

# Dijagnostička vrijednost imunocitokemijskih protutjela u dijagnostici tumora pluća

---

Uštar, Korina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:152:721593>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Korina Uštar**

**DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST**  
**IMUNOCITOKEMIJSKIH**  
**PROTUTIJELA U DIJAGNOSTICI**  
**TUMORA PLUĆA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Korina Uštar**

**DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST**  
**IMUNOCITOKEMIJSKIH**  
**PROTUTIJELA U DIJAGNOSTICI**  
**TUMORA PLUĆA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

Rad je ostvaren na Kliničkom zavodu za citologiju u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marija Perić, dr. med.

Rad sadrži 34 lista, 17 tablica i 2 slike.

*Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Mariji Perić na pomoći i vođenju kroz izradu rada.*

*Zahvaljujem djelatnicima Kliničkog zavoda za citologiju KBC-a Osijek koji su me primili tijekom prikupljanja rezultata.*

*Zahvaljujem Kristini Kralik, dr. sc. s Katedre za medicinsku statistiku i medicinsku informatiku Medicinskog fakulteta Osijek za pomoć pri statističkoj obradi podataka.*

*Zahvaljujem obitelji, rodbini i prijateljima na bodrenju za vrijeme studiranja.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Epidemiološki podaci o tumoru pluća .....	1
1.2. Etiologija tumora pluća.....	1
1.3. Citološka subtipizacija tumora pluća.....	2
1.3.1. Sitnostanični karcinom pluća .....	2
1.3.2. Adenokarcinom pluća .....	3
1.3.3. Karcinom pluća pločastih stanica .....	5
1.3.4. Krupnostanični nediferencirani karcinom i krupnostanični neuroendokrini karcinom pluća.....	6
1.4. Dijagnostika tumora pluća .....	6
1.4.1. Slikovna dijagnostika tumora pluća.....	6
1.4.2. Citološka i imunocitokemijska dijagnostika tumora pluća .....	7
1.4.3. Molekularna dijagnostika tumora pluća.....	8
2. CILJEVI .....	9
3. ISPITANICI I METODE .....	10
3.1. Ustroj studije.....	10
3.2. Ispitanici .....	10
3.3. Metode .....	10
3.4. Statističke metode.....	11
4. REZULTATI.....	12
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČCI .....	26
7. SAŽETAK.....	27
8. SUMMARY .....	28
9. LITERATURA .....	29
10. ŽIVOTOPIS .....	34

## Popis korištenih kratica

AAH – atipična adenomatozna hiperplazija (engl. *atypical adenomatous hyperplasia*)

AC – adenokarcinom

AIS – adenokarcinom *in situ* (engl. *adenocarcinoma in situ*)

ALK – kinaza anaplastičnog limfoma (engl. *anaplastic lymphoma kinase*)

BAL – bronhoalveolarni lavat/lavaža

BRAF – proto-onkogen B-raf (engl. *proto-oncogene B-raf*)

CK – citokeratin

CT – kompjuterizirana tomografija (engl. *computed tomography*)

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization*)

FNA – tankoiglena aspiracija (engl. *fine-needle aspiration*)

KRAS – homolog onkogeno Kirstenovog virusa štakorskog sarkoma (engl. *Kirsten rat sarcoma virus oncogene homolog*)

LCLC – krupnostanični karcinom pluća (engl. *large-cell lung carcinoma*)

LCNET – krupnostanični neuroendokrini tumor pluća (engl. *large cell neuroendocrine tumor*)

MGG – May-Grünwald Giemsa

N/C – jezgra/citoplazma (engl. *nucleus/cytoplasm*)

NET – neuroendokrini tumor (engl. *neuroendocrine tumor*)

NSCLC – ne-sitnostanični karcinom pluća (engl. *non-small-cell lung carcinoma*)

NSCLC-NOS – nespecificirani ne-sitnostanični karcinom pluća (engl. *non-small-cell lung carcinoma, not otherwise specified*)

PAH – policiklički aromatski ugljikovodik (engl. *polycyclic aromatic hydrocarbon*)

PCC – planocelularni karcinom

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PD-L1 – ligand programirane smrti 1 (engl. *programmed death-ligand 1*)

PTHrP – polipeptid nalik na parathormon (engl. *parathyroid hormone-related protein*)

ROS1 – ROS proto-onkogen 1 (engl. *ROS proto-oncogene 1*)

SCLC – sitnostanični karcinom pluća (engl. *small-cell lung carcinoma*)

TBP – transbronhalni punkt

TTF-1 – faktor transkripcije štitnjače (engl. *thyroid transcription factor 1*)

TTP – transtorakalni punkt



## 1. UVOD

### 1.1. Epidemiološki podaci o tumoru pluća

Maligni tumor pluća zauzima prvo mjesto u incidenciji i smrtnosti među svim tipovima karcinoma u svijetu u 2022. godini sa 2,48 milijuna novih slučajeva i 1,82 milijuna smrtnih ishoda, pri čemu je u muškaraca prvi, a u žena drugi po incidenciji i smrtnosti, iza karcinoma dojke. Incidencija tumora pluća prednjači u zemljama u razvoju s visokim udjelom pušača (1 – 3). U Hrvatskoj su 2021. godine dušnik, bronhi i pluća bili drugo najčešće sijelo raka u muškaraca te treće najčešće sijelo u žena, a u oba je spola karcinom pluća vodeći uzrok smrti od novotvorina (4). Dobna skupina u kojoj se najčešće otkrivaju zloćudne novotvorine pluća jest između 60 i 69 godina (4, 5). Iako je broj muškaraca koji boluju od tumora pluća veći u odnosu na žene, sve je veći broj žena koje obolijevaju, dok je incidencija tumora pluća u muškaraca u konstantnom i stabilnom padu (2).

Procjenjuje se da je rizik od oboljenja od raka pluća 10 – 20 puta veći za pušače u odnosu na nepušače<sup>1</sup>, ovisno o učestalosti pušenja i dužini pušačkog staža, a povećan je i za pasivne pušače (6). Pušače obično zahvaća karcinom pločastog, a nepušače karcinom žljezdanog epitela. Posebno se ističe trend povećane incidencije karcinoma pluća u žena nepušačica nešto mlađe dobi u odnosu na muškarce nepušače, no razlog ove pojave još nije moguće potpuno razjasniti (7).

Dugi je niz godina karcinom pluća najsmrtonosniji karcinom u Hrvatskoj zbog činjenice da se najčešće otkriva u kasnom, neoperabilnom stadiju, no očekuje se pad ukupne smrtnosti za 20 %, s obzirom da je 2020. godine pokrenut nacionalni program za probir karcinoma pluća pretragom kompjuterizirane tomografije niske doze zračenja (engl. *low-dose computed tomography*) (8). 90 do 95 % tumora pluća su maligni, a u većini slučajeva tumor u plućima metastaza je iz nekog drugog sijela, najčešće iz debelog crijeva, dojke i bubrega (6).

### 1.2. Etiologija tumora pluća

Glavni rizični čimbenik za nastanak karcinoma respiratornog sustava, s kojim je direktno povezano čak 80 do 85 % smrti od istog, jest pušenje, koje osim pluća, bronha i dušnika može uzrokovati nastanak karcinoma i u mnogim drugim organskim sustavima (6). Dosada je u duhanu i duhanskom dimu poznato više od 80 kancerogena (9). Svi su oblici duhana opasni (duhan za pušenje, žvakanje ili šmrkanje), no najveći rizik od karcinoma predstavlja duhan koji izgara, u kojem se nalaze formaldehid, acetaldehid, policiklički aromatski ugljikovodici (PAH),

---

<sup>1</sup>nepušačima se smatraju osobe koje su konzumirale manje od 100 cigareta tijekom života

benzen, furan i drugi kancerogeni (10). Većina kancerogena iz cigaretnog dima zahtjeva metaboličku aktivaciju kako bi formirali DNK adukte, pokrećući kancerogenezu. Potencijalni rizik od nastanka karcinoma pluća predstavlja i pušenje e-cigareta (engl. *vaping*).

Izuzev pušenja karcinom pluća mogu uzrokovati nepotpuno izgaranje ugljena, drvine i nedrvne biomase, onečišćenje zraka, ionizirajuće zračenje, tvari povezane s radnim mjestom poput arsena, azbesta, kadmija, berilija, klorometil etera, kroma, nikla, radona, silike te vinil klorida (11). Osobe s članovima obitelji koji boluju od raka pluća imaju predispoziciju za njegovu pojavu. Istaknuti genetski čimbenici koji su vezani za nastanak karcinoma pluća jesu mutacija gena za receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR), mutacija homologa onkogeno Kirstenovog virusa štakorskog sarkoma (KRAS), fuzija kinaze anaplastičnog limfoma (ALK), fuzija proto-onkogeno ROS 1, mutacija proto-onkogeno B-raf (BRAF), mutacije tumor-supresora p53, p73, p16, i dr.

### 1.3. Citološka subtipizacija tumora pluća

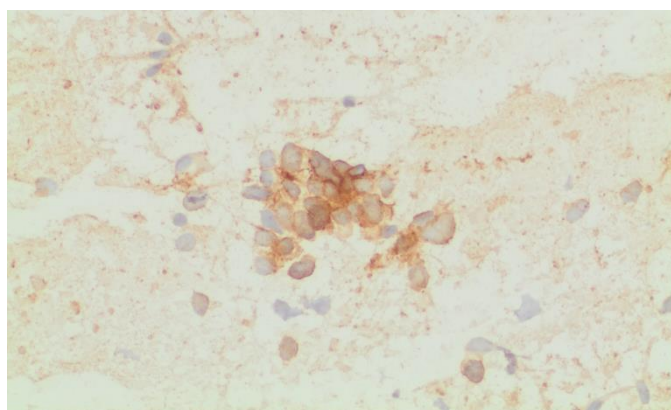
Glavna su dva tipa tumora pluća sitnostanični karcinom pluća (engl. *small-cell lung carcinoma*, SCLC) i ne-sitnostanični karcinom pluća (engl. *non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC), koji se dalje dijeli na sljedeće podtipove: karcinom žljezdanih stanica (adenokarcinom), karcinom pločastih stanica i krupnostanični karcinom (engl. *large-cell lung carcinoma*, LCLC). Nešto rjeđe pojavljuju se krupnostanični neuroendokrini tumor (engl. *large-cell neuroendocrine tumor*, LCNET), benigni tipični karcinoid, atipični karcinoid i sarkomatoidni karcinom.

#### 1.3.1. Sitnostanični karcinom pluća

Otprilike 10 do 20 % karcinoma pluća otpada na sitnostanični karcinom (lat. *carcinoma microcellulare*) (6). Sitnostanični karcinom jest *high-grade* neuroendokrini tumor (NET) karakteriziran agresivnošću, brzim rastom, slabom diferencijacijom i generalno lošom prognozom. Vrlo je veliki broj pušača s ovim karcinomom, nerijetko dijagnosticiranim već u uznapređovalom stadiju s udaljenim metastazama. Sitnostanični NET češći je od svog krupnostaničnog imenjaka. Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije SCLC se dijeli na dvije podkategorije: čisti SCLC i kombinirani SCLC, koji se dijelom sastoji od osobina ne-sitnostaničnog karcinoma. Tumor je obično smješten centralno, u blizini plućnog hilusa.

Mikroskopski se SCLC prezentira malim do srednje velikim stanicama s hiperkromatskom jezgrom i vrlo oskudnom citoplazmom u visoko celularnom i nekrotičnom okruženju. Unutar stanica nalazi se fini kromatin te slabo izraženi ili nevidljivi nukleoli. Stanice su uglavnom povezane u guste nakupine s malo vezivnog tkiva između njih te imaju visoku stopu mitoze (6,

12). SCLC prepoznatljiv je i po tzv. „*crush*“ efektu, odnosno razmazanom kromatinu te po fenomenu bazofilnog jezgrenog debrisa zalijepljenog za zid krvne žile pod imenom Azzopardi efekt. Stanice tumora pozitivno se bojaju na niskomolekularni keratin, a varijabilno se bojaju na markere neuroendokrine diferencijacije poput CD56, kromogranina i sinaptofizina (Slika 1). Za razlikovanje sitnostaničnog od krupnostaničnog NET pogodan je napsin A, a za razlikovanje SCLC od tumora nižih stupnjeva malignosti (*low-grade* i *intermediate-grade*) može se upotrijebiti Ki-67 indeks brzine proliferacije stanica. Faktor transkripcije štitnjače 1 (TTF-1) može poslužiti u diferencijaciji SCLC od tumora koji potječu izvan pluća (12).



Slika 1. Stanice sitnostaničnog karcinoma pluća obojane na CD56, MGGX200 (izvor: fotografirala mentorica rada)

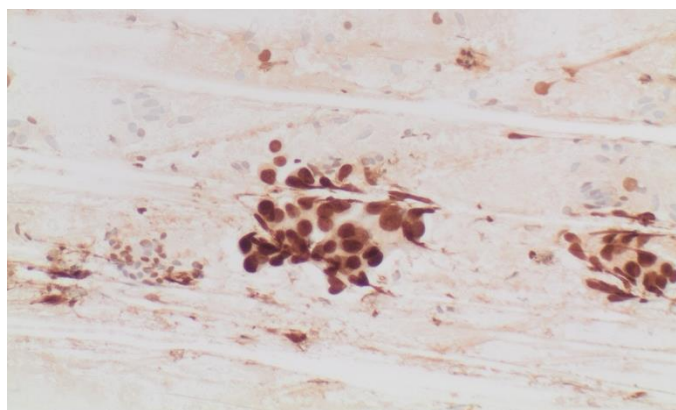
Karakteristična patofiziološka značajka SCLC jest uzrokovanje paraneoplastičnog sindroma zbog lučenja hormona od strane neuroendokrinih stanica ili imunosno-posredovanog uništenja tkiva, primjerice lučenja antidiuretskog hormona, adrenokortikotropnog hormona (ektopični Cushingov sindrom) i Lambert-Eatonovog mijasteničkog sindroma. Najčešća su mjesta metastaziranja u mozak, jetra, nadbubrežne žlijezde, kost i koštana srž (13). Standardne su metode liječenja kemoterapija i radijacija. Kirurško odstranjivanje nije preporučeno zbog ranog i brzog širenja tumora (6). U Sjedinjenim Američkim Državama petogodišnje preživljenje sa SCLC iznosi od 3 do 30 %, ovisno o proširenju tumora (14).

### 1.3.2. Adenokarcinom pluća

Najprevalentniji tip tumora pluća (oko 40 % dijagnoza) jest adenokarcinom (lat. *adenocarcinoma*), podvrsta ne-sitnostaničnog karcinoma (6). Ova vrsta karcinoma ima različite stupnjeve invazivnosti, varirajući od preinvazivnih lezija (atipična adenomatozna hiperplazija, AAH i adenokarcinom *in situ*, AIS) i minimalno invazivnog adenokarcinoma do invazivnog. Svjetska zdravstvena organizacija klasificira ga u pet kategorija: lepidični, acinarni, papilarni, mikropapilarni i solidni te posebnu kategoriju, mucinozni adenokarcinom. Poznat je po

fenomenu da često zahvaća osobe koje nikada nisu pušile, posebice žene. Incidencija adenokarcinoma u žena u porastu je posljednja četiri desetljeća, dok se njegova sveukupna incidencija i mortalitet smanjuju (15).

AAH očituje se kao lezija hiperplastičnih nakupina stanica malih dimenzija ( $\leq 5$  mm) koje oblažu alveolarne zidove s blagim do umjerenim atipijama i bez fibrozne ili upalne pozadine. AAH uglavnom nije moguće detektirati radiološkim tehnikama pa se nerijetko pronalaze tijekom operativnih postupaka povodom liječenja drugih bolesti (16). AIS nešto je veća lezija (5 – 30 mm) s više atipija od AAH, preklapanjem jezgara, bez sluzi i bez ikakvih znakova invazije. Minimalno invazivan adenokarcinom samostalna je lezija slične veličine kao AIS, sa žarištima invazije i varijabilnom arhitekturom (acinarna, papilarna, mikropapilarna i solidna). Za diferencijaciju adenokarcinoma od planocelularnog karcinoma imunocitokemijom povoljni su TTF-1 i napsin A, čiji je pozitivitet karakterističan za adenokarcinome (Slika 2). Žarišna obojenja TTF-1 smatraju se pozitivnim (17). EGFR mutacije u žena, nepušača i pacijenata s adenokarcinomom, iako prisutne i u bijelaca, nalaze se ponajviše u Azijskoj populaciji (18).



Slika 2. Stanice adenokarcinoma pluća obojane na TTF-1, MGGX200 (izvor: fotografirala mentorica rada)

Adenokarcinom raste sporo, zbog čega bolest u početku može biti asimptomatska te je sklon metastaziranju. Ponašanje adenokarcinoma ovisi o pušačkoj povijesti pacijenta. Primijećeno je da disfunkcija alveolarnih stanica uzrokovana pušenjem pridonosi agresivnosti karcinoma, dok je za to u nepušača odgovorna imunosupresivna mikrookolina tumora. Ipak, adenokarcinom u nepušača manje je agresivan od onog u pušača (19). Što se tiče prognoze adenokarcinoma, ona je vrlo povoljna u pacijenata s preinvazivnim lezijama i minimalno invazivnim karcinomom, s preživljenjem od 100 % ili približno tomu (6, 16). Pacijenti sa specifičnim EGFR mutacijama poput delecije egzona 19 imaju bolje preživljenje zbog osjetljivosti tumora na inhibitore tirozin kinaze (20). Inhibitori liganda programirane smrti 1 (PD-L1) pogodni su u liječenju ne-

sitnostaničnih karcinoma s visokom ekspresijom PD-L1, pogotovo one s BRAF ili KRAS mutacijom (21, 22).

### 1.3.3. Karcinom pluća pločastih stanica

30 % dijagnoza ne-sitnostaničnih karcinoma pluća zauzima karcinom pluća pločastih stanica (lat. *carcinoma planocellulare*). Visoko je povezan s pušenjem i pojavljuje se u muškaraca starije dobi (6). Započinje centralno, u glavnim bronhima. Raste sporo poput adenokarcinoma, ali metastazira kasno. Ova novotvorina manifestira se kao metaplazija bronhalnog cilindričnog epitela u pločasti, potom displazija te eventualno karcinom in situ i invazivni karcinom (6).

Mikroskopski, tumorske su stanice orožnjele, raznih oblika i veličina i mogu tvoriti međustanične mostove. U usporedbi s adenokarcinomom, pločasti karcinom ima manje veziva. O prisutnosti međustaničnih mostova i količini keratiniziranih stanica ovisi opisuje li se tumor kao slabo diferencirani (samo nekoliko orožnjelih stanica), umjereno diferencirani (oko 20 % orožnjelih stanica) ili dobro diferencirani (roževina u stanicama i izvan njih). Ovaj tumor ima visoku heterogenost (23). Imunokemijski panel za dijagnostiku planocelularnog karcinoma sastoji se prvenstveno od p63 i p40 proteina, gdje p40 pokazuje najbolju specifičnost i osjetljivost (24). Ipak, žarišni ili slabi pozitivitet p40 nije pokazatelj da se radi o pločastom karcinomu jer takvo obojenje može biti prisutno i u adenokarcinomu (17). EGFR mutacija vrlo je rijetka u planocelularnim karcinomima.

Ponekad je u pacijenata s pločastim karcinomom pluća prisutan nalaz hiperkalcemije zbog lučenja polipeptida nalik na parathormon (PTHrP) od strane tumorskih stanica (6). Imunoterapija PD-L1 inhibitorima koristi se u liječenju pacijenata s visokom ekspresijom PD-L1. Planocelularni karcinom ima povoljniju prognozu od invazivnog adenokarcinoma i može se kirurški odstraniti. Ukoliko je riječ o slabo diferenciranom stupnju karcinoma, prognoza postaje lošija.

Rijetke hibridne slučajeve adenoskvamoznog karcinoma generalno je teško dijagnosticirati preoperativno, agresivni su te imaju lošu prognozu. Češće pogađaju starije muškarce pušače (25). Ovaj tumor raste na plućnoj periferiji i spoj je karakteristika građe adenokarcinoma i planocelularnog karcinoma – zloćudni pločasti epitel u kombinaciji sa žljezdanim, žarišta roževine i pojava mucina. Pristup liječenju jednak je kao i kod adenokarcinoma (26).

### **1.3.4. Krupnostanični nediferencirani karcinom i krupnostanični neuroendokrini karcinom pluća**

Krupnostanični karcinom pluća (lat. *carcinoma macrocellulare*) termin je koji se koristi za ne-sitnostanične tumore koji nemaju obilježja pripisiva adenokarcinomu ili pločastom karcinomu, drugim riječima NSCLC-NOS (*not otherwise specified*). Zaključno po imenu tumora, njegove su stanice krupne, anaplastične i primitivne, bez žljezdanih ili pločastih osobina i točna se dijagnoza ne može postaviti pod svjetlosnim mikroskopom. U ovakvim se slučajevima elektronskom mikroskopijom može bolje razumijeti o kakvom je tumoru riječ. Tako se većina NSCLC-NOS tumora promatrana elektronskim mikroskopom pokazala kao adenokarcinomi i manjina kao pločasti karcinomi (23). Dakako, imunocitokemija i imunohistokemija nezanemarive su kada se ne može doći do konkretnog zaključka iz morfoloških značajki uzorka. Zbog slabe diferencijacije ovog tumora teško je odrediti najbolje metode liječenja i njegova je prognoza loša. Preživljenje pacijenata koji su primili kemoterapiju nakon operacije bolje je od pacijenata koji su samo operirani, no u oba slučaja preživljenje je nezadovoljavajuće (27).

S druge strane, krupnostanični neuroendokrini tumor pluća (LCNET) neoplazma je velikih stanica neuroendokrine diferencijacije i rijetko se dijagnosticira. Puno je agresivniji od ostalih karcinoma iste kategorije (NSCLC), a njegov su tijek i ponašanje sličniji sitnostaničnom karcinomu. Sklon je rekurenciji i metastazama nakon operacije te razvoju otpornosti na kemoterapiju. Pod mikroskopom ima jednu ili više klasičnih značajki ne-sitnostaničnog tumora uz neuroendokrinu diferencijaciju – velike stanice, pleomorfizam, nizak omjer veličine jezgre i citoplazme (N/C), granulirani ili vezikularni kromatin, visoka stopa mitoze, nekroza, rozete. Jedan od kriterija za dijagnozu je i pozitivitet na barem jedan neuroendokrini marker (28).

## **1.4. Dijagnostika tumora pluća**

Prvi su koraci u dijagnostici tumora pluća fizikalni pregled i anamneza. Nakon toga slijede osnovne laboratorijske pretrage (kompletna krvna slika i biokemijski parametri), slikovne, citološke, histološke i molekularne metode.

### **1.4.1. Slikovna dijagnostika tumora pluća**

Slikovnim metodama liječnik dobiva podatak o tome gdje je tumor smješten, njegovoj veličini, malignosti/benignosti, proširenosti te učinkovitosti liječenja. Slikovne pretrage na raspolaganju liječniku su rendgen, kompjuterizirana tomografija (CT), pozitronska emisijska tomografija, magnetska rezonancija i ultrazvuk. Sve navedene metode osim rendgena korisne su u procjeni proširenosti tumora i otkrivanju udaljenih metastaza. Uz to, rendgenom nije moguće odrediti ni malignost ili benignost tumora (29). Znakovima malignosti ili benignosti smatraju se veličina,

rast, konture, raspad, satelitske lezije i kalcifikati. Prednost CT-a je mogućnost pronalaska lezija promjera manjeg od 1 cm i subpleuralno smještenih lezija (23). CT niske doze zračenja učinkovit je u otkrivanju raka pluća u ranom stadiju.

#### **1.4.2. Citološka i imunocitokemijska dijagnostika tumora pluća**

Citološka dijagnostika tumora pluća obuhvaća brojne invazivne i neinvazivne tehnike uzimanja uzorka. Citološki se uzorci dijele na eksfolijativne (sputum, aspirat bronha, četkanje bronha, ekscidirani otisak sluznice, bronhoalveolarni lavat) i aspiracijske (transtorakalna i transbronhalna punkcija, pleuralni izljev). Iz spomenutih uzoraka mogu se izraditi stanični blokovi, izrazito pogodni za imunocitokemijska i molekularna testiranja.

Uzimanje sputuma (iskašljaja) najjeftinija je i najmanje invazivna tehnika, no njezina osjetljivost varira u odnosu na kvalitetu procesa uzimanja uzorka. Osjetljivost je najveća kada je uzorak pravilno uzet, u ponavljanju od 3 do 5 puta te induciran refleks kašlja udisanjem aerosola fiziološke otopine (30). U pravilno uzetom uzorku sputuma nalazi se sluz i respiratorne stanice, ponajprije alveolarni makrofazi, pločaste stanice i stanice bronhalnog epitela. Nedostatak analizi iskašljaja jest nemogućnost utvrđivanja lokalizacije i proširenosti tumora. Iz ovog je razloga neophodno korištenje bronhoskopskih metoda.

Aspirat bronha, četkanje bronha, ekscidirani otisak sluznice i bronhoalveolarna lažava (BAL) izvode se tijekom bronhoskopije fleksibilnim bronhoskopom pod lokalnom anestezijom. Aspirat bronha postiže se unošenjem fiziološke otopine u bronhalne cijevi i neposrednim aspiriranjem ispranog sadržaja, dok se bris bronha dobiva tako da se unutarnja površina bronha sastruže četkicom. Ekscidirani otisak sluznice predstavlja uzimanje male količine tvorbe i njezino otiskivanje na stakalce. Bronhoalveolarna lavaža ne-rutinska je metoda ispiranja suspektnog plućnog segmenta sterilnom fiziološkom otopinom. Minimalna količina uzorka iznosi 100 mL. U uzorku je prisutna dominacija alveolarnih makrofaga popraćena limfocitima, polimorfonuklearnim neutrofilima, eozinofilima i mastocitima (31). Transtorakalni (TTP) i transbronhalni (TBP) punktati spadaju pod tzv. tankoigleni aspiraciju (engl. *fine-needle aspiration*, FNA). TTP značajna je za tumore koji su smješteni periferno u plućnom krilu i teško dostupni bronhoskopom. Transtorakalna punkcija izvodi se iglom širine od 22 ili 25 G pod kontrolom radioloških *imaging* metoda, a transbronhalna punkcija tijekom bronhoskopije. Neželjena je posljedica TTP ulaz zraka u pleuru (pneumotoraks), no rizik od ove pojave vrlo je nizak. Pleuralni izljev podrazumijeva curenje tekućine u pleuralnu šupljinu i potencijalni je znak malignih događanja. Za citološku, biokemijsku i imunocitokemijsku analizu potrebno je uzeti 200 – 300 mL uzorka. Pleuralni izljev može biti eksudat ili transudat i obje vrste mogu

biti pokazatelji malignosti. U uzorku pleuralnog izljeva vrlo je važno razlikovati reaktivne mezotelne stanice od malignih, kao i maligne stanice metastaziranog karcinoma pluća od stanica primarnog malignog mezotelioma.

Svi se navedeni uzorci promatraju pod mikroskopom. Najčešće se primjenjuju bojenja po May-Grünwald Giemsi (MGG) i Papanicolau. Promatraju se svojstva stanica poput veličine, oblika, N/C omjera, hiperkromazije jezgre, strukture kromatina, međustanične arhitekture, stope mitoze, prisutnosti nekroze i pozadinske slike. Maligne stanice ne smiju se zamijeniti reaktivnim, hiperplastičnim ili regenerativnim epitelnim stanicama, reaktivnim alveolarnim stanicama, atipičnim metaplastičnim pločastim stanicama i stanicama izmijenjenim kemoterapijom i zračenjem.

Nakon osnovnog mikroskopskog pregleda uzoraka slijedi imunocitokemijska obrada. Imunocitokemijskom reakcijom specifičnog protutijela i molekularnih biljega na stanicama tumora može se utvrditi porijeklo stanica, vrsta i stupanj diferencijacije, te je od osobite važnosti u slučajevima kada se prema morfološkim značajkama ne može doći do dijagnoze točne podvrste tumora. Imunocitokemijski panel za dijagnostiku primarnih i metastatskih tumora u plućima obuhvaća brojne biljege: TTF-1, p40, p63, CD56, citokeratin 5/6 (CK 5/6), napsin A, kromogranin, sinaptofizin, CK7, CK20, receptor estrogena, receptor progesterona i dr. Osim porijekla i vrste stanica, imunocitokemijom se može odrediti i prognoza i odgovor na terapiju. Ključni koraci u imunocitokemijskom bojenju su inaktivacija peroksidaze i alkalne fosfataze, neutralizacija visoko nabijenih čestica koje bi mogle interferirati s protutijelom, vezanje primarnog i sekundarnog protutijela i dodatak kromogena koji omogućuje vizualizaciju.

### **1.4.3. Molekularna dijagnostika tumora pluća**

Molekularna dijagnostika otvorila je vrata suvremenim načinima liječenja – korištenje pametnih lijekova i personalizirana terapija. Otkrivanje mutacija određenih gena omogućuje primjenu lijekova koji ciljaju takve defekte i tako znatno poboljšavaju prognozu pacijenta. Najčešće su korištene metode lančana reakcija polimeraze (PCR) i fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH). Primjeri ciljane terapije su inhibitori tirozin-kinaze za pacijente s mutacijama u EGFR genu, kao i za one s mutacijama u ALK genu, PD-L1 inhibitori, ROS1 inhibitori i BRAF inhibitori (32). ALK mutacija, ROS1 mutacija i PD-L1 izražaj rutinski se testiraju imunohistokemijskom metodom zbog jednostavnosti i pristupačne cijene. Ekspresija PD-L1 testira se u svim slučajevima ne-sitnostaničnog karcinoma i tumači se prema sljedećim kriterijima: rezultat od 0 % predstavlja negativnu ekspresiju, < 1 % nisku, 1 – 49 % umjerenu i ≥ 50 % visoku ekspresiju. SCLC ne testira se na EGFR mutacije.



## 2. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. klasificirati citološke uzorke tumorskih tvorbi u plućima u podtipove, prema imunocitokemijskoj ocjeni i odrediti njihovu učestalost
2. odrediti dijagnostičku vrijednost pojedinih imunocitokemijskih protutijela u dijagnostici podtipova tumorskih tvorbi u plućima u odnosu na konačni patohistološki nalaz ili nalaz molekularne pretrage.

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je dizajnirano kao presječna studija s povijesnim podacima.

#### 3.2. Ispitanici

Ovim istraživanjem obuhvaćeni su ispitanici u kojih je u Kliničkom zavodu za citologiju i Kliničkom zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek u razdoblju od 1.1.2019. do 31.12.2023. izvršen patohistološki pregled pluća ili molekularna dijagnostika i utvrđen maligni tumor pluća, a kojima je prethodno učinjen citološki pregled istih tvorbi. Kriterij za isključenje su pacijenti u kojih je patohistološki nalaz malignan, ali nije prethodno učinjena citološka analiza. Za analizu navedenih podataka korištena je evidencija citoloških i patohistoloških nalaza Kliničkog zavoda za citologiju i Kliničkog zavoda za patologiju. Podaci o ispitanicima šifrirani su te njihovi anamnestički podaci nisu bili dostupni tijekom istraživanja.

#### 3.3. Metode

Fleksibilnim fiberoptičkim bronhoskopom i malom četkicom prikupljene su stanice mukoze segmentalnih bronha. Aspirat bronha i bronhoalveolarni lavat prikupljeni su aspiracijom sadržaja bronha u inicijalni uzorak te reaspiracijom nakon dodatka fiziološke otopine i ispiranja u nekoliko ponavljanja. Transtorakalna punkcija lezija u blizini plućnog zida izvedena je iglom širine 0,6 mm i dužine 10 cm. Dublje lezije uzorkovane su fleksibilnom iglom od 14 – 20 cm i istog promjera, umetnutom u deblju iglu koja služi kao vodilja i pod lokalnom anestezijom plućnog zida i pleure. Kada je igla umetnuta u tvorbu, aspiracija se izvodi ponavljanim pokretima igle u smjeru naprijed-nazad. Punktati, otisci i uzorci četkanja direktno se nanose na stakalce. Centrifugiranje mukoznih uzoraka izazovno je zbog njihove viskoznosti, stoga se uzorci aspirata bronha na stakalca nanose posebnim tehnikama.

Uzorci su obojani po MGG. May-Grünwald *stock* otopina sastoji se od eozin-metilenskog modrila otopljenog u apsolutnom metanolu. Giemsa bojilo sadrži azur II-eozin i azur II otopljene u glicerinu i apsolutnom metanolu. Radna otopina Giemse razrijeđena je u destiliranoj vodi. MGG bojenje izvedeno je u sljedećim koracima:

1. dodatak May-Grünwald otopine, trajanje 5 min
2. ispiranje vodom, trajanje 1 min
3. dodatak Giemsa otopine, trajanje 15 min
4. ispiranje vodom, trajanje 1 – 2 min
5. sušenje na zraku (33).

Nakon standardnog Giemsa bojenja tkivnih uzoraka tumorskih tvorbi iz pluća na izravnim razmazima i sedimentima, odabrana su prikladna stakalca za imunocitokemiju. Sva imunocitokemijska bojenja izvedena su korištenjem nebojanih uzoraka osušenih na zraku u automatiziranom uređaju Benchmark proizvođača Ventana (Roche). Primijenjene su jedna do tri različite boje protutijela po uzorku tkiva. Korišteni su obrasci automatskog imunološkog bojenja TTF-1, p40, CD56 i CK 5/6. Analizirani uzorci plućnih tumorskih tvorbi mikroskopski su ocijenjeni, te subtipizirani u podtipove, za one tvorbe koje su u zaključku citološkog nalaza označene kao maligne (NSCLC, SCLC, NSCLC-NOS, LCNET) ili suspektne.

#### **3.4. Statističke metode**

Kategorički podaci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike u kategoričkim varijablama testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Kontinuirani podaci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Za analizu podataka rabljen je statistički program MedCalc® Statistical Software version 22.023 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024).

#### 4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 313 ispitanika od kojih je 231 (73,8 %) muškaraca i 82 (26,2 %) žene. Medijan dobi ispitanika iznosi 66 godina u rasponu od 41 do 87 godina (Tablica 1).

Tablica 1. Osnovna obilježja ispitanika

Spol [n (%)]	Broj ispitanika [n (%)]
Muškarci	231 (73,8)
Žene	82 (26,2)
Dob [medijan (interkvartilni raspon)]	66 (61 – 72)

Učinjeno je ukupno sedam citoloških pretraga: aspirat bronha, bris bronha četkicom, otisak ekscidirane sluznice, bronhoalveolarni lavat (BAL), transtorakalni punktati (TTP), transbronhalni punktati (TBP) i aspirat pleuralnog izljeva. Najveći broj ispitanika uzorkovan je za bris bronha četkicom 213 (68,1%), zatim otisak ekscidirane sluznice 157 (50,2%) ispitanika, potom TTP, dok su ostale pretrage rađene kod manjeg broja ispitanika (Tablica 2).

Tablica 2. Raspodjela ispitanika prema učinjenoj pretrazi

Vrsta uzorka	Broj ispitanika [n (%)]
Aspirat bronha	83 (26,5)
Bris bronha četkicom	213 (68,1)
Otisak ekscidirane sluznice	157 (50,2)
BAL	1 (0,3)
TTP	102 (32,6)
TBP	14 (4,5)
Pleuralni izljev	8 (2,6)

Citološke dijagnoze su: SCLC, NSCLC-AC (adenokarcinom), NSCLC-PCC (planocelularni karcinom), adenoskvamozni karcinom, NSCLC-NOS, LCNET, metastatski karcinom, slabo diferencirani karcinom i nalaz suspektan na karcinom. Jednom pacijentu pripada samo jedna dijagnoza. Najučestalije su dijagnoze NSCLC-AC, dijagnosticiran u 116 (37,1 %) ispitanika i NSCLC-PCC u 71 (22,7 %) ispitanika (Tablica 3).

Tablica 3. Raspodjela ispitanika prema citološkoj dijagnozi

Citološka dijagnoza	Broj ispitanika [n (%)]
SCLC	47 (15,0)
NSCLC-AC	116 (37,1)
NSCLC-PCC	71 (22,7)
Adenoskvamozni karcinom	1 (0,3)
NSCLC-NOS	42 (13,4)
LCNET	1 (0,3)
Slabo diferencirani karcinom	15 (4,8)
Metastatski karcinom	10 (3,2)
Suspektno na karcinom	10 (3,2)

Patohistološke dijagnoze su: SCLC, NSCLC-AC, NSCLC-PCC, NSCLC-NOS, LCNET, slabo diferencirani karcinom, metastatski karcinom, suspektno na karcinom i EGFR-pozitivni (EGFR+) karcinomi, koji se odnose na malignitete pozitivne na EGFR mutaciju, ali nije dokazan malignitet citološkom dijagnostikom. Nalazi pozitivni na EGFR mutaciju, koji su bez citološke potvrde, obuhvaćeni su istraživanjem zbog molekularne potvrde koja upućuje na adenokarcinom. Prema patohistološkoj dijagnozi, 121 (38,7 %) ispitanik je NSCLC-AC, 94 (30 %) je NSCLC-PCC, dok su ostale dijagnoze zastupljne kod manjeg broja ispitanika (Tablica 4).

Tablica 4. Raspodjela pacijenata prema patohistološkoj dijagnozi

Patohistološka dijagnoza	Broj ispitanika [n (%)]
SCLC	51 (16,3)
NSCLC-AC	121 (38,7)
NSCLC-PCC	94 (30,0)
NSCLC-NOS	10 (3,2)
LCNET	7 (2,2)
Slabo diferencirani karcinom	8 (2,6)
Metastatski karcinom	16 (5,1)
Suspektno na karcinom	1 (0,3)
EGFR+	5 (1,6)

Najranije dijagnosticiran karcinom je NSCLC-NOS (63,5), a najkasnije dijagnosticiran NSCLC-PCC (69,5) (Tablica 5).

Tablica 5. Četiri najčešća karcinoma pluća prema spolu i dobi

Vrsta karcinoma	Dob (medijan)		
	Muškarci	Žene	Ukupno
SCLC	67	65	66
NSCLC-AC	66	65	65,5
NSCLC-PCC	68	71	69,5
NSCLC-NOS	65	62	63,5

Između broja muškaraca i žena kojima je dijagnosticiran adenokarcinom nema značajne razlike (Tablica 6).

Tablica 6. Incidencija adenokarcinoma prema spolu

Adenokarcinom	Broj ispitanika [n (%)]		P*
	Muškarci	Žene	
	78 (34)	38 (46)	0,05

\*Fisherov egzakti test

Imunocitokemijsko bojenje na TTF-1 učinjeno je na 297 uzoraka. S obzirom na raspodjelu citoloških dijagnoza u odnosu na rezultate TTF-1, pozitivan TTF-1 imaju značajnije više oni ispitanici koji po citološkoj dijagnozi imaju NSCLC-AC i SCLC. Negativan TTF-1 značajnije više imaju ispitanici s NSCLC-PCC i NSCLC-NOS (Fisherov egzakti test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 7).

P40 bojenje učinjeno je na ukupno 268 uzoraka. Pozitivan p40 imaju značajnije više oni ispitanici koji po citološkoj dijagnozi imaju NSCLC-PCC. Negativan p40 značajnije više imaju ispitanici s NSCLC-AC i NSCLC-NOS (Fisherov egzakti test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 8).

Tablica 7. Raspodjela citoloških dijagnoza u odnosu na rezultate TTF-1 imunocitokemijskog bojenja

Citološka dijagnoza	Broj ispitanika prema TTF-1 [n (%)]				P*
	Negativan TTF-1 (n = 126)	Pozitivan TTF-1 (n = 158)	Nekonkluzivan rezultat (n = 13)	Ukupno (n = 297)	
SCLC	1 (0,8)	34 (21,5)	0	35 (11,8)	
NSCLC-AC	4 (3,2)	111 (70,3)	1 (7,7)	116 (39,1)	
NSCLC-PCC	60 (47,6)	5 (3,2)	3 (23,1)	68 (22,9)	
Adenoskvamozni karcinom	0	1 (0,6)	0	1 (0,3)	
NSCLC-NOS	36 (28,6)	4 (2,5)	2 (15,4)	42 (14,1)	
LCNET	1 (0,8)	0	0	1 (0,3)	<b>&lt;0,001</b>
Slabo diferencirani karcinom	10 (7,9)	1 (0,6)	4 (30,8)	15 (5,1)	
Metastatski karcinom	9 (7,1)	0	0	9 (3,0)	
Suspektno na karcinom	5 (4,0)	2 (1,3)	3 (23,1)	10 (3,4)	

\*Fisherov egzaktini test

Tablica 8. Raspodjela citoloških dijagnoza u odnosu na rezultate p40 imunocitokemijskog bojenja

Citološka dijagnoza	Broj ispitanika prema p40 [n (%)]				P*
	Negativan p40 (n = 184)	Pozitivan p40 (n = 69)	Nekonkluzivan rezultat (n = 15)	Ukupno (n = 268)	
SCLC	24 (13)	0	0	24 (9,0)	
NSCLC-AC	98 (53,3)	0	5 (33,3)	103 (38,4)	
NSCLC-PCC	6 (3,3)	61 (88,4)	3 (20,0)	70 (26,1)	
Adenoskvamozni karcinom	0	1 (1,4)	0	1 (0,4)	
NSCLC-NOS	36 (19,6)	1 (1,4)	2 (13,3)	39 (14,6)	
LCNET	1 (0,5)	0	0	1 (0,4)	<b>&lt;0,001</b>
Slabo diferencirani karcinom	9 (4,9)	1 (1,4)	4 (26,7)	14 (5,2)	
Metastatski karcinom	7 (3,8)	0	0	7 (2,6)	
Suspektno na karcinom	3 (1,6)	5 (7,2)	1 (6,7)	9 (3,4)	

\*Fisherov egzaktini test

Ukupno je 88 uzoraka testirano na CD56. S obzirom na citološku dijagnozu u odnosu na rezultate CD56 imunocitokemijskog bojenja, pozitivan CD56 imaju značajnije više oni ispitanici kojima je dijagnosticiran SCLC. Negativan CD56 značajnije više imaju ispitanici s NSCLC-AC i NSCLC-NOS (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 9).

Tablica 9. Raspodjela citoloških dijagnoza u odnosu na rezultate CD56 imunocitokemijskog bojenja

Citološka dijagnoza	Broj ispitanika prema CD56 [n (%)]			Ukupno (n = 88)	P*
	Negativan CD56 (n = 33)	Pozitivan CD56 (n = 52)	Nekonkluzivan rezultat (n = 3)		
SCLC	1 (3,0)	46 (88,5)	0	47 (53,4)	
NSCLC-AC	12 (36,4)	2 (3,8)	1 (33,3)	15 (17,0)	
NSCLC-PCC	6 (18,2)	1 (1,9)	0	7 (8,0)	
Adenoskvamozni karcinom	0	0	0	0	
NSCLC-NOS	8 (24,2)	0	1 (33,3)	9 (10,2)	
LCNET	0	1 (1,9)	0	1 (1,1)	<b>&lt;0,001</b>
Slabo diferencirani karcinom	3 (9,1)	2 (3,8)	1 (33,3)	6 (6,8)	
Metastatski karcinom	1 (3,0)	0	0	1 (1,1)	
Suspektno na karcinom	2 (6,1)	0	0	2 (2,3)	

\*Fisherov egzaktni test

Na 97 uzoraka je učinjeno bojenje na CK 5/6. Pozitivan CK 5/6 imaju značajnije više oni ispitanici koji su citološki dijagnosticirani kao NSCLC-PCC. Negativan CK 5/6 značajnije više imaju ispitanici s NSCLC-AC (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 10).



Tablica 10. Raspodjela citoloških dijagnoza u odnosu na rezultate CK 5/6 imunocitokemijskog bojenja

Citološka dijagnoza	Broj ispitanika prema CK 5/6 [n (%)]			Ukupno (n = 97)	P*
	Negativan CK 5/6 (n = 46)	Pozitivan CK 5/6 (n = 47)	Nekonkluzivan rezultat (n = 4)		
SCLC	6 (13,0)	0	0	6 (6,2)	
NSCLC-AC	20 (43, 5)	1 (2,1)	0	21 (21,6)	
NSCLC-PCC	1 (2,2)	35 (74,5)	1 (25,0)	37 (38,1)	
Adenoskvamozni karcinom	0	0	0	0	
NSCLC-NOS	11 (23,9)	7 (14,9)	2 (50,0)	20 (20,6)	
LCNET	1 (2,2)	0	0	1 (1,0)	<b>&lt;0,001</b>
Slabo diferencirani karcinom	2 (4,3)	2 (4,3)	1 (25,0)	5 (5,2)	
Metastatski karcinom	2 (4,3)	0	0	2 (2,1)	
Suspektno na karcinom	3 (6,5)	2 (4,3)	0	5 (5,2)	

\*Fisherov egzaktini test

Prema patohistološkoj dijagnozi, pozitivan TTF-1 imaju značajnije više oni ispitanici koji imaju NSCLC-AC i SCLC. Negativan TTF-1 značajnije više imaju ispitanici s NSCLC-PCC. Pozitivan p40 imaju značajnije više oni ispitanici koji imaju NSCLC-PCC. Negativan p40 značajnije više imaju ispitanici s NSCLC-AC i SCLC. Ispitanici sa SCLC značajno su češće pozitivni na CD56, a oni s NSCLC-PCC su značajno češće negativni. Značajno su češće pozitivni na CK 5/6 ispitanici koji imaju NSCLC-PCC, a negativni oni s NSCLC-AC i SCLC (Fisherov egzaktini test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 11, 12, 13, 14).

Tablica 11. Raspodjela patohistoloških dijagnoza u odnosu na rezultate TTF-1 imunocitokemijskog bojenja

Patohistološka dijagnoza	Broj ispitanika prema TTF-1 [n (%)]				P*
	Negativan TTF-1 (n = 126)	Pozitivan TTF-1 (n = 158)	Nekonkluzivan rezultat (n = 13)	Ukupno (n = 297)	
SCLC	2 (1,6)	36 (22,8)	1 (7,7)	39 (13,1)	
NSCLC-AC	19 (15,1)	99 (62,7)	3 (23,1)	121 (40,7)	
NSCLC-PCC	74 (58,7)	9 (5,7)	8 (61,5)	91 (30,6)	
NSCLC-NOS	8 (6,3)	2 (1,3)	0	10 (3,4)	
LCNET	3 (2,4)	4 (2,5)	0	7 (2,4)	
Slabo diferencirani karcinom	5 (4,0)	2 (1,3)	1 (7,7)	8 (2,7)	<b>&lt;0,001</b>
Metastatski karcinom	15 (11,9)	0	0	15 (5,1)	
Suspektno na karcinom	0	1 (0,6)	0	1 (0,3)	
EGFR+ karcinom	0	5 (3,2)	0	5 (1,7)	

\*Fisherov egzaktni test

Tablica 12. Raspodjela patohistoloških dijagnoza u odnosu na rezultate p40 imunocitokemijskog bojenja

Patohistološka dijagnoza	Broj ispitanika prema p40 [n (%)]				P*
	Negativan p40 (n = 184)	Pozitivan p40 (n = 69)	Nekonkluzivan rezultat (n = 15)	Ukupno (n = 268)	
SCLC	26 (14,1)	0	1 (6,7)	27 (10,1)	
NSCLC-AC	101 (54,9)	2 (2,9)	5 (33,3)	108 (40,3)	
NSCLC-PCC	20 (10,9)	65 (94,2)	6 (40,0)	91 (34,0)	
NSCLC-NOS	9 (4,9)	1 (1,4)	0	10 (3,7)	
LCNET	6 (3,3)	0	0	6 (2,2)	
Slabo diferencirani karcinom	7 (3,8)	0	1 (6,7)	8 (3,0)	<b>&lt;0,001</b>
Metastatski karcinom	12 (6,5)	0	0	12 (4,5)	
Suspektno na karcinom	0	0	1 (6,7)	1 (0,4)	
EGFR+ karcinom	3 (1,6)	1 (1,4)	1 (6,7)	5 (1,9)	

\*Fisherov egzaktni test

Tablica 13. Raspodjela patohistoloških dijagnoza u odnosu na rezultate CD56 imunocitokemijskog bojenja

Patohistološka dijagnoza	Broj ispitanika prema CD56 [n (%)]				P*
	Negativan CD56 (n = 33)	Pozitivan CD56 (n = 52)	Nekonkluzivan rezultat (n = 3)	Ukupno (n = 88)	
SCLC	3 (9,1)	46 (88,5)	1 (33,3)	50 (56,8)	
NSCLC-AC	14 (42,4)	2 (3,8)	0	16 (18,2)	
NSCLC-PCC	9 (27,3)	1 (1,9)	1 (33,3)	11 (12,5)	
NSCLC-NOS	1 (3,0)	0	0	1 (1,1)	
LCNET	1 (3,0)	3 (5,8)	1 (33,3)	5 (5,7)	
Slabo diferencirani karcinom	4 (12,1)	0	0	4 (4,6)	<b>&lt;0,001</b>
Metastatski karcinom	1 (3,0)	0	0	1 (1,1)	
Suspektno na karcinom	0	0	0	0	
EGFR+ karcinom	0	0	0	0	

\*Fisherov egzakti test

Tablica 14. Raspodjela patohistoloških dijagnoza u odnosu na rezultate CK 5/6 imunocitokemijskog bojenja

Patohistološka dijagnoza	Broj ispitanika prema CK 5/6 [n (%)]				P*
	Negativan CK 5/6 (n = 46)	Pozitivan CK 5/6 (n = 47)	Nekonkluzivan rezultat (n = 4)	Ukupno (n = 97)	
SCLC	7 (15,2)	0	1 (25,0)	8 (8,2)	
NSCLC-AC	21 (45,7)	2 (4,3)	0	23 (23,7)	
NSCLC-PCC	2 (4,3)	43 (91,5)	3 (75,0)	48 (49,5)	
NSCLC-NOS	6 (13,0)	1 (2,1)	0	7 (7,2)	
LCNET	4 (8,7)	0	0	4 (4,1)	
Slabo diferencirani karcinom	1 (2,2)	1 (2,1)	0	2 (2,1)	<b>&lt;0,001</b>
Metastatski karcinom	5 (10,9)	0	0	5 (5,2)	
Suspektno na karcinom	0	0	0	0	
EGFR+ karcinom	0	0	0	0	

\*Fisherov egzakti test

Na EGFR mutaciju testirano je ukupno 152 ispitanika, od kojih je mutacija otkrivena u njih 18. Prema citološkoj dijagnozi, kod značajno više ispitanika s NSCLC-AC odsutna je EGFR mutacija, no od svih pozitivnih mutacija gotovo sve pripadaju upravo adenokarcinomu. Niti jedna EGFR mutacija nije pronađena u pacijenata s NSCLC-PCC. Negativan EGFR također značajnije više imaju ispitanici s NSCLC-NOS. Prema patohistološkoj dijagnozi, značajno više ispitanika s NSCLC-AC ima pozitivan rezultat na EGFR u odnosu na ostale ispitanike, ali je još uvijek veći broj ispitanika s NSCLC-AC koji nemaju mutaciju. Karcinoma s pozitivnom EGFR mutacijom, a bez citološke dijagnoze bilo je 5 (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,04$ ) (Tablica 15, 16).

Tablica 15. Raspodjela citoloških dijagnoza prema rezultatima molekularnog testiranja na EGFR mutaciju

Citološka dijagnoza	Broj ispitanika prema EGFR [n (%)]			<i>P</i> *
	Negativan EGFR (n = 134)	Pozitivan EGFR (n = 18)	Ukupno (n = 152)	
SCLC	0	0	0	
NSCLC-AC	90 (67,2)	16 (88,9)	106 (69,7)	
NSCLC-PCC	9 (6,7)	0	9 (5,9)	
Adenoskvamozni karcinom	0	1 (5,6)	1 (0,7)	
NSCLC-NOS	23 (17,2)	0	23 (15,1)	<b>0,04</b>
LCNET	0	0	0	
Slabo diferencirani karcinom	8 (6,0)	0	8 (5,3)	
Metastatski karcinom	1 (0,8)	0	1 (0,7)	
Suspektno na karcinom	3 (2,2)	1 (5,6)	4 (2,6)	

\*Fisherov egzaktni test

Tablica 16. Raspodjela patohistoloških dijagnoza prema rezultatima molekularnog testiranja na EGFR mutaciju

Patohistološka dijagnoza	Broj ispitanika prema EGFR [n (%)]			P*
	Negativan EGFR (n = 134)	Pozitivan EGFR (n = 18)	Ukupno (n = 152)	
SCLC	1 (0,7)	0	1 (0,7)	<b>&lt;0,001</b>
NSCLC-AC	102 (76,1)	11 (61,1)	113 (74,3)	
NSCLC-PCC	14 (10,4)	0	14 (9,2)	
NSCLC-NOS	8 (6,0)	1 (5,6)	9 (5,9)	
LCNET	3 (2,2)	0	3 (2,0)	
Slabo diferencirani karcinom	4 (3,0)	0	4 (2,6)	
Metastatski karcinom	2 (1,5)	0	2 (1,3)	
Suspektno na karcinom	0	1 (5,6)	1 (0,7)	
EGFR+ karcinom	0	5 (27,8)	5 (3,3)	

\*Fisherov egzakti test

Od 152 testirana ispitanika na EGFR mutaciju bilo je 105 (69 %) muškaraca i 47 (31 %) žena. Pozitivnih mutacija značajno je više u žena nego u muškaraca (Fisherov egzakti test, P = 0,03) (Tablica 17).

Tablica 17. Raspodjela rezultata molekularnog testiranja na EGFR mutaciju prema spolu

	Broj ispitanika [n (%)]			P*
	Muškarci (n = 105)	Žene (n = 47)	Ukupno (n = 152)	
Mutirani EGFR	8 (7,6)	10 (21,3)	18 (11,8)	<b>0,03</b>
Ne-mutirani EGFR	97 (92,4)	37 (78,7)	134 (88,2)	

\*Fisherov egzakti test

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju prikazali smo citološke, patohistološke i molekularne značajke tumorskih tvorbi u plućima, te odredili dijagnostičku točnost imunocitokemijskih pretraga u dijagnostici tumora pluća. Cilj je bio klasificirati citološke uzorke tumorskih tvorbi u plućima okarakteriziranih kao karcinom malih i nemalih stanica u podtipove, prema imunocitokemijskoj ocjeni, odrediti njihovu učestalost, te odrediti dijagnostičku vrijednost pojedinih imunocitokemijskih protutijela u dijagnostici podtipova tumorskih tvorbi u plućima u odnosu na konačni patohistološki nalaz ili nalaz molekularne pretrage. Prikupljeni su podatci o vrstama pretraga/uzoraka koje su učinjene na ispitanicima, zabilježene citološke i patohistološke dijagnoze te rezultati testiranja imunocitokemijskih markera: TTF-1, p40, CD56 i CK 5/6. Za prikupljanje podataka korištena je evidencija citoloških i patohistoloških nalaza kliničkih zavoda za citologiju i patologiju KBC-a Osijek za period od 1.1.2019. do 31.12.2023.

U istraživanje je uključeno 313 ispitanika (74 % muškaraca i 26 % žena). Najčešće pretrage koje se izvode na Kliničkom zavodu za citologiju KBC-a Osijek su bris bronha četkicom, otisak ekscidirane sluznice, transtorakalni punktati i aspirat bronha.

U provedenom istraživanju najčešća citološka i patohistološka dijagnoza bila je adenokarcinom (38 %), slijedi karcinom pločastih stanica (26 %) te sitnostanični karcinom (16 %), što je u skladu s istraživanjem Schabath i suradnika (34). Nešto su rjeđe zastupljeni slabo diferencirani karcinomi i metastatski karcinomi. U našem istraživanju primarni tumori pluća su češći od sekundarnih, suprotno navodima Damjanova i sur., koji navode češću pojavnost sekundarnih tumora pluća (6). Ovo možemo objasniti činjenicom da se za već dokazane tumore poznatih primarnih sjela rjeđe izvode tkivne dijagnostičke pretrage radi dokazivanja tipa tumora.

Prosječna dob dijagnoze raka pluća je oko 70 godina. Prema našim rezultatima ta je brojka nešto manja (66 godina) (3). U ranijoj životnoj dobi češće se dijagnosticira NSCLC-NOS, a planocelularni karcinom je češći u starijoj životnoj dobi. Prema istraživanju Ragavan i sur., karcinom pluća pogađa žene u ranijoj dobi nego muškarce (35). Naše istraživanje pokazalo je isto, osim za planocelularni karcinom, koji je dijagnosticiran nešto kasnije u žena.

Karcinom pluća češće zahvaća muškarce nego žene, s iznimkom adenokarcinoma. Glavni je razlog tomu veća prevalencija muškaraca pušača nego žena, a ostali značajni uzroci su veća izloženost muškaraca rizičnim čimbenicima iz okoline i na radnom mjestu te razlike u imunosnom odgovoru na karcinom i odgovoru na terapiju (36). U određenim slučajevima žene mogu biti pojačano izložene rizičnim čimbenicima za razvoj raka pluća, primjerice žene koje

žive s muškarcima pušačima i podliježu pasivnom pušenju te žene koje za kuhanje koriste ugljen, kao što je slučaj u Aziji (35). Također, žene koje puše imaju pojačani metabolizam policikličkih aromatskih ugljikovodika iz cigaretnog dima u odnosu na muškarce (36). S obzirom da anamnestički podaci nisu bili dostupni tijekom istraživanja, nije se mogao utvrditi pušački status ispitanika. Američko istraživanje Henschkea i sur. iz 2006. godine ustanovilo je više žena dijagnosticiranih s karcinomom pluća unatoč većem broju muškaraca koji su sudjelovali u istraživanju (37).

Mnoge su studije pokazale da adenokarcinom najčešće pogađa žene (34, 37, 38). Takvi su i rezultati našeg istraživanja, gdje je 46 % žena i 34 % muškaraca dijagnosticirano s adenokarcinomom, no razlika između njih nije značajna. Objašnjenje ove pojave mogla bi biti činjenica da su žene podložnije mutacijama EGFR i KRAS gena, koje su uglavnom povezane s nastankom adenokarcinoma pluća (35). Ragavan i Patel navode da polimorfizmi u genima povezanih sa sintezom estrogena mogu imati veze s povećanom ekspresijom EGFR (35). Prema našim rezultatima, medijan dobi žena kojima je dijagnosticiran adenokarcinom je 65, a medijan dobi muškaraca 66, što ne predstavlja značajnu razliku.

Prema raspodjeli citoloških dijagnoza u odnosu na TTF-1 pozitivitet, 96 % ispitanika s adenokarcinomom i 97 % ispitanika sa sitnostaničnim karcinomom bilo je pozitivno na TTF-1, dok je po patohistološkoj dijagnozi 82 % onih s adenokarcinomom i 92 % sa sitnostaničnim karcinomom bilo pozitivno. Očekivano, najviše negativnih rezultata bojenja imali su uzorci planocelularnih karcinoma. Prema istraživanju koje su proveli Stenhouse i suradnici, niti jedan karcinom porijekla izvan pluća nije bio pozitivan na TTF-1, što je pokazalo i naše istraživanje, podržavajući tvrdnju da je TTF-1 koristan marker za razlučivanje tumora plućnog i ne-plućnog porijekla, s isključenjem tumora štitnjače i neuroendokrinih tumora, koji također ekspimiraju ovaj protein. Također prema navedenom istraživanju, 86 % adenokarcinoma bilo je pozitivno varijabilnog intenziteta na TTF-1 (39). Katayama i suradnici zabilježili su slične rezultate, sa 65,5 % uzoraka adenokarcinoma pozitivnih na TTF-1 (40). Folpe i suradnici pronašli su iznad 90 %, a Wu i suradnici iznad 80 % pozitivno obojanih uzoraka sitnostaničnog karcinoma, (41, 42). Pregledom literature ustanovili smo da se naši rezultati TTF-1 testiranja nalaze u okviru očekivanih vrijednosti kojima se pokazuje da je TTF-1 učinkovit imunocitokemijski marker u dijagnostici adenokarcinoma pluća i SCLC jer su rezultati testiranja u skladu s konačnom patohistološkom dijagnozom.

87 % ispitanika s citološkom dijagnozom planocelularnog karcinoma bilo je pozitivno na p40, dok je s patohistološkom dijagnozom istog bilo pozitivno 71 %. Preko 90 % adenokarcinoma

(citološki i patohistološki dijagnosticiranih) bilo je negativno na p40. Niti jedan metastatski karcinom nije bio pozitivan. P40 nije bio izražen u sitnostaničnim karcinomima. Adenoskvamozni karcinom izražava i TTF-1 i p40 pozitivitet, što je u skladu s činjenicom da takav karcinom ispoljava značajke adenokarcinoma i planocelularnog karcinoma istovremeno. Walia i suradnici zabilježili su žarišni pozitivitet u svim uzorcima adenoskvamoznog karcinoma. U istom je istraživanju uočena 100 %-tni pozitivitet pločastog karcinoma na p40 (43). Bishop i suradnici također su zabilježili 100 % pozitivnih obojenja (44). Ovakvi rezultati p40 nedvojbeno čine najboljim markerom pločaste diferencijacije u rutinskoj primjeni. Usporedbom s objavljenom literaturom, naše istraživanje utvrdilo je p40 kao kvalitetan marker u dijagnostici planocelularnog karcinoma pluća.

TTF-1 i p40 istaknuti su kao esencijalni markeri u vidu smanjenja broja NSCLC-NOS dijagnoza. U istraživanju Walie i sur., 123 slučaja karcinoma pluća, koji su nakon morfološke analize svrstani pod NSCLC-NOS kategoriju, nakon imunohistokemijske obrade reducirani su na 38 slučajeva, koji su bili negativni na oba markera i nisu se više mogli kategorizirati (43). U našem istraživanju, preko 80 % karcinoma NOS tipa bilo je negativno na TTF-1 i preko 90 % negativno na p40. Ipak, broj dijagnoza ovog tipa karcinoma relativno je malen.

98 % ispitanika s citološkom dijagnozom sitnostaničnog karcinoma i 92 % s patohistološkom dijagnozom istog bilo je pozitivno na CD56. Od ukupno 5 slučajeva velikostaničnog neuroendokrinog tumora (patohistološka dijagnoza), 3 su bila pozitivna. Velika je većina ostalih karcinoma negativna na CD56. Takvi su rezultati očekivani s obzirom da je CD56 marker neuroendokrine diferencijacije. Kontogianni i suradnici zabilježili su pozitivitet SCLC na CD56 od 100 %, dok su Hiroshima i suradnici zabilježili 53 % pozitivnih velikostaničnih neuroendokrinih tumora i 96 % pozitivnih sitnostaničnih karcinoma (45, 46). Kromogranin i sinaptofizin izraženiji su od CD56 u LCNET (46). CD56 smatra se najosjetljivijim neuroendokrinim markerom raka pluća, ali ne i najspecifičnijim, s obzirom da je katkada pozitivan i u adenokarcinomu, pločastom karcinomu i velikostaničnom karcinomu bez neuroendokrine diferencijacije (47). Naši rezultati podudaraju se s prethodnim istraživanjima.

Prema citološkoj dijagnozi, 95 % pacijenata s planocelularnim karcinomom bilo je pozitivno na CK 5/6, a 95 % onih s adenokarcinomom bilo je negativno. Svi sitnostanični karcinomi bili su negativni. Karcinomi tipa NOS pokazali su varijabilne rezultate (55 % negativnih i 35 % pozitivnih). Nijedan metastatski karcinom nije bio pozitivan na CK 5/6. Prema patohistološkoj dijagnozi, 90 % planocelularnih karcinoma bilo je pozitivno, dok je 91 % adenokarcinoma bilo negativno na CK 5/6. Većina karcinoma tipa NOS bila je negativna na CK 5/6. U istraživanju



Argona i suradnika, 98 % svih pločastih karcinoma pluća bilo je pozitivno na CK 5/6, dok niti jedan adenokarcinom nije bio pozitivan (48). Nicholson i sur. zabilježili su 100 %-tni pozitivitet pločastih karcinoma pluća na CK 5/6 te 100 %-tnu negativnost adenokarcinoma, a nakon bojenja NSCLC-NOS karcinoma, 2 od 10 koja su određena kao adenokarcinomi bilo je pozitivno. CK 5/6 visoko je specifičan, no ima nešto nižu osjetljivost kada se radi o razlučivanju planocelularnog karcinoma i adenokarcinoma u slučajevima slabog ili žarišno pozitivnog obojenja (49). Prema navedenom, naši rezultati pokazuju da je CK 5/6 dobar marker pločastog epitela u dijagnostici tumora pluća i razlikovanju pločastog karcinoma pluća od drugih podvrsta.

Ukupno je 152 ispitanika bilo testirano na EGFR mutaciju, a pozitivnih je bilo 12 %. Samo jedan SCLC bio je testiran na prisutnost mutacije. Rutinski se EGFR testiranje ne provodi na sitnostaničnim karcinomima. Jedan adenoskvamozni karcinom i jedan suspektan nalaz bili su pozitivni na EGFR. Zbog snažne povezanosti EGFR mutacije i pojave adenokarcinoma, u istraživanje je uključeno i pet ispitanika koji nisu imali potvrdu patohistološke dijagnoze, ali je citološki pronađena malignost i pozitivitet na molekularnom testiranju na EGFR. Svih pet nalaza citološki je svrstano pod adenokarcinome. Sve ostale vrste karcinoma bile su negativne na molekularnom testiranju. Od ukupno 18 pozitivnih na EGFR mutacije bilo je 10 (56 %) žena. Uočljive su razlike u rezultatima između raznih istraživanja na ovu temu. Li i sur. uočili su prisutnost EGFR mutacije u 48 % testiranih uzoraka adenokarcinoma. 76 % svih utvrđenih mutacija nađeno je kod žena, ali i većina nalaza adenokarcinoma s odsutnom mutacijom (50). Boch i sur. utvrdili su manje od 5 % EGFR mutacija na 552 ispitanika, no poput drugih izvora, zabilježili su veću prisutnost mutacije u žena i osoba s adenokarcinomom. Navode da razlike u rezultatima mogu biti objašnjene potencijalnim selekcijskim biasom i geografskim varijacijama (51). Naši rezultati sukladni su s literaturom i utemeljuju činjenicu da je EGFR mutacija uglavnom povezana s nastankom adenokarcinoma i češće je prisutna u žena.

Svi korišteni markeri pokazali su zadovoljavajuću povezanost s njihovom odgovarajućom dijagnozom te su se pokazali kvalitetnim markerima za subtipizaciju tumora pluća, što je u skladu s dosad objavljenim istraživanjima.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Prema citološkoj dijagnozi, najčešće je dijagnosticiran adenokarcinom, zatim karcinom pločastog epitela, potom sitnostanični karcinom. Nešto su rjeđe zastupljeni slabo diferencirani karcinomi i metastatski karcinomi.
2. Prema patohistološkom nalazu, najčešće je dijagnosticiran adenokarcinom, zatim karcinom pločastog epitela, potom sitnostanični karcinom i metastatski karcinomi. Nešto su rjeđe dijagnosticirani slabo diferencirani karcinomi.
3. Najranije u životnom razdoblju je dijagnosticiran karcinom NSCLC-NOS i NSCLC-AC, a najkasnije je dijagnosticiran NSCLC-PCC.
4. Značajna je raspodjela bolesnika između nalaza imunocitokemijskih protutijela (TTF-1, p40, CD56, CK 5/6) i patohistološkog nalaza.
5. Nema značajne razlike u raspodjeli ispitanika s adenokarcinomom u odnosu na spol.
6. Prema patohistološkoj dijagnozi, značajno više ispitanika s adenokarcinomom ima pozitivan rezultat na EGFR mutaciju u odnosu na ispitanike s ostalim vrstama tumora pluća.
7. EGFR mutacija uglavnom je povezana s nastankom adenokarcinoma i značajno je češće prisutna u žena.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** istražiti učestalost pojedinih vrsta tumora pluća i odrediti dijagnostičku vrijednost imunocitokemijskih protutijela na TTF-1, p40, CD56 i CK 5/6 u dijagnostici tumora pluća.

**Nacrt studije:** presječna studija s povijesnim podacima u kojoj su obrađeni ispitanici unutar posljednjih pet godina.

**Ispitanici i metode:** Ispitanici uključeni u istraživanje bili su svi koji su u periodu od 1.1.2019. do 31.12.2023. na Kliničkom zavodu za citologiju i Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a Osijek imali pozitivan patohistološki nalaz na malignitet u plućima ili pozitivan nalaz molekularnog testiranja. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni i prikazani tablično.

**Rezultati:** U istraživanje je uključeno 313 ispitanika. Najčešće dijagnoze bile su adenokarcinom, planocelularni karcinom i sitnostanični karcinom. Karcinom pluća češći je u muškaraca, s iznimkom adenokarcinoma, od kojeg je oboljelo 46 % žena i 34 % muškaraca. Adenokarcinom pokazao je pozitivitet na TTF-1 iznad 80 %, planocelularni karcinom na p40 iznad 70 % i CK 5/6 iznad 90 %, te sitnostanični karcinom na TTF-1 i CD56 iznad 90 %. 12 % testiranih ispitanika bilo je pozitivno na EGFR mutaciju, od kojih većina ima adenokarcinom i većina su bile žene.

**Zaključci:** Najčešće dijagnosticirani tumori pluća su adenokarcinom, karcinom pločastih stanica i sitnostanični karcinom. Raspodjela bolesnika prema nalazu imunocitokemijskih protutijela i patohistoloških nalaza značajno se razlikuje. EGFR mutacija uglavnom je povezana s nastankom adenokarcinoma i češće je prisutna u žena.

**Ključne riječi:** citologija; imunocitokemija; karcinom pluća; ne-sitnostanični karcinom pluća; sitnostanični karcinom pluća

## 8. SUMMARY

### **Diagnostic value of immunocytochemical antibodies in lung tumor diagnostics**

**Study Objectives:** This study aims to research the frequency of different lung tumor subtypes and determine the diagnostic value of immunocytochemical antibodies for TTF-1, p40, CD56 and CK 5/6 in lung tumor diagnostics.

**Study Design:** The study is designed as a cross-sectional study with historical data, which analyzed participants within the previous five years.

**Participants and Methods:** The participants included in the study were all who, in the period between January 1st 2019 and December 31st 2023, at the Clinical Institute of Cytology and the Clinical Institute of Pathology of the Clinical Hospital Center in Osijek, were pathohistologically positive for any malignancy in the lung or had a positive molecular testing result. Discovered results were statistically analyzed and presented in tables.

**Results:** 313 participants were included in the study. Adenocarcinoma, squamous-cell carcinoma and small-cell lung cancer were the most diagnosed. Lung carcinoma was more common in men, although adenocarcinoma is an exception to this, with 46 % affected women and 34 % affected men. Adenocarcinoma showed above 80 % positivity for TTF-1, squamous-cell carcinoma above 70% for p40 and above 90 % for CK 5/6, and small-cell lung carcinoma above 90 % for both TTF-1 and CD56. 12 % of the tested participants were positive for an EGFR mutation, out of which the majority has adenocarcinoma and majority were women.

**Conclusions:** Most frequently diagnosed lung tumors are adenocarcinoma, squamous-cell carcinoma and small-cell lung cancer. There are significant differences in the distribution of patients in regards to immunocytochemical antibody testing and pathohistological diagnoses. The mutation of EGFR is generally tied to the origination of adenocarcinoma and is more frequently found in women.

**Keywords:** cytology; immunocytochemistry; lung cancer; non-small-cell lung carcinoma; small-cell lung carcinoma

**9. LITERATURA**

1. International Agency for Research on Cancer; Global Cancer Observatory. Trachea, Bronchus and Lung Factsheet. Dostupno na adresi:<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/15-trachea-bronchus-and-lung-fact-sheet.pdf>. Datum pristupa: 29.05.2024.
2. International Agency for Research on Cancer; Global Cancer Observatory. Cancer Today. Dostupno na adresi:[https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group\\_populations=1&types=1&sexes=0&key=total&multiple\\_populations=1](https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&types=1&sexes=0&key=total&multiple_populations=1). Datum pristupa: 29.05.2024.
3. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Aluru JS, Barsouk A. Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2021;25(1):45-52.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj u 2021. godini. Dostupno na adresi:<https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/incidencija-raka-u-hrvatskoj-u-2021-godini/>. Datum pristupa: 29.05.2024.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Bilten incidencija raka u Hrvatskoj 2015. godine. Dostupno na adresi:<https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/bilten-incidencija-raka-u-hrvatskoj-2015-godine/>. Datum pristupa: 01.06.2024.
6. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. Patologija. Peto izdanje, Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
7. Jemal A, Miller KD, Ma J, Siegel RL, Fedewa SA, Islami F i sur. Higher Lung Cancer Incidence in Young Women Than Young Men in the United States. *N Engl J Med*. 2018;378:1999-2009.
8. Ministarstvo zdravstva. Nacionalni program za probir i rano otkrivanje raka pluća 2020. – 2024. Dostupno na adresi: <https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2019%20Programi%20i%20projekti/NACIONALNI%20PROGRAM%20PREVENCIJJE%20RAKA%20PLU%C4%86A.pdf>. Datum pristupa: 01.06.2024.
9. Li Y, Hecht SS. Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. *Food Chem Toxicol*. 2022 Jul;165:113179.

10. Hecht SS, Hatsukami DK. Smokeless tobacco and cigarette smoking: chemical mechanisms and cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2022 Mar;22(3):143-155.
11. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011 Dec;32(4):605-44.
12. Raso MG, Bota-Rabassedas N, Wistuba II. Pathology and Classification of SCLC. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 16;13(4):820.
13. Basumallik N, Agarwal M. Small Cell Lung Cancer. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Dostupno na adresi:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482458/#article-24494.s15>  
Datum pristupa: 05.06.2024.
14. American Cancer Society. Lung Cancer Survival Rates. Dostupno na adresi:  
<https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>  
Datum pristupa: 07.06.2024.
15. Myers DJ, Wallen JM. Lung Adenocarcinoma. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Dostupno na adresi:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/>  
Datum pristupa: 07.06.2024.
16. Kuhn E, Morbini P, Cancellieri A, Damiani S, Cavazza A, Comin CE. Adenocarcinoma classification: patterns and prognosis. *Pathologica*. 2018 Mar;110(1):5-11.
17. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S i sur. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2019 Mar;14(3):377-407.
18. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, Fu XH, Han XR, Threapleton D i sur. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):78985-78993.
19. Luo W, Zeng Z, Jin Y, Yang L, Fan T, Wang Z i sur. Distinct immune microenvironment of lung adenocarcinoma in never-smokers from smokers. *Cell Rep Med*. 2023 Jun 20;4(6):101078.
20. Yoon HY, Ryu JS, Sim YS, Kim D, Lee SY, Choi J i sur. Clinical significance of EGFR mutation types in lung adenocarcinoma: A multi-centre Korean study. *PLoS One*. 2020 Feb 13;15(2):e0228925.

21. Lau SCM, Pan Y, Velcheti V, Wong KK. Squamous cell lung cancer: Current landscape and future therapeutic options. *Cancer Cell*. 2022 Nov 14;40(11):1279-1293.
22. Dantoing E, Piton N, Salaün M, Thiberville L, Guisier F. Anti-PD1/PD-L1 Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Actionable Oncogenic Driver Mutations. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 11;22(12):6288.
23. Šamija M, Tomek R, Pavelić Lj i sur. *Rak Pluća*. Prvo izdanje, Zagreb: Nakladni zavod Globus, Klinika za plućne bolesti „Jordanovac“; 1998.
24. Inamura K. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Mar 14;10(3):72.
25. Li C, Lu H. Adenosquamous carcinoma of the lung. *Onco Targets Ther*. 2018 Aug 14;11:4829-4835.
26. Šamija M, Šarčević B, Rudan I. *Rijetki tumori*. Prvo izdanje, Zagreb: Nakladni zavod Globus, Klinika za tumore, Hrvatska liga protiv raka; 1997.
27. Tai Q, Zhang L, Hu X. Clinical characteristics and treatments of large cell lung carcinoma: a retrospective study using SEER data. *Transl Cancer Res*. 2020 Mar;9(3):1455-1464.
28. Yang L, Fan Y, Lu H. Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2022 Oct 11;28:1610730.
29. Panunzio A, Sartori P. Lung Cancer and Radiological Imaging. *Curr Radiopharm*. 2020;13(3):238-242.
30. Bešlija S, Vrbanec D i sur. *Medicinska/internistička onkologija*. Prvo izdanje, Sarajevo: Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Udruženje onkologa Bosne i Hercegovine; 2014.
31. Stanzel F. Bronchoalveolar Lavage. *Principles and Practice of Interventional Pulmonology*. 2012 May 22:165–76.
32. Gregg JP, Li T, Yoneda KY. Molecular testing strategies in non-small cell lung cancer: optimizing the diagnostic journey. *Transl Lung Cancer Res*. 2019 Jun;8(3):286-301.
33. Koss LG, Melamed MR. *Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases*. Peto izdanje, Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
34. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019 Oct;28(10):1563-1579.
35. Ragavan MV, Patel MI. Understanding sex disparities in lung cancer incidence: are women more at risk? *Lung Cancer Manag*. 2020 Jun 22;9(3):LMT34.

36. May L, Shows K, Nana-Sinkam P, Li H, Landry JW. Sex Differences in Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Jun 8;15(12):3111.
37. International Early Lung Cancer Action Program Investigators; Henschke CI, Yip R, Miettinen OS. Women's susceptibility to tobacco carcinogens and survival after diagnosis of lung cancer. *JAMA*. 2006 Jul 12;296(2):180-4.
38. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*. 2014 Sep 15;120(18):2883-92.
39. Stenhouse G, Fyfe N, King G, Chapman A, Kerr KM. Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004 Apr;57(4):383-7.
40. Katayama Y, Yamada T, Morimoto K, Fujii H, Morita S, Tanimura K i sur. TTF-1 Expression and Clinical Outcomes of Combined Chemoimmunotherapy in Patients With Advanced Lung Adenocarcinoma: A Prospective Observational Study. *JTO Clin Res Rep*. 2023 Mar 7;4(4):100494.
41. Folpe AL, Gown AM, Lamps LW, Garcia R, Dail DH, Zarbo RJ i sur. Thyroid transcription factor-1: immunohistochemical evaluation in pulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol*. 1999 Jan;12(1):5-8.
42. Wu M, Wang B, Gil J, Sabo E, Miller L, Gan L i sur. p63 and TTF-1 immunostaining. A useful marker panel for distinguishing small cell carcinoma of lung from poorly differentiated squamous cell carcinoma of lung. *Am J Clin Pathol*. 2003 May;119(5):696-702.
43. Walia R, Jain D, Madan K, Sharma MC, Mathur SR, Mohan A i sur. p40 & thyroid transcription factor-1 immunohistochemistry: A useful panel to characterize non-small cell lung carcinoma-not otherwise specified (NSCLC-NOS) category. *Indian J Med Res*. 2017 Jul;146(1):42-48.
44. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 ( $\Delta$ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2012 Mar;25(3):405-15.
45. Kontogianni K, Nicholson AG, Butcher D, Sheppard MN. CD56: a useful tool for the diagnosis of small cell lung carcinomas on biopsies with extensive crush artefact. *J Clin Pathol*. 2005 Sep;58(9):978-80.
46. Hiroshima K, Iyoda A, Shida T, Shibuya K, Iizasa T, Kishi H i sur. Distinction of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma from small cell lung carcinoma: a morphological, immunohistochemical, and molecular analysis. *Mod Pathol*. 2006 Oct;19(10):1358-68.



47. Andrini E, Marchese PV, De Biase D, Mosconi C, Siepe G, Panzuto F i sur. Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung: Current Understanding and Challenges. *J Clin Med.* 2022 Mar 7;11(5):1461.
48. Argon A, Nart D, Veral A. The Value of Cytokeratin 5/6, p63 and Thyroid Transcription Factor-1 in Adenocarcinoma, Squamous Cell Carcinoma and Non-Small-Cell Lung Cancer of the Lung. *Turk Patoloji Derg.* 2015;31(2):81-8.
49. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, Pynegar MJ, Deshmukh M, Rice A i sur. Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol.* 2010 Apr;5(4):436-41.
50. Li AR, Chitale D, Riely GJ, Pao W, Miller VA, Zakowski MF i sur. EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *J Mol Diagn.* 2008 May;10(3):242-8.
51. Boch C, Kollmeier J, Roth A, Stephan-Falkenau S, Misch D, Grüning W i sur. The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open.* 2013 Apr 3;3(4):e002560.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI

Korina Uštar, univ. bacc. med. lab. diag.

Datum i mjesto rođenja: 12.01.2001., Osijek

Adresa: Sjenjak 48, 31000 Osijek

E-mail adresa: [kustar@mefos.hr](mailto:kustar@mefos.hr)

### ŠKOLOVANJE

2015. – 2019. III. gimnazija Osijek

2019. – 2022. Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika,  
Medicinski fakultet Osijek

2022. – 2024. Diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika,  
Medicinski fakultet Osijek