



Smjernice za dijagnostičku obradu tkivnih uzoraka nesitnostaničnih karcinoma pluća

Guidelines for handling tissue samples in non-small cell lung cancer diagnostics

Lovorka Batelja Vuletić^{1,2✉}, Monika Ulamec^{1,3}, Jasmina Rajc⁴, Snježana Tomić⁵, Sven Seiwerth^{1,2}
u ime radne skupine za torakalnu patologiju Hrvatskog društva za patologiju i sudsku medicinu

¹ Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

² Klinički zavod za patologiju i citologiju, Klinički bolnički centar Zagreb

³ Klinički zavod za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb

⁴ Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku, Klinički bolnički centar Osijek

⁵ Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Klinički bolnički centar Split

Deskriptori

NESITNOSTANIČNI KARCINOM PLUĆA – genetika, patologija; IMMUNOHISTOKEMIJA; FIKSACIJA TKIVA; TUMORSKI BIOMARKERI – genetika; SMJERNICE; HRVATSKA

Descriptors

CARCINOMA, NON-SMALL-CELL LUNG – genetics, pathology; IMMUNOHISTOCHEMISTRY; TISSUE FIXATION; BIOMARKERS, TUMOR – genetics; PRACTICE GUIDELINES AS TOPIC; CROATIA

SAŽETAK. Karcinom pluća je jedan od tri karcinoma s najvišom incidencijom u Republici Hrvatskoj, u oba spola, a najučestaliji su nesitnostanični karcinomi pluća. Zadnje desetljeće označilo je velik iskorak u liječenju uznapredovalog karcinoma pluća, a posljedično tomu i u obradi uzoraka tkiva dobivenih u svrhu patohistološke dijagnostike i molekularne analize pacijenata s ovom dijagnozom, a koja je postala i temelj ciljane terapije. Od izuzetne je važnosti standardizacija obrade tkiva, a koja prati aktualne internacionalne preporuke. Ove smjernice namijenjene su primarno doktorima medicine, specijalistima patoloziima, ali i svim drugim specijalistima koje sudjeluju u dijagnostici, liječenju i praćenju pacijenta: specijalistima onkoloziima, pulmoloziima, radioloziima, kirurziima.

SUMMARY. Lung cancer is one of the three cancers with the highest incidence in the Republic of Croatia in both genders, and non-small cell lung cancers is the most common group. The last decade has marked a great step forward in the therapy and processing of tissue samples from patients with this diagnosis, it is also the basis of targeted therapy. Standardized pathological processing that follows current international recommendations is extremely important. These guidelines are primarily intended for doctors of medicine; pathologists, as well as for specialists in oncology, pulmonology, radiology and surgery.

Unatoč mnogim javnozdravstvenim akcijama i naporima, incidencija karcinoma pluća kao i stope smrtnosti u Hrvatskoj i u cijelom svijetu ostaju visoke te predstavljaju velik teret za zdravstveni sustav. Nesitnostanični karcinomi pluća (NSCLC, engl. *non small cell cancer*) u toj kategoriji zauzimaju do 85%¹, a što je i razlog donošenja ovih nacionalnih smjernica. Male biopsije i reseksijski uzorci NSCLC-a koji dolaze na obradu i analizu u patohistološki laboratorij u porastu su, kao i različitost pristupa u obradi i analizi uzoraka. Osnovni cilj ovih smjernica jest poboljšanje kvalitete rada u laboratorijima, kao i standardizacija postupaka dijagnostičke obrade uzoraka NSCLC-a.

Smjernice za dijagnostičku obradu i imunohistokemijsku te molekularnu analizu prediktivnih biljega materijala uzoraka NSCLC-a u patohistološkom laboratoriju izradila je radna skupina za torakalnu patologiju Hrvatskog društva za patologiju i sudsku medicinu. Smjernice su usvojene od strane Hrvatskog društva za patologiju i sudsku medicinu na prvom zajedničkom nacionalnom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem hrvatskih društava za patologiju i citologiju u Dubrovniku 23. – 26. studenoga 2023. Ove smjernice usvojila su i dva stručna društva: Hrvatsko

društvo za torakalnu kirurgiju te Hrvatsko pulmološko društvo. Izrada ovih smjernica nije financijski potpomognuta.

Epidemiologija

Karcinom pluća, prema podatcima Hrvatskog registra za rak iz 2020. godine, zauzima drugo mjesto po učestalosti sijela karcinoma u muškaraca (16%) te treće mjesto po učestalosti sijela karcinoma u žena (10%). Incidencija raka traheje, bronha i pluća u 2020. godini iznosila je za oba spola 76,2, odnosno 47,2, za muškarce 102,6, odnosno 69,0, a za žene 51,2 odnosno 29,9 (grube stope / 100.000, odnosno korigirane stope EU / 100.000), a ukupni mortalitet karcinoma ovog sijela za oba spola 69,6, odnosno 41,8, za muškarce 97,3, odnosno 65,6, te za žene 43,3 odnosno 24,1 (grube stope/100.000, odnosno korigirane stope EU/100.000).¹

✉ Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Lovorka Batelja-Vuletić,
Klinički zavod za patologiju i citologiju, Klinički bolnički centar Zagreb,
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, e-pošta: lovorka.batelja.vuletic@mef.hr

Primljeno 4. srpnja 2024., prihvaćeno 21. listopada 2024.

Rizični faktori, kao npr. pušenje, široko su prisutni u populaciji svih dobnih skupina, obaju spolova. Tu je i onečišćen zrak, kao i veća izloženost azbestu kroz kontakt s lokacijama bogatim azbestom u proteklom vremenskom periodu i prilikom građevinskih radova na objektima iz druge polovice 20. stoljeća.

Određivanje patohistološke dijagnoze

Patohistološka dijagnoza NSCLC-a iz biopsijskog materijala i uzoraka resekcije postavlja se sukladno aktualnoj klasifikaciji tumora toraksa Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organization*), prema morfološkim kriterijima.² U prethodnom desetogodišnjem razdoblju patohistološka dijagnoza NSCLC-a postavljala se dominantno u uznapredovalim stadijima bolesti te je rano dijagnosticiranje od presudne važnosti.

Tu ulogu ima program ranog otkrivanja karcinoma pluća koji se u Republici Hrvatskoj provodi od 2020. godine. Patolozi su karika u dijagnostičkom lancu jer analiziraju bioptirane suspektne lezije koje se definiraju prema radiološkim kriterijima, no uloga patologa, kao i patohistološka evaluacija suspektnih bioptiranih lezija, ne navodi se u tekstu nacionalnog programa prevencije raka pluća.

Dijagnostička obrada uzoraka tkiva u patohistološkom laboratoriju

U Kliničkim zavodima za patologiju i citologiju kliničkih bolničkih centara u Republici Hrvatskoj trebaju raditi patolozi s usmjerenjem k plućnoj patologiji, educirani u području plućne patologije. Također je važna i uloga laboratorijskih inženjera, a zbog osiguranja adekvatne obrade primljenih uzoraka.

Preporuke koje se odnose na obradu tkiva, morfološku analizu, imunohistokemijsku analizu za postavljanje patohistološke dijagnoze te analizu PD-L1 statusa i pojedinačnih analiza prediktivnih biomarkera, kao i odabira tumorskog tkiva za molekularno profiliranje tumora, podijeljene su na smjernice koje se odnose na preanalitičku, analitičku i postanalitičku fazu.

Smjernice za preanalitičku fazu obrade uzorka

Preanalitička faza počinje od trenutka uzorkovanja tkivnih materijala i traje do trenutka patohistološke analize materijala od strane patologa. Ova faza ima značajan utjecaj na analitičku fazu i u konačnici na postanalitičku fazu.³ Postupci s materijalom u preanalitičkoj fazi imaju utjecaj na očuvanje morfologije, rezultat imunohistokemijskih analiza te kvalitetu i rezultat molekularnih analiza.

Preanalitika se minimalno mijenjala zadnjih deset godina. Područje plućne patologije je specifično jer

se, izuzev kirurškog materijala, raspolaže vrlo malim, možda i najmanjim tkivnim uzorcima u patologiji, a istovremeno je opseg analiza izuzetno velik. Upravo zbog toga bioptički uzorci tkiva uvijek se zasebno uklapaju u parafinske blokove. U plućnoj patologiji analizira se biološki materijal dobiven bronhoskopskom biopsijom, perkutanom transtorakalnom biopsijom, otvorenom biopsijom pluća, torakocentezom, parcijalnom ili potpunom lobektomijom te pulmektomijom.

Vrijeme nakon odvajanja tkiva iz vaskularne mreže (uzimanja uzorka) do trenutka fiksacije jest vrijeme hladne ishemije.^{3,4} Produženje vremena hladne ishemije može rezultirati kvantitativnim i kvalitativnim promjenama (degradacijom) nukleinskih kiselina, osobito RNA. Do enzimske degradacije RNA dolazi i u slučaju produženog vremena fiksacije.^{5–7}

Kao i kod ostaloga biološkog materijala, preanalitička faza u zavodima za patologiju započinje u trenutku prijma materijala, kada je potrebno provjeriti usuglašenost podataka na uputnici koja prati biološki materijal i podatke na ambalaži u kojoj je biološki materijal primljen. Primljeni materijal treba dobiti svoju oznaku (crtični kod, engl. *bar code*) koji ga prati tijekom cijele obrade materijala od prijma do ulaganja u arhivu nakon završene patohistološke analize (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: snažna).^{4,8}

Fiksacija u formalinu kritičan je korak u očuvanju DNA i RNA. Optimalno vrijeme fiksacije tkiva u neutralno „puferiranom“ formalinu jest 6 – 12 sati za male bioptičke uzorke (bronhoskopija i iglena biopsija) i 24 – 48 sati za operativne reseksijske uzorke (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: snažna).^{6–8}

Kraće vrijeme fiksacije rezultira nekompletnom fiksacijom te dolazi do enzimske degradacije i puno teže ekstrakcije DNA i RNA.⁷ Nepotpuna fiksacija rezultira i poremećajem morfologije, što otežava patohistološku analizu.

Nakon preporučenog vremena fiksacije pristupa se preuzimanju biološkog materijala koji se odnosi na pregled i odabir dijela primljenog materijala koji se uklapa u parafinske blokove ili se primljeni materijal, ako se radi o bioptičkim uzorcima, uklapa u parafinske blokove u cijelosti. Prilikom preuzimanja biološkog materijala obavlja se i makroskopski pregled primljenog materijala. Makroskopski pregled materijala (prilog br. 1) dobivenog nekom od bioptičkih tehnika obuhvaća određivanje broja primljenih uzoraka, pojedinačno mjerenje najvećeg promjera svakog primljenog uzorka i konačno stavljanje svakog uzorka zasebno u plastičnu kasetu iz koje će biti uklopljen u pojedinačni parafinski blok.^{4,5} Makroskopski pregled operativnog materijala dobivenog parcijalnom resekcijom

plućnog reznja obuhvaća mjerenje materijala u tri dimenzije, određivanje cjelovitosti uzorka, identificiranje reseksijskih rubova te udaljenost promjene/tumora u odnosu na reseksijske rubove plućnog parenhima, markiranje dijela visceralne pleure koja je u najbližem odnosu s promjenom, mjerenje tvorbe/tumora u tri dimenzije, određivanje postotka nekroze tumora, uzimanje po jednog reza na 1 cm veličine tumora ili u serijskim rezovima preuzimanje cijelog tumora ako je tumor promjera do 3 cm. Preostali plućni parenhim reže se na rezove debljine do 0,5 cm, kako bi se mogli identificirati satelitski tumorski čvorovi, drugi tumori – ako se radi o multifokalnom neoplastičnom procesu – ili bilo koja druga patološka promjena preostalog plućnog parenhima.^{4,5,9} Makroskopski pregled operativnog materijala cijeloga plućnog reznja, uz gore navedeno, obuhvaća i odnos tumora prema bronhalnom i vaskularnom reseksijskom rubu i njihovo uklapanje u parafinske blokove. Uz limfne čvorove koji se primaju odvojeno i koji trebaju biti označeni prema nodularnim regijama, potrebno je izolirati i vidljive peribronhalne i intrapulmonalne limfne čvorove te ih uklopiti u parafinske blokove. Bronhalni limfni čvorovi uklapaju se u cijelosti, obje polovice prerezane kroz dulji promjer, odnosno serijskim rezovima u cijelosti ako se makroskopski ne vidi zahvaćenost limfnog čvora tumorom. Ako se makroskopski uočava zahvaćenost limfnog čvora tumorom uzima se onaj rez gdje je promjer tumora najveći, odnosno gdje se vidi odnos tumora i čahure limfnog čvora.⁹ Artificijelne promjene

mogu biti rezultat uzimanja biološkog materijala ili pak nastale u laboratoriju, trebaju se nastojati svesti na minimum, a ako su prisutne potrebno ih je prepoznati.

Preuzeti uzorci materijala dalje se procesuiraju rutinskom metodom prilikom koje se istiskuje formalin iz tkiva te se materijal uklapa u parafinske blokove. Rezovi tkiva uklopljenog u parafin trebaju biti debljine 3 – 5 mikrona, na standardno bojenim hemalaun-eozin (HE) preparatima trebaju biti tri reza jednog uzorka, a za imunohistokemijske analize, kao i za molekularne analize, preporučuje se učiniti unaprijed neobojene rezove (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: snažna).^{8,9} Učestalost ponovnog rezanja blokova treba svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se štedio materijal. Rezanje obavljaju educirani, iskusni laboratorijski tehničari, koristeći mikrotome opremljene slapovima kako bi se iskoristio sav primljeni materijal.⁹ Neobojeni rezovi mogu se čuvati maksimalno do dva mjeseca, u tami, na temperaturi od 2°C (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: umjerena).^{8,9}

Ove smjernice nisu namijenjene obradi i analizi citoloških uzoraka, no valja spomenuti kako se prvenstveno preporučuje citološki materijal uklopiti u stanični blok (citoblok) te ga dalje procesuirati jednako kao biopsijski uzorak tkiva (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: umjerena).^{8,9} Unatoč tomu, u mnogim ustanovama još uvijek se koriste citološki razmazi koji iznimno mogu biti od koristi u dobivanju nalaza.

PRILOG BR. 1: PREANALITIKA – DIO KOJI SE ODNOSI NA RAD DOKTORA MEDICINE, SPECIJALISTA PATOLOGA

1.1. Postupanje s biopsijskim uzorcima:

- odrediti broj uzoraka i maksimalni promjer pojedinog uzorka,
- svi uzorci se puštaju u obradu,
- materijal podijeliti u više plastičnih košića odnosno parafinskih blokova (idealno svaki uzorak u zaseban blok),
- iglene biopsije odmah nakon uzimanja materijala fiksirati u plastičnim košaricama.

1.2. Postupanje s operativnim uzorcima:

- izmjeriti i zabilježiti veličinu uzorka u tri dimenzije,
- prilikom prijma uzorak razrezati na rezove debljine najmanje 1 cm, kako bi se adekvatno fiksirao,
- identificirati reseksijske rubove (bronh/krvne žile), označiti ih i uklopiti u parafinske blokove,
- markacija tkivnom bojom pojedinih segmenata primljenog materijala (pleura / parenhimski rub / medijastinalne strukture),
- izmjeriti i zabilježiti veličinu tumora u tri dimenzije te opisati odnos tumora prema glavnom bronhu, reseksijskim rubovima i pleuri,
- ako se pri pregledu materijala utvrde drugi čvorovi, opisati i označiti i njih, izmjeriti, odrediti njihov odnos prema prvom opisanom tumorskom čvoru, reseksijskim rubovima te uzeti uzorke za analizu,
- uzeti minimalno jedan nasumični uzorak ostalog tkiva pluća nezahvaćenog tumorom,
- tumore promjera ≤ 30 mm preuzeti serijskim rezovima u cijelosti, za tumore promjera ≥ 30 mm uzeti najmanje 1 uzorak / 1 cm promjera tumora,
- resektat pluća opsežno razrezati i identificirati eventualne satelitske tumorske čvorove, simultani drugi tumor i peribronhalne i intrapulmonalne limfne čvorove,
- limfne čvorove pregledati u cijelosti ako metastaza nije makroskopski vidljiva, a kod vidljive metastaze preuzeti jedan reprezentativni prerez tumorom zahvaćenoga limfnog čvora.

Smjernice za analitičku fazu

Pacijenti s radnom dijagnozom karcinoma pluća, temeljem kliničke slike i radiološke obrade, zahtijevaju patohistološku dijagnozu. Svaki postupak dijagnostičke biopsije/uzorkovanja tkiva koji se provodi treba imati za cilj maksimiziranje količine dobivenog tkiva.⁹ Ciljevi uzorkovanja tkiva uključuju postavljanje patohistološke dijagnoze sukladno aktualnoj klasifikaciji WHO-a na preparatima bojenim HE, a prema potrebi i imunohistokemijsku analizu (IHC) te molekularno testiranje.² Stoga je kvantiteta i kvaliteta tkivnog uzorka u postavljanju dijagnoze NSCLC-a i potrebnih analiza od izuzetne važnosti.

Patohistološke dijagnoze se postavljaju prema aktualnoj klasifikaciji torakalnih tumora WHO-a iz 2021. godine (tablica 1).² Klasifikacija temelji patohistološku dijagnozu na morfologiji i prema potrebi na ograničenoj upotrebi imunohistokemije kako bi se očuvalo tumorsko tkivo za molekularne analize (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: visoka, preporuka: visoka).^{2,8,9}

Sedamdeset posto karcinoma pluća dijagnosticira se u uznapredovalom stadiju te se patohistološka dijagnoza primarno postavlja na bioptičkom uzorku ili citološkom materijalu uklopljenom u citoblok koji se obrađuje i klasificira jednako kao i tkivni uzorci.¹⁰ U malim tkivnim uzorcima dijagnoze NSCLC-a koje su moguće jesu: NSCLC: karcinom pločastog epitela, NSCLC: adenokarcinom, NSCLC: prvenstveno adenokarcinom, NSCLC: prvenstveno karcinom pločastog epitela. Dijagnoza nesitnostanični karcinom pluća: karcinom pločaste diferencijacije postavlja se ako su prisutni morfološki elementi pločaste diferencijacije (orožnjavanje, vidljivi intercelularni mostići, prisutna komponenta *in situ*). Dijagnoza NSCLC: adenokarcinom postavlja se ako je prisutna morfologija adenokarcinoma (acinarne, papilarne ili kribriiformne formacije). Dijagnoza NSCLC: prvenstveno adenokarcinom ili prvenstveno karcinom pločaste diferencijacije postavlja se ako na temelju morfologije nije moguće postaviti precizniju dijagnozu od nesitnostaničnog karcinoma pluća, ali se koristi i imunohistokemijska analiza. Pozitivni imunohistokemijski markeri karakteristični za adenokarcinom pluća (TTF1, Napsin-A) rezultiraju dijagnozom NSCLC, prvenstveno adenokarcinom, a pozitivni markeri karakteristični za pločastu diferencijaciju (p40, CK5/6, p 63) dijagnozom NSCLC, prvenstveno karcinom pločaste diferencijacije. Dijagnoza NSCLC-NOS koristi se kada preciznija dijagnoza nije moguća i treba se koristiti uz ograničenja, maksimalno u do 10% uzoraka godišnje. U tom slučaju potreban je barem jedan pozitivan imunohistokemijski epitelni marker (CK AE1/AE3, Oscar). Imunohistokemijska analiza neuroendokrinih markera provodi se samo ako morfologija upućuje na neuro-

endokrinu neoplazmu (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: visoka, preporuka: visoka).^{2,9} Dijagnoze adenokarcinoma *in situ* (AIS), minimalno invazivnog adenokarcinoma (MIA), velikostaničnog karcinoma ili bilo kojega miješanog karcinoma (adenoskvamoznog karcinoma, miješanog karcinoma s komponentama adenokarcinoma i neuroendokrino karcinoma, kao i miješanog karcinoma s komponentom karcinoma pločaste diferencijacije i neuroendokrino karcinoma) te sarkomatoidnog/pleomorfno karcinoma moguće je postaviti samo na operativnom materijalu (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: visoka).^{2,9,12}

U malim bioptičkim uzorcima može se postaviti i sumnja na karcinom pluća tipa žlijezde slinovnice, a definitivna dijagnoza se postavlja na operativnom materijalu te se na operativnom materijalu izvodi i gradiranje. Adenokarcinom se klasificira od 2015. godine na invazivni nemucinozni adenokarcinom i invazivni mucinozni adenokarcinom (IMA), koloidni karcinom, fetalni adenokarcinom te enterički adenokarcinom. Invazivni mucinozni adenokarcinom češće pokazuju mutacije KRAS (62 – 76%, obično G12D i G12V), zatim NRG1 fuzije te ERBB2 alteracije, a rjeđe mutacije EGFR i TP53 u odnosu na invazivne nemucinozne adenokarcinome.^{12,13}

Prema aktualnoj klasifikaciji prepoznaje se pripadajuća premaligna lezija: atipična adenomatoidna hiperplazija (AAH): prema definiciji; žarište atipičnih pneumocita bez prisutne invazije, promjera do 0,5 cm te adenokarcinom *in situ*: žarište atipičnih pneumocita promjera 0,5 – 3 cm, bez prisutne stromalne i limfovaskularne invazije. Pojam mikroinvazivni adenokarcinom znači: adenokarcinom s invazivnom komponentom promjera do 0,5 cm.²

Dijagnoza koloidnog karcinoma postavlja se temeljem morfologije, a dijagnoza fetalnog i enteričkog karcinoma postavlja se temeljem morfologije i specifičnoga imunohistokemijskog profila. Subtipovi karcinoma pločaste diferencijacije jesu bazaloidni karcinom te „*lymphoepithelial like*“ karcinom koji se dijeli na Epstein-Barrin virus (EBV) pozitivan i EBV negativan (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: visoka).^{2,9,12}

Karcinom pločaste diferencijacije ne gradira se, adenokarcinomi se gradiraju: gradus I: dobro diferencirani adenokarcinomi građeni su od lepidičke komponente ili su u kombinaciji s <20% načina rasta visokog gradusa; gradus II: umjereno diferencirani adenokarcinomi pokazuju acinarni ili papilarni rast ili su u kombinaciji <20% načina rasta visokog gradusa; gradus III: slabo diferencirani adenokarcinom, građen je od 20% ili >20% komponente visokog gradusa koji predstavljaju mikropapilarni, solidni i kribriiformni način rasta.¹⁵ Gradiranje adenokarcinoma moguće je

TABLICA 1. POPIS PATOHISTOLOŠKIH DIJAGNOZA NESITNOSTANIČNIH KARCINOMA PLUĆA I PRIPADAJUĆIH PREMALIGNIH LEZIJA S ICD-O, SUKLADNO KLASIFIKACIJI TORAKALNIH TUMORA WHO-A IZ 2021. GODINE
TABLE 1. LIST OF HISTOPATHOLOGICAL DIAGNOSES OF NSCLC AND ASSOCIATED PREMALIGNANT LESIONS WITH ICD-O, IN ACCORDANCE WITH THE WHO CLASSIFICATION OF THORACIC TUMORS 2021.

Prekursorna žljezdana lezija. Atipična adenomatozna hiperplazija 8250/0 / Precursor glandular lesions. Atypical adenomatous hyperplasia 8250/0
Adenokarcinom in situ. Adenokarcinom in situ, nemucinozni 8250/2 / Adenocarcinoma in situ, nonmucinous 8250/2
Adenokarcinom in situ, mucinozni 8253/2 / Adenocarcinoma in situ, mucinous 8253/2
Adenokarcinom. Minimalno invazivan adenokarcinom. Minimalno invazivan adenokarcinom, nemucinozni 8256/3 / Adenocarcinomas. Minimally invasive adenocarcinoma. Minimally invasive adenocarcinoma, nonmucinous 8256/3
Minimalno invazivan adenokarcinom, mucinozni 8257/3 / Minimally invasive adenocarcinoma, mucinous 8257/3
Invazivni nemucinozni adenokarcinom. Lepidički adenokarcinom 8250/3 / Invasive nonmucinous adenocarcinoma. Lepidic adenocarcinoma 8250/3
Acinarni adenokarcinom 8551/3 / Acinar adenocarcinoma 8551/3
Papilarni adenokarcinom 8260/3 / Papillary adenocarcinoma 8260/3
Mikropapilarni adenokarcinom 8265/3 / Micropapillary adenocarcinoma 8265/3
Solidni adenokarcinom 8230/3 / Solid adenocarcinoma 8230/3
Invazivni mucinozni adenokarcinom 8253/3 / Invasive mucinous adenocarcinoma 8253/3
Miješani invazivni mucinozni i nemucinozni adenokarcinom 8254/3 / Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma 8254/3
Coloidni adenokarcinom 8480/3 / Colloid adenocarcinoma 8480/3
Fetalni adenokarcinom 8333/3 / Fetal adenocarcinoma 8333/3
Adenokarcinom, enterični tip 8144/3 / Adenocarcinoma, enteric type 8144/3
Adenokarcinom, NOS 8140/3 / Adenocarcinoma, NOS 8140/3
Prekursorne lezije pločastog epitela. Karcinom <i>in situ</i> pločastog epitela 8070/2 / Squamous precursor lesions Squamous cell carcinoma in situ 8070/2
Blaga displazija pločastog epitela 8077/0 / Mild squamous dysplasia 8077/0
Umjerena displazija pločastog epitela 8077/2 / Moderate squamous dysplasia 8077/2
Jaka displazija pločastog epitela 8077/2 / Severe squamous dysplasia 8077/2
Karcinom pločastog epitela. Karcinom pločastog epitela, NOS 8070/3 / Squamous cell carcinomas. Squamous cell carcinoma, NOS 8070/3
Karcinom pločastog epitela, keratinizirajući 8071/3 / Squamous cell carcinoma, keratinizing 8071/3
Karcinom pločastog epitela, nekeratinizirajući 8072/3 / Squamous cell carcinoma, nonkeratinizing 8072/3
Bazaloidni karcinom pločastog epitela 8083/3 / Basaloid squamous cell carcinoma 8083/3
Limfoepitelni karcinom 8082/3 / Lymphoepithelial carcinoma 8082/3
Karcinom velikih stanica 8012/3 / Large cell carcinomas. Large cell carcinoma 8012/3
Adenoskvamozni karcinom 8560/3 / Adenosquamous carcinoma 8560/3
Sarkomatoidni karcinom. Pleomorfni karcinom 8022/3 / Sarcomatoid carcinomas. Pleomorphic carcinoma 8022/3
Karcinom orijaških stanica 8031/3 / Giant cell carcinoma 8031/3
Karcinom vretenastih stanica 8032/3 / Spindle cell carcinoma 8032/3
Plućni blastom 8972/3 / Pulmonary blastoma 8972/3
Karcinosarkom 8980/3 / Carcinosarcoma 8980/3
Drugi epitelni tumori, NUT karcinom 8023/3 / Other epithelial tumors, NUT carcinoma 8023/3
Torakalni SMARCA4-deficijentni nediferencirani tumori 8044/3 / Thoracic SMARCA4-deficient undifferentiated tumors 8044/3
Tumori tipa žlijezda slinovnica / Salivary gland-type tumors
Pleomorfni adenom 8940/0 / Pleomorphic adenoma 8940/0
Adenoid cistični karcinom 8200/3 / Adenoid cystic carcinoma 8200/3
Epitelno-mioepitelni karcinom 8562/3 / Epithelial-myoepithelial carcinoma 8562/3
Mukoepidermoidni karcinom 8430/3 / Mucoepidermoid carcinoma 8430/3
Hijalinizirajući svijetlostanični karcinom 8310/3 / Hyalinizing clear cell carcinoma 8310/3
Mioepitelioma 8982/0 / Myoepithelioma 8982/0
Mioepitelni karcinom 8982/3 / Myoepithelial carcinoma 8982/3

samo na operativnom reseksijskom materijalu (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: visoka, preporuka: visoka).^{2,8}

Ako se temeljem morfologije ne može odrediti radi li se o adenokarcinomu ili karcinomu pločaste diferencijacije, kako bi se sačuvalo tkivo za potrebne molekularne analize, preporučuje se ograničeno korištenje imunohistokemijskih markera, u prvom koraku samo analiza p40 i TTF1 koja će riješiti većinu dilema (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: visoka, preporuka: visoka).^{2,9}

STAS označava širenje tumora kroz zračne prostore, udaljeno minimalno 0,5 cm od glavne tumorske mase, s prisutnošću u minimalno tri ili pet alveolarnih prostora. STAS pokazuje solidni ili mikropapilarni rast ili su prisutne pojedinačne tumorske stanice. STAS se veže uz lošiji klinički ishod i nužno ga je uočiti i navesti u patohistološkom nalazu, osobito kod atipičnih lobektomija.¹⁴

Važno je i analizirati odnos tumorske mase prema visceralnoj pleuri te prema reseksijskim rubovima: bronhalnom i vaskularnom, odnosno prema parenhimskom rubu kod atipičnih resekcija.

Potrebno je zabilježiti i citološke osobitosti tumorskih stanica (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: visoka, preporuka: visoka).^{2,8}

Trenutno u internacionalnim smjernicama NCCN-a (engl. *National Comprehensive Cancer Network*), verzija 9.2024., stoji preporuka bronhoskopičarima i interventnim radiolozima u smjeru nastojanja dobivanja dovoljno tkiva za histološku analizu, analizu prediktivnih biomarkera i molekularne analize, jer je u sadašnjem uhodanom sustavu obrade i analize optimalan materijal za molekularne analize tkivo fiksirano u formalinu te uklopljeno u parafinski blok (FFPE). FDA nije još odobrio analizu sekvenciranjem nove generacije (NGS-om, engl. *next generation sequencing*) materijala citoblokova. Surogat-uzorak je periferna krv i cf/ct DNA (od engl. *cell free/circulating tumor DNA*), koji se može koristiti u kombinaciji s tkivnim uzorcima, ali treba misliti na tehničke prepreke (dostupnost metodologije i iskustva u testiranju takvih uzoraka) i ograničenja ove vrste biološkog materijala. Aktualne smjernice kao optimum navode NGS (od engl. *next generation sequencing*) esej s panelom većim od 50 gena, ali se i pojedinačne analize prediktivnih biomarkera ili eseji NGS-a s ograničenim panelom gena smatraju prihvatljivim. I metode RT-PCR-a (od engl. *real time polymerase chain reaction*) i FISH-a (od engl. *fluorescent in situ hybridization*) imaju svoju vrijednost i mjesto u molekularnom profiliranju NSCLC-a (visoka razina dokaza, najmanje 2a, kvaliteta dokaza: visoka, preporuka: visoka).^{8,15}

NCCN verzija 9.2024. navodi kao potrebnu analizu NSCLC adenokarcinoma, velikostaničnog karcinoma i NOS: mutacije *EGFR* 18-21, preraspodjelu (od engl. *rearrangement*) gena *ALK* i *ROS 1* te *RET*, *KRAS* točkastu mutaciju G12C, *MET* egzon 14, preskakanje varijante (od engl. *skipping*), *ERBB*/*HER2* mutaciju gena, *NTRK1/2/3* fuziju gena, mutacije *BRAFV600E*. Ove smjernice navode i potrebu za analizom statusa PD-L1 imunohistokemijskom metodom.^{15,16}

Preporučeno molekularno profiliranje nesitnostaničnih karcinoma pločaste diferencijacije, osim analize PDL1 statusa u mlađih pacijenata te nepušača kao i „lakah“ pušača, obuhvaća isti panel kao i adenokarcinom pluća, osobito mutacije *EGFR* i *MET* te *ALK* i *ROS 1* preraspodjelu (visoka razina dokaza, najmanje 2a, kvaliteta dokaza: visoka, preporuka: visoka).^{8,15,16}

ESMO smjernice za uznapredovale NSCLC^{17,18} preklapaju se sa smjernicama NCCN, a za rane stadije smjernice ESMO naglašavaju obveznu potrebu analize statusa *EGFR*, ali statusa *ALK* proizvoljno.^{17,18} Prilikom analize primljenoga biološkog materijala uloga patologa jest da odredi koji je pojedinačni uzorak tumorskog tkiva prikladan za koju analizu.

PD-L1

Inhibitori imunološke kontrolne točke (ICI), inhibitori proteina-1/liganda-1 programirane stanične smrti (PD-1/PD-L1) i u manjoj mjeri blokatori citotoksičnog proteina 4 (CTLA-4) povezani s T-limfocitima, dokazano su učinkovita strategija u liječenju raka pluća, NSCLC-a i karcinoma malih stanica pluća (SCLC). Trenutačno, podatci iz randomiziranih kliničkih ispitivanja podupiru ih kao standardni tretman za pacijente s lokalno uznapredovalim ili metastatskim NSCLC-om, bilo u monoterapiji ili u kombinaciji s kemoterapijom.¹⁹

Testiranje PD-L1 temelji se na imunohistokemijskoj analizi, trenutno jedinom validiranom prediktivnom testu. Smjernice za određivanje biomarkera PD-L1 preporučuju uobičajene predanalitičke uvjete imunohistokemijskog testiranja.²⁰

Ekspresija PD-L1 procjenjuje se određivanjem postotka tumorskih stanica s djelomičnim ili cjelovitim obojenjem membrane odnosno membrane i citoplazme, ovisno o korištenom protutijelu, bilo kojeg intenziteta. Potrebno je analizirati cijeli rez tumora na velikom povećanju mikroskopa. Postotak pozitivnih stanica zaokružuje se na desetice i izražava kao apsolutan broj. Kao pozitivna kontrola koristi se tkivo tonzile ili posteljice. Klonovi koji se koriste za analizu PD-L1 statusa za karcinome pluća su klon 22C3 (Dako) i SP263 tvrtke MedImmune®/Ventana (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: visoka).^{8,20}

Nije neuobičajeno da jedini dostupni materijal potječe iz citoloških uzoraka. U tim slučajevima, budući da je upotreba imunohistokemijskog kompleta PD-L1 validirana za tkivne uzorke fiksirane u formalinu i uklopljene u parafin (FFPE), a ne za citološke uzorke, moguće je koristiti citološki materijal obrađen u skladu s predanalitičkim smjernicama za tkiva, odnosno na citološkom materijalu uklopljenom u cito-blokove.

Najvažniji kriterij adekvatnosti uzorka tumorskog tkiva za analizu PD-L1 jest brojnost tumorskih stanica invazivne komponente, a minimalni broj tumorskih stanica je 100. Na adekvatnost uzorka za analizu statusa PD-L1 utječe i predanalitičko postupanje s tkivom. Ekspresija proteina PD-L1 često je tumorski heterogena te vremenski dinamična i mijenja se pod utjecajem prethodnih terapija.²⁰

Molekularne analize (visoka razina dokaza, kvaliteta dokaza: umjerena, preporuka: visoka)

Ako je dostupno nekoliko blokova tkiva, patolog za dodatne analize odabire parafinske blokove s tumorskim tkivom, a s najmanjom količinom nekroze, krvi, sluzi ili upalnog infiltrata. Osim kvalitete treba se odabrati i kvantitativno optimalan parafinski blok za molekularno profiliranje; odnos tumorskih stanica prema

netumorskim stanicama također je od ključne važnosti; najmanje 20 – 30% tumorskih stanica treba biti prisutno u materijalu testiranom na genetske promjene kako bi se lažno negativni rezultati smanjili na minimum.^{16,20} Patolog može celularnost u uzorku povećati smanjujući ukupnu površinu uzorka, tako da označi dio tkiva na HE preparatu, a prema kojem će se parafinski blok izrezati i uzeti označeni dio tkiva za molekularno profiliranje. Generalno se molekularno testiranje izbjegava na materijalu starijem od tri godine te na dekalciniranim uzorcima. Isti bi patolog trebao, ako je moguće, pregledati sav dostupni tumorski materijal od istog pacijenta, uključujući tkivne i citološke blokove kako bi odabrao najprikladniji materijal za pojedinu analizu.¹⁶ Korištenje molekularnih metoda sastavni je dio suvremene obrade tkivnih uzoraka, a nalazi molekularnih analiza trebaju se implementirati u jedinstven patohistološki nalaz. U Republici Hrvatskoj, u zavodima za patologiju i citologiju kliničkih bolničkih centara, provode se refleksna i automatska molekularna testiranja.

Molekularne analize u Republici Hrvatskoj pratile su aktualne smjernice NCCN-a i grupe ESMO do 2020. godine^{15,21}, a tijekom 2023. u potpunosti je integrirano multigeno testiranje temeljeno na RT-PCR metodi za neoplazme različitih sijela, uključujući i pluća. Do uvođenja metode sekvenciranja nove generacije (NGS) ciljanih panela molekularna analiza je obuhvaćala testiranje mutacija gena EGFR u egzonima 18-21, izražaj i/ili preraspodjelu gena ALK, ROS1 i ekspresiju PDL1 za sve dijagnosticirane adenokarcinome pluća, velikostanične neuroendokrine karcinome te nesitnostanične karcinome – NOS, a na zahtjev onkologa ili pulmologa i nesitnostaničnih karcinoma pločaste diferencijacije, neovisno o stadiju bolesti, kliničkom statusu pacijenta i njegovoj dobi, uz napomenu da su postojale razlike u postotku testiranih uzoraka ovisno o centru i pojedinom markeru. Implementacija molekularnih metoda započela je u Republici Hrvatskoj 2015. godine testiranjem mutacija gena EGFR u egzonima 18-21 metodom PCR-a u realnom vremenu (RT-PCR) ili qPCR (od engl. *quantitative PCR*). Od 2016. godine provodi se analiza ALK statusa koristeći imunohistokemijsko bojenje²¹; od 2018. godine analizira se i ROS 1 status u dva koraka. Prvi korak je imunohistokemija, a nalaz difuznog pozitiviteta bilo kojeg intenziteta zahtijeva analizu u drugom koraku. Prve dvije godine drugi korak je bila metoda fluorescentne hibridizacije *in situ* (FISH), a zadnjih nekoliko godina metoda RT-PCR.

Integriranje analize platformom NGS u svakodnevnoj praksi započelo je u studenom 2023. godine u Zavodu za patologiju i citologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb u suradnji sa Zavodom za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a plan je

da se ista platforma analize uvede u svakodnevnu praksu svih zavoda za patologiju svih kliničkih bolničkih centara u Republici Hrvatskoj (KBC Osijek, KBC Split, KBC Sestre milosrdnice te KBC Rijeka) u sljedećih šest mjeseci.

Molekularne analize panela gena koji su usko vezani uz postojeću ciljanu terapiju trebaju se izvoditi koristeći onu metodu koja je optimalna za uzorak biološkog materijala kojim raspolažemo te u skladu s kliničkim osobitostima pojedinog pacijenta kao što su stadij bolesti, klinički performans pacijenta i komorbiditeti.²²

Uzorci za analizu metodom NGS-a jesu svi tkivni uzorci s udjelom tumorskih stanica 20% ili više te količinom stanica koju definira korišteni panel. Adekvatni uzorci za metodu RT PCR jesu tkivni uzorci i citoblokovci s tumorskom celularnošću 10%. Primarno je uzorak tekućinske biopsije pacijenata s NSCLC-om periferna krv, ali moguće je analizirati pleuralni izljev, slinu i cerebrospinalni likvor iz kojih se testiraju cirkulirajuće tumorske stanice (CTC), cirkulirajuća slobodna DNA (cfDNA), cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA), cirkulirajuće ekstracelularne vezikule, trombocitna RNA i cirkulirajuća tumorska RNA (ctRNA). Prvenstvena uloga tekućinske biopsije jest detekcija sekundarne mutacije gena T 790M.^{24–25}

Sukladno konsenzusu radne skupine za patologiju toraksa te Hrvatskog društva za patologiju i sudsku medicinu, a sukladno smjernicama NCCN 9.2024, od 2024. godine u Republici Hrvatskoj preporučljivo je testiranje metodom sekvencioniranja nove generacije slijedećih biomarkera u svim adekvatnim tkivnim uzorcima (uvjeti adekvatnosti navedeni u gornjem tekstu) s patološkim dijagnozama: NSCLC adenokarcinom, NSCLC prvenstveno adenokarcinom – u bioptičkom uzorku, NSCLC – NOS, miješanih karcinoma s komponentom adenokarcinoma te dijagnozom velikostaničnog neuroendokrinog karcinoma: delecije, eksercije i mutacije EGFR egzona 18-21, preraspodjela ALK, preraspodjela ROS1, mutacija BRAF, fuzija NTRK, MET egzon 14 preskakanje, preraspodjela RET i mutacija KRAS G 12C.^{15,22}

EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*): aktivirajuća mutacija prisutna je u 10 – 16% europske populacije pacijenata s plućnim adenokarcinomom, i to u nepušača. Dominantno se radi o mutaciji na egzonu 19 (između kodona 746-759) ili L858R mutaciji egzona 21. Analizom je potrebno obuhvatiti dio egzona 18-21. Za analizu mutacija EGFR, metodom RT-PCR, može se koristiti i tkivni i citološki blok adekvatne celularnosti.²⁶

Genski rearanžman ALK (engl. *anaplastic lymphoma kinase*) prisutan je u 1 – 4% europskih pacijenata s dijagnozom adenokarcinoma pluća; rezultat je EML4 koji stalno podržava ALK kinaznu aktivnost, a time i tumorski rast. Karakteristično je prisutan u mlađoj

dobi, u žena i nepušača, a veže se uz brz razvoj metastaza u jetru, serozne ovojnice i mozak te tromboembolijske incidente.^{19,26}

Osim metodom NGS-om ili RNA-esejima prihvaćena je i analiza imunohistokemijom, protutijelo *Ventana ALK D5F3 CDx Assay*, Tuscon, Arizona, SAD, a tkivo za pozitivnu i negativnu kontrolu jest tkivo crvuljka. Pozitivan imunohistokemijski nalaz jest prisutno difuzno tamnosmeđe intenzivno, sitnozrnato obojenje u citoplazmi tumorskih stanica.^{19,26}

Gen *ROS1* nalazi se na kratkom kraku kromosoma 6 (6q22) i uključen je u obitelj receptora inzulinske tirozin kinaze. Fiziološka uloga gena *ROS1* još uvijek je nejasna, poznato je da ima homologiju s protein kinazom anaplastičnog limfoma (*ALK*) veću od 80% u ATP veznom mjestu i domenama kinaze. Aktivirajuća genska preraspodjela prisutna je u oko 1% europskih pacijenata s dijagnozom adenokarcinoma, često mlađe dobi i nepušača, i to onih sa solidnim načinom rasta te stanicama tipa prstena pečatnjaka, a koje vode u onkogenu transformaciju stanice. Kao i kod *ALK* preraspodjele, i ova preraspodjela karakterizirana je trombotičkim događajima te brzim razvojem moždanih metastaza.²⁶ Preporučuje se testiranje u prvom koraku imunohistokemijom, koristi se monoklonsko protutijelo D4D6, *Cell Signalling Technology* ili *SP384 Ventana*. Kao kontrolno tkivo može se koristiti pozitivno tumorsko tkivo, stanična kultura ili pozitivni peritumorski pneumociti. U slučaju pozitiviteta bilo kojeg intenziteta tumorskih stanica potrebna je potvrda ili metodom FISH ili RT PCR-om.²⁶ Može se testirati i u jednom koraku RT-PCR-om ili NGS-om.

Genske promjene *EGFR*, *ALK* i *ROS-1* međusobno su isključujuće u ranim stadijima adenokarcinoma pluća.

BRAF (engl. *B-Raf proto-oncogene*) prisutan je u oko 2% plućnih adenokarcinoma, osobito u onih papilarnog rasta. Najčešća mutacija je *BRAF V600E*, češća je u žena i nosi veću agresivnost biološkog ponašanja. Metoda analize je NGS ciljanoga multigenskog panela za NSCLC, uključujući najmanje egzon 11-15 ovoga gena.^{15,26}

NTRK (engl. *neurotrophic tyrosine receptor kinase*): fuzija ovih receptora prisutna je i u NSCLC-u u postotku 1%, i to najčešće *NTRK1*.^{15,26} Strategija analize je NGS ciljanoga multigenskog panela za NSCLC, a pozitivan nalaz na nivou RNA potvrđuje se drugim korakom – reakcijom imunohistokemije, pri čemu je kontrolno tkivo tkivo mozga ili tkivo crvuljka.^{15,26}

RET (engl. *gene rearranged during transfection*) fuzija prisutna je u 1 – 2% NSCLC-a; morfološki psamomska tjelešca sugeriraju *RET* fuziju.²⁷ I ova mutacija dominantno se nalazi u nepušača. Optimalna detekcija *RET* fuzije jest metodom NGS ciljanoga multigenskog panela, ali je moguće koristiti i PCR jer je rezultate metodom FISH često teško interpretirati.^{27,28}

Mutacije *KRAS* identificiraju se u oko 25% pacijenata s NSCLC-om. Nalaze se u svim histološkim podtipovima adenokarcinoma, ali i u 5% karcinoma pločaste diferencijacije. Mutacije su obično locirane na kodonima 12 (u 80% slučajeva), 13 i 61. Mutacije *KRAS G12C* i *KRAS G12V* karakteristične su za pušače, a mutacija *KRAS G12D* za nepušače i one imaju različite signalne puteve. Više od 50% nesitnostaničnih karcinoma pluća s *KRAS* mutacijom ima i neku drugu mutaciju, u 40% mutaciju *TP53*, zatim mutacije vezane uz serin-treonin kinazu ili pak uz inaktivaciju *CDK2A/B*. Preporučena metoda analize može biti monogenetska metodom RT-PCR ili u sklopu multigenskog testiranja metodom NGS ciljanog panela za NSCLC.^{29,30}

MET (engl. *mesenchymal epithelial transition factor gene*) amplifikacija gena prisutna je u oko 1 – 5% NSCLC-a, u egzonu 14 koji smanjuje degradaciju *MET* proteina. Ova mutacija uzrok je i razvoja rezistencije na *EGFR*-TKI u 5 – 20% slučajeva. Optimalna metoda analize je NGS, ali je moguća i analiza FISH-om.³¹

Gen *HER2* također može biti promijenjen u pacijenata s NSCLC-om: u 3 – 38% nalazi se prekomjerna ekspresija, u 3% amplifikacija i u 1 – 4% mutacija. Najčešća mutacija je insercija u egzonu 20. Obično je vezana uz žene, nepušače. Najprikladnija metoda analize je NGS.³²

Sukladni smo u stavu da nije dostatna analiza DNA, već se treba analizirati RNA.¹⁵

U slučaju progresije NSCLC-a potrebno je učiniti retestiranje molekularnog profila, u slučaju progresije *EGFR*-pozitivnih NSCLC-a detekciju mutacije gena *T790M*, najprije tekućinskom biopsijom (do dva pokušaja), a zatim u slučaju potrebe tkivnim uzorkom.^{33,34}

Za potrebe retestiranja *RET* fuzija i reanalizu *MET* broja kopija metodom NGS potreban je tkivni uzorak.^{27,28}

Mikrosatelitska nestabilnost prema trenutnim dokazima nema prediktivnu vrijednost u nesitnostaničnim karcinomima pluća.¹⁵

Liječnici u Europi, uključujući patologe u Republici Hrvatskoj, slažu se da se molekularne analize trebaju primarno izvoditi u patohistološkim zavodima i biti nadzirane od strane patologa.¹⁵ Preporuka našeg društva jest da se navedene analize primarno izvode u suradnji sa zavodima za patologiju i citologiju u kliničkim bolničkim centrima i po potrebi i u kliničkim bolnicama.

Analiza panela gena karakterističnih za nesitnostanične karcinome pluća metodom NGS limitirano je prepoznata od strane HZZO-a, a i od strane privatnih osiguravajućih društava.

Vođenje sustavne baze podataka kao i kontrola kvalitete molekularnih laboratorija obvezni su. Laboratoriji molekularne patologije moraju biti spremni sudjelovati u međunarodnim ring studijama.²⁹

TAT (engl. *turn around time*) u našim molekularnim laboratorijima unutar zavoda za patologiju treba nastojati pratiti praksu istih u zavodima za patologiju zapadne Europe u kojima je prihvaćen vremenski interval od 21 dana, s prosjekom vremenskog intervala od 17 dana.

Multidisciplinarni timovi poboljšavaju ishod liječenja onkoloških pacijenata, uključujući i pacijente s NSCLC-om, a formirani su u većini kliničkih bolničkih centara Republike Hrvatske te se sastaju na tjednoj bazi. Javlja se i potreba formiranja multidisciplinarnih molekularnih timova koji bi od strane kliničkih zavoda za patologiju bili zastupljeni s dva člana: patologom i molekularnim biologom.³⁵ Bolnice bez multidisciplinarnih timova imaju pristup ovakvim timovima u najbližem KBC-u.

Upravo zbog potrebe za multidisciplinarnim molekularnim timovima, u kojima patolog i molekularni biolog sudjeluju zajedno u donošenju odluke za optimalno postupanje s biološkim materijalom i da zajedno sudjeluju na sastancima s drugim specijalistima doktorima medicine, svaki molekularni laboratorij u svom sastavu uz laboratorijske tehničare i laboratorijske inženjere treba imati i barem jednoga molekularnog biologa.

Nacionalni sastanci patologa koji se bave torakalnom patologijom, uključujući molekularnu patologiju, održavaju se potaknuti od strane radne skupine za torakalnu patologiju nekoliko puta godišnje.

Redoviti sastanci važni su za praćenje novosti u području torakalne patologije i rad na dopunama i promjenama dijagnostičkih preporuka, minimalno dva puta godišnje.

Smjernice za postanaličku fazu

Postanalička faza obuhvaća strukturirane patološke nalaze i kontrolu kvalitete.

Strukturirani nalazi

Važnost strukturiranih nalaza jest u dostupnosti i jednostavnosti svih potrebnih informacija kliničarima za daljnje postupke s pacijentom, određivanje patološkog stadija proširenosti bolesti i prognostičkih faktora, evaluaciju dijagnostičkog odnosno dijagnostičko-terapijskog postupka te pregled prediktivnih biomarkera za ciljano onkološko liječenje pacijenta. Strukturirani patološki nalazi također su i izvor podataka za registre malignih oboljenja. Strukturirani patohistološki nalazi doprinose standardizaciji i kvalitetnijoj skrbi za maligne pacijente i tako doprinose boljem ishodu liječenja.³⁶

I nalaz molekularnih analiza treba biti standardiziran sukladno standardu International Organisation for Standardization (ISO) 15189:2022 koji je namijenjen medicinskim laboratorijima.

Strukturirani nalaz je neophodan za dobru komunikaciju patologa s kolegama kliničarima i njime se daje važan doprinos, ne samo u postavljanju konačne dijagnoze pacijenta, već i njegovom daljnjem liječenju. Stoga mora obuhvaćati sve podatke važne za daljnje postupanje s pacijentom, mora biti pregledan i logično organiziran. U patohistološkom nalazu trebaju biti navedene i dodatne dijagnostičke analize, korištena protutijela u imunohistokemijskim analizama prediktivnih biljega i rezultati molekularnih analiza kao i platforme koje su se koristile u molekularnom profiliranju.^{36,37}

U idealnom slučaju, rezultati molekularnih analiza trebaju biti prodiskutirani s molekularnim biologom koji je učinio molekularnu analizu prije integriranja ovog dijela analize u cjelovit nalaz.

Patohistološki nalaz treba sadržavati i podatke potrebne za aktualni patološki nalaz, a koji se odnose na podatke dobivene od kolega kliničara, a prema međunarodnim smjernicama o izvještavanju i strukturiranim nalazima karcinoma³⁷ gdje se pojedina polja i klinički podatci smatraju obveznim, a pojedini se uvrštavaju kao preporuka. Standardizirane kliničke uputnice trebaju biti kreirane u suradnji s patologom, kako bi dobili sve potrebne podatke. Uputnica treba uključivati: osobne podatke pacijenta (ime i prezime, datum rođenja, MBO, spol), ime liječnika koji upućuje biološki materijal, kontakt liječnika kojega patolog može kontaktirati prema potrebi vezano uz primljeni biološki materijal i vezani patološki nalaz, datum uzimanja te slanja biološkog materijala prethodne potvrđene dijagnoze pacijenta s naglaskom na malignitete, uputnu kliničku dijagnozu ili diferencijalne dijagnoze, prethodne analize prediktivnih biomarkera i na kojem biološkom materijalu su rađene, navesti je li operativnom zahvatu prethodila neoadjuvantna terapija, jer su i način preuzimanja biološkog materijala i evaluacija drugačiji.³⁷ Potrebno je navesti klinički stadij bolesti. Navesti treba također smatra li se da se radi o novom primarnom karcinomu ili o recidivu prethodno dijagnosticiranog. Potrebno je navesti anatomske sjelo biopsije ili resekcije. Bez navođenja točne lokalizacije limfnih čvorova određivanje pTNM-a nije moguće, a time niti određivanje stadija maligne bolesti. Ako se radi o operativnom materijalu potrebno je navesti vrstu operativnog zahvata, lokaciju, stranu uzorkovanja. Idealno bi bilo na uputnici imati navedene radiološke nalaze, uključujući minimalno podatke o lokaciji i dinamici rasta promjene te zaključak radiološke obrade.³⁷ Treba postojati i polje „Napomena“ u kojemu kliničari navode ono što smatraju važnim, a nije obuhvaćeno u prethodno navedenom. Nedostatne informacije od strane kliničara mogu rezultirati insuficijentnom ili neadekvatnom patološkom obradom biološkog materijala te potrebom za ponavljanjem dijagnostičkog postupka.

PRILOG BROJ 2: VODIČ ZA PISANJE STRUKTURIRANOG IZVJEŠĆA PATOLOGA

2.1. Obrazac za patohistološki izvještaj bioptičkog materijala s prisutnim tumorskim tkivom

BROJ UZORAKA:

VELIČINA UZORAKA: (najveća dimenzija)

PREUZETO U CIJELOSTI U:

_____ (broj parafinskih blokova)

BROJ UZORAKA ZAHVAĆENIH LEZIJOM:
(numerička vrijednost)

HISTOLOŠKI OPIS:

DODATNE ANALIZE:

PREDIKTIVNI BIOMARKERI:

NAPOMENE:

ZAKLJUČAK:

2.2. Obrazac za patohistološki izvještaj atipične resekcije pluća s prisutnim tumorskim tkivom

UZORAK I VELIČINA UZORKA:

ZAHVAT:

CJELOVITOST UZORKA:

SMJEŠTAJ TUMORA:

centralno/paracentralno/periferno

FOKALNOST TUMORA: unifokalan/multifokalan

VELIČINA TUMORA: (u tri dimenzije)

MORFOLOŠKI OPIS TUMORA:

NAČIN RASTA (izražen u %):

POSEBNE CITOLOŠKE KARAKTERISTIKE

TUMORSKIH STANICA:

HISTOLOŠKI GRADUS:

ŠIRENJE KROZ ZRAČNE PROSTORE (STAS):
da/neMAKROSKOPSKA UDALJENOST TUMORA
OD BRONHOVASKULARNOG RUBA:

udaljen od bronhovaskularnog ruba ... cm

/ ne može se odrediti

RESEKCIJSKI RUBOVI:

(zahvaćeni/nezahvaćeni tumorom)

INVAZIJA VISCERALNE PLEURE TUMOROM:
da/ne

LIMFO-VASKULARNA INVAZIJA:

uočena/neuočena

LIMFNI ČVOROVI: izolirano je _____ (broj)
limfnih čvorova promjera od ____ cm do ____ cm,
histološki...

DODATNE ANALIZE:

NAPOMENE:

ZAKLJUČAK:

PREDIKTIVNI BIOMARKERI:

PATOLOŠKI STADIJ (pTNM) : TNM

2.3. Obrazac za patohistološki izvještaj materijala lobektomije ili jednostrane pulmektomije s prisutnim tumorskim tkivom

UZORAK I VELIČINA UZORKA:

ZAHVAT:

CJELOVITOST UZORKA:

SMJEŠTAJ TUMORA:

centralno/paracentralno/periferno

FOKALNOST TUMORA: unifokalan/multifokalan

VELIČINA TUMORA:

MORFOLOŠKI OPIS TUMORA:

NAČIN RASTA (izražen u %):

POSEBNE CITOLOŠKE KARAKTERISTIKE

TUMORSKIH STANICA:

HISTOLOŠKI GRADUS:

ŠIRENJE KROZ ZRAČNE PROSTORE (STAS):
da/neMAKROSKOPSKA UDALJENOST TUMORA
OD BRONHOVASKULARNOG RUBA:

RESEKCIJSKI RUBOVI:

(zahvaćeni/nezahvaćeni tumorom)

Bronhalni rub –

Vaskularni rub –

INVAZIJA VISCERALNE PLEURE TUMOROM:

MORFOLOŠKI OPIS TUMORA:

MORFOLOŠKI OPIS OKOLNOG PLUĆNOG
PARENHIMA:

LIMFO-VASKULARNA INVAZIJA:

uočena/neuočena

STATUS LIMFNIH ČVOROVA:

broj izoliranih limfnih čvorova:

broj limfnih čvorova zahvaćenih tumorom:

morfološki opis limfnih čvorova nezahvaćenih
tumorom:

DODATNE ANALIZE:

PREDIKTIVNI BIOMARKERI:

NAPOMENA:

ZAKLJUČAK:

PATOLOŠKI STADIJ (pTNM):

2.4. Obrazac za patohistološki izvještaj analize limfnih čvorova

UZORCI I VELIČINA UZORKA:

BROJ IZOLIRANIH LIMFNIH ČVOROVA:

BROJ LIMFNIH ČVOROVA ZAHVAĆENIH
TUMOROM:

PROMJER METASTAZE U LIMFNOM ČVORU:

EKSTRANODALNO ŠIRENJE TUMORA:

DODATNE ANALIZE:

OPIS:

ZAKLJUČAK:

Vodič za pisanje strukturiranog izvješća patologa (prilog broj 2)

Format nalaza patologa trebao bi biti ujednačen, kao i struktura, preporučena veličina slova, brojki i znaka koja je 12, font *Times New Roman*, a pojedini dijelovi nalaza trebaju biti odvojeni dvostrukim proredom. Naglašavanje pojedinih dijelova teksta u nalazu izvodi se koristeći velika slova, što je bolja opcija od zadebljanja ili podcrtavanja dijelova teksta jer se to kopiranjem patološkog nalaza u drugu medicinsku dokumentaciju gubi. Jedinstven format nalaza patologa nije u potpunosti moguć zbog korištenja različitih softvera u različitim zdravstvenim ustanovama u Republici Hrvatskoj.

Kontrola kvalitete

Kontrola kvalitete obuhvaća kontinuiranu edukaciju, koja je obnovom licence već regulirana za sve doktore medicine u Republici Hrvatskoj. Specijalisti patolozi usmjereni na plućnu patologiju, primarno plućne tumore, trebaju redovito sudjelovati na međunarodnim i domaćim konferencijama, radnim sastancima i radionicama s tematikom karcinoma pluća. Svim patolozima koji dolaze u kontakt s biološkim materijalom donjega respiratornog sustava preporučuje se prisustvovanje sastancima radne skupine za patologiju toraksa. Kontrolom kvalitete trebaju biti obuhvaćeni patolozi, ali i sve ostalo laboratorijsko osoblje odnosno postupci/analize u laboratorijima odjela/zavoda/kliničkih zavoda. Treba razmisliti i o uvođenju kontrola kvalitete predanalitičke faze (SPIDIA PROJEKT, <http://www.spidia.eu>). Kontrola analize ekspresije PD-L1, očitavanja analize od strane patologa i kontrola kvalitete imunohistokemijskih preparata trebaju se provoditi NORDiQC vanjskom kontrolom kvalitete u svim kliničkim zavodima za patologiju i citologiju u svim kliničkim bolničkim centrima te u kliničkim bolnicama koje provode analizu PD-L1 u Hrvatskoj.

Zaključak

U Republici Hrvatskoj karcinom pluća značajan je uzrok morbiditeta i mortaliteta, kao i izvor velikoga financijskog javnozdravstvenog opterećenja i ulaganja od strane zdravstvenog osiguranja.

Donošenje smjernica u patološkoj dijagnostici, kao i smjernica drugih kliničkih specijalizacija koje su uključene u dijagnostičku obradu i liječenje pacijenata s karcinomom pluća te poboljšanje multidisciplinarnog pristupa i rad na planiranom postupku s pacijentom uvelike će doprinijeti boljem ishodu liječenja pacijenata.

Nacionalne smjernice daju sigurnost i pacijentima i doktorima medicine koji su uključeni u njihovo liječenje; one su namijenjene liječnicima kao polazište za ostvarivanje dobre kliničke prakse utemeljene na

dosadašnjim znanstvenim i stručnim spoznajama. S obzirom na dinamiku noviteta u dijagnostici i liječenju potrebna je nadopuna i prema potrebi izmjena ovih smjernica na godišnjoj bazi.

ZAHVALA

Zahvaljujemo dr. sc. G. Bubanović, dipl. ing. mol. biol. i dr. sc. M. Milavić, dipl. ing. mol. biol. na sugestijama u tekstu koji se odnosi na molekularne analize.

INFORMACIJE O SUKOBU INTERESA

Autori nisu deklarirali sukob interesa relevantan za ovaj rad.

INFORMACIJA O FINANCIRANJU

Za ovaj članak nisu primljena financijska sredstva.

DOPRINOS AUTORA

KONCEPCIJA ILI NACRT RADA: LBV, MU, JR, ŠT, SS

PRIKUPLJANJE, ANALIZA I INTERPRETACIJA PODATAKA: LBV, ŠT, SS

PISANJE PRVE VERZIJE RADA: LBV, MU, JR

KRITIČKA REVIZIJA: LBV, MU, JR, ŠT, SS

LITERATURA

- Škerija M, Bubanović LJ, Lončar J, Čukelj P, Veltruski I, Mikolaj L i sur. Incidencija raka u Hrvatskoj. Hrvatski registar za rak, Zavod za javno zdravstvo, bilten br. 45, 2022, str. 3–13. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2022/11/Bilten-Incidencija-raka-u-Hrvatskoj-2020>. (Pristupljeno 19. ožujka 2023.)
- Travis WD, Al Dayel FH, Bubendorf L, Chung JH, Rekhtman N, Scagliotti GV. Small diagnostic samples. Borczuk AC, Chan JKC, Cooper WA, Dacic S, Kerr KM, Lantuejoul S i sur. WHO Classification of Tumours, Thoracic Tumours. 5 izd. Geneva: Switzerland; International Agency for Research of Cancer. 2021, str. 29–37.
- Warth A, Muley T, Meister M, Weichert W. Preanalytics in lung cancer Recent Results. Cancer Res. 2015;199:71–84.
- Kerr KM, Bubendorf L, Lopez-Rios F, Khalil F, Roy-Chowdhuri S, Joubert P i sur. Optimizing tissue stewardship in non-small cell lung cancer to support molecular characterization and treatment selection: statement from a working group of thoracic pathologists. Histopathology. 2024;84:429–39.
- Susman S, Berindan-Neagoe I, Petrushev B, Pirlog R, Florian IS, Miha CM i sur. The Role of the Pathology Department in the Preanalytical Phase of Molecular Analyses. Cancer Manag Res. 2018;10:745–53.
- Guo D, Wang A, Xie T, Zhang S, Cao D, Sun J. Effects of Ex Vivo Ischemia Time and Delayed Processing on Quality of Specimens in Tissue Biobank. Mol Med Rep. 2020;22(5): 4278–88.
- Guerrera F, Tabbò F, Bessone L, Maletta F, Gaudiano M, Ercole E i sur. The Influence of Tissue Ischemia Time on RNA Integrity and Patient-Derived Xenografts (PDX) Engraftment Rate in a Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Biobank. PLoS One. 2016;11(1):e0145100.

8. Ryan R, Hill S. How to GRADE the quality of the evidence. Cochrane Consumers and Communication Group. 2020. Dostupno na: <http://cccr.cochrane.org/author-resources>. Version 3.0. (Pristupljeno: 19. ožujka 2023.).
9. Radonic T, Dickhoff C, Mino-Kenudson M, Lely R, Paul R, Thunnissen E. Gross handling of pulmonary resection specimen: maintaining the 3-dimensional orientation. *J Thorac Dis.* 2019;11:S37-S44.
10. Angerilli V, Galuppini F, Pagni F, Fusco N, Malapelle U, Fassin M. The Role of the Pathologist in the Next-Generation Era of Tumor Molecular Characterization. *Diagnostics.* 2021;11:339.
11. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y i sur. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6:244-85.
12. Chang JC, Offin M, Falcon C, Brown D, Houck-Loomis BR, Meng F i sur. Comprehensive molecular and clinicopathologic analysis of 200 pulmonary invasive mucinous adenocarcinomas identifies distinct characteristics of molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2021;27:4066-76.
13. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A i sur. National Comprehensive Cancer Network Guidelines. Version 5.2023 Non-Small Cell Lung Cancer. 2023;21(4):340-50.
14. Kadota K, Nitadori JI, Sima CS, Eguchi T, Bains S, Jones DR i sur. Tumor spread through air spaces is an important pattern of invasion and impacts the frequency and location of recurrences after limited resection for small stage I lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2015;10:806-14.
15. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 9.2024. Dostupno na: [nsc.pdf \(nccn.org\)](https://nccn.org). (Pristupljeno: 19. ožujka 2024.).
16. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Berniker E i sur. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 2018;13:323-58.
17. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A i sur. [uime ESMO odbora za smjernice]. Non-oncogene-activated metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2023;34:358-76.
18. Remon J, Soria JC, Peters S [u ime ESMO odbora za smjernice]. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: an update of the ESMO Clinical Practice Guidelines focusing on diagnosis, staging and systemic and local therapy. *Ann Oncol.* 2021;32(12):1637-42.
19. Sezer A, Kilickap S, Gümüş M, Bondarenko I, Ozuroglu M, Gogishvili M i sur. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet.* 2021;397:592-604.
20. Doroshow DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gn-jatic S i sur. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18:345-62.
21. Chen TD, Chang IC, Liu HP, Wu YC, Wang CL, Chen YT i sur. Correlation of anaplastic lymphoma kinase overexpression and the EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer by immunohistochemical study. *Chung Gung Med J.* 2012; 35(4):309-17.
22. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J i sur. Early stage and locally advanced non-metastatic NSCLC-ESMO Practical guidelines. *Ann Oncol.* 2017;28:1-21.
23. Mack P, Yung R, Weder W, Aisner D. Sample Acquisition, Processing, and General Diagnostic Procedures. U: IASLC Atlas of EGFR testing in lung cancer-guidebook, Mok TS, Carbone DP, Hirsch FR. Aurora, Colorado: International Association for the Study of Lung Cancer; 2017, str. 27-32.
24. Zugazagoitia J, Biosca M, Oliveira J, Olmedo ME, Dómine M, Nadal E i sur. Incidence, predictors and prognostic significance of thromboembolic disease in patients with advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer. *Eur Respir J.* 2018;51(5):1-4.
25. Planchard D, Johnson BE. BRAF Adds an Additional Piece of the Puzzle to Precision Oncology-Based Treatment Strategies in Lung Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(7):796-7.
26. Mukhopadhyay S, Pennell NA, Ali SM, Jeffrey S, Ross JS, Velcheti V. RET-rearranged lung adenocarcinomas with lymphangitic spread, psammoma bodies, and clinical responses to cabozantinib. *J Thorac Oncol.* 2014;9(11):1714-9.
27. Tan AC, Tan DSW. Targeted therapies for lung cancer patients with oncogenic driver molecular alterations. *J Clin Oncol.* 2022;40(6):611-25.
28. Yang SR, Aypar U, Rosen EY, Mata DA, Benayed R, Mullaney K i sur. A performance comparison of commonly used assays to detect RET fusion. *Clin Cancer Res.* 2023;27:1316-28.
29. Ferrer I, Zugazagoitia J, Herrbertz S, John WM, Pas-Ares L, Schmid-Bindert G. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: from biology to therapy. *J Mol Diagn.* 2021;23(5):507-20.
30. Scheffler M, Ihle MA, Hein R, Merkelbach-Bruse S, Scheel AH i sur. K-ras subtypes in NSCLC and associated co-occurring mutations in other oncogenic pathways. *J Thorac Oncol.* 2019;14:606-16.
31. Liu X, Jia Y, Stoopler MB, Shen Y, Cheng H i sur. Next-generation sequencing of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutation. *J Clin Oncol.* 2016;34:794-802.
32. Zhao J, Xia Y. Targeting HER2 alteration in non-small lung cancer: a comprehensive review. *JCO Precis Oncol.* 2020; 4:411-25.
33. Pirker R, Herth FJ, Kerr KM, Filipits M, Taron M, Gandara D i sur. [u ime Europske radne skupine za EGFR]. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol.* 2010;5 (10):1706-13.
34. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, Baas P, Berles F, Bivona TG i sur. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC. *J Thorac Oncol.* 2018;13:1248-68.
35. de Castro G Jr, Souza FH, Lima J, Bernardi LP, Teixeira CHA, Prado GF; Grupo Brasileiro de Oncologia Torácica (GBOT). Does Multidisciplinary Team Management Improve Clinical Outcomes in NSCLC? A Systematic Review With Meta-Analysis. *JTO Clin Res Rep.* 2023;4(12):100580.
36. Burnham A, Cooke-Yarborough C, Ellis D, Legg M, McCauley V, McGuire L i sur. Guidelines for Authors of Structured Cancer Pathology Reporting Protocols. Australia: Royal College of Pathologists of Australia; 2009.
37. International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR) datasets. Dostupno na: [Published Datasets – ICCR \(iccr-cancer.org\)](https://www.iccr-cancer.org). (Pristupljeno: 19. ožujka 2023.).