Citološka subtipizacija karcinoma pluća nemalih stanica

Bandjak, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:712953

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Bandjak

CITOLOŠKA SUBTIPIZACIJA KARCINOMA PLUĆA NEMALIH STANICA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ana Bandjak

CITOLOŠKA SUBTIPIZACIJA KARCINOMA PLUĆA NEMALIH STANICA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju Kliničkog bolničkog centra u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Branka Lončar, dr. med.

Rad ima 31 list, 9 tablica i 0 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Epidemiologija i etiologija raka pluća 1

1.1.1.Histološka i citološka klasifikacija raka pluća 1

1.2. Subtipizacija karcinoma pluća 3

1.3. Citološki uzorci u dijagnostici raka pluća 3

1.4. Imunocitokemija 4

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 6

3. MATERIJALI I METODE 7

3.1. Ustroj studije 7

3.2. Ispitanici 7

3.3. Metode 7

3.3.1. Standardna metoda bojenja 7

3.3.2. Imunocitokemija/protutijela 8

3.4. Statističke metode 10

4. REZULTATI 11

5. RASPRAVA 20

6. ZAKLJUČCI 24

7. SAŽETAK 25

8. SUMMARY 26

9. LITERATURA 27

10. ŽIVOTOPIS 31

POPIS KRATICA:

EGFR - receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

ALK – (engl. *anaplastic lymphoma kinase*)

NSCLC - karcinom pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*)

NSCLC-NOS – karcinom pluća ne malih stanica, nespecificirani/koji nije drugačije specificiran – (engl. *non-small cell lung cancer – non otherwise specified*)

SCLC - karcinom pluća malih stanica (engl. *small-cell lung cancer)*

TTF-1 - Anti-tiroidni transkripcijski faktor-1

Ber-EP - Epitelijalni specifični antigen

CK 7- Anti-citokeratin 7

CK 20 - Anti-citokeratin 20

1. UVOD

1.1 Epidemiologija i etiologija raka pluća

Rak pluća već nekoliko desetljeća najčešća je zloćudna bolest u svijetu (1,8 milijuna novih slučajeva u 2012. godini), najčešće sijelo karcinoma u muškaraca i najčešći uzrok smrti od raka diljem svijeta s 1,59 milijuna smrtnih ishoda na godinu (omjer smrtnosti i pojavnosti je 0,87) (1).

Prema podacima Hrvatskog registra za rak, rak pluća vodeća je zloćudna bolest u muškaraca, a u žena je prema učestalosti na trećem mjestu. U 2014. godini dijagnosticirano je 2909 novih bolesnika s rakom pluća, uz incidenciju 67,9/100.000 stanovnika. Smrtnost od raka pluća i dalje je izrazito visoka. Godine 2014. od raka pluća umrlo je 2829 oboljelih, što je vodeći uzrok smrti od zloćudnih bolesti u Republici Hrvatskoj (2).

S obzirom na visoku smrtnost od raka pluća (samo 17,4 % oboljelih živi pet godina nakon dijagnoze bolesti), najrelevantnija svjetska stručna onkološka društva preporučila su probir za rano otkrivanje raka pluća kod osoba visokog rizika (dob 55 – 74 godine, pušenje više od 30 paketa na godinu). Metoda probira niskodozni je CT, čime je zabilježeno sniženje stope smrtnosti za 20 %. U Republici Hrvatskoj ne postoji program ranog otkrivanja raka pluća (3).

Etiologija bolesti nije potpuno razjašnjena, ali poznati su rizični čimbenici koji mogu pogodovati razvoju bolesti. Rizični čimbenici su: pušenje cigareta, izloženost azbestu, arsenu, kromu, niklu, beriliju, ugljikovodicima, onečišćenost atmosfere, zračenje, ožiljci, manjkavost prehrane, nedostatak vitamina A, C, E i genska predispozicija (4).

1.1.1.Histološka i citološka klasifikacija raka pluća

Dijagnoza se postavlja na osnovi patohistološke (preferencijalno)/citološke potvrde bolesti. Patohistološka se dijagnoza najčešće postavlja analizom uzorka tkiva dobivenog bronhoskopijom (otisak ekscidirane sluznice) ili transtorakalnom biopsijom pod kontrolom CT-a ili UZ-a. (5)

Patohistološku verifikaciju potrebno je učiniti prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2015. godine (3, 6, 7). Prema toj klasifikaciji, karcinom pluća dijeli se na

karcinom pluća malih stanica (engl. *small-cell lung cancer* – SCLC), koji se dijagnosticira u 15 – 20 % slučajeva i karcinom pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer* – NSCLC), koji se dijagnosticira u 75 – 80 % bolesnika. Karcinom pluća nemalih stanica dalje se dijeli na histološke podtipove: adenokarcinom, karcinom pluća pločastih stanica te velikostanični karcinom. Kod neskvamoznog karcinoma pluća nužno je učiniti i molekularnu analizu prognostičkih i prediktivnih biobiljega, mutacije u genu za receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. epidermal growth factor receptor – EGFR) te translokacije u genu ALK (engl. anaplastic lymphoma kinase) (3, 6).

Unatoč primjeni novih, poboljšanih dijagnostičkih metoda, karcinom se pluća patohistološki ne uspijeva uvijek subklasificirati, što rezultira dijagnozom slabo diferenciranog karcinoma - karcinoma pluća nemalih stanica, nespecificirani/koji nije drugačije specificiran - NSCLC-NOS (engl. non-small cell lung cancer – non otherwise specified). Patohistološke nespecificirane (NOS) dijagnoze često su posljedica izrazito malih bioptičkih uzoraka i vrlo heterogenih tumora koji ograničavaju dosljednost i točnost subklasifikacije. U mnogim je istraživanjima istaknuta činjenica da je NOS nepovoljan nezavisni prognostički čimbenik te da je povezan s agresivnom biologijom tumora (8).

Od ukupnog broja pacijenata s NSCLC, 22,1 % pacijenata ima NOS koji je najčešće dijagnosticiran citološki, 37,0 % ima najlošije petogodišnje preživljenje (5,8 %) te medijan ukupnog preživljenja (OS, 5 mjeseci) među svim NSCLC karcinomima (8).

Karcinom velikih stanica (engl, large cell carcinoma - LCC) samo je opisni izraz koji ukazuje na podtip karcinoma pluća bez specifičnih obilježja raka pluća malih stanica (engl, small cell lung carcinoma - SCLC), adenokarcinoma (engl, adenocarcinoma - ADC) ili karcinoma skvamoznih stanica (engl, squamous cell carcinoma - SQC). Ova se dijagnoza postavlja samo na kirurškim uzorcima. Većina karcinoma velikih stanica (LCC/NSCLC-NOS) eventualno se može ponovno klasificirati uz pomoć imunohistokemije i/ili molekularnih metoda kako bi se zadovoljili kriteriji personalizirane terapije – pravog lijeka u pravom trenutku za pojedinog bolesnika (9).

Prema Smjernicama za dijagnozu, liječenje i praćenje raka pluća nemalih stanica Hrvatskoga liječničkoga zbora, histološka klasifikacija raka pluća na citološkom, bioptičkom ili operativnom materijalu je nužna jer utječe na terapijski pristup i prognozu. Obzirom da je rak ne samo histološki nego i molekularno heterogena bolest, preoperativni, definitivni (u slučaju

inoperabilnih tumora) patohistološki nalaz bioptata treba sadržavati: histološki tip, status EGFR-a (za neskvamozne, za skvamozne kada se radi o nepušačima i/ili mladim bolesnicima te miješane tumore), status ALK (za neskvamozne, za skvamozne kada se radi o nepušačima i/ili mladim bolesnicima te miješane tumore) (5).

1.2. Subtipizacija karcinoma pluća

Planocelularni se karcinom smatra općenito najčešćim podtipom (30-50 %), zatim adenokarcinom (15-30 %), karcinom malih stanica (15-30 %) i velikostanični nediferencirani karcinom (5-15 %) ovisno o prirodi analiziranog materijala.

Uočene su promjene u prevalenciji, npr. povećanje adenokarcinoma i to osobito u žena pušača u SAD-u, do točke gdje je adenokarcinom postao najčešći tip karcinoma, a povećanje planocelularnih karcinoma i karcinoma malih stanica u usporedbi s adenokarcinomom u Japanu (10).

Glavna je uloga patologa razlikovati karcinom malih stanica od karcinoma pluća nemalih stanica. Uz adekvatan uzorak za analizu, dosljednost u razlikovanju karcinoma malih stanica od karcinoma pluća nemalih stanica iznosi do 90 % (10).

U karcinomima pluća nemalih stanica stadij proširenosti bolesti je najvažniji prognostički čimbenik. U karcinomu pločastog epitela stupanj diferencijacije je od utjecaja na preživljenje, za razliku od stupnja diferencijacije adenokarcinoma. Stopa preživljenja kod bolesnika sa velikostaničnim karcinomom lošija je nego u bolesnika sa pločastim i adenokarcinomom pluća (10).

Subtipizacija elektronskim mikroskopom ukazuje na neke razlike u odnosu na subtipizaciju karcinoma svjetlosnim mikroskopom; ta različitost ne pokazuje biološku ili kliničku značajnost u rutinskoj praksi, ali omogućuje bolju subklasifikaciju rijetkih tumora te veću stopu korelacije s tipizacijom s citološkim uzorkom nego s patologijom (10).

1.3. Citološki uzorci u dijagnostici raka pluća

Prema Smjernicama za provođenje minimuma dijagnostičkih postupaka, prije početka liječenja raka pluća za potvrdu bolesti postavlja se citološka dijagnoza, najčešće analizom

iskašljaja, bronhoskopijom (ispirak, otisak, bronhoalveolarna lavaža, obrisak četkicom) i transtorakalnom punkcijom (3, 5).

Punkcija pod kontrolom endoskopskog ultrazvuka (endobronhalna punkcija peribronhalnih i medijastinalnih limfnih čvorova) najpoželjnija je citološka tehnika jer citološkom analizom tako dobivenih uzoraka moguće je odrediti ne samo tip već i proširenost raka pluća. Do 40 % svih postavljenih dijagnoza uznapredovalog karcinoma pluća nemalih stanica dijagnosticira se isključivo citologijom. Citološka je dijagnoza ne samo jednako vrijedna patohistološkoj dijagnozi u subtipizaciji raka pluća nemalih stanica nego i predstavlja minimalno invazivnu metodu za prikupljanje tumorskog materijala potrebnog za analizu biomarkera u bolesnika sa recidivom raka ili metastazama (11).

Uzorci dobiveni navedenim tehnikama najčešće su razvučeni na stakalce ili centrifugirani (ukoliko je dobiven tekući materijal) te bojeni standardnim metodama. U mnogim se laboratorijima kao standardna metoda obrade koristi jedna od metoda tekućinske citologije ili metoda staničnog bloka. Tekućinska citologija način je obrade uzorka kojim se sadržaj iz igle ispire u fiksacijsku otopinu i potom poluautomatiziranom metodom sedimentacije ili filtriranja pripremaju jednoslojni preparati. Metodom staničnog bloka uzorci fiksirani u formalinu uklapaju se u parafin, a pogodna je i za dodatnu imunocitokemijsku analizu i analizu biomarkera. Prednost je staničnih blokova u dugotrajnom skladištenju uz očuvanje kvalitete DNA ili proteina, kao i u mogućnosti pravljenja većeg broja preparata (11).

1.4. Imunocitokemija

U posljednjih nekoliko godina dijagnostika primarnih i metastatskih karcinoma pluća sve je izazovnija. Iako se polazišna točka za postavljanje dijagnoze temelji na morfološkim karakteristikama, ponekad je teško razlučiti stvarno podrijetlo tumora ukoliko je on slabo diferenciran ili se morfološki preklapa s drugim sličnim entitetima. Metoda imunocitokemije primjenjuje se za klasifikaciju tumora i detekciju specifičnih stanica u svrhu određivanja podrijetla primarnog ili sekundarnog tumora (12). Upotreba metode u subtipizaciji raka pluća nemalih stanica dijagnostički je standard u mnogim citološkim laboratorijima (11).

Citološki uzorak može biti jedini dostupan uzorak u bolesnika s karcinomom. Mnogi se pomoćni testovi izvode na histološkim uzorcima te se oni sada mogu primijeniti i na citološkim uzorcima. Imunocitokemija može se izvoditi na većini citoloških uzoraka kao što

su izljevi, tankoigleni aspirati ili na spontano odljuštenim stanicama. Antigeni citoplazmatske su membrane u takvim uzorcima lako dostupni. Lokalizacija određenih intracitoplazmatskih i intranuklearnih antigena mogu zahtijevati dodatne korake za poboljšanje stanične propusnosti u otiscima, razmazima i centrifugiranim uzorcima. Fiksacija i očuvanje antigena ključni su predanalitički koraci za uspješnu izvedbu imunocitokemijskog bojenja. Bojenju prethodi fiksacija citoloških uzoraka (2 do 10 minuta) u fiksativu kao što su alkohol ili puferirani formalin. Fiksacija koja traje danima ili tjednima može smanjiti imunocitokemijsku osjetljivost antigena u određivanju specifičnih antigena. U svakom imunocitokemijskom bojenju potrebno je imati pozitivnu i negativnu kontrolu. (13). Preuzeti imunohistokemijski protokoli izvor su najčeših pogrešaka kao što su neprikladni kontrolni uzorak i neusklađena koncentracija, pri čemu se najčešće u obzir ne uzima činjenica da se radi o različitim fiksacijskim otopinama (14).

Odabir odgovarajućeg antigena ovisi o nekoliko čimbenika koji uključuje kliničke nalaze, citomorfološke karakteristike, diferencijalnu dijagnozu, vjerojatnost određene neoplazme koja se pojavljuje na određenoj anatomskoj lokaciji i dobnoj skupini. Dobiveni rezultat je potrebno uklopiti u konačnu dijagnozu, uzimajući u obzir prediktivne vrijednosti odabranog antigena, osjetljivost i mogućnost tehničke i analitičke pogreške (13).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

• odrediti učestalost pojedinih citoloških tipova karcinoma pluća dijagnosticiranih u Zavodu za kliničku citologiju KBC Osijek u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 31. prosinca 2017. godine.

• utvrditi postoji li razlika između citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica obzirom na spol i dob pacijenta

• utvrditi imunocitokemijska bojenja korištena u citološkoj subtipizaciji karcinoma pluća nemalih stanica

• odrediti podudarnost citologije karcinoma pluća nemalih stanica usporedbom s patohistološkim nalazom iste promjene

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao presječno istraživanje (15).

3.2. Ispitanici

U istraživanje su uključeni ispitanici čiji su bronhoskopski uzorci i uzorci dobiveni transtorakalnom punkcijom tankom iglom pregledani u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju KBC Osijek u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 31. prosinca 2017. godine te im je postavljena citološka dijagnoza malignog tumora pluća. Kao baza podataka korištena je postojeća medicinska dokumentacija Kliničkog zavoda za kliničku citologiju KBC Osijek i arhiva nalaza Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku.

3.3. Metode

Ispitanicima su određeni: dob (godine), spol, citološki tip karcinoma, imunocitokemijska protutijela korištena u subtipizaciji i patohistološka dijagnoza. Patohistološka dijagnoza istog tumora postavljena je na bioptičkom ili resekcijskom materijalu fiksiranom u formalinu, uklopljenom u parafinske kocke, bojenom standardnim hemalaun eozin bojenjem i dodatnim imunohistokemijskim, a u skladu s važećom klasifikacijom Svjetske zdravstvene organizacije.

3.3.1. Standardna metoda bojenja

Citološki uzorci dobiveni su bronhoskopski i transtorakalnom punkcijom tankom iglom, razmazani/sedimentirani su na predmetna stakla i fiksirani sušenjem na zraku. Nakon procjene kvalitete razmaza pertorakalnog punktata po jedan razmaz je bojen matodom po May Grünwald Giemsa (MGG) kao i dva sedimenta aspirata i dva razmaza dobivenih četkanjem bronha.

U bojenju metodom May-Grünwald Giemsa koriste se otopina May Grünwald (metilensko modrilo i kiseli eozin otopljen u metanolu) i otopina Giemsa (azur II-eozin i azur II otopljen u glicerinu i metanolu). Postupak bojenja osušenih razmaza je:

1. otopina May Grünwald 3 minute
2. ispiranje destiliranom vodom 1 minutu
3. otopina Giemsa 20 minuta
4. isprati destiliranom vodom 1 - 2 minute
5. postavljanje preparata u kosi položaj na žičane predloške
6. sušenje preparata na zraku

3.3.2. Imunocitokemija/protutijela

Dio je neobojenih razmaza nakon 24-satne fiksacije na zraku imunocitokemijski obrađen. Uzorci su bojeni na uređaju Ventana BenchMark GX (Roche, SAD) (16).

Imunocitokemija je spoj imunoloških i histoloških metoda čiji je princip vezivanje specifičnog protutijela na ciljni antigen, a nakon toga očitavanje karakterističnog signala koji se vidi kao smeđe obojenje (17). Prednost u rutinskim dijagnostičkim postupcima ima indirektna metoda koja je složenija, ali značajno jeftinija u odnosu na direktnu metodu. Indirektna metoda sastoji se od dva koraka, u prvom dolazi do vezivanja specifičnog neobilježenog protutijela na ciljni antigen, a u drugom se veže obilježeno protutijelo koje omogućava vizualizaciju reakcije (18).

Korišten je mali panel protutijela, najčešće dva do tri protutijela.

Korištena su sljedeća protutijela namijenjena za in vitro dijagnostiku:

- Antitiroidni transkripcijski faktor-1 (TTF-1) – (SP141; Ventana Medical Systems)

Antitiroidni transkripcijski faktor-1 mišje je monoklonsko primarno protutijelo usmjereno protiv proteina transkripcijskog faktora štitnjače. Ovo protutijelo pokazuje nuklearnu aktivnost i koristi se za pomoć u klasifikaciji neoplazmi pluća i štitnjače (16).

- Epitelijalni specifični antigen (Ber-EP4) (Cell Marque Corporation)

Ber-EP4 sastoji se od dva glikoproteina. Glikoproteini se nalaze na površini stanične membrane i u citoplazmi gotovo svih epitelnih stanica s iznimkom većine skvamoznih epitela (19).

- Anti-citokeratin 5/6 **(**D5&16B4;Ventana Medical Systems)

Mišje je primarno monoklonsko protutijelo koje detektira citokeratin 5 i 6. Ovo protutijelo pokazuje citoplazmatsko obojenje i može se koristiti za pomoć kod identifikacije karcinoma pločastih stanica te u razlikovanju malignih mezotelioma od adenokarcinoma pluća.

- Anti-citokeratin 7 (CK7) (SP52; Ventana Medical Systems)

Monoklonsko je primarno zečje protutijelo usmjereno na tip II citokeratin proteina izraženih u većini duktalnih, žljezdanih i prijelaznih epitela te pokazuje citoplazmatsku lokaciju. Može se koristiti za identificiranje normalnih i neoplastičnih stanica porijekla jajnika, pluća, dojki, epitela debelog crijeva i prostate.

- Anti-citokeratin 20 (CK20) (SP33; Ventana Medical Systems)

Monoklonsko je primarno zečje protutijelo usmjereno na tip I citokeratin proteina zrelih eneterocita i vrčastih stanica želučane i intestinalne sluznice. Izražava citoplazmatsko obojenje i pomaže u identifikaciji normalnih stanica koje eksprimiraju CK20 i neoplastičnih stanica epitelnih linija debelog crijeva.

- Anti-CD56 (123C3; Ventana Medical Systems)

Monoklonsko je mišje primarno protutijelo pokazuje membransku ili citoplazmatsku obojenost i može se upotrijebiti za pomoć pri identifikaciji karcinoma malih stanica, neuroblastoma i rabdomiosarkoma.

- Kromogranina A (LK2H10; Ventana Medical Systems)

Primarno je monoklonsko mišje protutijelo usmjereno protiv proteina koji se nalaze u sekretornim granulama većine endokrinih stanica.

- Synaptophisin (SP11; Ventana Medical Systems)

Monoklonalno je zečje protutijelo koje pomaže u identifikaciji neuroendokrinih neoplazmi u kombinaciji s drugim ciljanim protutijelima. Obojenje je lokalizirano u citoplazmi. (16)

Za citoplazmatska protutijela dijagnostički je značajna bila pozitivnost u više od 10 % tumorskih stanica (uz napomenu o jačini pozitivnosti – slaba, umjerena, jaka) (20) , a za TTF-1 dijagnostičku je vrijednost imala jasna pozitivnost jezgri bez obzira na postotak pozitivnih stanica (21).

Sve su citološke dijagnoze raka pluća subklasificirane prema preporukama Hratskoga društva za kliničku citologiju, a u skladu s važećom klasifikacijom Svjetske zdravstvene organizacije (22)

3.4. Statističke metode

Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc 12.4.0.0 software (MedCalc, Mariakerke, Belgium) i Microsoft Excel.

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. Kategorijski su podaci analizirani Fisherovim egzaktnim testom. Numerički su podaci prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom, dok je za usporedbe između grupa korišten Kappa test. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

U razdoblju od 1. siječnja 2015. godine do 31. prosinca 2017. godine u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek pregledano je 376 bronhoskopskih uzoraka i 114 uzoraka dobivenih pertorakalnom punkcijom koja je provedena pod kontrolom CT-a ((PTP) 490 pacijenata te je postavljena citološka dijagnoza malignog tumora.

Dijagnoza adenokarcinoma i planocelularnog karcinoma temeljena na jasnim morfološkim karakteristikama postavljena je u 132 (16,9 %) bolesnika. Najčešće postavljena dijagnoza je nalaz nediferenciranog karcinoma NSCLC-NOS, je i u 195 (39,5 %) bolesnika (Tablica 1).

Tablica 1. Raspodjela citološki dijagnosticiranih malignih tumora (pluća) temeljem bronhoskopskih i PTP uzoraka (n = 490)

	Vrsta uzorka		**Ukupno (%)**
	bronhoskopija	**PTP**	
Adenokarcinom	22	27	**49 (10,0)**
Planocelularni karcinom	69	14	**83 (16,9)**
NSCLC – adenokarcinom*	47	13	**60 (12,2)**
NSCLC – planocelularni†	34	4	**38 (7,8)**
NSCLC - NOS‡	154	41	**195 (39,8)**
NSCLC – miješani§	-	1	**1 (0,2)**
NSCLC - neuroendokrini‖	4	-	**4 (0,8)**
Karcinom malih stanica	38	3	**41 (8,4)**
Karcinom neplućnog podrijetla	8	11	**19 (3,9)**
Ukupno (%)	**376 (100)**	**114 (100)**	**490 (100)**

*NSCLC-adenokarcinom – *karcinom pluća ne malih stanica u prilog adenokarcinomu*
†*NSCLC-planocelularni - karcinom pluća ne malih stanica u prilog karcinomu pločastih stanica*
‡*NSCLC-NOS – karcinom pluća ne malih stanica, nespecificirani/bez znakova diferencijacije*
§*NSCLC-miješani- karcinom pluća ne malih stanica miješane, adeno-plano mofologije*
‖*NSCLC-neuroendokrini – karcinom pluća ne malih staniica neuroendokrine morfologije*

U istraživanje je uključeno 430 ispitanika s citološkom dijagnozom karcinoma pluća nemalih stanica, 327 (76 %) muškaraca i 103 (24 %) žena. Medijan dobi bolesnika i bolesnica uključenih u ovo istraživanje bio je 64, 5, interkvartilni raspon 60 – 71. Najmlađi bolesnik pri postavljanju dijagnoze je imao 39 godina, a najstariji 86 godina. Najmlađa je bolesnica imala 33 godine, a najstarija 85 godina. Karcinom pluća nemalih stanica dijagnosticiran je u trostruko više muškaraca u odnosu na žene (Tablica 2).

Tablica 2. Dobna i spolna raspodjela ispitanika (n = 430)

	Muškarci	**Žene**
Broj	327 (75,5 %)	103 (24,5 %)
Medijan	64, 5	64, 5
Interkvartilni raspon	60 - 71	60 - 71

Značajne su razlike u dijagnozi karcinoma nemalih stanica prema spolu, adenokarcinomi su značajno više zastupljeni kod žena, planocelularni kod muškaraca, a NSCLC – NOS također kod muškaraca (Fisherov egzaktni test, P = 0,002) (Tablica 3).

Tablica 3. Raspodjela citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica s obzirom na spol

Citološki nalaz	**Broj (%) u odnosu na spol**		**Ukupno**	**P¶**
	Žene	**Muškarci**		
Adenokarcinom	20 (19,9)	29 (8,9)	49 (11,4)	**0,002**
Planocelularni karcinom	11 (10,7)	72 (22,0)	83 (19,3)	
NSCLC – adenokarcinom*	20 (19,4)	40 (12,2)	60 (14,0)	
NSCLC – planocelularni†	8 (7,8)	30 (9,2)	38 (8,8)	
NSCLC - NOS‡	41 (39,8)	154 (47,1)	195 (45,3)	
NSCLC – miješani§	1 (1,0)	0	1 (0,2)	
NSCLC - neuroendokrini‖	2 (1,9)	2 (0,6)	4 (0,9)	
Ukupno (%)	**103 (100)**	**327 (100)**	**430 (100)**	

*NSCLC-adenokarcinom – *karcinom pluća ne malih stanica u prilog adenokarcinomu;* †*NSCLC-planocelularni - karcinom pluća ne malih stanica u prilog karcinomu pločastih stanica;* ‡*NSCLC-NOS – karcinom pluća ne malih stanica, nespecificirani/bez znakova diferencijacije;* §*NSCLC-miješani- karcinom pluća ne malih stanica miješane, adeno-plano mofologije;* ‖*NSCLC-neuroendokrini – karcinom pluća ne malih staniica neuroendokrine morfologije;*¶Fisherov egzaktni test

Raspodjela citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica kod ispitanica s obzirom na dob statistički je značajna (Fisherov egzaktni test, P = 0,001) (Tablica 4).

Tablica 4. Raspodjela citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica s obzirom na dob ispitanica (N=103)

Citološki nalaz	**Broj (%) žena u odnosu na dob**							**P***
	30-39	**40-49**	**50-59**	**60-69**	**70-79**	**80-89**	**Ukupno (%)**	
Adenokarcinom	1/2	1/7	3	5	7	3/7	20 (19,4)	**0,001**
Planocelularni karcinom	0	1/7	1	7	2	0	11 (10,7)	
NSCLC – adenokarcinom*	0	0	8	8	4	0	20 (19,4)	
NSCLC – planocelularni†	0	2/7	1	2	3	0	8 (7,8)	
NSCLC - NOS‡	0	2/7	**12**	**17**	6	4/7	41 (39,8)	
NSCLC – miješani§	0	0	0	1	0	0	1 (1,0)	
NSCLC - neuroendokrini¶	1/2	1/7	0	0	0	0	2 (1,9)	
Ukupno (%)	**2/2**	**7/7**	**25 (100)**	**40 (100)**	**22 (100)**	**7/7**	**103 (100)**	

*NSCLC-adenokarcinom – *karcinom pluća ne malih stanica u prilog adenokarcinomu;* †*NSCLC-planocelularni - karcinom pluća ne malih stanica u prilog karcinomu pločastih stanica;* ‡*NSCLC-NOS – karcinom pluća ne malih stanica, nespecificirani/bez znakova diferencijacije;* §*NSCLC-miješani- karcinom pluća ne malih stanica miješane, adeno-plano mofologije;* ¶*NSCLC-neuroendokrini – karcinom pluća ne malih staniica neuroendokrine morfologije;*Fisherov egzaktni test

Raspodjela citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica kod ispitanika s obzirom na dob statistički je značajna (Fisherov egzaktni test, P < 0,001) (Tablica 5).

Tablica 5. Raspodjela citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica s obzirom na dob ispitanika (n = 327)

Citološki nalaz	**Broj (%) muškaraca u odnosu na dob**							**P¶**
	30-39	**40-49**	**50-59**	**60-69**	**70-79**	**80-89**	**Ukupno (%)**	
Adenokarcinom	0	1/11	7	12	5	4	29 (8,9)	
Planocelularni karcinom	0	1/11	12	40	14	5	72 (22,0)	
NSCLC – adenokarcinom*	0	3/11	1	19	11	6	40 (12,2)	
NSCLC – planocelularni†	0	3/11	3	9	11	4	30 (9,2)	**< 0,001**
NSCLC - NOS‡	0	3/11	32	69	44	6	154 (47,1)	
NSCLC – miješani§	1/1	0	0	1	0	0	2 (0,6)	
Ukupno (%)	**1/1**	**11/11**	**55 (100)**	**150 (100)**	**85 (100)**	**25 (100)**	**327 (100,00)**	

*NSCLC-adenokarcinom – *karcinom pluća ne malih stanica u prilog adenokarcinomu;* †*NSCLC-planocelularni - karcinom pluća ne malih stanica u prilog karcinomu pločastih stanica;* ‡*NSCLC-NOS – karcinom pluća ne malih stanica, nespecificirani/bez znakova diferencijacije;* §*NSCLC-miješani- karcinom pluća ne malih stanica miješane, adeno-plano mofologije;* ||*NSCLC-neuroendokrini – karcinom pluća ne malih staniica neuroendokrine morfologije;*¶Fisherov egzaktni test

U **56** je ispitanika u istom vremenskom razdoblju učinjena i patohistološka verifikacija bronhopulmonarnog tumora. Citološka subtipizacija karcinoma pluća u minimalnim uvjetima, temeljena isključivo na rutinski bojenim preparatima slabo se podudara s patohistološkom dijagnozom (Kappa = 0,03, 95 % CI -0,1 do 0,14) (Tablica 6).

Tablica 6. Raspodjela citoloških tipova karcinoma pluća u minimalnim uvjetima u odnosu na patohistološku dijagnozu (N=56)

Citološka dijagnoza	**Patohistološka dijagnoza**						**p¶**
	Uredan nalaz /displazija	**Adenokarcinom**	**Planocelularni karcinom**	**NSCLC-NOS‡**	**Karcinom malih st**	**Ukupno (%)**	
Uredan nalaz	0	0	0	0	0	0	**0,03**
Adenokarcinom	0	4	1	1	0	6/56	
Planocelularni karcinom	0	2	11	1	0	14/56	
NSCLC – adenokarcinom*	3	4	1	0	0	8/56	
NSCLC – planocelularni†	1	0	2	0	0	3/56	
NSCLC - NOS‡	0	0	0	0	0	0	
NSCLC – miješani§	1	17	4	1	2	25/56	
Ukupno (%)	**5/56**	**27/56**	**19/56**	**3/56**	**2/56**	**56/56**	

*NSCLC-adenokarcinom – *karcinom pluća ne malih stanica u prilog adenokarcinomu;* †*NSCLC-planocelularni - karcinom pluća ne malih stanica u prilog karcinomu pločastih stanica;* ‡*NSCLC-NOS – karcinom pluća ne malih stanica, nespecificirani/bez znakova diferencijacije;* §*NSCLC-miješani- karcinom pluća ne malih stanica miješane, adeno-plano mofologije;* ||*NSCLC-neuroendokrini – karcinom pluća ne malih staniica neuroendokrine morfologije;*¶ Kappa (95 % CI -0,1 do 0,14)

Početna interpretacija omogućila je određivanje panela protutijela s ciljem postavljanja konačne citopatološke dijagnoze. Citološka subtipizacija nakon primjene imunocitokemijskog panela slabo se podudara s patohistološkim nalazom (Kappa = 0,14, 95 % CI je od - 0,13 do 0,42) (Tablica 7).

Tablica 7. Citološka subtipizacija nakon primjene imunocitokemijskog panela

Citološka dijagnoza	**Patohistološki dijagnoza**							**P¶**
	Uredan nalaz /displazija	**Adenokarcinom**	**Planocelularni karcinom**	**Neuroendokrini karcinom**	**NSCLC-NOS**	**Karcinom malih st**	**Ukupno (%)**	
Adenokarcinom	0	**5**	0	0	**1**	0	6/20	
Planocelularni karcinom	0	0	0	0	0	0	0	
NSCLC – adenokarcinom*	**3**	1	0	0	**1**	0	5/20	
NSCLC – planocelularni†	0	0	0	0	0	0	0	**0,14**
NSCLC – miješani§	0	**1**	0	0	0	0	1/20	
NSCLC - neuroendokrini†	0	0	0	2	0	0	2/20	
NSCLC - NOS‡	0	**2**	3	0	0	1	6/20	
Ukupno (%)	**3/20**	**9/20**	**3/20**	**2/20**	**2/20**	**1/20**	**20/20**	

*NSCLC-adenokarcinom – *karcinom pluća ne malih stanica u prilog adenokarcinomu;* †*NSCLC-planocelularni - karcinom pluća ne malih stanica u prilog karcinomu pločastih stanica;* ‡*NSCLC-NOS – karcinom pluća ne malih stanica, nespecificirani/bez znakova diferencijacije;* §*NSCLC-miješani- karcinom pluća ne malih stanica miješane, adeno-plano mofologije;* II*NSCLC-neuroendokrini – karcinom pluća ne malih stanica neuroendokrine morfologije;*¶ Kappa (95 % CI -0,13 do 0,42)

TTF-1 visoko specifičan marker za primarne adenokarcinome pluća ujedno je i najčešće određivan u 60 (40 %) bolesnika, slijede CK 7 i BerEp4 (Tablica 8).

Tablica 8. Ekspresija pojedinih vrsta protutijela u citološkoj subtipizaciji karcinoma pluća ne malih stanica

Citološki nalaz	**protutijela**							
	CK 7	**CK 20**	**CK 5/6**	**BerEp4**	**TTF-1**	**CD 56**	**Syn/chr***	**drugo†**
Adenokarcinom	14	0	0	19	32	0	0	0
Planocelularni karcinom	1	0	4	0	0	0	0	1
Slabo dif. karcinom nemalih stanica u prilog adenokarcinomu	11	0	2	5	16	0	0	0
Slabo dif.. karcinom nemalih stanica, u prilog planocelularnom karcinomu	0	0	4	0	2	0	0	0
Slabo dif. karcinom nemalih stanica, nespecificirani (NSCLC-NOS)	2	0	5	5	8	2	0	0
Karcinom malih stanica	0	0	0	0	2	13	2	0
Ukupno (%)	**28** (18,7)	**0** (0,0)	**15** (10,0)	**29** (19,3)	**60** (40,0)	**15** (10,0)	**2** (1,3)	**1** (0,7)

*synaptophisin/chromogranin; †drugo: calretinin, CD45, CEA, CK 19, CK 7/8, Estrogen, HMB 45, p63, Thyroglobulin

Uočena je slaba podudarnost citološkog s patohistološkim nalazom u subtipizaciji karcinoma pluća nemalih stanica (Kappa = 0,03; 95 % CI je od -0,08 do 0,15) (Tablica 9).

Tablica 9. Usporedba citološkog i patohistološkog nalaza (n = 74)

		Patohistološka dijagnoza						P*
		Uredan nalaz /displazija	**Adenokarcinom**	**Planocelularni karcinom**	**NSCLC-NOS**	**Karcinom malih st**	**Ukupno (%)**	
Citološka dijagnoza	Adenokarcinom	0	9	1	2	0	**12 (16,2)**	**0,03**
	Planocelularni karcinom	0	2	11	1	0	**14 (18,9)**	
	NSCLC – adenokarcinom*	6	5	1	1	0	**13 (17,6)**	
	NSCLC – planocelularni†	1	0	2	0	0	**3 (4,1)**	
	NSCLC – miješani§	0	1	0	0	0	**1 (1,4)**	
	NSCLC - NOS‡	1	19	7	1	3	**31 (41,9)**	
	Ukupno (%)	**8 (10, 8)**	**36 (48,6)**	**22 (29,7)**	**5 (6,8)**	**3 (4,1)**	**74 (100)**	

*NSCLC-adenokarcinom *– karcinom pluća ne malih stanica u prilog adenokarcinomu;* †*NSCLC-planocelularni - karcinom pluća ne malih stanica u prilog karcinomu pločastih stanica;* ‡*NSCLC-NOS – karcinom pluća ne malih stanica, nespecificirani/bez znakova diferencijacije;* §*NSCLC-miješani- karcinom pluća ne malih stanica miješane, adeno-plano mofologije;* II*NSCLC-neuroendokrini – karcinom pluća ne malih stanica neuroendokrine morfologije;*¶ Kappa (95 % CI -0,08 do 0,15)

5. RASPRAVA

U istraživanje koje je provedeno u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek tijekom dvogodišnjeg razdoblja, uključeno je 490 bolesnika. Postavljena im je dijagnoza malignog tumora pluća, i to iz 376 bronhoskopskih uzoraka i 114 uzoraka dobivenih pertorakalnom punkcijom. Citologija je od velikog dijagnostičkog značenja u dijagnostici karcinoma pluća jer je ponekad vrlo teško doći do adekvatnog uzorka za biopsiju i patohistološku analizu. Razlog može biti nepristupačna lokalizacija samog tumora ili tehničke poteškoće prilikom bronhoskopskog postupka što može rezultirati nereprezentativnim ili lažno negativnim uzorkom (23). U literaturi je navedeno da se do 70 % karcinoma pluća dijagnosticira upravo na materijalu dobivenog tankoiglenom punkcijom, transbronhalnom ili transtorakalnom punkcijom (24).

Bolesnici, njih 60 (12,3 %), kojima je postavljena dijagnoza karcinoma pluća malih stanica i karcinom neplućnog podrijetla isključeni su iz istraživanja jer prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije iz 2015. ne pripadaju skupini karcinoma pluća nemalih stanica. Prema literaturnim podacima karcinom pluća nemalih stanica dijagnosticira se u 75-85 % bolesnika (3, 6) što se slaže s našim rezultatom - u 87,6 % bolesnika dijagnosticiran je NSCLC.

U ovo je istraživanje uključen veći broj muškaraca, njih 327 i 103 žene. Odnos muškaraca i žena je 3,2:1. Veća učestalost karcinoma pluća nemalih stanica u muškaraca u odnosu na žene uočena je i u literaturi (25).

Rak pluća najučestalija je zloćudna bolest u muškaraca, a pri vrhu je učestalosti i u žena. Istodobno je i vodeći uzrok smrti među svim zloćudnim bolestima. U Hrvatskoj se na godinu dijagnosticira više od 2900 novih bolesnika s rakom pluća, od kojih 85 % čine bolesnici s rakom pluća nemalih stanica. Incidencija raka pluća u Hrvatskoj jest 68/100 000 stanovnika (M 103, Ž 35,5) (26).

Najmlađi je bolesnik sa karcinomom pluća nemalih stanica imao 39 godina a najstariji 86 godina. Najmlađa je bolesnica imala 33 godine dok je najstarija imala 85 godina. Medijan dobi svih ispitanika (bez obzira na spol) bio je 64,5 godina. Ovi su podaci u skladu sa podatcima Foucaulta i suradnika provedenog u Francuskoj 2013. godine o medianu dobi bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica od 62,6 godina (27, 28).

Uočena je značajna statistička razlika u subtipizaciji karcinoma pluća nemalih stanica prema spolu - adenokarcinomi su značajno više zastupljeni kod žena, a planocelularni karcinom i NSCLC-NOS kod muškaraca. Navedeni su rezultati u skladu s podacima o pojavnosti adenokarcinoma pluća (28), kao i o učestalijoj pojavnosti planocelularnog tipa karcinoma u muškaraca u odnosu na žene (29).

U raspodjeli citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica s obzirom na dob ispitanica, uočena je statistički značajna razlika. Najveći je broj karcinoma dijagnosticiran u dobi od 50-69 godine života (29/103). NSCLC-NOS je ujedno i najčešće dijagnosticiran karcinom kod žena, 41 (39,8 %). Nalaz adenokarcinoma i nalaz NSCLC - u prilog adenokarcinomu čini 38,8 % od ukupnog broja karcinoma pluća nemalih stanica u žena.

Značajna je razlika u subtipizaciji karcinoma pluća nemalih stanica s obzirom na dob muškaraca. Slabo diferencirani karcinom, NSCLC-NOS, najčešće je dijagnosticiran u bolesnika u dobi 50 – 79 godina. Drugi po učestalosti je planocelularni karcinom, u 102 (31,2 %) koji se najčešće i dijagnosticira u muškaraca (29). Planocelularni karcinom i adenokarcinom pluća najčešće se dijagnosticira u bolesnika starijih od 65 godina (30).

Patohistološka verifikacija bronhopulmonarnog tumora učinjena je u istom vremenskom razdoblju kao i citološka analiza u minimalnim uvjetima iste promjene u 56 bolesnika. Citološka se subtipizacija prema Kappa testu slabo podudara s patohistološkom dijagnozom. Razlog tomu može biti u činjenici da se prema citološkoj subtipizaciji karcinom dijeli u više kategorija prema jasno morfološkim karakteristikama na adenokarcinom ili planocelularni karcinom, ali se i subklasificira na NSCLC - u prilog adenokarcinomu, odnosno NSCLC u prilog planocelularnom karcinomu, dok se u patohistološkoj dijagnozi patolog treba odlučiti pripada li karcinom u adeno ili planocelularni. Kliničaru su citološki nalazi NSCLC - u prilog adenokarcinomu i NSCLC - u prilog planocelularnom karcinomu jednako vrijedni kao i dijagnoza adenokarcinoma pluća i planocelularnog karcinoma pluća, budući da je prema Smjernicama za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka pluća nemalih stanica (5) citološka pretraga i interpretacija uzorka važna smjernica u daljnjem dijagnostičkom i terapijskom postupku. Razlikovanje adenokarcinoma i planocelularnog karcinoma pluća potrebno je zbog provođenja ciljane genske terapije koja je usmjerena na adenokarcinom (26, 31 - 32).

Dijagnoza NSCLC - miješani tip citološki je dijagnosticiran u 25/56 bolesnika, adenokarcinom je patohistološki potvrđen u 17 bolesnika, u 4 je bolesnika dijagnosticiran planocelularni karcinom, u 2 karcinom pluća malih stanica, u jednog bolesnika diferencijacija nije bila moguća, a u drugog maligne stanice nisu nađene. U slabo diferenciranih karcinoma, koji se u standardnim razmazima ne mogu podrobnije odrediti (31 - 32) žlijezdana diferencijacija se dodatno dokazuje imunohistokemijskim metodama (31 - 33). Nakon primjene imunocitokemijskog panela u dijagnostici NSCLC došlo je do značajnog pada broja citoloških dijagnoza karcinoma miješanog tipa, a i tada je u tog bolesnika patohistološki dijagnosticiran adenokarcinom. Primjena imunocitokemije na citološkim uzorcima u ovom istraživanju ukazala je na učinkovitost u subklasifikaciji/razlikovanju adenokarcinoma od planocelularnog karcinoma.

Posljednjih je nekoliko godina zbog provođenja ciljane genske terapije u bolesnika s karcinomom pluća neophodno subklasificirati karcinom (31 - 32), a u tome veliku ulogu ima imunocitokemija u citologiji, odnosno imunohistokemija u patohistološkoj obradi koja uz pomoć ekspresije pojedinih biljega ukazuje na različit tip diferencijacije. U ovom je istraživanju ispitana ekspresija različitih protutijela u 150 uzoraka plućnog podrijetla. Adenokarcinom pluća od planocelularnog karcinoma se razlikuje uz pomoć određivanja specifičnog antitijela TTF-1 (27) koji je ujedno i najčešće određivano protutijelo u ovom istraživanju, u 60 (40 %) bolesnika. Treba obratiti pozornost i na klon protutijela. SPT24 i 8G7G3/1 najadekvatniji su klonovi za TTF-1 protutijelo, gdje je TTF-1 (klon SPT24) više specifičan (pozitivan u 1 % planocelularnih karcinoma), ali manje osjetljiv (pozitivan u 65-77 %) za adenokarcinome prilikom diferenciranja od planocelularnog karcinoma (27). U ovom istraživanju po učestalosti slijede BerEp4 (19,3 %) i CK 7 (18,7 %) što djelomično odgovara literaturnim navodima, koji navode TTF-1 i CK 7 kao najčešće korištene, ali i keratin visoke molekulske mase i p63 (34), koji u ovom istraživanju nisu određivani.

Ukoliko se u slabo diferenciranom karcinomu standardnom morfologijom ne vidi pločasta diferencijacija, moguće ju je dodatno detektirati imunocitokemijskim panelom za ne-keratinizirajući pločasti karcinom koji uključuje p40, CK 5/6 i p63. Primjenom ovog panela značajno se smanjuje udio velikostaničnih karcinoma (31 - 32). CK 5/6 koji se koristi kao pomoć pri identifikaciji karcinoma pločastih stanica, u ovom je istraživanju određivan u 15 (10 %) uzoraka. Terminologija "u prilog karcinomu" koristi se kada se maligni tumor morfološki ili imunocitokemijski interpretira kao prijedlog tumorskog tipa, ali kvalitativno ili

kvantitativno nedovoljno za konačnu dijagnozu (33). Na kvalitetu pomoćnih testova koji se provode na tkivu utječu mnogi čimbenici poput, uključujući interpretativnu varijabilnost patologa do patologa, laboratorijskih ograničenja i predanalitičke varijable koje ocjenjuju imunohistokemijske markere podložne zamkama i drugim izazovima (35). Rezultati imunocitokemijskih reakcija mogu biti nedosljedni zbog inherentnih tehničkih poteškoća, stoga kada morfološke značajke snažno ukazuju na dijagnozu, negativni rezultat prethodnog imunocitokemijskog bojenja ne mora se uzeti u obzir. Na nepovoljan rezultat imunocitokemije može utjecati pozadinska reakcija, prethodno bojenje, ograničeni panel protutijela ili etanol (36).

Usporedbom citološke i patohistološke dijagnoze NSCLC, Kappa testom utvrđeno je slabo podudaranje. Jedan od mogućih razloga leži u činjenici da je u citološku dijagnostiku uključeno nekoliko citologa nejednakog iskustva u plućnoj citologiji, što je i rezultiralo nedosljednošću u subklasifikaciji karcinoma. Drugi razlog slabe podudarnosti je i zbog većeg broja negativnih/urednih patohistoloških dijagnoza. Naknadnim uvidom u medicinsku dokumentaciju utvreno je da se radilo o bolesnicima s klinički nedvojbenom malignom bolesti.

Subklasifikacija karcinoma pluća nemalih stanica neophodna je zbog složenih i sofisticiranih kemoterapijskih protokola. Potrebno je provoditi stalno poboljšanje kvalitete i standardizaciju postupaka citološke dijagnostike koja je važna smjernica u dijagnostičkom i terapijskom postupku bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih podataka može se zaključiti sljedeće:

- Najčešće je dijagnosticiran tip karcinoma pluća slabo diferencirani karcinom pluća, nespecificirani - NSCLC-NOS, u 39,8 % bolesnika.
- Postoji statistički značajna razlika u subtipizaciji citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica obzirom na spol (P = 0,002), adenokarcinomi su značajno više zastupljeni kod žena, a planocelularni karcinom kod muškaraca.
- Raspodjela citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica kod ispitanica s obzirom na dob statistički je značajna (P = 0,001). Kod žena u dobi od 50 do 69 godina najčešće je dijagnosticiran slabo diferencirani karcinom, NSCLC – NOS.
- Raspodjela citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica kod muškaraca s obzirom na dob statistički je značajna (P < 0,001). Kod muškaraca u dobi od 50 – 79 godina najčešće je dijagnosticiran slabo diferencirani karcinom, NSCLC – NOS, a u dobi od 60 – 69 godina i planocelularni karcinom.
- Citološka subtipizacija karcinoma pluća u minimalnim uvjetima, temeljena isključivo na rutinski bojenim preparatima, slabo se podudara s patohistološkom dijagnozom (Kappa = 0,03, 95 % CI -0,1 do 0,14).
- Slaba je podudarnost patohistološke dijagnoze i citološkog nalaza nakon primjene imunocitokemijskog panela (Kappa = 0,14, 95 % CI je od - 0,13 do 0,42).
- Najčešće korištena imunocitokemijska protutijela u citološkoj subtipizaciji karcinoma pluća nemalih stanica su TTF-1, BerEp 4 i CK7 koji čine više od 50 % svih korištenih protutijela.

7. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Odrediti učestalost pojedinih citoloških tipova karcinoma pluća, utvrditi postoji li razlika između citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica s obzirom na spol i dob pacijenta, utvrditi imunocitokemijska bojenja korištena u citološkoj subtipizaciji karcinoma pluća nemalih stanica, odrediti podudarnost citologije karcinoma pluća nemalih stanica usporedbom s patohistološkim nalazom iste promjene.

USTROJ STUDIJE: presječno istraživanje.

MATERIJAL I METODE: U istraživanje je uključeno 490 bolesnika kojima je postavljena dijagnoza karcinoma pluća. Svi su razmazi bojeni metodom po May-Grünwald-Giemsi, a nekima je dodatno učinjeno imunocikemijsko bojenje.

REZULTATI: Najčešće je dijagnosticiran NSCLC-NOS, zatim planocelularni karcinom, NSCLC – adenokarcinom, adenokarcinom, karcinom malih stanica te ostali. Dokazana je statistički značajna razlika u subtipizaciji NSCLC-NOS između citoloških tipova karcinoma pluća nemalih stanica obzirom na spol i dob, dok za preostale citološke tipove karcinoma pluća nema statistički značajne razlike. Najčešće korištena imunocitokemijska protutijela u ovom istraživanju su TTF-1, BerEp 4 i CK7. Utvrđena je slaba podudarnost u citološkoj subklasifikaciji karcinoma pluća nemalih stanica i patohistološke dijagnoze.

ZAKLJUČAK: Subklasifikacija karcinoma pluća nemalih stanica neophodna je zbog složenih i sofisticiranih kemoterapijskih protokola. Potrebno je provoditi stalno poboljšanje kvalitete i standardizaciju postupaka citološke dijagnostike koja je važna smjernica u dijagnostičkom i terapijskom postupku bolesnika s karcinomom pluća nemalih stanica.

KLJUČNE RIJEČI: karcinom pluća nemalih stanica, subtipizacija, imunocitokemija, citologija, biopsija

KEY WORDS: non-small lung cancer, subtyping, immunocytochemistry, cytology, biopsy

8. SUMMARY

CYTOLOGICAL SUBTYPING OF NON SMALL CELL LUNG CARCINOMA

AIM OF THE STUDY: Determine the frequency of specific cytological types of lung carcinomas, determine if there is a difference between the cytological types of non-small-cell lung carcinomas regarding the sex and the age of the patients, determine the immunocytochemical staining used in cytological subtyping non-small-cell lung carcinoma, determine the matching of cytologic diagnosis of non-cell lung carcinoma and the histopathological diagnosis of the same specimen.

STUDY DESIGN: Cross-sectional study.

MATERIALS AND METHODS: The study included 490 patients with diagnosed lung carcinomas. All the smears were stained using the May-Grünwald-Giemsi method, and immunocytochemical staining was additionally done for some of the patients.

RESULTS: The most common diagnosis was NSCLC-NOS, followed by planocellular carcinoma, NSCLC – adenocarcinoma, adenocarcinoma, small-cell carcinoma, and other carcinomas. There is a proven statistically significant difference in the NSCLC-NOS subtyping among the cytological types of non-small-cell lung carcinomas regarding the sex and the age of the patients, while there are no statistically significant differences for the other cytological types of lung carcinomas. The most commonly used immunocytochemical antibodies in this study were TTF-1, BerEp 4, and CK7. We determined a low-level match between the cytological subclassification of non-small-cell lung carcinoma and the pathohistological diagnosis.

CONCLUSION: It is necessary to subclassify non-small-cell lung carcinomas due to the complex and sophisticated chemotherapy protocols. Continuous quality improvements are necessary, as well as the continuous standardisation of cytological diagnostic procedures, as they provide important guidelines regarding the diagnostic and therapy procedures for the patients suffering from non-small-cell lung carcinoma.

KEYWORDS: non-small-cell lung carcinoma, subtyping, immunocytochemistry, cytology, biopsy

9. LITERATURA

1. The GLOBOCAN project. GLOBOCAN 2012. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Dostupno na adresi: http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/lung-new.asp. Datum pristupa: 14.6.2018.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. Zagreb: HZJZ; 2016, Bilt. br. 39.
3. Dedić Plavetić N, Silovski T, Tečić Vuger A, Pavlović M, Vazdar LJ, Herceg D i sur. Smjernice za provođenje dijagnostičkih pretraga prije početka liječenja onkološkog bolesnika – kliničke preporuke Hrvatskog društva za internističku onkologiju HLZ-a. Liječ Vjesn. 2018;140:92–105.
4. Grbac I, Bašić-Grbac M, Jelena Ostojić J. Rak pluća. Medicus. 2001;10:179–190.
5. Samaržija M, Jakopović M, Boban M, Bošković L, Belac Lovasić I, Juretić A i sur. Smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka pluća nemalih stanica. Liječ Vjesn 2017;139:365–371.
6. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.2015; 4th ed Lyon: IARC;
7. Roy-Chowdhuri S, Aisner DL, Allen TC. Biomarker testing in lung carcinoma cytology specimens: a perspective from members of the Pulmonary Pathology Society. Arch Pathol Lab Med 2016; 140: 1267–1272.
8. Ou SH, Zell JA. Carcinoma NOS is a common histologic diagnosis and is increasing in proportion among non-small cell lung cancer histologies. J Thorac Oncol. 2009;4:1202–11.
9. Pelosi G, Barbareschi M, Cavazza A, Graziano P, Rossi G, Papotti M. Large cell carcinoma of the lung: a tumor in search of an author. A clinically oriented critical reappraisal. Lung Cancer. 2015;87:226-31.
10. Ramzy I, Herbert A. Respiratory tract. U: Gray W, Kocjan G, urednik. Diagnostic Cytopathology. 3.izd Elsevier; 2010. str. 17 – 111.

11. Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens. Eur Respir Rev 2017;26:170007. Dostupno na adresi: https://doi.org/10.1183/16000617.0007-2017. Datum pristupa: 15.7.2018.

12. Carney JM, Kraynie AM i Roggi VL. Durham. Immunostaining in Lung Cancer for the Clinician. Commonly used markers for differentiating primary and metastatic pulmonary tumors. Ann Am Thorac Soc. 2015; 12(3).

13. Nadji M, Ganjei P, Morales A. Immunocytochemistry in contemporary cytology. The technique and its application. Laboratory Medicine, 1994; 25(8), 502 –508.

14. Fowler J. Larry, Whitney A. Application of Immunohistochemistry to Cytology. LAchar. San Antonio: Arch Pathol Lab Med. 2008;132.

15. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 38-55.

16. Roche. Clinical reagents: Primary Antibodies- Ventana Medical Systems. Dostupno na adresi:http://www.ventana.com/product/list/2#JumpTo. Datum pristupa: 25.3.2018.

17. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova Medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 192-198.

18. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. 4th.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014. str. 1-41

19. Cell Marque. Primary Antibodies. Ažurirano: 24.5.2017. Dostupno na stranici: http://www.cellmarque.com/antibodies/CM/1980/Ep-CAM-Epithelial-Specific-Antigen_Ber-EP4. Datum pristupa: 23.7.2018.

20. Maxwelln P, Salto-Tellez M. Validation of Immunocytochemistry as a Morphomolecular Technique. Cancer Cytopathol 2016;124:540-5.

21. Smojver Ježek S, Vrabec Branica B, Juroš Z, Boras Z, Čučević B, Mažuranić I. TTF-1 u plućnoj citologiji. Acta Med Croat;62:373-8.

22. Smojver-Ježek S, Vrabec Branica B. Citologija karcinoma pluća. Dogovor o terminologiji i načinu pisanja citoloških nalaza karcinoma pluća. Tečaj trajne

medicinske izobrazbe. Hrvatsko torakalno društvo. Zagreb. 27.2.2015. Dostupno na adresi: citologija.hlz.hr/wp-content/.../03/Pisanje-citoloskih-nalaza.ppsx. Datum pristupa: 8.6.2018.

23. Jerše M. Terčelj M. Contributions of cytology examination and methods in lung cancer diagnostic. Radiol Oncol 2006; 40(Suppl 1): S77-S85.
24. Maureen FZ, Rekhtman N, Auger M, Booth CN, Crothers B i sur. Morphologic Accuracy in Differentiating Primary Lung Adenocarcinoma From Squamous Cell Carcinoma in Cytologyy Specimens. Arch Pathol Lab Med. 2016;140(10):1116-1120.
25. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D,Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 117-125.
26. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.
27. Foucault C, Mordant P, Grand B, Achour K, Arame A, Dujon A, i sur. Unexpected extensions of non-small-cell lung cancer diagnosed during surgery: revisiting exploratory thoracotomies and incomplete resections. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery. 2013; 16(5):667-672.
28. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija 4. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 149-191; 379-417.
29. Verywell. Squamous Cell Carcinoma of the Lungs. Dostupno na adresi: https://www.verywell.com/squamous-cell-carcinoma-of-the-lungs-in-depth-2249367 Datum pristupa: 27. 8. 2018.
30. DoveMed. Squamous Cell Carcinoma of Lung. Dostupno na adresi: http://www.dovemed.com/diseases-conditions/squamous-cell-carcinoma-lung/. Datum pristupa: 25. 8. 2019.
31. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. Front Oncol. 2017;7: 193. Objavljeno: 28.8.2017. Dostupno na stranici: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581355/#B2. Datum pristupa: 8.6.2018.

32. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (DeltaNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. Mod Pathol (2012) 25(3):405–15.10.1038/modpathol.2011.173 Mod Pathol. 2012 Mar;25(3):405-15. Datum pristupa: 8.6.2018.
33. Carlie SS, Andre LM, William DT, Maureen FZ, Raymond HT, Gregory JR i sur. Subtyping of Non-small Cell Lung Carcinoma. A Comparison of Small Biopsy and Cytology Specimens. J Thorac Oncol. 2011;6:1849–1856.
34. Nizzoli R , Marcello T, Francesco G, Marco B i sur. Accuracy of Fine Needle Aspiration Cytology in the Pathological Typing of Non-small Cell Lung Cancer Journal of Thoracic Oncology, Volume 6, Issue 3, 2011;6:489-93.
35. John M. Carney, Alyssa M. Kraynie, and Victor L. Roggli. Immunostaining in Lung Cancer for the Clinician Commonly Used Markers for Differentiating Primary and Metastatic Pulmonary Tumors. Annals ATS. 2015;12:429-35.
36. Chavali P, Trayaga AK, Tandon A, Uppin SG. Utility of immunochemistry in cytology. J.Cytol 2016;33:71-5 Dostupno na adresi: http://www.jcytol.org/text.asp?2016/33/2/71/182520 Datum pristupa: 10.02.2019.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i Prezime:	Ana Bandjak
Datum rođenja:	11.9.1993.
Adresa:	Mljetska 30, Osijek
E-mail:	ana.bandjak@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2016. – danas	Medicinski fakultet Osijek Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike
2012. – 2016.	Medicinski fakultet Osijek Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike
2008. – 2012.	Medicinska škola Osijek Smjer: Zdravstveno-laboratorijski tehničar

RADNO ISKUSTVO:

Studeni 2018.- danas	Prvostupnik medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek
Lipanj 2017. – Studeni 2018.	Prvostupnik medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Klinički zavod za kliničku citologiju, KBC Osijek

Siječanj 2016. – Lipanj 2017.	Zdravstveno-laboratorijski tehničar, Klinički zavod za kliničku citologiju, KBC Osijek
Srpanj 2015. – Siječanj 2016.	Zdravstveno-laboratorijski tehničar, Odjel za laboratorijsku dijagnostiku, Opća županijska bolnica Vukovar i bolnica hrvatskih veterana
Svibanj 2013. – Svibanj 2014.	Stručno osposobljavanje, zdravstveno-laboratorijski tehničar, Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek