistencija na terapiju.

Odgovor na TKI, toksičnost terapije i razvoj rezistencije bili su procenjivati na redovnim kontrolama. Odsustvo primarne rezistencije se procenjivalo nakon prva 3 meseca primene leka i definisano je kao bilo koji klinički odgovor koji ne podrazumeva progresiju bolesti. Pod stečenom rezistencijom se smatrala pojava progresije bolesti kod pacijenata koji su inicijalno (nakon prva tri meseca) pokazali dobar odgovor na TKI. Toksičnost na TKI se procenjivala prema kriterijumima 5.0 verzije CTCAE – Common Terminology Criteria for Adverse Events.

Prisustvo bola pri dijagnozi i tokom terapije prijavljivana je korišćenjem Pain – Related Patient - Reported Outcomes.

Ukupno preživljavanje (OS) bilo je definisano kao vreme koje protekne od postavljanja dijagnoze do smrti bolesnika ili poslednje kliničke kontrole, a preživljavanje bez progresije bolesti (PFS) kao vreme od postavljanja dijagnoze do pojave progresije, smrtnog ishoda ili poslednje kontrole za bolesnike koji nisu progredirali.

3.2 Procena nivoa bola i antidolorozna terapija

Nivo bola procenjen je primenom dve metode – numeričkom skalom za procenu bola (NRS) i verbalnom deskriptivnom skalom (VDS) pre otpočinjanja terapije inhibitorima tirozin kinaza, kao i tokom primene ovih lekova. Odgovor na antidoloroznu terapiju procenjen je nakon 3 meseca primenom NRS i VDS. U isto vreme vršena je radiografska (CT grudnog koša i gornjeg sprata abdomena) i klinička procena efikasnosti terapije inhibitorima tirozin kinaza. Numerička skala procene nivoa bola podrazumevala je samoprocenu intenziteta bola od strane pacijenata na skali od 0 do 10, pri čemu 0 predstavlja stanje bez bola, a 10 najjači bol. Bol blagog intenziteta predstavlja vrednost NRS od 1 do 3, umereni bol vrednost NRS od 4 do 6, a jak bol vrednost NRS od 7 do 10. Kod pacijenata koji su imali poteškoća da procene intenzitet bola primenom numeričke skale

korišćena je verbalna deskriptivna skala koja je uključivala nekoliko opisnih fraza koje su se odnosile na različit intenzitet bola (npr. „bez bola“, „blagi bol“, „umeren bol“, „jak bol“, „najgori bol koji se može zamisliti“). U antidoloroznoj terapiji primenjeni su acetaminofen, nesteroidni antiinflamatorni lekovi, kai i slabi i jaki opioidi. Terapija zračenjem jednom dozom od 8 Gy i dva režima dugog kursa, uključujući 20 Gy u 5 frakcija i 30 Gy u 10 frakcija, korišćeni su kod pacijenata sa bolnim metastazama na kostima.

3.3 Određivanje hematoloških parametara

Periferna krv sa etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA) dobijena je venepunkcijom pre otpočinjanja primene TKI, a rezultati kompletne krvne slike sa leukocitarnom formulom dobijeni su iz elektronskih medicinskih kartona pacijenata. Analizirani su sledeći hematološki parametri: odnos neutrofila i limfocita (NLR), trombocita i limfocita (PLR), trombocita i monocita (PMR), limfocita i monocita (LMR) i neutrofila i monocita (NMR).

3.4 Materijal za analizu

Formalinom fiksirani parafinom ukalupljeni uzorci (Formaline-fixed, paraffin-embedded - FFPE) uzorci tumora pluća dobijeni bronhoskopijom, transbronhijalnom iglenom biopsijom, transtorakalnom iglenom biopsijom ili VATS biopsijom pacijenata obolelih od uznapredovalog adenokarcinoma pluća uzeti pre primene EGFR TKI pregledani su od strane specijaliste kliničke patologije. Iz parafinskih kalupa su izolovane DNK i RNK, pri čemu je DNK bila polazni material za analizu mutacija u genu EGFR (egzoni 18-21), a RNK polazni material za analizu ekspresije gena IGF-1R, N-kadherin, E-kadherin i okcludin.

Sve eksperimentalne analize izvedene su u Laboratoriji za molekularnu genetiku Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) kao eksperimentalna studija i podržane su od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Pre izvođenja molekularnih analiza pribavljen je informisani pristanak pacijenata za učešće u ispitivanju).

3.5 Izolovanje DNK i RNK i dobijanje Cdnk

DNK i RNK su izolovane iz FFPE uzoraka (3-4 isečka debljine 10 μ m) pomoću QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-a, odnosno pomoću RNeasy FFPE Kit (QIAGEN) prema preporukama proizvođača.

3.5.1 Izolovanje DNK iz parafinskih uzoraka pomoću RNeasy FFPE Kit-a (QIAGEN) –

Izolovanje DNK iz parafinskih uzoraka pomoću QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-a (QIAGEN) se vršio na sledeći način. U mikrotubu od 1,5 mL u kojoj se nalaze isecci FFPE uzorka tumora dodato je 1 mL ksilola, promešano vorteksom 10 sekundi. Nakon toga uzorak je centrifugiran na maksimalnoj brzini (14000 rpm, 5417 R Centrifuge, Eppendorf) 2 minuta na sobnoj temperaturi. Pipetom je izvučen supernatant i u njega dodat 1 ml etanola (96-100%) i centrifugiran na maksimalnoj brzini (14000 rpm) 2 minuta na sobnoj temperaturi. Pipetom je izvučen supernatant (izvučen sav etanol najmanjom pipetom). Nakon toga su otvorene ependorfice i inkubirane na sobnoj temperaturi 10 minuta dok sav etanol nije ispario. Talog je resuspendovan u 180 μ L ATL pufera, nakon čega je dodato 20 μ L proteinaze K i dobro promešali vorteksom. Nakon toga smo uzorak inkubirali na 56°C 1h, a zatim na 90°C 1h. Posle inkubacije dodali smo 200 μ L pufera AL kao i 200 μ L etanola (96-100%) i jako vorteksovali. Pažljivo smo prebaciti ceo lizat na QIAamp MinElute kolonicu, bez kvašenja oboda i centrifugirali na 8000 rpm 1 minut na sobnoj temperaturi. Ako lizat nije potpuno prošao kroz membranu kolonice nakon centrifugiranja, ponovo smo centrifugirali na 10000 rpm 1 minut dok se kolonica ispraznila. Nakon toga dodali smo 500 μ L pufera AW1 bez kvašenja oboda i centrifugirali na 8000 rpm 1 minut. Sledilo je dodavanje 500 μ L pufera AW2 bez kvašenja oboda i centrifugiranje na 8000 rpm 1 minut. Prebacili smo kolonicu u novu tubicu i centrifugirali na 14000 rpm 3 minuta da bi se potpuno osušila membrana. Sledilo je prebacivanje kolonice u čistu ependorficu (1,5 mL) koja nije u kit-u i dodali 50 μ L ATE pufera na centar membrane i inkubirali na sobnoj

temperaturi 5 minuta, pa centrifugirali na 14000 rpm 1 minut. Ependorficu sa eluiranim uzorkom DNK obeležili i staviti na -20°C.

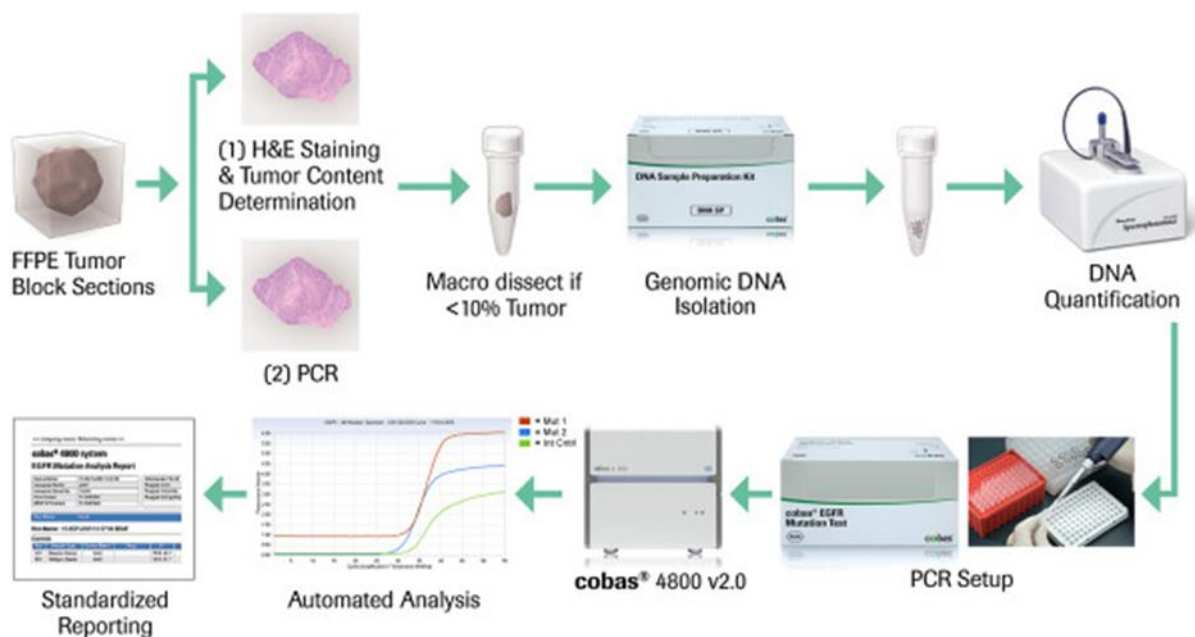
3.6 Izolovanje RNK iz parafinskih uzoraka pomoću RNeasy FFPE Kit-a (QIAGEN)

U mikrotubu od 1,5 mL u kojoj se nalaze isečci FFPE uzorka tumora dodali smo 1 mL ksilola, jako vorteksovati 10 sekundi i zatim centrifugirali 2 min na 14 000 rpm (5417 R Centrifuge, Eppendorf). Pažljivo smo ukloniti supernatant pipetiranjem i dodali 1 mL etanola (96-100%) na talog, vorteksovati i centrifugirali 2 min na 14 000 rpm kako bi se uklonio zaostali ksilol. Pažljivo smo uklonili supernatant pipetiranjem, pa inkubirali na sobnoj temperaturi (ili do 37 °C) 10 min. Dodali smo 240 µL pufera PKD, pa zatim 10 µL proteinaze K. Nakon toga smo uzorak inkubirali na 56 °C 15 min, a zatim na 80 °C 15 min. Izlupali smo led za naredne korake. Inkubacija na 80 °C je kritičan korak jer delimično otklanja modifikacije nukleinskih kiselina nastale formaldehidom, tako da smo sačekali da se temperatura popne na 80 °C pre nego što smo započeli inkubaciju od 15 minuta. Duže vreme ili viša temperatura mogu rezultovati u dobijanju više fragmentisane RNK. Zatim smo prebacili bistru fazu u novu ependorficu od 2 mL i inkubirali na ledu 3 minuta, zatim centrifugirali 15 min na 13 500 rpm. Supernatant smo prebacili u novu mikrotubicu vodeći računa da se ne zahvati talog (talog sadrži nerastvorljive tkivne ostatke uključujući i 'crosslinked' DNK). Dodali smo DNase booster pufer u količini jednakoj desetini ukupne zapremine uzorka (okvirno 25 µL) i 10 µL štoka DNase i rastvora. Zatim smo centrifugirali kratko da bi se sakupili ostaci tečnosti sa strana i inkubirali na sobnoj temperaturi 15 min. Dodali smo 500 µL pufera RBC da bi se podesili uslovi za vezivanje i dobro promešali lizat, a nakon toga dodali 1200 µl etanola (100%) i izmešali dobro pipetiranjem. Prebacili smo 700 µL uzorka, uključujući i bilo koji precipitat koji se formirao, u RNeasy MinElute spin kolonicu koja se nalazi u 2 mL kolekcionalnoj tubici. Sledilo je centrifugiranje 15 sekundi na preko 10 000 rpm. Ponavljali smo prethodni korak dok sav uzorak ne prođe kroz RNeasy MinElute spin kolonicu. Nakon toga dodali smo 500 µL RPE pufera i centrifugirali 15 sekundi na preko 10 000 rpm, a zatim 500 µL RPE pufera i centrifugirali 2 minuta na preko 10 000 rpm da bi se isprala membrana kolonice. Nakon centrifugiranja pažljivo smo vadili kolonicu kako ne bi došla u kontakt sa tečnošću koja je prošla kroz nju. Posle prebacivanja kolonice u novu 1,5 mL kolekcionalnu tubicu dodavali smo 30 µL RNase-free vode direktno na membranu kolonice i centrifugirati 1 min na 14 000 rpm da bi se RNK eluirala.

Kvalitet i količina izolovanih uzoraka DNK i RNK bili su procenjeni spektrofotometrijski koristeći BioSpec-nano UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu Scientific Instruments). Spektrofotometrijsko određivanje količine DNK i RNK zasnovano je na osobini purinskih i pirimidinskih baza da apsorbuju svetlost talasne dužine 260 nm, a intenzitet je direktno proporcionalan koncentraciji nukleinskih kiselina u uzorku čija se apsorbancija meri. Koncentracija uzoraka izražena je u ng/µL, a svi izolovani uzorci su bili zadovoljavajućeg kvaliteta za nishodne analize (odnos A260/A280 u opsegu 1,7-1,9.).

3.7 Detekcija mutacija u genu EGFR

Izolovana DNK korišćena je za određivanje mutacija u genu EGFR metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (qRT-PCR) koristeći dijagnostički validirani cobas® EGFR Mutation Test v2 (Roche Diagnostics) na aparatu cobas® z 480 analyzer, prateći uputstva proizvođača. Ovaj test ima sposobnost detekcije 42 mutacije u egzonima 18-21 gena EGFR (29 delecija u egzonu 19, bez mogućnosti razlikovanja među njima, kao i 5 insercija u egzonu 20 i 3 promene označene kao G719X u egzonu 18. Obrada podataka bila je izvedena pomoću automatizovanog cobas® softverskog paketa, a limit detekcije ovog testa je 5%.



Slika 13. Shematski prikaz analize mutacija u EGFR genu metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (qRT-PCR) koristeći cobas® EGFR Mutation Test v2 (Roche Diagnostics) na aparatu cobas® z 480 analyzer.

Sekvenciranje uzoraka DNK rezistentnih uzoraka bilo je izvedeno na aparatu ABI Prism 310 Genetic Analyzer u cilju potencijalne detekcije rezistentnih mutacija u EGFR genu koje nisu prisutne u cobas® EGFR Mutation Test kitu. Analiza dobijenih rezultata vršila se uz pomoć programa Sequencher DNA Sequence Analysis Software i dostupnih baza podataka na internetu.

3.8 Sinteza komplementarne cDNK iz RNK

Reverzna transkripcija (RT) podrazumeva reakciju sinteze jednolančane DNK (engl. complementary DNA, cDNA) iz uzorka RNK katalizovanu enzimom reverznom transkriptazom. U reakciji je korišćen High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a (Thermo Fisher Scientific). U reakcionu smešu je dodato 2 µg RNK, 2 µL 10x RT pufera, 1 µL 10 x nasumičnih heksamer prajmera, 1 µL nukleotida 10X dNTP-ova (100mM), 1 µL MultiScribe™ reverzne transkriptaze, 1 µL inhibitora ribonukleaza i voda do ukupne zapremine od 20 µL. Reakcija je izvedena korišćenjem programa: 10 minuta na 25°C, 2h na 37°C i 5 minuta na 85°C u PCR aparatu MasterCycler Gradient (Eppendorf).

3.9 Analiza ekspresije gena

Nivoi ekspresije mRNK gena IGF-1R, N-kadherin, E-kadherin i okcludin bili su analizirani qRT-PCR metodom primenom TaqMan® Gene Expression Assays specifičnih za svaki gen i TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) na aparatu Applied ABI Prism 7500, korišćenjem odgovarajuće cDNK kao matrice. Svaki uzorak je urađen u triplikatu u tri nezavisna eksperimenta i srednja vrednost Ct je korišćena za dalju analizu. Analiza podataka bila je urađena klasičnom ddCt metodom uz korišćenje gena GAPDH kao interne kontrole i nezavisnog kalibratora koji je korišćen u svakom eksperimentu.

3.10 Statističke metode

Za testiranje normalne distribucije podataka korišćeni su Kolmogorov–Smirnov i Shapiro-Wilk testovi. Deskriptivne metode statističkih analiza (frekvencija, procenti, srednja vrednost, medijana, greške, opseg) korišćene su pri sumiranju podataka. Za poređenje karakteristika bolesti između podgrupa korišćeni su Kruskal-Wallis, Wilcoxon rank sum, Pearson chi-square i Fisher exact testovi. Za ispitivanje diskriminatorskog potencijala EGFR mutacija i ekspresija EMT gena između različitih

podgrupa primenjen je Receiver Operating Characteristics curve (ROC) metod kao i Area Under the ROC curve uz DeLong test za dve povezane ROC krive. Spearmanov rho koeficijent i model linearne regresije korišćeni su za ispitivanje linearne korelacije između ekspresija različitih gena. Za analizu ukupnog preživljavanja (OS) i preživljavanje bez progresije bolesti (PFS) korišćene su Survival analize: Kaplan-Meier product limit metod za grafičku prezentaciju; medijana sa odgovarajućim 95% intervalom pouzdanosti (95% CI) za deskripciju i Log-rank test za testiranje razlika između kriva za ukupno preživljavanje. Cox proporcionalna hazard regresija (univarijantna) korišćena je za procenu statistički značajnih faktora koji imaju uticaj na OS i PFS: Hazard Ratio (HR) sa odgovarajućim 95% CI korišćen je za deskripciju i Likelihood ratio test za statističko testiranje. Statističke analize su urađene u programu R (version 3.3.2 (2016-10-31)). Nivo statističke značajnosti u svim analizama bio je postavljen na $\alpha=0,05$, a Bonferroni korekcija urađena za multipla testiranja za isti set podataka.

4 REZULTATI

4.1 Ispitivanje uticaja demografskih karakteristika ispitivane grupe pacijenata na preživljavanje

U periodu od 2011-2020. godine izvedeno je centralizovano testiranje 5650 uzoraka pacijenata tokom koga su otkrivene mutacije u *EGFR* genu u 9,8% slučajeva. Prosečna starost naših ispitanika je bila 61,7 (\pm 11.1) godina, više od polovine pacijenata bilo je ženskog pola (65,3%). Najveći broj ispitanika (81,1%) inicijalno je bilo dobrog opšteg stanja – ECOG 1, dok su polovinu grupe činili pušači (48,5%). Ostale kliničke karakteristike pacijenata nalaze se u Tabeli 1.

Tabela 15. Karakteristike pacijenata u trenutku postavljanja diagnoze

Karakteristike pacijenata	Broj pacijenata (%) N=101
Starost	
Mean \pm sd	61,7 \pm 11,1
Pol	
Ženski	66 (65,3)
Muški	35 (34,7)
Performansstatus (PS)*	
ECOG 0	5 (5)
ECOG 1	82 (81,1)
ECOG 2	8 (7,9)
ECOG 3	5 (5)
ECOG 4	1 (1)
Pušački status	
Nepušač	45 (44,6)
Pušač	49 (48,5)
Nepoznato	7 (6,9)

* ECOG PS - The Eastern Cooperative Oncology Group performan status (142)

Većina pacijenata u našoj studiji dijagnostikovana je u metastatskom stadijumu bolesti (91%) (tabela 16).

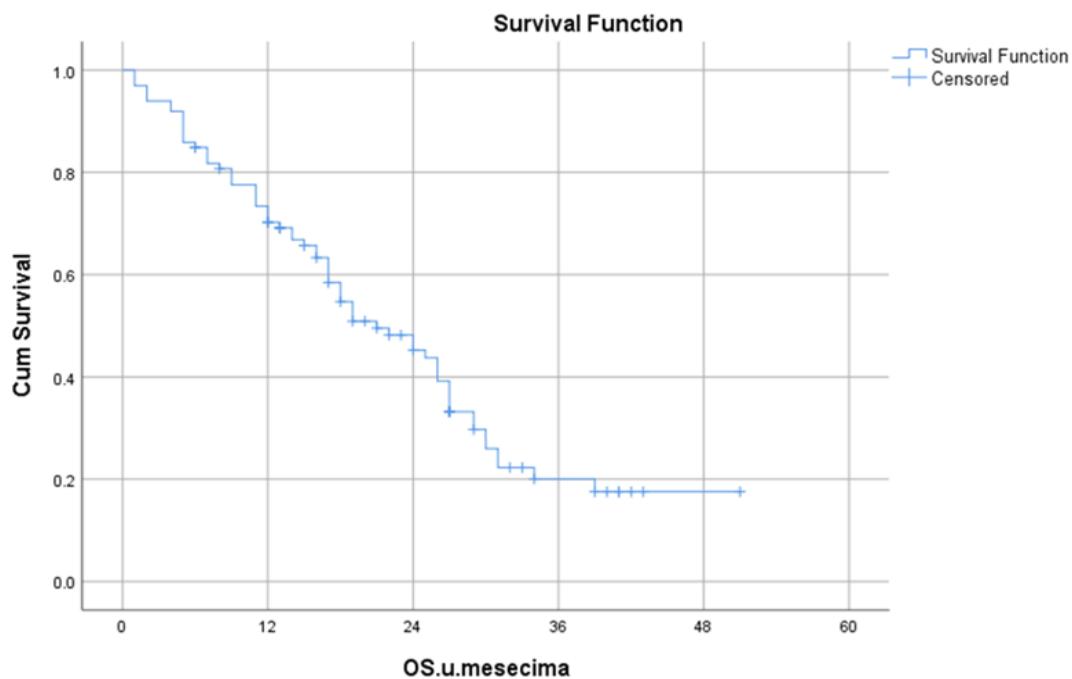
Tabela 16. Stadijum bolesti pre početka primene *EGFR* TKI

TNM stadijum	Broj pacijenata (%) N=101
IIIb	10 (10)
IV	91 (91)
T stadijum	

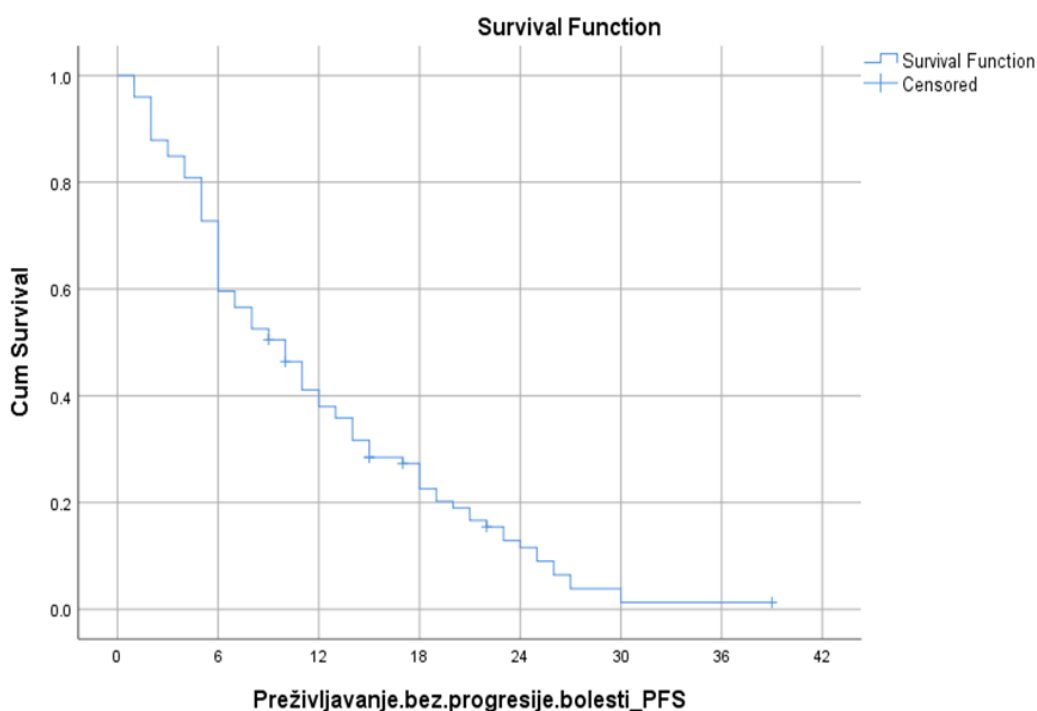
T0	5 (5)
T1	4 (4)
T2	36 (35,6)
T3	25 (24,8)
T4	27 (26,7)
Tx	4 (4)
N stadijum	
N0	26 (25,7)
N1	20 (19,8)
N2	43 (42,6)
N3	12 (11,9)
M stadijum	
Bez metastaza	10 (9,9)
M1a	38 (37,6)
M1b	28 (27,7)
M1c	25 (24,8)

T – veličina tumora; N – zahvaćenost limfnih čvorova; M – prisustvo metastaza. M1a - tumor u kontralateralnom plućnom krilu ili pleuralni/perikardijalni nodus/maligna efuzija; M1b – pojedinačna ekstratorakalna metastaza koja uključuje pojedinačni neregionalni limfni čvor; M1c – multiple ekstratorakalne metastaze u jednom ili više organa.

Medijana ukupnog preživljavanja pacijenata u našoj studiji je 21 mesec (15,2-26,7 CI 95%). Medijana PFS u celoj grupi bila je 10 meseci (7,4-12,5 CI 95%) (slika 14). Trećina pacijenata (34%) je u trenutku analize podataka i dalje bilo živo.

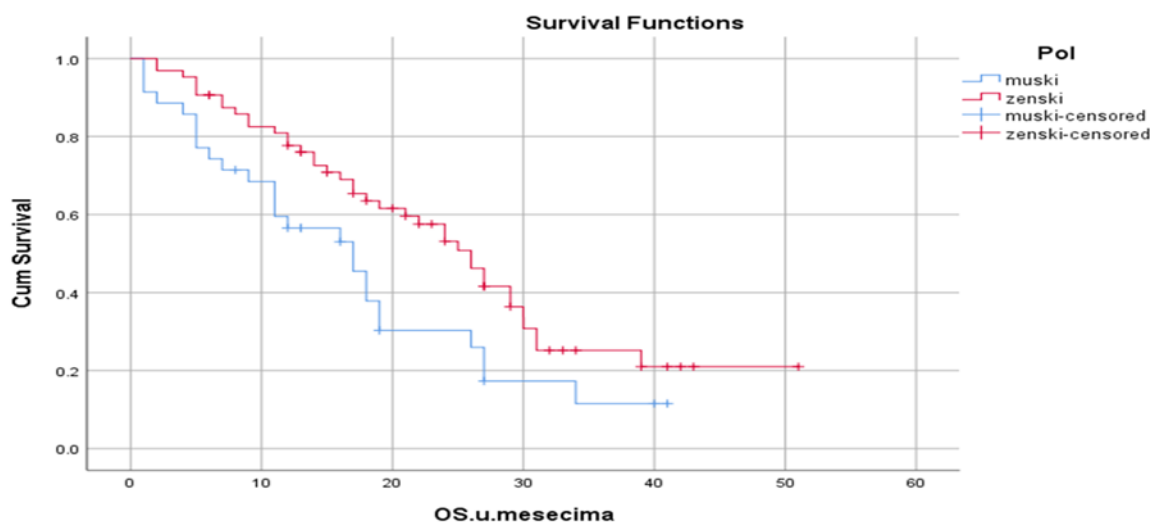


Slika 14. Ukupno preživljavanje (OS) ispitanika u mesecima

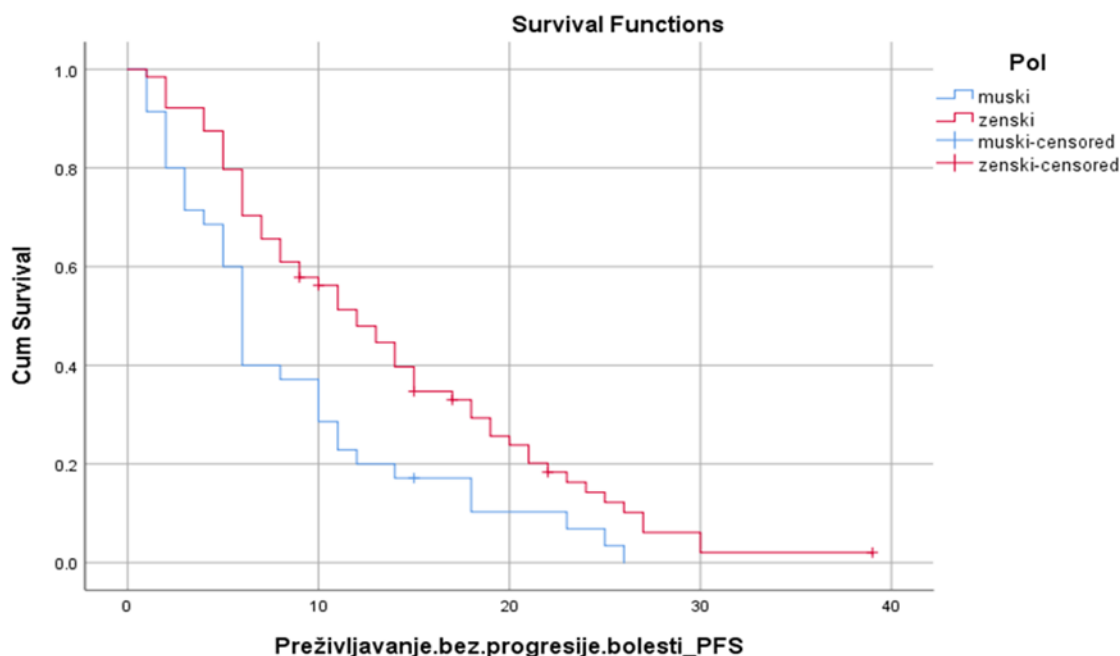


Slika 15. Preživljavanje bez progresije bolesti (PFS) ispitanika po mesecima

U analiziranoj grupi pacijenata razlika u PFS je detektovana u zavisnosti od tipa *EGFR* mutacija [$p=0,005$, Log-rank (Mantel-Cox)]. Srednji PFS je bio značajno duži kod pacijenata sa *ex19del* i *L858R* mutacijom nego kod pacijenata sa redim mutacijama kao što su *ex20Ins*, *L861Q* and *G719X* [12,0 meseci (10,0 – 14,0, CI 95%) vs. 5,0 (2,9 – 7,1 CI 95%), $p=0,001$, Log-rank (Mantel-Cox)] (Fig2d) (slika 15). Značajan efekat tipa *EGFR* mutacija na OS nije potvrđen.



Slika 16. Uticaj pola na OS

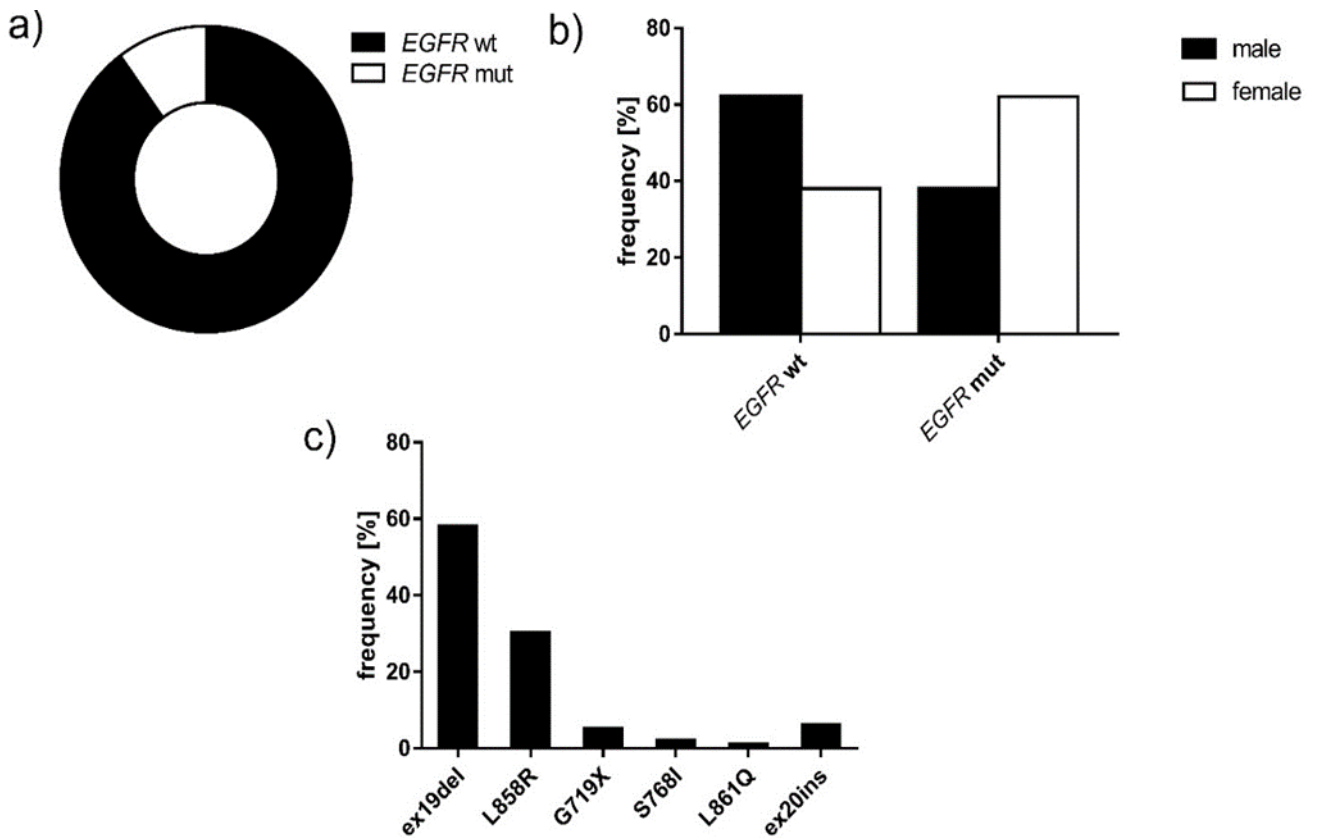


Slika 17. Uticaj pola na PFS

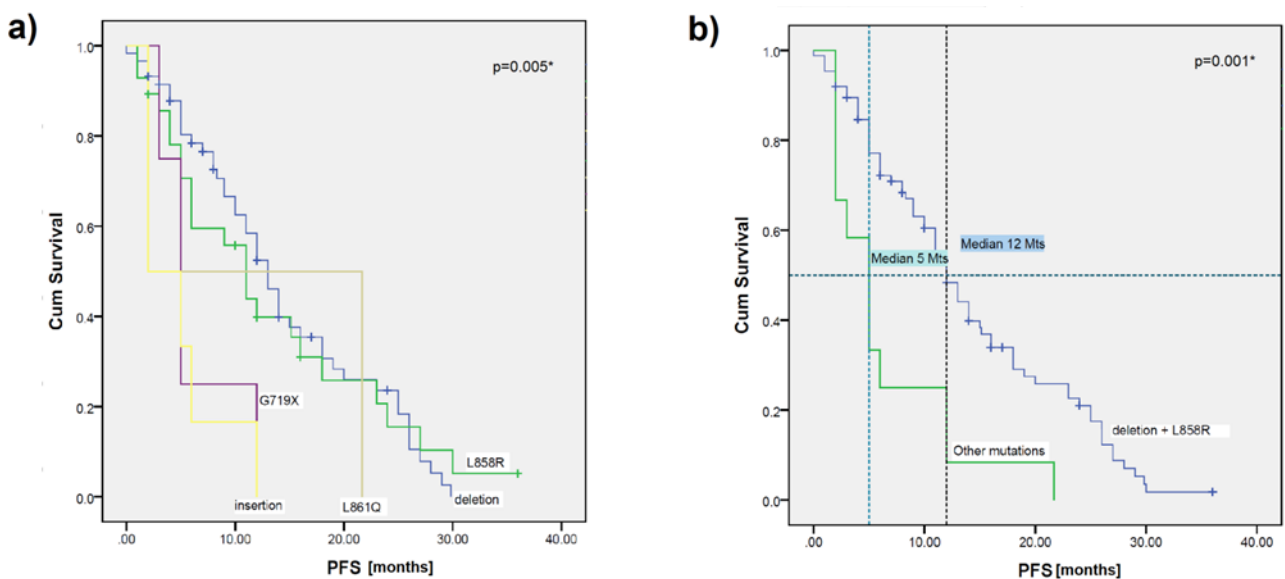
Pacijenti ženskog pola su imali duži PFS u poređenju sa pacijentima muškog pola uz postignutu statističku značajnost [12,0 meseci (18,8 – 15,2, CI 95%) vs. 6 meseci (5,2 – 6,8 CI 95%), $p=0,004$, Log-rank (Mantel-Cox)] (Slika 16 i 17). Međutim, nije pokazana statistička značajnost u dužini OS između pacijenata ženskog i muškog pola [26,0 meseci (21,8 – 30,2, CI 95%) vs. 17,0 (11,4 – 22,6 CI 95%), $p=0,021$, Log-rank (Mantel-Cox)].

4.2 Detekcija mutacija u EGFR genu i uticaj na preživljavanje

EGFR mutacije su češće detektovane kod pacijenata ženskog pola ($p<0.001$), a dva najčešća tipa mutacija (88%) bili su delecija egzona 19 i tačkasta mutacija *L858R* u egzonu 21 za koje je karakteristično da pokazuju najveću senzitivnost na TKI (slika 18). Samo 12% pacijenata imalo je neki od retkih tipova *EGFR* mutacija, kao što su *L861Q*(2%),*G719X* (4%) i insercije (5,9%). Dva pacijenta bili su dupli mutanti.



Slika 18. Frekvencija *EGFR* mutacija (a) kod muškaraca i žena (b) i distribucija najčešćih tipova *EGFR* mutacija u celoj grupi pacijenata (c).



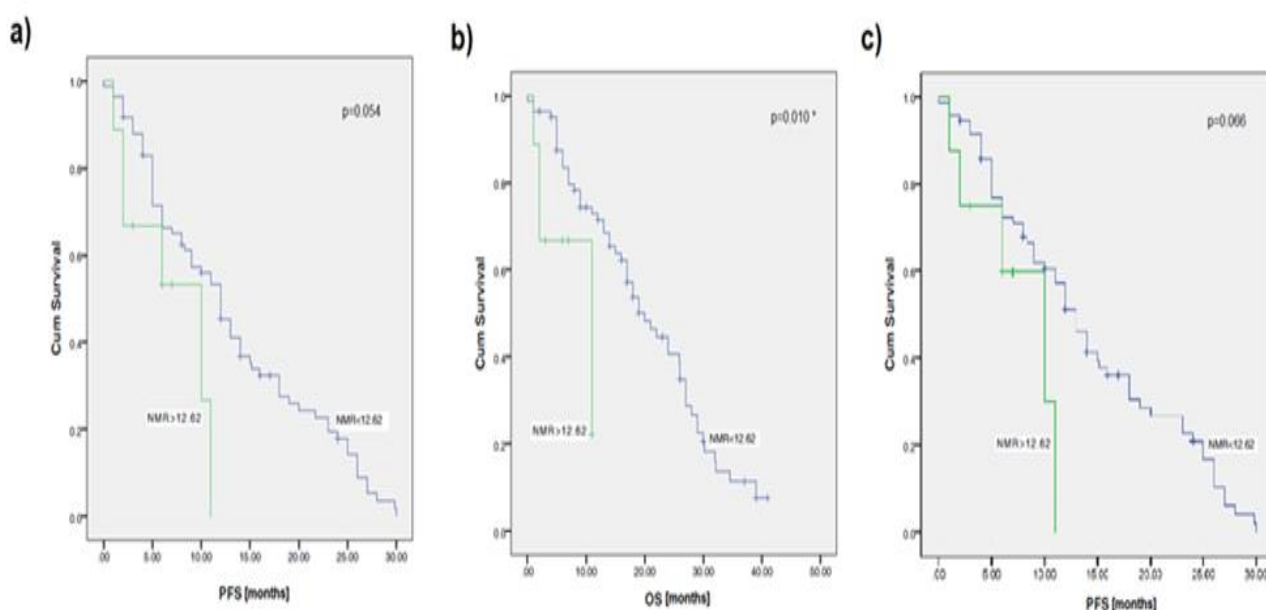
Slika 19. Krive (a) vremena bez progresije bolesti (PFS) i (b) ukupnog preživljavanja (OS) u celoj grupi pacijenata lečenih sa *EGFR*-TKI. Vreme bez progresije bolesti (PFS) (c) spram tipa *EGFR* mutacije i (d) kod pacijenata sa čestim aktivirajućim *EGFR* mutacijama (ex19del i L858R) u poređenju sa pacijentima sa retkim *EGFR* mutacijama (ex20Ins, L861Q i G719X). P vrednosti su dobijene primenom Log-rank (Mantel-Cox) testa, a statistički značajne vrednosti označene su sa *.

Postoji statistički značajna razlika ($p=0.001$) u dužini vremena bez progresije bolesti (PFS) kod pacijenata sa čestim aktivirajućim *EGFR* mutacijama (delecija egzona 19 i tačkasta mutacija

L858R) kod kojih je bila 15 meseci u poređenju sa pacijentima sa retkim *EGFR* mutacijama (insercija egzona 20, L861Q i G719X) koja je bila 5 meseci.

4.3 Uticaj hematoloških parametara na PFS, OS i toksičnost terapije

Efekat različitih hematoloških parametara odgovora na terapiju i preživljavanje je inicijalno procenjen primenom ROC kriva i njihovih graničnih vrednosti (ROC cut-off values). Međutim, u ovoj grupi pacijenata parametri NLR, PLR, PMR i LMR nisu potvrđeni kao značajni prediktori PFS ili OS. Pacijenti sa $NMR < 12,62$ su imali duži PFS u poređenju sa pacijentima sa višim vrednostima NMR, ali bez dokazane statističke značajnosti [12,0 meseci (9,8 – 14,2, CI 95%) vs. 10,0 (1,9 – 18,1 CI 95%), $p=0,054$, Log-rank (Mantel-Cox)] (Fig3a), i značajno duži OS [20,0 meseci (15,1 – 24,8, CI 95%) vs. 11,0 (3,5 – 18,5 CI 95%), $p=0,010$, Log-rank (Mantel-Cox)] (Fig3b). Efekat NMR je dalje analiziran na podgrupama pacijenata koji su imali aktivirajuće mutacije *ex19del* i L858R i potvrđeno je da su pacijenti sa $NMR < 12,62$ imali duži PFS u poređenju sa pacijentima koji su imali više vrednosti NRM, iako statistička značajnost nije postignuta [13,0 meseci (10,7 – 15,3, CI 95%) vs. 10,0 (4,0 – 16,0 CI 95%), $p=0,066$, Log-rank (Mantel-Cox) (slika 20).

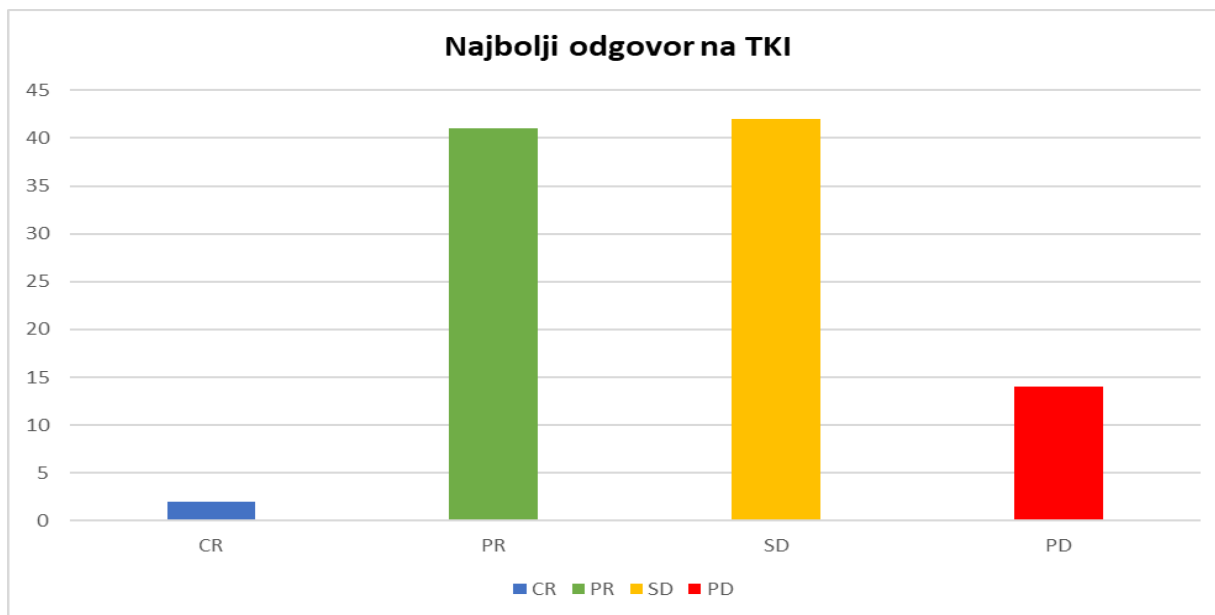


Slika 20. Krive (a) vremena bez progresije bolesti (PFS) i (b) ukupnog preživljavanja (OS) pacijenata primenom ROC vrednosti preseka za neutrofil-monocit odnos (NMR) od 12,62. (c) kriva vremena bez progresije bolesti (PFS) podgrupe pacijenata sa *ex19del*+L858R primenom ROC graničnih vrednosti za neutrofil-monocit odnos (NMR) od 12,62. P vrednosti su dobijene primenom Log-rank (Mantel-Cox) testa.

Značaj hematoloških parametara kao prediktora toksičnosti na terapiju *EGFR* TKI u globalu ili značaj ovih parametara kao prediktora specifičnih vrsta toksičnosti ispitivan je korišćenjem eksperimentalno dobijenih i literaturnih ROC vrednosti preseka primenom univarijantne i multivarijantne cox regresione analize. Od svih analiziranih hematoloških parametara koristeći ROC vrednost iz naše studije i iz literaturnih podataka pacijenti sa $NLR > 2,9$ su češće imali znakove toksičnosti na primenu *EGFR* TKI, naročito paronihiju ($p=0,060$, Pearsonov Hi kvadrat test) i dijareju ($p=0,035$, Pearson Chi-Square test). Pacijenti sa $LMR < 2,5$ značajno su manje imali registrovanu paronihiju ($p=0,031$, Pearson Chi-Square test) i dijareju (0,007, Pearson Chi-Square test), dok su pacijenti sa $PLR > 190$ imali češće paronihiju ($p=0,058$, Pearson Chi-Square test), dijareju ($p=0,044$, Pearson Chi-Square test) i hiperbilirubinemiju ($p=0,077$, Pearson Chi-Square test).

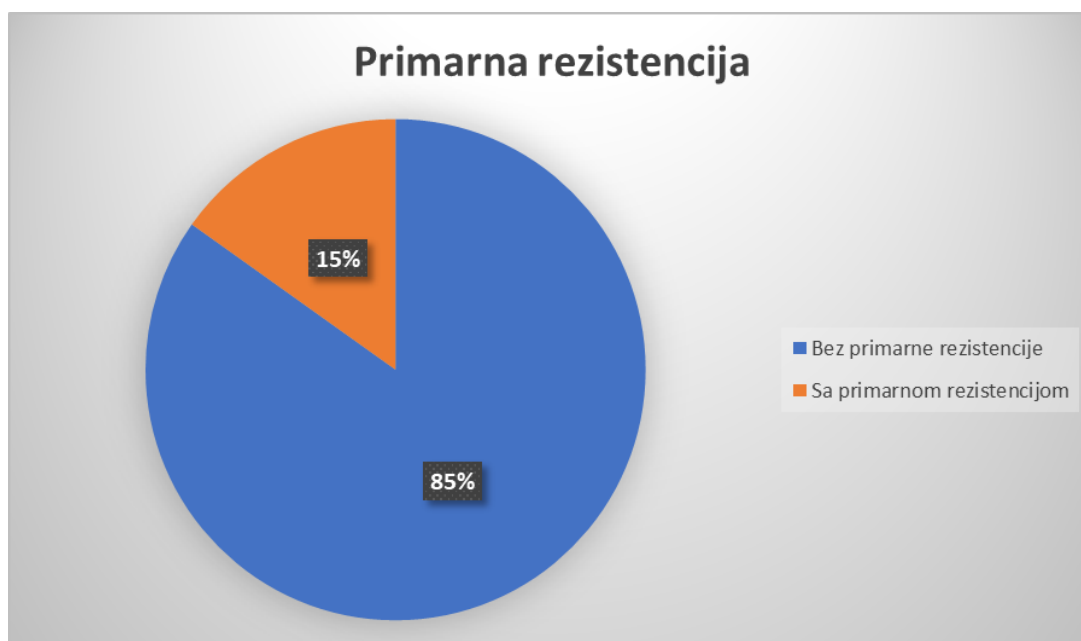
4.4 Ispitivanje pojave progresije na prvu liniju TKI

Većina pacijenata (84%) je inicijalno ostvarila povoljan odgovor na terapiju u vidu stabilizacije bolesti (SD) ili parcijalne regresije (PR). Samo 2 bolesnika imala su kompletnu regresiju bolesti.



Slika 21. Najbolji odgovor na TKI. CR –kompletna regresija, PR – parcijalna regresija, SD- stabilna bolest, PD- progresija bolesti.

Kod 15% pacijenata sa *EGFR* pozitivnim uznapredovalim adenokarcinomom pluća inicijalno nije postignut povoljan odgovor na primenu *EGFR* TKI, već je u prva tri meseca od početka terapije registrovana progresija bolesti (slika 21).



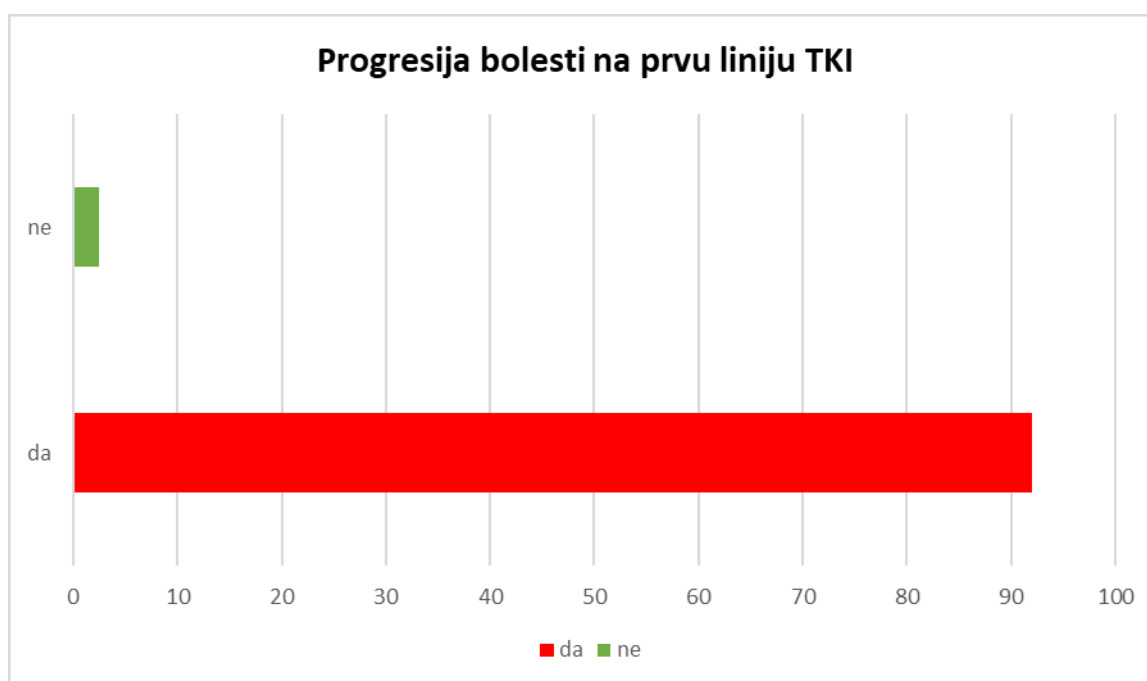
Slika 22. Primarna rezistencija – izostanak odgovora u prva 3 meseca terapije *EGFR* TKI.

Pokazana je statistički značajna razlika između pacijenata muškog i ženskog pola ($p=0,006$) i pojave primarne rezistencije na primenu *EGFR* TKI. Međutim, nije pokazana statistički značajna razlika među pacijentima u odnosu na pušački status i pojavu primarne rezistencije na *EGFR* TKI ($p=0,752$) (slika 22, tabela 17).

Tabela 17. Primarna rezistencija na *EGFR* TKI u odnosu na pol i pušački status

		Bez primarne rezistencije N (%)	Sa primarnom rezistencijom N (%)	p
Pol	muški	25 (29,8)	10 (66,7)	0,006
	ženski	59 (70,2)	5 (33,3)	
Pušački status	nepušač	37 (47,4)	6 (42,9)	0,752
	bivši/sadašnji pušač	41 (52,6)	8 (57,1)	

Kod većine bolesnika (91%) je u nekom trenutku od početka terapije *EGFR* TKI u prvoj liniji registrovana progresija bolesti, stoga je trenutno samo 9% pacijenata aktuelno na ciljanoj terapiji primenom *EGFR* TKI (slika 23).



Slika 23. Progresija bolesti na prvu liniju *EGFR* TKI.

4.5 Ispitivanje neželjenih efekata primene *EGFR* TKI

Neželjeni efekti terapije detektovani su kod 73 (72%) pacijenata lečenih sa TKI, dok je 97 % njih ispoljilo maksimalnu toksičnost gradusa 2 (Tabela 17). Najčešći neželjeni efekti TKI bili su kožni raš (63%), paronihija (24%), dijareja (33%), poremećaj parametara funkcije jetre (19%), očna toksičnost (6%) i bubrežna slabost (4%). Ni kod jednog pacijenta terapija TKI nije prekinuta u potpunosti usled razvoja neželjenih efekata, niti je registrovan gradus 4 toksičnosti. Najčešće su registrovani neželjeni efekti gradusa 1 i 2, dok se gradus 3 kožnog raša ispoljio kod 4 pacijenta, paronihije kod 4 pacijenta, a skok transaminaza od 5 pacijenta (143).

Tabela 18. Toksičnost na primenu *EGFR* TKI kod analizirane grupe pacijenata

Tip toksičnosti	Broj pacijenata (%) N=101
Kožni raš	63 (6,3)
<i>gradus</i> 1	48 (47,5)
2	11 (10,9)
3	4 (4,0)
Paronhija	24 (23,8)
<i>gradus</i> 1	14 (13,9)
2	6 (5,9)
3	4 (4,0)
Dijareja	33 (33,4)
<i>gradus</i> 1	25 (25,3)
2	8 (8,1)
Skok transaminaza	17 (16,8)
<i>gradus</i> 1	9 (8,9)
2	3 (3,0)
3	5 (4,9)
Hiperbilirubinemija	
<i>gradus</i> 1	2 (2,0)
Očna toksičnost	
<i>gradus</i> 1	6 (5,9)
Bubrežna slabost	
<i>gradus</i> 1	4 (4,0)

Pokazana je statistički značajna razlika između pacijenata muškog i ženskog pola (češće kod ženskog pol)a ($p=0.006$) i pojave toksičnosti na primenu *EGFR* TKI, dok nema statistički značajne razlike u pojavi toksičnosti na *EGFR* TKI kod pacijenata u odnosu na pušački status ($p=0.918$) (tabela 18).

Tabela 19: Toksičnost na primenu *EGFR* TKI u odnosu na pol i pušački status

		Bez znakova toksičnosti N (%)	Sa znakovima toksičnosti N (%)	p
Pol	muški	15 (57,7)	20 (27,4)	0.006
	ženski	11 (42,3)	53 (72,6)	
	nepušač	11 (45,8)	32 (47,1)	

Pušački status	bivši/sadašnji pušač	13 (52,4)	36 (52,9)	0.918
-----------------------	-----------------------------	-----------	-----------	-------

4.6 Ispitivanje prisustva i efikasnosti lečenja kancerskog bola

U trenutku postavljanja dijagnoze bol je registrovan kod 41 (41 %) pacijenata i bio je značajno povezan sa prisustvom metastaza ($p < 0.001$) (Tabela 18).

Tabela 20. Prisustvo bola u trenutku postavljanja dijagnoze kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća

Karakteristike pacijenata		Bez bola N (%)	sa bolom N (%)	p vrednost
Starost (srednja vrednost)		63	60	0,109
Pol	<i>Muškarci</i>	18 (30)	17 (41,5)	0,234
	<i>Žene</i>	42 (70)	24 (58,5)	
Performans status (PS)	<i>ECOG 0</i>	5 (8,3)	0 (0)	0,080
	<i>ECOG 1</i>	48 (80)	33 (80,5)	
	<i>ECOG 2</i>	4 (6,7)	5 (12,2)	
	<i>ECOG 3</i>	2 (3,3)	3 (7,3)	
	<i>ECOG 4</i>	1 (1,7)	0 (0)	
Pušački status	<i>Nepušač</i>	30 (53,6)	15 (39,5)	0,179
	<i>Pušač</i>	26 (46,4)	23 (60,5)	
TNM stadijum	<i>IIIB</i>	8 (13,3)	2 (4,9)	0,195
	<i>IV</i>	52 (86,7)	39 (95,1)	
Prisustvo metastaza	<i>Bez metastaza</i>	8 (13,3)	2 (4,9)	<0,001
	<i>M1a</i>	29 (48,3)	9 (22,0)	
	<i>M1b</i>	14 (23,3)	14 (34,1)	
	<i>M1c</i>	9 (15)	16 (39)	

M1a - tumor u kontralateralnom plućnom krilu ili pleuralni/perikardijalni nodus/maligna efuzija.

M1b – pojedinačna ekstratorakalna metastaza koja uključuje pojedinačni neregionalni limfni čvor, M1c – multiple ekstratorakalne metastaze u jednom ili više organa. Statistički značajne vrednosti su prikazane u boldiranom format.

Analiza prisustva bola kod pacijenata sa metastatskim lezijama na različitim lokalizacijama pokazala je da je bol češće prisutan kod pacijenata sa koštanim metastazama i metastazama u nadbubežnim žezdama (Tabela 19). Različiti tipovi *EGFR* mutacija nisu bili značajno povezani sa prisustvom bola ($p=0,351$) kada je vršeno poređenje najčešćih *EGFR* mutacija (egzon 19 delecija, L858R tačkasta mutacija u egzonu 21) naspram retkih mutacija (*L861Q*, *G719X*, egzon 20 insercija, *S768I*, dupli mutanti).

Tabela 21. Lokalizacija metastaza povezanih sa prisustvom bola u trenutku postavljanja dijagnoze

Mesto metastaze (meta)		bez bola N (%)	sa bolom N (%)	p vrednost
Jetra	<i>bez meta na jetri</i>	46 (76,7)	35 (85,4)	0,281
	<i>sa meta na jetri</i>	14 (23,3)	6 (14,6)	
Kosti	<i>bez meta na kostima</i>	55 (91,7)	19 (46,3)	<0,001
	<i>sa metas na kostim</i>	5 (8,3)	22 (53,7)	
Neregionalni limfni čvorovi (lgl.)	<i>bez meta na lgl.</i>	58 (96,7)	38 (92,7)	0,393
	<i>sa meta na lgl.</i>	2 (3,3)	3 (7,3)	
Perikard	<i>bez meta na perikardu</i>	53 (88,3)	36 (87,8)	1,000
	<i>sa meta na perikardu</i>	7 (11,7)	5 (12,2)	
Mozak	<i>bez meta na mozgu</i>	53 (88,3)	38 (92,7)	0,736
	<i>sa meta na mozgu</i>	7 (11,7)	3 (7,3)	
Pluća	<i>bez meta na plućima</i>	34 (56,7)	24 (58,5)	0,852
	<i>sa meta na plućima</i>	26 (43,3)	17 (41,5)	
Nadbubrežne žlezde (adr gl.)	<i>bez meta na adr. gl.</i>	58 (96,7)	34 (82,9)	0,029
	<i>sa meta na adr. gl.</i>	2 (3,3)	7 (17,1)	
Maligni pleuralni izliv	<i>bez pleuralnog izliva</i>	33 (55)	21 (51,2)	0,708
	<i>sa pleuralnim izlivom</i>	27 (45)	20 (48,8)	

Statistički značajne vrednosti predstavljene su u boldiranom formatu.

Pacijenti koji su imali bol inicijalno su lečeni primenom analgetika i palijativne radijacione terapije u analgetske svrhe. Kod 21 pacijenta sa koštanim metastazama (Tabela 20 i 21) postignuta je dobra kontrola bola.

Tabela 22. Dozni režimi antidolorozne terapije

Tip analgetika	Ime leka	Početna doza	Maksimalna doza korišćena u ovoj studiji
Acetaminofen	Paracetamol	1 g četiri puta dnevno PO	4 g daily PO
Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi	Ibuprofen	400 mg tri puta dnevno PO	1.2 g dnevno PO
Slab opioid	Tramadol	100 mg dva puta dnevno PO	200 mg dnevno PO
Jak opioid	Morfin	5 mg jednom dnevno PO	60 mg dnevno PO
	Oksikodon	5 mg svakih 4-6 hours PO	20 mg dnevno PO

	Hidromorfon	8mg jednom dnevno PO	16 mg dnevno PO
	Fentanil	25 mcg/h transdermalno, reaplikovano na svaka 72 h	150 mcg/h
	Metadon	2,5 mg jednom dnevno PO	5 mg dnevno PO
Adjuvantni analgetik	Pregabalin	75 mg dva puta dnevno PO	300 mg dnevno PO
	Gabapentin	300 mg jednom dnevno PO	900 mg dnevno PO
	Deksametazon	4 mg dva puta dnevno PO	8 mg dnevno PO

Tabela 23. Farmakološki tretman kancerskog bola u analiziranoj grupi pacijenata

Tip analgetika	Ime leka	Broj pacijenata koji uzimaju lek (% ukupnog broja pacijenata koji koriste analgetsku terapiju)	Doza (TDD)*	Broj pacijenata (% ukupnog broja pacijenata koji koristi taj lek)
Acetaminofen	Paracetamol	19 (46,3)	1000 mg	10 (52,6)
			2000 mg	8 (42,1)
			4000 mg	1 (5,3)
Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi	Ibuprofen	11 (26,8)	400 mg	4 (36,4)
			800 mg	6 (54,5)
			1200 mg	1 (9,1)
Slab opioid	Tramadol	10 (24,4)	50 mg	3 (30,0)
			100 mg	3 (30,0)
			200 mg	4 (40,0)
Jak opioid	Morfin	31 (75,6)	20 mg	16 (51,6)
			30 mg	7 (22,6)
			40 mg	3 (9,7)
			60 mg	5 (16,1)
	Oksikodon	2 (4,9)	5 mg	1 (50,0)
			20 mg	1 (50,0)
	Hidromorfon	8 (19,5)	8 mg	7 (87,5)
			16 mg	1 (12,5)
	Fentanil	17 (41,5)	25 mcg/h	7 (41,1)
			50 mcg/h	4 (23,5)
			100 mcg/h	1 (5,9)
			125 mcg/h	2 (11,8)

			150 mcg/h	3 (17,7)
	Metadon	2 (4,9)	2.5 mg	1 (50,0)
			5.0 mg	1 (50,0)
Adjuvantni analgetik	Pregabalin	3 (7,3)	75 mg	2 (66,7)
			300 mg	1 (33,3)
	Gabapentin	3 (7,3)	300 mg	2 (66,7)
			900 mg	1 (33,3)
	Deksametazon	16 (39,0)	4 mg	4 (25,0)
			8 mg	12 (75,0)

TDD- ukupna dnevna doza.

Nakon 3 meseca od primene *EGFR* TKI učinjena je reevaluacija nivoa kancerskog bola kod svih pacijenata usled čega je registrovano da je kod 20 % pacijenata došlo do smanjenja nivoa bola u odnosu na inicijalni nivo merenja ($p=0,011$), kao i da je registrovano statistički značajno poboljšanje nivoa bola ($p<0,001$) (Tabela 22).

Tabela 24. Numerička skala (NRS) intenziteta bola i verbalna deskriptivna skala (VDS) intenziteta bola

Intenzitet bola	<i>Inicijalno</i> (N, %)	<i>Nakon 3 meseca</i> (N, %)
1-3 (NRS) ili blag bol (VDS)	13 (31,7)	17 (65,4)
4-7 (NRS) ili srednje jak bol (VDS)	22 (53,7)	7 (26,9)
8-10 (NRS) ili jak bol (VDS)	6 (14,6)	2 (7,7)
Ukupno	41	26

Od 41 pacijenta koji su se u trenutku postavljanja dijagnoze prezentovali bolom njih 20 je imalo pogoršanje bola nakon inicijalno postignute adekvatne kontrole bola verovatno usled progresije bolesti (kod njih 14 registrovana je progresija primarne lezije u prva tri meseca od primene *EGFR* TKI). Dodatnih 6 pacijenata koji inicijalno nisu imali bol su u međuvremenu razvili ovaj simptom, najverovatnije usled progresije bolesti uprkos primeni *EGFR* TKI. Kod preostalih 21 postignuta je adekvatna kontrola bola tokom primene terapije *EGFR* TKI, iako je kod njih 17 tokom praćenja registrovana progresija bolesti (kod 6 pacijenata je registrovana nova lezija, a kod 11 pacijenata je registrovana progresija primarne lezije). Nije bilo značajne razlike u mPFS između pacijenata koji su imali progresiju bola nakon postignute adekvatne kontrole bola inicijalno i kod pacijenata kod kojih je postignuta kontrola bola tokom trajanja terapije ($p=0,779$).

4.7 Ispitivanje nivoa ekspresije gena *IGF-1R*, *E-kadherin*, *N-kadherin* i *okludin*

Nivoi ekspresije gena *IGF-1R*, *E-kadherin*, *N-kadherin* i *okludin* ispitani su u uzorcima biopsija tumora pre početka terapije metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu i rezultati su prikazani u Tabeli 23.

Tabela 25. Rezultati bazalnih nivoa ekspresije gena *IGF-1R*, *E-kadherin*, *N-kadherin* i *okludin*

	<i>IGF-1R</i>	<i>E-kadherin</i>	<i>N-kadherin</i>	<i>okludin</i>
N	99	99	99	99
Srednja vrednost	3,24	3,25	2,43	4,73
SD	2,50	2,14	2,01	4,75
Medijana	2,34	2,56	1,88	3,28
Opseg	0,65-12,15	0,63-9,30	0,88-11,08	0,04-30,02

Analizom uticaja ekspresije ovih gena na preživljavanje bez progresije bolesti, pokazano je da su pacijenti čiji su tumori inicijalni imali niže nivoe ekspresije *IGF-1R* i *N-kadherina* statistički značajno imali duži PFS u odnosu na pacijente sa višim nivoom ekspresije ovog gena ($p < 0,001$ u oba slučaja). Poređenjem nivoa ekspresije ovih gena u odnosu na najbolji terapijski odgovor, pokazano je da su pacijenti čiji su tumori imali niže nivoe ekspresije *IGF-1R* i više nivoe ekspresije *E-kadherina* statistički značajno češće imali kompletan ili parcijalni odgovor na terapiju u odnosu na pacijente sa višim nivoom ekspresije ovog gena (medijane ekspresije 2,10 (0,65 – 9,14) naspram 2,83 (0,66 – 12,15); Mann-Whitney test, ($p = 0,04$).

Nakon toga smo ispitivali uticaj bazalnih nivoa ekspresije gena na pojavu rezistencije metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu iz uzoraka biopsije pre početka TKI tretmana. Rezultati su prikazani u Tabeli 24.

Pokazana je statistički značajna povezanost povišene ekspresije *IGF-1R* (bez ustanovljene rezistencije 2,38 u poređenju sa ustanovljenom rezistencijom 8,09) sa pojavom rezistencije na *EGFR* TKI kod pacijenata ($p < 0,001$). Takođe je pokazana statistički značajna povezanost između povišene ekspresije *N-kadherina* (bez ustanovljene rezistencije 1,82 vs. sa ustanovljenom rezistencijom 5,86; $p < 0,001$) sa pojavom rezistencije na *EGFR* TKI kod pacijenata. Međutim, kod pacijenata sa sniženim nivoom ekspresije *E-kadherina* pokazana je statistička povezanost sa pojavom rezistencije na terapiju *EGFR* TKI (bez ustanovljene rezistencije 3,52 vs. sa ustanovljenom rezistencijom 1,74; $p < 0,001$). Nije pokazana statistički značajna povezanost između ekspresije *okludina* kod pacijenata u našoj studiji i pojave rezistencije na terapiju *EGFR* TKI.

Tabela 26. Prisustvo rezistencije u odnosu na nivo ekspresiju gena.

Primarno rezistentni	N	Srednja vrednost	SD	Medijana	Minimum	Maksimum	<i>p</i> vrednost
Ekspresija IGF-1R							
Ne	84	2,38	1,21	2,15	0,65	5,98	< 0,001

Da	15	809	2,36	8,35	3,91	12,15	
Ekspresija E-kadherin							
Ne	84	3,52	2,18	2,90	0,73	9,30	<i>< 0,001</i>
Da	15	1,74	1,02	1,39	0,63	4,15	
Ekspresija N-kadherin							
Ne	84	1,82	0,95	1,36	0,88	4,83	<i>< 0,001</i>
Da	15	5,86	2,86	5,09	2,13	11,08	
Ekspresija okludina							
Ne	84	4,79	4,15	3,35	0,04	21,08	0,083
Da	15	4,42	7,47	1,52	0,31	30,02	

N- ukupan broj pacijenata. SD - standardna devijacija.

5. DISKUSIJA

Cilj ispitivanje naše studije bila je ispitivanje kliničkih i genetičkih prediktivnih faktora efikasnosti terapije inhibitorima tirozin kinaza u pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća u Srbiji. Prisustvo mutacija u genu *EGFR* ukazuje na potencijalnu osetljivost mutiranih ćelija tumora na ciljanu terapiju *EGFR*-TKI i detekcija ovih mutacija postala je standardna dijagnostika kod pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća u Srbiji 2011. godine (145). U Srbiji se trenutno ne radi testiranje pacijenata na ovaj tip mutacije u ranom stadijumu karcinoma pluća, zato što ciljana terapija nije odobrena od strane Republičkog fonda za zdravstveno osiguranje u adjuvantnom pristupu. Iako ova terapija dovodi do početnog dobrog odgovora kod velikog procenta pacijenata, čest je razvoj rezistencije. Poznavanje mehanizama rezistencije i toksičnosti na TKI ključno je u donošenju odluke o najboljoj specifičnoj terapiji, čime se postiže najviši terapijski efekat uz najbolji kvalitet života za pacijente.

U randomizovanoj studiji faze III LUX-LUNG 6 procenat pacijenata ženskog pola je bio 64%, što je skladu sa rezultatima naše studije koji iznose 65,3 % u korist ženskog pola. Međutim, procenat pušača je u našoj studiji znatno veći nego u LUX LUNG 6 studiji (25,5 naspram 8,5), što se može objasniti kulturološkim razlikama imajući u vidu da su u LUNG-LUX 6 studiji ispitanici bili Azijati, nižom cenom duvanskih proizvoda u našoj zemlji kao i nedovoljno razvijenih programa za kontrolu i odvikavanje od pušenja. Prosečna starost naših pacijenata je bila 61,7 godina što je u skladu sa prosečnom starošću pacijenata iz LUX-LUNG 3 studije koja je iznosila (1).

Do sada je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije testirano preko 6000 uzoraka pacijenata sa karcinomom pluća stadijuma IIIb i IV. Mutacije u *EGFR* genu kod naših pacijenata otkrivene su u 9,8 % slučajeva, što je u skladu sa postojećim literaturnim podacima u populaciji belaca (145,146). Prema meta analizi iz 2016. godine prevalencija *EGFR* mutacije kod pacijenata sa NSCLC varira od 10% kod pacijenata u Evropi do 38,4% u populaciji kineskih pacijenata, što je takođe u skladu sa našim podacima (147).

Najveći broj pacijenata u našoj studiji (88%) imalo je detektovan jedan od dva najčešća tipa mutacija, deleciju u egzonu 19 (ex19del) ili tačkastu mutaciju L858R u egzonu 21, što je u skladu sa najnovijim "real world" podacima iz 2021. godine gde su ova dva tipa mutacija nađena kod 90% pacijenata sa *EGFR* mutiranim NSCLC (148). U našoj studiji je deleciju egzona 19 imalo 45% pacijenata, a mutaciju egzona L858A 40% pacijenata, a u prethodno pomenutom istraživanju veći broj pacijenata je takođe imao deleciju egzona 19 u odnosu na tačkastu mutaciju L8585R u egzonu 21 (58% vs. 30%)(148). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima velikog broja studija u kojima ex19del imalo 44-51% pacijenata, a L858R 38-40% i u populaciji belaca i u populaciji Azijata (41).

Retke mutacije u *EGFR* genu, kao što su delecije, insercije i tačkaste mutacije u egzonima 18-25 čine preostalih 10-15% *EGFR* mutacija kod pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća (149). Rezultati naše studije su slični i ukazali su na to da 12% naših pacijenata ima detektovane retke mutacije (150). L861Q , G719X i insercije su dokazane retke targetabilne mutacije za lekove iz druge generacije *EGFR* TKI prema podacima iz studija LUX-Lung 2, LUX-Lung 3 I LUX-Lung 6, a to su ujedno i najčešće ispitivane retke mutacije u našem istraživanju.

Pacijenti koji su nosioci retkih mutacija najčešće imaju slabiji odgovor na prvu liniju *EGFR* TKI u odnosu na pacijente koji su nosioci čestih mutacija, zbog čega je prema rezultatima nekoliko studija vreme bez progresije bolesti (PFS) i ukupno preživljavanje (OS) kod ovih pacijenata znatno kraće (149). Zbog toga je precizna detekcija svih mutacija veoma značajna, a sve u cilju primene personalizovane ciljane terapije specifične za određenu mutaciju čime bi se preživljavanje i kvalitet života pacijenata poboljšali (149).

Prema podacima prethodnih istraživanja, dužina vremena bez progresije bolesti (PFS) kod pacijenata sa retkom mutacijom *G719X* je iznosila 6,3 meseca u poređenju sa 10-13 meseci kod pacijenata sa

čestim mutacijama kao što su *L858R* i *Ex19Del* (151). Slične rezultate dobili smo i u našem istraživanju u kom su pacijenti sa retkim mutacijama (inercija egzona 20, *L861Q* i *G719X*) imali PFS od 5 meseci u poređenju sa 15 meseci kod pacijenata sa čestim EGFR mutacijama.

Povremeno se kod pacijenata sa *EGFR* mutacijama detektuju kompleksne ili duple mutacije, koje podrazumevaju kombinaciju *Ex19Del* i *L858R*, kombinaciju *L858R* ili *Ex19Del* uz retku mutaciju ili kombinaciju dve retke mutacije (149). Kompleksne mutacije su najčešće prisutne kod 5-15% pacijenata, a *G179X* čini 90% svih kompleksnih mutacija, *G709X* kod više od 75% i *S768I* u više 50% (149)(41). U jednom istraživanju postoji podatak da oko 6% pacijenata sa uznapredovalim *EGFR* mutiranim NSCLC ima kompleksne mutacije (152), dok je u našoj studiji taj procenat nešto manji i iznosi 2%.

Poznato je da hematološki parametri sistemskog inflamatornog odgovora predstavljaju potencijalan prediktor odgovora na hemioradioterapiju (153), imunoterapiju (154), kao i da mogu biti prediktori dužine preživljavanja pacijenata nakon primene ciljane terapije (155). Rekrutovanje leukocita i neutrofila dovodi do oslobađanja različitih inflamatornih medijatora koji menjaju biohemiju tumora i tako utiču na preživljavanje i ishod lečenja (120). Smatra se da neutrofilima imaju dvostruku ulogu u razvoju i progresiji tumora, kao faktori koji promoviraju rast tumora i kao faktori koji promoviraju antitumorski odgovor.

Podaci o potencijalnoj prediktivnoj vrednosti odnosa broja neutrofila u odnosu na limfocite (NLR), neutrofila u odnosu na monocite (NMR), limfocita u odnosu na monocite (LMR), trombocita u odnosu na limfocite (PLR) i broja trombocita u odnosu na monocite (PMR) zasnovanih na sistemskoj inflamaciji kod pacijenata sa uznapredovalim ili metastatskim adenokarcinomom pluća lečenih *EGFR*-TKI su oskudni i kontradiktorni. Prethodne studije predložile su da bi NLR mogao biti potencijalni biomarker za ukupno preživljavanje, PFS, i efikasnost lečenja TKI u populaciji pacijenata u Aziji i Zapadnoj Evropi (156) kao i kod pacijenata sa mikrocelularnim karcinomom pluća (SCLC) (121).

Kod pacijenata sa NSCLC, studija Sim et al. pokazala je da je NLR bio značajan prognostički biomarker kod pacijenata lečenih primenom hemioterapije, ali ne i kod pacijenata lečenih primenom *EGFR*-TKI (157). Postoje studije koje su pokazale da se LMR i PLR mogu koristiti za predviđanje dužine preživljavanja kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim karcinomom pluća (158–160), ali i one koje sugerišu da nema relacije između PLR i preživljavanja kod pacijenata lečenih primenom *EGFR*-TKI (161). Stoga je naša studija imala za cilj da procenimo prognostički i prediktivni potencijal različitih hematoloških parametara dobjenih iz parametara kompletne krvne slike kod pacijenata sa *EGFR*-mutiranim uznapredovlim adenokarcinomom pluća slovenskog porekla u regionu Zapadnog Balkana.

Prisustvo monocita može doprineti nastanku progresije tumora, ali složene funkcije i interakcije između ćelija imunog sistema, tumorskih i drugih netumorskih ćelija ne omogućavaju da se donese definitivni zaključak (162). Imajući u vidu da se pomoću NMR izražava ravnoteža između neutrofila i monocita, viši NMR naješće ukazuje na jači inflamatorni odgovor i jaču supresiju imuniteta što može ukazati na lošiju prognozu bolesti. U našoj studiji je uočeno da pacijenti sa nižim NMR vrednostima pre tretmana (granična vrednost 12,62) imaju značajno duži PFS u poređenju sa pacijentima koji imaju veću NMR vrednost. Ovo je potvrđeno i u podgrupi pacijenata sa *EGFR* mutacijama koji najčešće imaju povoljan odgovor na *EGFR*-TKI (*ex19del* i *L858R*), tako da analiza NMR može ukazati da pacijenti u ovoj grupi treba detaljnije ili češće pratiti za rane kliničke znake progresije. Ovi podaci mogu podržati ideju o istovremenom targetovanju različitih puteva imunskog odgovora u kombinaciji sa *EGFR*-TKI uz identifikaciju populacije pacijenata sa NSCLC koji će imati najviše koristi od ovog terapijskog pristupa.

U nekoliko kohorti pacijenata sa NSCLC azijskog porekla lečenih primenom *EGFR*-TKI pokazano je da LMR, NLR, PMR i PLR mogu biti potencijalni prognostički faktori pre početka terapije (163,164), a nađeno je i da NLR može biti potencijalan nezavisni prognostički faktor za OS u maloj kohorti pacijenata u Zapadnoj Evropi. U ovoj doktorskoj tezi, literaturne granične vrednosti su

dodatno korišćene za procenu primene NLR, PLR, PMR i LMR kada eksperimentalno dobijene ROC granične vrednosti nisu dale značajne informacije (165,166). Međutim, nijedan od ovih parametara nije potvrđen kao značajni prediktor PFS ili OS u našoj studijskoj grupi NSCLC pacijenata slovenskog porekla. Iako se moglo očekivati da će visoki indeks systemske imuno-inflamacije ukazati na lošiju prognozu zbog povećane vrednosti trombocita ili niskog broja limfocita kao posledica većeg tumorskog metastatskog potencijala nastalog indukcijom angiogeneze ili imunosupresije (167), neophodno je uključiti i ostale specifične populacione faktore. Takođe je potrebno sprovesti opsežniju meta-analizu koja bi uključila podatke iz različitih populacija radi utvrđivanja potencijalne koristi primene hematoloških parametara u ovoj postavci, kao i značajne granične vrednosti parametara koje je potrebno koristiti.

Koliko nam je poznato, ovo je prva studija koja je ukazala na direktnu vezu između različitih hematoloških parametara i profila specifične toksičnosti pacijenata sa uznapredovalim NSCLC lečenim primenom *EGFR*-TKI. Utvrđeno je da se kod pacijenata sa $NLR > 2,9$ češće javlja paronihija i dijareja, kao i kod pacijenata sa $LMR < 2,5$. Takođe su pacijenti sa $PLR > 190$ češće imali paronihiju, dijareju i hiperbilirubinemiju. Ovi podaci imaju veliki značaj imajući u vidu da je brzo otkrivanje i odgovarajuće lečenje neželjenih efekata onkološke terapije ključno u sprečavanju pojave toksičnosti visokog gradusa kao i potencijalne hospitalizacije. Identifikacija pacijenata sa većim rizikom od nastanka neželjenih efekata od posebne je važnosti kod pacijenata lečenih primenom *EGFR*-TKI, jer do sada nisu otkriveni i validirani specifični prediktori toksičnosti za *in vitro* dijagnostiku.

NLR i PLR su nedavno predloženi za potencijalne prediktivne faktore toksičnosti imunoterapije kod pacijenata sa uznapredovalim NSCLC, tako da njihova upotreba može imati višestruke koristi kod pacijenata koji su na sekvencijalnom tretmanu ciljanom, pa imunoterapijom (168). Ovi hematološki parametri u budućnosti mogu biti takođe značajni kao potencijalni prediktori toksičnosti kod pacijenata kod kojih se konkomitantno primenjuje ciljana terapija sa imunoterapijom.

U našoj studiji, vrednost hematološkog parametra NMR pre primene terapije *EGFR*-TKI pokazala se potencijalno kao dobra, rutinska, jeftina i minimalno invazivna metoda za predviđanje odgovora na *EGFR*-TKI kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim uznapredovalim NSCLC. Dobijena NMR ROC granična vrednost trenutno se prospektivno validira u većoj kohorti pacijenata sa NSCLC na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

U našem istraživanju se takođe pokazalo da su početne vrednosti NLR, LMR i PLR potencijalno korisne za predviđanje specifičnih podtipova toksičnosti. Mogućnost automatskog izračunavanja ovih odnosa ugradnjom jednostavnog kodiranja prilikom izrade kompletne krve slike sa leukocitarnom formulom ili korišćenje automatskih hematoloških kalkulatora omogućava njihovo jednostavno korišćenje u svakodnevnoj rutinskoj kliničkoj praksi. Kako je naša studija retrospektivna analiza iz samo jednog centra fokusirana na relativno mali broj pacijenata slovenskog porekla, dobijene podatke je potrebno tumačiti sa oprezom. Više kliničkih ispitivanja u većem broju centara neophodni su u proceni prediktivne moći vrednosti hematoloških parametara, kao što su NLR, NMR, LMR, PMR i PLR pre terapije u cilju ispitivanja specifičnih populacionih razlika. Takođe je moguće uključivanje ovih parametara u prognostičke/prediktivne algoritme za lečenje pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća primenom *EGFR* TKI.

EGFR TKI terapija je najčešće bezbedna, a prekid terapije zbog ispoljenih znakova toksičnosti visokog gradusa je najčešće potreban kod manje od 10% pacijenata (143). Na to ukazuju i rezultati naše studije u kojoj terapija primenom *EGFR* TKI nije prekinuta ni kod jednog pacijenta. Prema meta analizi iz 2016. godine smrt kao neželjeni efekat primene *EGFR* TKI se veoma retko registruje i to u oko 1,7% slučajeva, najčešće kao posledica pneumonitisa (143). U našoj studiji nijedan pacijent nije imao fatalne posledice primene *EGFR* TKI, kao ni pneumonitis.

Prema podacima meta analize u koju je uključeno 2535 pacijenata iz 16 studija, oko 40% pacijenata ispoljilo je znakove toksičnosti gradusa 3-4 (143), dok je u našoj studiji taj broj znatno manji imajući

u vidu da toksičnost gradusa 4 uopšte nije registrovana, a da je toksičnost gradusa 3 registrovana u samo 13% slučajeva (143).

Toksični profil se razlikuje u odnosu na lek koji je korišćen. U našoj studiji smo u prvoj liniji terapije *EGFR* TKI koristili lekove prve i druge generacije i to gefitinib, erlotinib i afatinib. U prethodnim istraživanjima pokazana je veća učestalost neželjenih efekata visokog gradusa, naročito dijareje, nakon primene afatiniba u odnosu na gefitinib (143). Razlika u incidenci neželjenih efekata najverovatnije je posledica većeg afiniteta afatiniba kao leka druge generacije *EGFR* TKI za *EGFR* receptor.

Međutim prema LUX-LUNG 7 studiji učestalost kožnog raša je češća nakon primene gefitiniba u odnosu na afatinib, kao i abnormalnosti u funkciji jetre. Neželjeni efekti gradusa su češći nakon primene erlotiniba u odnosu na gefitinibom naverovatnije zbog razlike u farmakološkom profilu (143).

Poznavanje neželjenih efekata *EGFR* TKI terapije od strane lekara i pacijenata je od suštinskog značaja zato što se ova terapija upotrebljava oralno svakog dana u dužem vremenskom periodu kod pacijenata sa uznapredovalim ili metastatskim *EGFR* mutiranim adenokarcinomom pluća, a u novije vreme i u adjuvatnom pristupu. Dobro poznavanje i razumevanje stepena neželjenih efekata od strane pacijenata ključno je u ranom otkrivanju znakova toksičnosti i adekvatnoj reakciji i tretmanu neželjenih efekata.

Kancerski bol je veoma čest kod pacijenata sa karcinomom pluća, jer se u većini slučajeva dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu. U zemljama kao što je Srbija koje nemaju odgovarajući program za skrining karcinoma pluća, kao ni adekvatno primenjene mere odvikavanja od pušenja ovo predstavlja veliki javno-zdravstveni problem. Lečenje kancerskog bola podrazumeva utvrđivanje porekla i evolucije bola uz stalno praćenje intenziteta bola radi prilagođavanja antidolorozne terapije i doze medikamenata. Rano palijativno zbrinjavanje i kontrola simptoma porekla osnovne bolesti utiče značajno na poboljšanje kvaliteta života, kao i dužinu preživljavanja (169). Iako su druge zemlje do sada sprovele brojne multicentrične prospektivne studije koje se tiču kancerskog bola kod pacijenata sa karcinomom pluća (170), u našem regionu do sada nisu sprovedene detaljne studije koje procenjuju faktore povezane sa kancerskim bolom kod pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća koji su lečeni primenom *EGFR*-TKI.

Najčešće opisani uzroci bola kod pacijenata sa uznapredovalim karcinomom pluća vezani su za koštane metastaze, metastaze na nadbubrežnim žlezdama i pancoast tumore (171). U našoj studiji prisustvo bola pri postavljanju dijagnoze bilo je značajno povezano sa prisustvom metastaza, posebno u kostima i nadbubrežnim žlezdama, što je u skladu sa ranije objavljenim podacima (172, 173).

Svetska zdravstvena organizacija preporučuje upotrebu modela analgetičke lestvice u tri koraka za adekvatno lečenje kancerskog bola (174). Prema ovim smernicama, prvi korak u lečenju su neopioidni analgetici kao što su paracetamol i nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL). Ovi lekovi se propisuju pacijentima sa blagim bolom. Paracetamol je osnova prva dva koraka SZO analgetičke lestvice u mnogim zemljama, kao i u našoj studiji (175). Uzimajući u obzir dobro poznate neželjene efekte dugotrajne upotrebe NSAIL-a kao što su gastrointestinalno krvarenje, bubrežna slabost, disfunkcija trombocita, NSAIL se nisu redovno koristili u našoj studiji osim kao pojedinačna intermitentna terapija ili u kombinaciji sa paracetamolom za blagi bol. Za lečenje umerenog do umereno jakog bola, prva i druga stepenica SZO-ove skale podrazumevaju upotrebu opioidnih lekova sa ili bez neopioidnih i pomoćnih analgetika. Neki autori su predložili da je slabe opioide moguće zameniti niskim dozama oralnog morfijuma, čime se eliminiše korak 2 lestvice. Imajući u vidu da je većina naših pacijenata u početku imala umereni do jak bol, osnova analgetičke terapije u našoj studiji bio je morfin dat *per os* (176). Ipak, kod 10% naših pacijenata tramadol je kao lek iz drugog stupnja SZO lestvice omogućio adekvatnu kontrolu kancerskog bola u maksimalno korišćenoj dozi od 200 mg dnevno. Drugi jaki opioidi korišćeni u našoj studiji bili su oksikodon, hidromorfon, metadon i fentanil. Oksikodon ili hidromorfon, u formulacijama sa trenutnim i produženim oslobađanjem za oralnu primenu pokazali su se kao efikasne alternative oralnom morfinu i u našoj studiji (177, 178).

U našoj studiji, oralni metadon je korišćen samo kod malog broja pacijenata (2%) sa jakim kancerskim bolom otpornim na prethodnu farmakoterapiju. Transdermalni fentanil je korišćen kao efikasna opcija za pacijente sa stabilnim potrebama za opioidima, kao i za pacijente koji su imali problema sa oralnom primenom lekova. Adjuvantni analgetici koji su korišćeni u ovoj studiji bili su pregabalin, gabapentin i deksametazon. Triciklični antidepresivi (amitriptilin) i selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (fluoksetin, citalopram) nisu korišćeni kao pomoćni analgetici u našoj studiji. Postignuta je dobra kontrola kancerskog bola, uz značajno smanjenje broja pacijenata koji su i dalje imali bol tokom lečenja. Takođe je postignuto i statistički značajno smanjenje intenziteta kancerskog bola kod pacijenata kod kojih je bio prisutan. Kod pacijenata koji su razvili novu leziju ili su imali progresiju primarnog tumora tokom lečenja TKI, uočeno je pogoršanje intenziteta bola uprkos tome što je prethodno postignuta adekvatna kontrola.

Koštane metastaze praćene bolom se često javljaju kod karcinoma pluća, a radioterapija ima značajnu ulogu u lečenju bola u kostima, lečenju metastatske kompresije kičmene moždine i palijativnom lečenju patoloških preloma kostiju koji se ne mogu hirurški stabilizovati (179). Radioterapija eksternim snopom (EBRT) obezbedila je ublažavanje bolova kod 60-80% pacijenata posle RT, pri čemu je jedna trećina pacijenata imala potpuni prestanak bola u tretiranoj zoni (179). Za ovu indikaciju se preporučuju različiti radioterapijski režimi, ali pojedinačnu dozu od 8 Gy treba smatrati režimom izbora za pacijente sa bolnim metastazama u kostima prema najnovijim ESMO smernicama za kliničku praksu za lečenje bola kod odraslih pacijenata sa karcinomima (175). U našoj studiji, najčešće korišćeni režimi za palijativnu antidoloroznu terapiju zračenjem bili su kratki kurs od 8 Gy, pojedinačna frakcija, kao i dva dugotrajna režima, uključujući 20 Gy u 5 frakcija i 30 Gy u 10 frakcija. Iako je prisustvo bolnih metastaza u kostima obično povezano sa kraćim preživljavanjem (180), u našoj studiji nije primećena razlika u PFS ili OS kod pacijenata koji su imali bol povezan sa metastazama u kostima pri postavljanju dijagnoze, niti je prisustvo bola bilo u korelaciji sa verovatnoćom nastanka neželjenih efekata bilo kog primenjenog tretmana.

EGFR inhibitori tirozin-kinaza su tretman izbora za pacijente sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća čiji tumori sadrže mutacije u *EGFR* genu. Međutim, ishod lečenja značajno varira između pacijenata. Poznato je da osnovne genetičke varijacije u *EGFR* genu (mutacije i mali nukletidni polimorfizmi) menjaju funkciju proteina i utiču na biologiju tumora, izazivajući drugačiju prezentaciju simptoma kod pacijenata i menjajući terapijsku efikasnost *EGFR-TKI* (181,182). Tako smo analizirali efekat najčešćih *EGFR* mutacija u egzonomima 18-21 na pojavu bola i efikasnost kombinovanog tretmana analgetika/TKI. Podtip mutacije *EGFR* nisu imali direktan uticaj na pojavu i kontrolu bola, ali su imali značajan uticaj na odgovor na TKI koji indirektno utiče na simptome pacijenata. Pacijenti sa najčešćim mutacijama (*ex19del* i *L858R*) imali su duži srednji PFS. Dakle, iako prisustvo specifičnih genetskih promena *EGFR* nije imalo direktan uticaj na pojavu bola i ne mogu se koristiti kao direktni prognostički parametri, oni izazivaju drugačiji odgovor na TKI, što je na kraju dovelo do smanjenja opterećenja bolesti i opšteg ublažavanja bola tokom lečenja.

U nekoliko studija ispitivan je značaj *IGF-1R* kao potencijalnog prediktivnog biomarkera kod pacijenata sa *EGFR* mutiranim karcinomom pluća koji su na terapiji TKI. Pre dve godine objavljena je meta-analiza koja je uključila 22 studije i 3859 pacijenata u kome je ispitivan prediktivni potencijal ekspresije gena *IGF-1R*. Rezultati su pokazali da je povišen nivo ekspresije *IGF-1R* bio povezan sa nepovoljnom prognozom bolesti - dužina vremena bez progresije bolesti (DFS) bila je kraća kod pacijenata sa visokom ekspresijom *IGF-1R*, što je pokazano univarijantnom (HR=1.24, 95% CI: 1,00–1,55, P=,054) i multivarijantnom analizom (HR=1.49, 95% CI: 1,01–2,21, P=.045) (183). Međutim, nije pokazana statistički značajna veza između pozitivne ekspresije *IGF-1R* i ukupnog preživljavanja (OS) (183). U našoj studiji prekomerna ekspresija *IGF-1R* je bila statistički značajno povezana sa češćom pojavom rezistencije na *EGFR* TKI (PFS bez rezistencije 2,38 naspram primarne rezistencije 8,09), što može ukazati na činjenicu da prekomerna ekspresija *IGF-1R* može biti negativni prediktivni faktor odgovora na *EGFR* TKI. Smatra se da povišena ekspresija *IGF-1R* dovodi do povećanog preživljavanja kancerskih ćelija, kao i da interakcijom sa *EGFR* receptorom

recipročnim kompenzatornim mehanizmima limitira odgovor ili dovodi do rezistencije na tretman koji cilja EGFR. Ova interakcija se može odigrati na više nivoa, ili putem direktnih kontakata dva molekula, ili raspoloživošću respektivnih liganada, kao i indirektno putem zajedničkih interreagujućih partnera kao što su receptori povezani sa G proteinom i adaptorni proteini koji učestvuju u nishodnoj signalizaciji (184).

U studiji koji su izveli Capuzzo et al. ispitivana je ekspresija *IGF-1R* kod pacijenata sa hirurški odstranjenim NSCLC u stadijumu I-III. Pokazana je povezanost između povišene ekspresije *IGF-1R* i češće pojave skvamozne histologije i gradusa 3 tumorskih ćelija, ali nije dokazana potencijalna prediktivna vrednost *IGF-1R* i njegov uticaj na preživljavanje (185).

E-kadherin igra značajnu ulogu u imunskom odgovoru, a smatra se i da je važan faktor u pojavi rezistencije ili senzitivnosti na *EGFR*-TKI tako što reguliše slanje intracelularnih signala (186). U našoj studiji ispitivana je povezanost ekspresije E-kadherina i pojave rezistencije na *EGFR*-TKI kod pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća. Rezultati su pokazali da pacijenti sa sniženim nivoom E-kadherina imaju statistički značajno veću šansu za pojavom rezistencije na *EGFR*-TKI koja se ispoljava u prva tri meseca od otpočinjanja terapije. Ovi rezultati imaju jasno objašnjenje zbog činjenice da je snižena ekspresija E-kadherina jedno od glavnih obeležja epitelijalno-mezenhimalne transformacije (EMT) koja je karakteristika agresivnih tumora koji su često rezistentni na primenjenu terapiju.

Naši rezultati su slični rezultatima studije koji je ispitivala prediktore stečene rezistencije na *EGFR* TKI (187). U ovoj studiji uočena je smanjena ekspresija E-kadherina u ćelijama PC-9/G, dok nivo E-kadherina kod H460/ER ćelija nije ni registrovan. Oba tipa ovih ćelija pokazala su EMT karakteristike i kod njih je registrovan porast nivoa mezenhimalnih markera kao što su vimentin, transkripcioni faktor Snail i β katenin čime se sposobnost migracije i invazivnost ovih ćelija značajno promenila u odnosu na isti tip ćelija pre nastanka stečene rezistencije na *EGFR* TKI (187).

Sa druge strane, uočen je visok nivo ekspresije E-kadherina kod *EGFR* mutiranih NSCLC ćelije koje pokazuju osetljivost na primenu *EGFR* TKI (188,189). Za razliku od njih, NSCLC ćelije koje pokazuju visoku ekspresiju vimentina i fibronektina nisu dovoljno osetljive na primenu *EGFR* TKI (188,189).

N-kadherin spada u mezenhimalne proteine i zajedno sa E-kadherinom predstavlja glavno obeležje epitelijalno-mezenhimalne transformacije. Ovaj kalcijum zavisni protein odgovoran je za tumorsku migraciju, invazivnost i nastanak metastaza, a nađena je i njegoa u uloga u nastanku rezistencije na hemioterapiju (190). U prethodnim istraživanjima uočeno je da N-kadherin indukovana perzistentna *Akt* fosforilacija koja aktivira *PI3K/Akt* put omogućava preživljavanje ćelijama rezistentnim na *EGFR* TKI (190)

U jednoj od studija ispitivana je ekspresija i funkcija N-kadherina u H1650ER soju tumorskih ćelija rezistentnih na Erlotinib (190). U H1650ER soju tumorskih ćelija uočena je indukcija EMT procesa vidu snižene ekspresije N-kadherina i povišene ekspresije E-kadherina što je dovelo do pojave stečene rezistencije na Erlotinib (190).

Druge studije su takođe ispitivale značaj ekspresije N-kadherina u populaciji tumorskih ćelja rezistentnih na Gefitinib (191). I u ovoj studiji pokazana je povišena ekspresija N-kadherina u gefitinib rezistentnom PC9/ZD soju ćelija kod kojih je registrovana T790M mutacija kao uzrok stečene rezistencije na *EGFR* TKI (191). Takođe, u ovom istraživanju je uočena povišena ekspresija N-kadherina i kod soja ćelija rezistentnih na Erlotinib (A549, H157, and H322)(191).

Okludini su transmembranski proteini koj čine sastavni deo čvrstih veza značajnih u kontroli međućelijskog transporta, a i u ćelijskoj proliferaciji i migraciji (192). Okludini su u respiratornom traktu prisutni u bronhijalnom epitelu i u alveolarnim ćelijama čineći fiziološku selektivnu barijeru (192), a permeabilnost te barijere se menja usled različitih inflamatornih faktora u patološkim stanjima (139). Ovu međućelijsku barijeru čine međućelijske veze, veze ćelija sa površine sa

matriksom koji se zasnivaju na proteinima i adhezionim kompleksima koji se vezuju za ćelijski citoskelet (139). Ispitivan je uticaj proinflammatornih citokina $TNF-\alpha$, IL-4 i IFN- γ na strukturu čvrste veze uključujući i okludin, kao i mehanizam nastanka tih promena. Pokazano je da različiti faktori regulišu ćelije bronhijalnog epitela uključujući *EGFR* signalne puteve, a takođe je pronađeno da aktivacija *EGFR* dovodi do uključivanja *MAPK/ERK1/2* signalnog puta koji posreduje u promociji, proliferaciji, rastu i diferencijaciji ćelija, kao i da ima ključnu ulogu u sprečavanju oštećenja epitelijalne barijere dejstvom proinflammatornih citokina (139).

U prethodnim istraživanjima uočeno je da je ekspresija okludina bitan faktor u razvoju rezistencije na hemioterapiju (192). Naime, uočeno je da je ekspresija Okludina bila povišena kod A549 populacije ćelija rezistentne na cisplatinu, doksorubicin, gemcitabin i 7-etil-10-hidroksi-camptothecin (192).

Nivo p-Akt je u bio viši u A549 ćelijama rezistentnim na cisplatinu, a ekspresija okludina je spimirana primenom PI3K/Akt inhibitora (LY-294002) čime je pokazano da je PI3K/Akt put uljučen u povišenu ekspresiju okludina (192). Povišena ekspresija okludina takođe je dovela do smanjenog paracelularnog permeabiliteta za doksorubicin u A549 ćelijama, na osnovu čega je zaključeno da okludin ne učestvuje direktno u nastanku rezistencije na hemioterapiju, već utiče na međućelijsku permeabilnost i sprečava adekvatnu akumulaciju antikancerskih lekova (192).

Podaci o značaju ekspresije okludina i njegovoj povezanosti sa nastankom rezistencije na EGFR TKI i dužine preživljavanja pacijenata obolelih od adenokarcinoma pluća su oskudni u literaturi, te se naše istraživanje bavilo time u populaciji pacijenata iz Srbije.

Ograničenja ove studije su veličina uzorka koja je bila relativno mala što uvodi pristrasnost slučaja i ograničava implikacije uočenih trendova. Rezultate dobijene u ovoj studiji potrebno je validirati na većem broju uzoraka pacijenata u prospektivnoj multicentričnoj studiji kako bi njihov značaj bio potvrđen i potencijalna primena našla svoje mesto u kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČCI

1. U delu ispitivanje demografskih karakteristika pacijenata i karakteristika tumora (pol, starost pri dijagnozi, pušački status, prisustvo inicijalnih metastaza, prisustvo bola pri dijagnozi, performans status, gradus tumora, hematološki parametri) kao prediktivnih faktora efikasnosti EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim EGFR mutiranim adenokarcinomom pluća (korelacija sa ukupnim preživljavanjem (overall survival - OS), preživljavanjem bez progresije bolesti (progression free survival – PFS), pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola) pokazano je da su:
 - pacijenti ženskog pola imali duži PFS u poređenju sa pacijentima muškog pola
 - pacijenti ženskog pola češće su ispoljili toksičnost na primenu EGFR TKI
 - pacijenti sa NMR<12,62 imali značajno duži OS
 - pacijenti sa NLR>2,9 češće imali znakove toksičnosti na primenu EGFR TKI, naročito dijareju
 - pacijenti sa LMR<2,5 značajno ređe imali registrovanu paronihiju (p=0,031) i dijareju
 - pacijenti sa PLR>190 imali češće dijareju (p=0,044) i hiperbilirubinemiju (p=0,077)
2. U delu ispitivanja tipa i zastupljenosti mutacija u genu EGFR kao prediktivnih faktora EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim EGFR mutiranim adenokarcinomom pluća (korelacija sa OS, PFS, pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola) pokazano je da:
 - Srednji PFS bio je značajno duži kod pacijenata sa ex19del i L858R mutacijama nego kod pacijenata sa ređim mutacijama kao što su ex20Ins, L861Q i G719X
3. U delu ispitivanja nivoa ekspresije gena IGF-1R, E-kadherin, N-kadherin i okcludin kao prediktivnih faktora EGFR TKI terapije u pacijenata sa uznapredovalim EGFR mutiranim adenokarcinomom pluća (korelacija sa OS, PFS, pojavom rezistencije, toksičnosti i kancerskog bola), pokazano je da:
 - pacijenti čiji su tumori inicijalno imali niže nivoe ekspresije gena IGF-1R i N-kadherina imali su duži PFS u odnosu na pacijente sa višim nivoima ekspresije ovih gena pacijenti čiji su tumori imali niže nivoe ekspresije IGF-1R češće su imali kompletan ili parcijalni odgovor na terapiju
 - pacijenti sa povišenom ekspresijom gena IGF-1R češće su razvijali rezistenciju na terapiju EGFR TKI
 - pacijenti sa povišenom ekspresijom gena N-kadherin češće su razvijali rezistenciju na terapiju EGFR TKI
 - pacijenti sa sniženom ekspresijom gena E-kadherin češće su razvijali rezistenciju na terapiju EGFR TKI

7. LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394–424.
3. Clinical N, Guidelines P, Guidelines N. Non-Small Cell Lung 2021.
4. Asia S, Asia S, Hdi H. Source: Globocan 2020.2020;419:7–8.
5. Country-specific I, Serbia C, Registry C, Country-specific M, Computed P, Index HD. 8 737 370. 2020;048:1–2.
6. Mattson ME, Pollack ES, Cullen JW. What are the odds that smoking will kill you? *American Journal of Public Health*. 1987;77(4):425–31.
7. Tindle HA, Stevenson Duncan M, Greevy RA, Vasani RS, Kundu S, Massion PP, et al. Lifetime Smoking History and Risk of Lung Cancer: Results From the Framingham Heart Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2018;110(11):1201–7.
8. Ettinger DS, Wood DE, Chair V, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, et al. Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures NCCN Guidelines Version 7.2021 Non-Small Cell Lung Cancer. 2021.
9. (No Title) [Internet]. Available from: <http://srab.cancer.gov/joinpoint/>
10. (No Title). 2020.
11. National Comprehensive Cancer Network. Guideline for NSCLC. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. 2018.
12. Jha P, Peto R. Global Effects of Smoking, of Quitting, and of Taxing Tobacco. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(1):60–8.
13. Tang M shong, Wu XR, Lee HW, Xia Y, Deng FM, Moreira AL, et al. Electronic-cigarette smoke induces lung adenocarcinoma and bladder urothelial hyperplasia in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019 Oct 22;116(43):21727–31.
14. Boffetta P, Pershagen G, Jöckel K-H, Forastiere F, Gaborieau V, Heinrich J, et al. Cigar and Pipe Smoking and Lung Cancer Risk: a Multi-center Study From Europe [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/91/8/697/2519397>
15. Jovanović D, Milašinović G. NACIONALNI vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje karcinoma pluća [Internet]. 2011. Available from: [http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2011/Decembar/Vodici/Vodic za dijagnostikovanje i lecenje karcinoma pluca.pdf](http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2011/Decembar/Vodici/Vodic%20za%20dijagnostikovanje%20i%20lecenje%20karcinoma%20pluca.pdf)
16. Latimer KM, Mott TF. Lung cancer: Diagnosis, treatment principles, and screening. *American Family Physician*. 2015;91(4):250–6.
17. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *British Journal of Cancer*. 2005;93(7):825–33.

18. Timofeeva MN, Hung RJ, Rafnar T, Christiani DC, Field JK, Bickeböllner H, et al. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: Meta-analysis of 14 900 cases and 29 485 controls. *Human Molecular Genetics*. 2012;21(22):4980–95.
19. Ganie F, Hussain S, Lone H, Wani ML, Wani S. Carcinoma lung: Clinical presentation, diagnosis, and its surgical management. *The Journal of Association of Chest Physicians*. 2013;1(2):38.
20. Gatsonis CA, Aberle DR, Berg CD, Black WC, Church TR, Fagerstrom RM, et al. The national lung screening trial: Overview and study design. *Radiology*. 2011;258(1):243–53.
21. Jiang G, Zhang L, Zhu Y, Chen C, Zhou X, Liu J, et al. Clinical consensus on preoperative pulmonary function assessment in patients undergoing pulmonary resection (first edition). *Current Challenges in Thoracic Surgery*. 2019; 1:7–7.
22. Sporn MB. Approaches to Prevention of Epithelial Cancer during the Preneoplastic Period '. 1976;(July):2699–702.
23. Yousaf-Khan U, van der Aalst C, de Jong PA, Heuvelmans M, Scholten E, Lammers JW, et al. Final screening round of the NELSON lung cancer screening trial: The effect of a 2.5-year screening interval. *Thorax*. 2017;72(1):48–56.
24. Krist AH, Davidson KW, Mangione CM, Barry MJ, Cabana M, Caughey AB, et al. Screening for Lung Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2021 Mar 9;325(10):962–70.
25. Kerpel-Fronius A, Tammemägi MC, Cavic M, Huber RM, Yang D, Zulueta J, et al. Lung Cancer Screening in Persons Who Never Smoked Has to be Evaluated—A Response to Letter to the Editor. *Journal of Thoracic Oncology* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2022 Jan 21];17(2): e20–1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086421034158>
26. Passaro A, Bestvina C, Velez Velez M, Garassino MC, Garon E, Peters S. Severity of COVID-19 in patients with lung cancer: Evidence and challenges. Vol. 9, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BMJ Publishing Group; 2021.
27. NACIONALNI VODIČ DOBRE KLINIČKE PRAKSE ZA DIJAGNOSTIKOVANJE I LEČENJE KARCINOMA PLUĆA.
28. Simmons CPL, MacLeod N, Laird BJA. Clinical management of pain in advanced lung cancer. Vol. 6, *Clinical Medicine Insights: Oncology*. Libertas Academica Ltd.; 2012. p. 331–46.
29. Silvestri GA, Gonzalez A v, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, et al. DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF LUNG CANCER, 3RD ED: ACCP GUIDELINES. *CHEST* [Internet]. 2013;143: e211S-e250S. Available from: <http://journal.publications.chestnet.org/>
30. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2018;29(September): iv192–237.
31. de Wever W, Ceyskens S, Mortelmans L, Stroobants S, Marchal G, Bogaert J VJA. Additional value of PET-CT in the staging of lung cancer: comparison with CT alone, PET alone and visual correlation of PET and CT. *Eur Radiol*. 2007.
32. Subedi N et al. The clinical impact of integrated FDG PET–CT on management decisions in patients with lung cancer. *Lung Cancer*. 2008;64(3):301–7.

33. Song JW, Oh YM, Shim TS, Kim WS, Ryu JS CC. Efficacy comparison between (18)F-FDG PET/CT and bone scintigraphy in detecting bony metastases of non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009.
34. Ozcan Kara P, Kara T, Kara Gedik G, Kara F, Sahin O, Ceylan Gunay E SO. The role of fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography in differentiating between benign and malignant adrenal lesions. *Nucl Med Commun*. 2011.
35. Grassetto G, Fornasiero A, Bonciarelli G, Banti E, Rampin L, Marzola MC, Massaro A, Galeotti F, Del Favero G, Pasini F, Minicozzi AM, Al-Nahhas A, Cordiano C RD. Additional value of FDG-PET/CT in management of “solitary” liver metastases: preliminary results of a prospective multicenter study. *Mol Imaging Biol*. 2010.
36. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, M Austin JH, Beth Beasley M, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. 2015.
37. Daly ME, Singh N, Nofisat Ismaila, Antonoff MB, Arenberg DA, Bradley J, et al. Management of Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021;0. Available from: <https://doi>.
38. Stamatis G. Staging of lung cancer: The role of noninvasive, minimally invasive and invasive techniques. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2015;46(2):521–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00126714>
39. El-Sherief AH, Lau CT, Wu CC, Drake RL, Abbott GF, Rice TW. International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) lymph node map: Radiologic review with CT illustration. *Radiographics*. 2014 Oct 1;34(6):1680–91.
40. Guibert N, Pradines A, Mazieres J, Favre G. Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages. *European Respiratory Review* [Internet]. 2020;29(155). Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0052-2019>
41. Reita D, Pabst L, Pencreach E, Guérin E, Dano L, Rimelen V, et al. cancers Molecular Mechanism of EGFR-TKI Resistance in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Application to Biological Diagnostic and Monitoring. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers13194926>
42. Morgillo F, della Corte CM, Fasano M, Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: Lung cancer. *ESMO Open*. 2016;1(3):1–9.
43. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current research in cancer. *American journal of cancer research* [Internet]. 2020;10(3):727–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>
44. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* [Internet]. 2017;28(Supplement 4):iv1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx222>
45. Ilonen IK, Räsänen J v., Knuutila A, Salo JA, Sihvo EI. Anatomic thoracoscopic lung resection for non-small cell lung cancer in stage i is associated with less morbidity and shorter hospitalization than thoracotomy. *Acta Oncologica*. 2011;50(7):1126–32.
46. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M, et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(18):4910–8.

47. Li BT, Shen R, Buonocore D, Olah ZT, Ni A, Ginsberg MS, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Ado-Trastuzumab Emtansine for Patients with HER2-Mutant Lung Cancers: Results from a Phase II Basket Trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2018; 36:2532–7. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2018>.
48. Schil PE van, Hellmann MD, Peters S, Guidelines E. ESMO Clinical Practice Guidelines for mNSCLC. *Ann Oncol* [Internet]. 2019;29(suppl 4): iv192–iv237. Available from: <https://www.esmo.org/Guidelines/Lung-and-Chest-Tumours/Metastatic-Non-Small-Cell-Lung-Cancer>
49. Mckenna RJ, Meyers BF. *HHS Public Access*. 2017;147(2):747–53.
50. Petersen RP, Pham DK, Burfeind WR, Hanish SI, Toloza EM, Harpole DH, et al. Thoracoscopic Lobectomy Facilitates the Delivery of Chemotherapy after Resection for Lung Cancer. *Annals of Thoracic Surgery*. 2007;83(4):1245–50.
51. Nakamura H. Systematic review of published studies on safety and efficacy of thoracoscopic and robot-assisted lobectomy for lung cancer. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2014;20(2):93–8.
52. Ettinger DS, Wood DE, Chair V, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, et al. NCCN Guidelines Version 1.2022 Non-Small Cell Lung Cancer Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures [Internet]. 2021. Available from: <https://www.nccn.org/home/member->
53. Clinical N, Guidelines P, Guidelines N. Non-Small Cell Lung. 2021.
54. Remon J, Soria JC, Peters S. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: an update of the ESMO Clinical Practice Guidelines focusing on diagnosis, staging, systemic and local therapy. Vol. 32, *Annals of Oncology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 1637–42.
55. Kris MG, Gaspar LE, Chaft JE, Kennedy EB, Azzoli CG, Ellis PM, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancers: American Society of Clinical Oncology/Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017; 35:2960–74. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017>.
56. Kulkarni AA, Abdul; Naqash R, Puri S, Dienstmann R. Is It Time to Implement Adjuvant Targeted Therapy in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer? 2022; Available from: <https://doi>.
57. Jelinek MJ, Aggarwal C. Adjuvant Osimertinib: A New Standard of Care. *Oncologist*. 2020;1–3.
58. Remon J, Soria JC, Peters S. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: an update of the ESMO Clinical Practice Guidelines focusing on diagnosis, staging, systemic and local therapy. Vol. 32, *Annals of Oncology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 1637–42.
59. (No Title). 2020.
60. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(20):1919–29.
61. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(24):2342–50.

62. Felip E et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomized, multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 398(10308):1344–57.
63. (SEER) SE and ER, Institute NC. Age-adjusted SEER incidence and U.S. death rates and 5-year relative survival rates. 2006.
64. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK -Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(9):829–38.
65. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Updated version published 15 September 2020 by the ESMO Guidelines Committee Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up †. *Ann Oncol*. 2018.
66. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(19):1823–33.
67. Solomon BJ et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 2018;19(12):1654–67.
68. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1 -Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(21):1963–71.
69. Wu YL, Yang JCH, Kim DW, Lu S, Zhou J, Seto T, et al. Phase II study of crizotinib in east asian patients with ROS1-positive advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(14):1405–11.
70. Mazières J, Rouvière D, Milia J, Filleron T, Zalcman G, Biondani P, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: Results from the EUROS1 cohort. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(9):992–9.
71. Michels S, Massutí B, Schildhaus HU, Franklin J, Sebastian M, Felip E, et al. Safety and Efficacy of Crizotinib in Patients with Advanced or Metastatic ROS1-Rearranged Lung Cancer (EUCROSS): A European Phase II Clinical Trial. *Journal of Thoracic Oncology*. 2019;14(7):1266–76.
72. Cho BC, Lim SM, Kim HR, Lee JS, Lee KH, Lee YG, et al. Open-label, multicenter, phase II Study of ceritinib in patients with non-small-cell lung cancer harboring ROS1 rearrangement. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(23):2613–8.
73. Drilon A et al. Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *The Lancet Oncology*, 2019;21(2):261–70.
74. No Title [Internet]. Available from: chrome-extension://dagcmkpagjhhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fcancerdiscovery.aacrjournals.org%2Fcontent%2Fcaandisc%2F8%2F10%2F1227.full.pdf
75. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet P, Quoix E, Baik CS, et al. HHS Public Access. 2016;17(7):984–93.
76. Gautschi O, Milia J, Cabarrou B, Bluthgen MV, Besse B, Smit EF, et al. Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer results from the European EURAF cohort. *Journal of*

Thoracic Oncology [Internet]. 2015;10(10):1451–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000625>

77. Canon, J., Rex, K., Saiki AY et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019.
78. Drilon A, Oxnard G, Wirth L, Besse B, Gautschi O, Tan SWD, et al. PL02.08 Registrational Results of LIBRETTO-001: A Phase 1/2 Trial of LOXO-292 in Patients with RET Fusion-Positive Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology* [Internet]. 2019;14(10): S6–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.059>
79. Justin F. Gainor, Giuseppe Curigliano, Dong-Wan Kim, Dae Ho Lee, Benjamin Besse, Christina S Baik, Robert C Doebele, Philippe Alexandre Cassier, Gilberto Lopes, Daniel Shao-Weng Tan, Elena Garralda, Luis G. Paz-Ares, Byoung Chul Cho, Shirish M. Gadgeel, M and VS. Registrational dataset from the phase I/II ARROW trial of pralsetinib (BLU-667) in patients (pts) with advanced RET fusion+ non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*. 2020.
80. uergen Wolf, Takashi Seto J-YH. Capmatinib (INC280) in METΔex14-mutated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Efficacy data from the phase II GEOMETRY mono-1 study. *Journal of Clinical Oncology*. 2019.
81. Hossein Borghaei, Benjamin Besse, Aditya Bardia, Julien Mazieres, Sanjay Popat, Bincy Augustine, Anthony Michael D’amelio, Daniel Barrios and HSR. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in combination with pembrolizumab in patients with advanced/metastatic breast or non-small cell lung cancer (NSCLC): A phase Ib, multicenter, study. *Journal of Clinical Oncology*. 2020.
82. Tsurutani J, Iwata H, Krop I, Jänne PA, Doi T, Takahashi S, et al. Targeting HER2 with Trastuzumab Deruxtecan: A Dose-Expansion, Phase I Study in Multiple Advanced Solid Tumors. *Cancer Discov* [Internet]. 2020; 10:688–701. Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/>
83. WHO-World Helath Organization. Tobacco Control Fact Sheet - Serbia. *Elektronski izvor*. 2016; Available from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/312596/Tobacco-control-fact-sheet-Serbia.pdf?ua=1
84. Monograph D. A - Drug Name. 2019;(June):1–10.
85. Monograph D. A - Drug Name. 2020;(August):1–13.
86. Monograph D. A - Drug Name. 2019;(June):1–11.
87. Name D, Name CT. A - Drug Name. 2019;(June):1–12.
88. Sequist L v., Yang JCH, Yamamoto N, O’Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(27):3327–34.
89. Wu Y-L et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(2):213–22.
90. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(25):2380–8.

91. Han JY, Park K, Kim SW, Lee DH, Kim HY, Kim HT, et al. First-SIGNAL: First-line single-agent irressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(10):1122–8.
92. Rosell R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(3):239–46.
93. Kobayashi K, Inoue A, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(9):1394–400.
94. Paz-Ares L, Tan EH, O’Byrne K, Zhang L, Hirsh V, Boyer M, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: Overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Annals of Oncology*. 2017;28(2):270–7.
95. Byrne O. Effect of afatinib on overall survival of patients with EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma: outcomes of the two randomised Phase III trials LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6. Vol. 2045. 2015. 141–151 p.
96. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S, et al. Improvement in overall survival in a randomized study that compared dacomitinib with gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer and EGFR-activating mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(22):2244–50.
97. Park K et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(5):577–89.
98. Wu Y-L et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(11):1454–66.
99. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer . *New England Journal of Medicine*. 2018;378(2):113–25.
100. Płużański A, Piórek A. Side effects of tyrosine kinase inhibitors — management guidelines. *Oncology in Clinical Practice*. 2016;12(4):113–8.
101. Saito H et al. Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20(5):625–35.
102. Piccirillo M.C. BL, GMCC, DC, CL, EG, BMA, RF et al. Bevacizumab+Erlotinib vs erlotinib alone as first-line treatment of pts with EGFR mutated advanced non-squamous NSCLC: Final analysis of the multicenter, randomized, phase III BEVERLY trial. *Annals of Oncology*. 2021;32(supple 5):949–1039.
103. Nakagawa, KazuhikoChu Q et al. Ramucirumab plus erlotinib in patients with untreated, EGFR-mutated, advanced non-small-cell lung cancer (RELAY): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20(12):1655–69.
104. Xia Y, Jin R, Peng L, Shou J, Wang J, Jin Y, et al. 1215P EGFR-mutated squamous cell lung cancer and its association with outcomes. *Annals of Oncology*. 2021 Sep;32: S966–7.

105. Park K, Haura EB, Leighl NB, Mitchell P, Shu CA, Girard N, et al. Amivantamab in EGFR Exon 20 Insertion-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Progressing on Platinum Chemotherapy: Initial Results from the CHRYSALIS Phase I Study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2021; 39:3391–402. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.3391>.
106. Huang J, Meng L, Yang B, Sun S, Luo Z, Chen H. Safety Profile of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: A Disproportionality Analysis of FDA Adverse Event Reporting System. *Scientific Reports*. 2020 Dec 1;10(1).
107. Hopkins AM, Wagner J, Kichenadasse G, Modi N, Rowland A, Sorich MJ. Patient-reported outcomes as a prognostic marker of survival in patients with advanced nonsmall cell lung cancer treated with immunotherapy. 2020.
108. Nagano T, Tachihara M, Nishimura Y. Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy. *Cells*. 2018;7(11):212.
109. Chiba M, Togashi Y, Bannno E, Kobayashi Y, Nakamura Y, Hayashi H, et al. Efficacy of irreversible EGFR-TKIs for the uncommon secondary resistant EGFR mutations L747S, D761Y, and T854A. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–10.
110. Grolleau E, Haddad V, Boissière L, Falchero L, Arpin D. Clinical Efficacy of Osimertinib in a Patient Presenting a Double EGFR L747S and G719C Mutation. *Journal of Thoracic Oncology*. 2019;14(7):e151–3.
111. Kim D, Bach DH, Fan YH, Luu TTT, Hong JY, Park HJ, et al. AXL degradation in combination with EGFR-TKI can delay and overcome acquired resistance in human non-small cell lung cancer cells. *Cell Death and Disease* [Internet]. 2019;10(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1601-6>
112. della Corte CM, Fasano M, Vitagliano D, Troiani T, Martinelli E, Ciardiello F, et al. Role of Hedgehog Pathway in Mediating Resistance to Egfr-Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Annals of Oncology* [Internet]. 2014;25(Supplement 4):iv556. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdu358.35>
113. Bai XY, Zhang XC, Yang SQ, An SJ, Chen ZH, Su J, et al. Blockade of hedgehog signaling synergistically increases sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer cell lines. *PLoS ONE*. 2016;11(3):1–16.
114. Jacobsen K, Bertran-Alamillo J, Molina MA, Teixidó C, Karachaliou N, Pedersen MH, et al. Convergent Akt activation drives acquired EGFR inhibitor resistance in lung cancer. *Nature Communications* [Internet]. 2017;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00450-6>
115. Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of akt and EGFR. *Cancer Research*. 2009;69(8):3256–61.
116. Wu SG, Chang YL, Yu CJ, Yang PC, Shih JY. The role of PIK3CA mutations among lung adenocarcinoma patients with primary and acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibition. *Scientific Reports*. 2016;6(October):1–9.
117. Sequist L v, Waltman BA, Dias-santagata D, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, et al. Genotypic and Histological Evolut. *Sci Transl Med*. 2011;3(75).
118. Suda K et al. CRKL amplification is rare as a mechanism for acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancers with epidermal growth factor receptor mutation. *Lung Cancer*. 85(2):147–51.

119. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–16.
120. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. *Immunity, Inflammation, and Cancer*. Vol. 140, Cell. 2010. p. 883–99.
121. Drpa G, Sutic M, Baranasic J, Jakopovic M, Samarzija M, Kukulj S, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio can predict outcome in extensive-stage small cell lung cancer. *Radiology and Oncology*. 2020 Sep 22;54(4):437–46.
122. (No Title). 2019; Available from: <https://doi.org/10.1002/jcla.22964>
123. Sim SH, Beom S-H, Ahn Y-O, Keam B, Kim TM, Lee S-H, et al. Pretreatment neutrophil-lymphocyte ratio is not a significant prognostic factor in epidermal growth factor receptor-mutant non-small cell lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors. 2015;
124. Aguiar-Bujanda D D-CAS-GSR-SLB-SMH-SM-DSMG-RSL-BJV-PAB-SU. Neutrophil to Lymphocyte Ratio as a Prognostic Factor in European Patients with Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Non-small cell lung cancer Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors. *Oncol Res Treat*. 2018;41(12):755–61.
125. Phan TT, Trong Ho T, Nguyen T, Nguyen T, Tran TB, Nguyen T. The prognostic impact of neutrophil to lymphocyte ratio in advanced non-small cell lung cancer patients treated with eGFr TKI. *International Journal of General Medicine [Internet]*. 2018;11–423. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/IJGM.S174605>
126. (No Title).
127. Jakobsen KR, Demuth C, Sorensen BS, Nielsen AL. The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*. 2016;5(2):172–82.
128. Karacosta LG, Anchang B, Ignatiadis N, Kimmey SC, Benson JA, Shrager JB, et al. Mapping lung cancer epithelial-mesenchymal transition states and trajectories with single-cell resolution. *Nature Communications*. 2019 Dec 1;10(1).
129. Vazquez-Martin A, Cufí S, Oliveras-Ferraros C, Torres-Garcia VZ, Corominas-Faja B, Cuyàs E, et al. IGF-1R/epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) crosstalk suppresses the erlotinib-sensitizing effect of EGFR exon 19 deletion mutations. *Scientific Reports*. 2013;3:1–15.
130. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. Vol. 8, *Cells*. NLM (Medline); 2019.
131. Du B, Shim JS. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer. *Molecules*. 2016;21(7).
132. Xiao D, He J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*. 2010;2(3):154–9.
133. Zhu X, Chen L, Liu L, Niu X. EMT-Mediated Acquired EGFR-TKI Resistance in NSCLC: Mechanisms and Strategies. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
134. Lee AF, Chen MC, Chen CJ, Yang CJ, Huang MS, Liu YP. Reverse epithelial-mesenchymal transition contributes to the regain of drug sensitivity in tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small cell lung cancer cells. *PLoS ONE*. 2017 Jul 1;12(7).

135. Yuan X, Wu H, Han N, Xu H, Chu Q, Yu S, et al. Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: Biological significance and therapeutic application. *Journal of Hematology and Oncology*. 2014;7(1).
136. Xu J, Bie F, Wang Y, Chen X, Yan T, Du J. Prognostic value of IGF-1R in lung cancer A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (United States)*. 2019;98(19).
137. Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Research*. 2005;65(20):9455–62.
138. Wang M, Liu Y, Qian X, Wei N, Tang Y, Yang J. Downregulation of occludin affects the proliferation, apoptosis and metastatic properties of human lung carcinoma. *Oncology Reports*. 2018 Jul 1;40(1):454–62.
139. Petecchia L, Sabatini F, Usai C, Caci E, Varesio L, Rossi GA. Cytokines induce tight junction disassembly in airway cells via an EGFR-dependent MAPK/ERK1/2-pathway. *Laboratory Investigation*. 2012 Aug;92(8):1140–8.
140. IJCEP1201001 [Internet]. Available from: www.ijcep.com
141. Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. Vol. 1788, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier; 2009. p. 872–91.
142. ECOG_performance_status.
143. Ding PN, Lord SJ, GebSKI V, Links M, Bray V, Gralla RJ, et al. Risk of Treatment-Related Toxicities from EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors: A Meta-analysis of Clinical Trials of Gefitinib, Erlotinib, and Afatinib in Advanced EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. In: *Journal of Thoracic Oncology*. Elsevier Inc; 2017. p. 633–43.
144. 21-5-1287.
145. Cavic M, Krivokuca A, Pavlovic M, Boljevic I, Rakobradovic J, Mihajlovic M, et al. EGFR mutation testing from liquid biopsy of non-small cell lung cancer at the Institute for Oncology and Radiology of Serbia. *JBUON*. 2020;25(6):2635–42.
146. cavicl.
147. Zhang Y-L, Yuan J-Q, Wang K-F, Fu X-H, Han X-R, Threapleton D, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis [Internet]. Vol. 7, *Oncotarget*. 2016. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
148. Winfree KB, Molife C, Peterson PM, Chen Y, Visseren-Grul CM, Leusch MS, et al. Real-world characteristics and outcomes of advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR exon 19 deletions or exon 21 mutations. Available from: www.futuremedicine.com
149. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. Vol. 61, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2020. p. 167–79.
150. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. Vol. 61, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2020. p. 167–79.
151. Recondo G, FF, OKA et al. Making the first move in EGFR-driven or ALK-driven NSCLC: first-generation or next-generation TKI? *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018; 15:694–708.
152. Chen Z, Feng J, Saldivar J-S, Gu D, Sommer SS. EGFR somatic doublets in lung cancer are frequent and generally arise from a pair of driver mutations uncommonly seen as singlet mutations:

- one-third of doublets occur at five pairs of amino acids. *Oncogene* [Internet]. 2008; 27:4336–43. Available from: www.EGFR.org
153. Tong Y-S, Tan J, Zhou X-L, Song Y-Q, Song Y-J. Systemic immune-inflammation index predicting chemoradiation resistance and poor outcome in patients with stage III non-small cell lung cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2017; 15:221.
154. (No Title). 2019; Available from: <https://doi.org/10.1002/jcla.22964>
155. Deng C, Zhang N, Wang Y, Jiang S, Lu M, Huang Y, et al. High systemic immune-inflammation index predicts poor prognosis in advanced lung adenocarcinoma patients treated with EGFR-TKIs. 2019; Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000016875>
156. (No Title).
157. Sim SH, Beom S-H, Ahn Y-O, Keam B, Kim TM, Lee S-H, et al. Pretreatment neutrophil-lymphocyte ratio is not a significant prognostic factor in epidermal growth factor receptor-mutant non-small cell lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors. 2015.
158. Oya Y, Yoshida T, Asada K, Oguri T, Inui N, Morikawa S, et al. Clinical utility of liquid biopsy for EGFR driver, T790M mutation and EGFR amplification in plasma in patients with acquired resistance to afatinib. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07777-2>
159. Phan TT, Trong Ho T, Nguyen T, Nguyen T, Tran TB, Nguyen T. The prognostic impact of neutrophil to lymphocyte ratio in advanced non-small cell lung cancer patients treated with eGFr TKI. *International Journal of General Medicine* [Internet]. 2018;11–423. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/IJGM.S174605>
160. Uk Lim J, Dong Yeo C, seon Kang H, Kwon Park C, sang Kim J, Woo Kim J, et al. elevated pretreatment platelet-to-lymphocyte ratio is associated with poor survival in stage IV non-small cell lung cancer with malignant pleural effusion. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41289-9>
161. (No Title).
162. Zheng W, Munder M, Birge RB, Jung K, Jeong J, Suh Y. Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* [Internet]. 2019; 10:1817. Available from: www.frontiersin.org
163. Chen Y-M, Lai C-H, Chang H-C, Chao T-Y, Tseng C-C, Fang W-F, et al. Baseline and Trend of Lymphocyte-to-Monocyte Ratio as Prognostic Factors in Epidermal Growth Factor Receptor Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with First-Line Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. 2015.
164. Watanabe K, Yasumoto A, Amano Y, Kage H, Goto Y, Yatomi Y, et al. Mean platelet volume and lymphocyte-to-monocyte ratio are associated with shorter progression-free survival in EGFR-mutant lung adenocarcinoma treated by EGFR tyrosine kinase inhibitor. *PLoS ONE*. 2018 Sep 1;13(9).
165. Lan H, Zhou L, Chi D, Zhou Q, Tang X, Zhu D, et al. *Oncotarget* 35301 www.impactjournals.com/oncotarget Preoperative platelet to lymphocyte and neutrophil to lymphocyte ratios are independent prognostic factors for patients undergoing lung cancer radical surgery: A single institutional cohort study [Internet]. Vol. 8, *Oncotarget*. 2017. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
166. Chen YM, Lai CH, Rau KM, Huang CH, Chang HC, Chao TY, et al. Impact of clinical parameters and systemic inflammatory status on epidermal growth factor receptor-mutant non-small

cell lung cancer patients readministration with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *BMC Cancer*. 2016 Nov 8;16(1).

167. Stoiber D, Assinger A. Platelet-Leukocyte Interplay in Cancer Development and Progression. Available from: www.mdpi.com/journal/cells

168. Pavan A, Calvetti L, Dal Maso A, Attili I, Bianco P del, Pasello G, et al. Peripheral Blood Markers Identify Risk of Immune-Related Toxicity in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immune-Checkpoint Inhibitors. 2019; Available from: <http://dx.doi.org/10.1634/>

169. Irwin KE, Greer JA, Khatib J, Temel JS, Pirl WF. Early palliative care and metastatic non-small cell lung cancer: Potential mechanisms of prolonged survival.

170. Wei Y-F, Huang W-T, Liu T-C, Shieh J-M, Chian C-F, Wu M-F, et al. Factors associated with improvement in symptoms and quality of life for first-line EGFR-tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer-A multicenter prospective SMILE study. *Journal of Cancer* [Internet]. 2019;10. Available from: <http://www.jcancer.org://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

171. Marulli G, Battistella L, Mammana M, Calabrese F, Rea F. Superior sulcus tumors (Pancoast tumors). Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2016.06.16>

172. Kuchuk M, Kuchuk I, Sabri E, Hutton B, Clemons M, Wheatley-Price P. The incidence and clinical impact of bone metastases in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2015;89(2):197–202.

173. Bazhenova L, Newton P, Mason J, Bethel K, Nieva J, Kuhn P. Adrenal Metastases in Lung Cancer Clinical Implications of a Mathematical Model STATE OF THE ART: CONCISE REvIEW. Vol. 9, *Journal of Thoracic Oncology* ® • 2014.

174. 9241544821.

175. Fallon M, Giusti R, Aielli F, Hoskin P, Rolke R, Sharma M, et al. Management of cancer pain in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*. 2018 Oct 1;29: iv166–91.

176. Bandieri E, Romero M, Ripamonti CI, Artioli F, Sichetti D, Fanizza C, et al. Randomized trial of low-dose morphine versus weak opioids in moderate cancer pain. *Journal of Clinical Oncology*. 2016 Feb 10;34(5):436–42.

177. King SJ RCFKHG. A systematic review of oxycodone in the management of cancer pain. *Palliative Medicine*. 2011;25(5):454–70.

178. PigniA BCCA. The role of hydromorphone incancer pain treatment:a systematic review. *Palliative Medicine*. 2011;25(5).

179. Lutz S, Balboni T, Jones J, Lo S, Petit J, Rich SE, et al. Palliative radiation therapy for bone metastases: Update of an ASTRO Evidence-Based Guideline. *Practical Radiation Oncology*. 2017 Jan 1;7(1):4–12.

180. Antonio CD', Passaro A, Gori B, Signore E del, Migliorino MR, Ricciardi S, et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology Bone and brain metastasis in lung cancer: recent advances in therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. 2014;6(3):101–14. Available from: <http://tam.sagepub.comhttp://www.sagepub.co.uk/>

181. Winther-Larsen A FEEMPSB. EGFR gene polymorphism predicts improved outcome in patients with EGFR-mutation positive non-small cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*. 2019;20(3):161–6.

182. Castellanos E, Feld E, Horn L. Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. Vol. 12, *Journal of Thoracic Oncology*. Elsevier Inc; 2017. p. 612–23.
183. Xu J, Bie F, Wang Y, Chen X, Yan T, Du J. Prognostic value of IGF-1R in lung cancer A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (United States)*. 2019;98(19).
184. Wang R, Yamada T, Kita K, Taniguchi H, Arai S, Fukuda K, et al. Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18442-4>
185. Cappuzzo F, Tallini G, Finocchiaro G, Wilson RS, Ligorio C, Giordano L, et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) expression and survival in surgically resected non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. *Annals of Oncology*. 2009 Sep 18;21(3):562–7.
186. Xing R, Zheng J, Zheng W, Qin Z, Liu W, Yao R. Relevance of E-cadherin expression to EGFR-TKI molecular targeted therapy sensitivity/resistance and its clinical significance. *Genetics and Molecular Research [Internet]*. 2015;14(2):5785–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.May.29.10>
187. Zhou J, Wang J, Zeng Y, Zhang X, Hu Q, Zheng J, et al. Implication of epithelial-mesenchymal transition in IGF1R-induced resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer [Internet]. Vol. 6. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
188. Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, et al. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(24):8686–98.
189. Rho JK et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer*. 2008;63(2):219–26.
190. Zhang X, Liu G, Kang Y, Dong Z, Qian Q, Ma X. N-Cadherin Expression Is Associated with Acquisition of EMT Phenotype and with Enhanced Invasion in Erlotinib-Resistant Lung Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*. 2013 Mar 8;8(3).
191. ajcr0000074 [Internet]. Available from: www.ajcr.us
192. Eguchi H, Akizuki R, Maruhashi R, Tsukimoto M, Furuta T, Matsunaga T, et al. Increase in resistance to anticancer drugs involves occludin in spheroid culture model of lung adenocarcinoma A549 cells OPEN. Avail

Spisak skraćenica

AIDS (od eng.-acquired Immune Deficiency Syndrom),
AIS adenokarcinom in situ,
Bcl-2 (od eng.-B-cell CLL/lymphoma 2),
cDNA komplementarnu DNK,
CE-IVD cobas® EGFR Mutation Test,
CHRNA5 (od eng.-cholinergic receptor nicotinic alpha 5),
CHRNA3 (od eng.- cholinergic receptor nicotinic alpha 3),
CISH (od eng.-chromogenic in situ hybridization),
c-MET C- mezenhimalnoepitelni faktor tranzicije,
C-myc (od eng.-myc-v-myc avian, myelocytomatosis viral oncogene homolog 1
EGF (od eng.-epidermal growth factor),
EGFR (od eng.- epidermal growth factor receptor),
EMT- epitelijalno-mezenhimalna tranzicija;
ErbB2/HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ErbB3/HER3 Human Epidermal Growth Factor Receptor 3
ErbB4/HER4 Human Epidermal Growth Factor Receptor 4 ERS (od eng. - European Respiratory Society),
FISH fluorescentna in situ hibridizacija,
FR faktor rasta
HER2 – receptor humanog epidermalnog faka rasta;
IATSL (od eng.- International Association for the Study of Lung Cancer),
KRAS (od eng.-homologous to the oncogene of the Kirsten rat sarcoma virus),
LP lepidični,
MAPK Ras/Raf/mitogen-aktivirajuća protein kinaza,
MET – factor mezenhimalno-epitelijalne tranzicije;
MIA minimalno invazivni adenokarcinom,
NRAS (od eng.-neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene)
NSCLC (od eng.- non-small cell lung cancer) OS (od eng.-overall survival)
SCLC – sitnoćeijski karcinom pluća.
PCR (od eng.-polymerase chain reaction),
PFS (od eng.-progression free-suvirval).
PI3K/Akt/mTOR fosfatidilinozitol- 3-kinaza,
PNS Paraneoplastični sindrom,
RT- PCR (od eng.-Reverse transcription -PCR),
SZO Svetska zdravstvena organizacija,
TGF- α transformišući faktor rasta- α ,
TKI Tirozin kinaza inhibitori,
TNM (od eng.-tumour lymph nodes metastasis),
TTF-1 (od eng.-thyroid transcription factor-1),
VATS videoasistirana torakoskopija,

VEGF vaskularni endotelni faktor rasta,
VMS videoasistirana medijastinoskopija,
WT (od eng.- wild type),

Biografija kandidata

Dr Vera Jokić rođena je 28.10.1990. godine u Požarevcu. Od 2009-2015 pohađala je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu. Osnovne akademske studije završila je kao jedan od najboljih studenata u generaciji sa prosekom 9,54. Tokom studija dobila je više nagrada i stipendija među kojima se izdvajaju nagrada Ass. Dr Zorana Penezić za najboljeg studenta 4. godine osnovnih akademskih studija iz oblasti interne medicine i Dositejeva stipendija za 500 najboljih studenata završne godine svih visokoškolskih ustanova u zemlji Srbiji.

Nakon završetka osnovnih akademskih studija 2015. godine upisala je doktorske akademske studije iz oblasti medicinska farmakologija, a doktorska teza pod naslovom "*Ispitivanje kliničkih i genetičkih prediktivnih faktora efikasnosti terapije inhibitorima tirozin kinaza (TKI) pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća*" odobrena joj je 2019. godine. Mentor doktorske disertacije je prof. dr Katarina Savić-Vujović, a komentor dr sci. Milena Čavić. Članovi komisije u sastavu doc. dr Branislava Medić (Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu), dr sci. Radmila Janković, naučni savetnik (Institut za onkologiju i radiologiju Srbije - IORS) i doc. dr Bojan Zarić (Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu).

Nakon završetka obaveznog kliničkog staža upisala je specijalističke studije iz interne medicine, nakon čega se zaposlila kao lekar opšte prakse u Opštoj bolnici Bel Medic gde je radila godinu dana. Od maja 2017. radila je kao klinički lekar Dnevne bolnice za hemioterapiju, Klinike za medikalnu Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS). Tokom rada na IORSu bila je učesnik brojnih stručnih sastanaka u organizaciji evropskih i svetskih onkoloških društava na kojim je imala prilike da prezentuje oralne i poster prezentacije. Na stručnim sastancima za mlade onkologe u organizaciji Evropskog onkološkog društva (ESO) Sarajevu oktobra 2018. godine, Evropskog udruženja medikalnih onkologa (ESMO) u Beogradu juna 2018. godine i Američko-austrijske fondacije (AAF) u Gracu 2019. godine dobila je nagrade za najbolju oralnu prezentaciju prikaza slučajeva pacijenata.

Marta 2021. godine objavila je rad pod nazivom Hematological parameters in EGFR-mutated advanced NSCLC patients treated with TKIs: predicting survival and toxicity kao prvi autor u časopisu Expert Review of Anticancer Therapy čime je stekla uslov za odbranu doktorske disertacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

U dosadašnjem naučnom radu objavila je 4 radova in extenso, prikazala 7 poster prezentacija i 9 oralnih prezentacija.

Krajem 2019. godine preselila se u Sjedinjene Američke Države. Nakon položenog državnog stručnog ispita za lekare pod nazivom The United States Medical Licensing Examination (USMLE Step 1, Step 2CK) i stručnog ispita za engleski jezik za lekare (Occupational English Examination - OET) u 2020. i 2021. dobila je sertifikat za lekare koji su studije medicine završili van SAD (Educational Commission for Foreign Medical Graduates - ECFMG), čime je stekla uslov za otpočinjanje specijalizacije iz interne medicine u julu 2022. godine.

Udata je i majka dečaka od godinu dana kom u slobodno vreme voli da svira čelo.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: dr Vera Jokić

Broj indeksa: MF 02/15

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom

“Ispitivanje kliničkih i genetičkih prediktivnih faktora efikasnosti terapije inhibitorima tirozin kinaza pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini i u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 15.03.2022.

Potpis doktoranda

____*Vera Jokić*____

dr Vera Jokić

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: dr Vera Jokić

Broj upisa: MF 02/15

Studijski program: medicinska farmakologija

Naslov rada: *Ispitivanje kliničkih i genetičkih prediktivnih faktora efikasnosti terapije inhibitorima tirozin kinaza pacijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća*

Mentor: Prof. dr Katarina Savić-Vujović

Komentor: dr sci Milena Čavić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.03.2022.

____*Vera Jokić*____

dr Vera Jokić

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: *“Ispitivanje kliničkih i genetičkih prediktivnih faktora efikasnosti terapije inhibitorima tirozin kinaza acijenata sa uznapredovalim adenokarcinomom pluća”* koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.3.2022.

Vera Jokić

dr Vera Jokić