

GENOMSKA PATOLOGIJA - PATOLOGIJA PRIHODNOSTI

Dr. Barbara Gazić, dr. med.

Oddelek za patologijo, Onkološki inštitut Ljubljana

Izvleček

Dokončanje projekta analize humanega genoma in razvoj tehnologije, ki obeta cenejše in hitrejše analize lastnosti genoma bolezensko spremenjenih celic, sta omogočila revolucijo v patologiji in novo ero individualnega zdravljenja raka. Nov način diagnostike bo v bližnji prihodnosti omogočal patologu zgodnje odkrivanje bolezni in hitro diagnozo ter hkrati krojil način zdravljenja posameznika. Patologi bomo imeli izjemno priložnost povezati rezultate analize genoma z morfološko diagnostiko v integrirane diagnoze bolezni. Število patologov iz izkušnjami na področju analize genoma je zaradi zastarelih metod specialističnega izobraževanja in neustrezne opremljenosti laboratorijev za enkrat majhno.

Uvod

Patologija je medicinska veda, ki proučuje naravo bolezni, in znanost, na kateri temelji medicina. Patologi moramo po šestletnem študiju medicine opraviti petletno specializacijo in specialistični izpit, nato pa sledi poglobljeno izobraževanje na posameznih področjih patologije. Patologija in patologi smo odgovorni za 70 % vseh diagnoz v medicini in za 100 % diagnoz tumorjev in s tem posredno pomembno vplivamo na zdravljenje bolnikov. Patologija ima pomembno vlogo v preventivnih zdravstvenih programih in v diagnostiki in zdravljenju številnih kroničnih bolezni, kot so rak, diabetes, artritis, hepatitis in druge.

Zgodovina patologije

Da bi lahko sklepali, kakšna bo prihodnost patologije, se moramo najprej ozreti nazaj in spoznati njeno zgodovino. Začetek patologije sega v čase grškega zdravnika Hipokrata, njen razvoj pa je bil kasneje tesno povezan z napredkom tehnologije. Izum svetlobnega mikroskopa v 17. stoletju je omogočil revolucijo v razumevanju infekcijskih bolezni in odprl vrata razvoju moderne patologije, kot jo poznamo še danes, z Rudolphom Virchowom (1821-1902) na čelu. Izum elektronskega mikroskopa v 20. stoletju je pomembno prispeval k ra-

zumevanju etiologije številnih bolezni. Diagnostika na nivoju nukleinskih kislin z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pa je pomenila naslednji pomemben kvalitativni premik v patologiji in tlakovala pot kompleksnejšim preiskavam tumorskih in netumorskih celic ter omogočila začetek individualnega zdravljenja bolnikov z rakom.

Kljub vsemu pa so se nove tehnologije v patologijo prebijale počasi. Za pomembnejši napredek v razumevanju infekcijskih bolezni in razvoj diagnostike s pomočjo mikroskopskih lastnosti tkiva je patologija, po izumu prvega mikroskopa, potrebovala kar 150 let. Danes, po skoraj 80 letih od začetka uporabe elektronskega mikroskopa, si mnenja raziskovalcev glede njegovega pomena za rutinsko diagnostiko še vedno močno nasprotujejo. Tehnologija PCR je potrebovala 5 do 10 let, da si je utrla pot in pridobila svoje mesto kot rutinska diagnostična preiskava v patologiji, kljub temu da se je že od samega začetka uveljavila kot nenadomestljiva genetska preiskava v številnih medicinskih raziskavah. Nedvomno je k počasnemu razvoju in uvajanju novih tehnologij v patologijo prispevala skepsa patologov, da lahko katerakoli preiskava nadomesti mikroskopsko sliko, patologovo oko in njegove izkušnje, vsemu navkljub pa je patologija ostala temelj diagnostike in zdravljenja. Ne glede na zgodovinsko odlašanje z uvajanjem sodobne tehnologije v rutinsko prakso in kljub splošnemu odporu patologov do sodobne tehnologije v diagnostiki bolezni pa se je v zadnjih letih na obzorju pojavila tehnološka novost, ki je patologija nikakor ne bo mogla spregledati in ki bo v bližnji prihodnosti zelo verjetno spremenila način diagnosticiranja bolezni ter dodatno prispevala k implementaciji zdravljenja 'po meri' posameznega bolnika ('personalized medicine').

Sekvenciranje nove generacije

Molekularna diagnostika ima že nekaj časa ključno vlogo v medicini, predvsem v diagnostiki in klasifikaciji bolezni, vse bolj pomembna pa postaja tudi za individualni pristop k zdravljenju raka, za zdravljenje 'po meri' bolnika. Vse obsežnejše znanje o genetskih vzrokih raka in drugih bolezni je pripomoglo tudi k razvoju učinkovitih tarčnih zdravil. Znani primeri so mutacije KIT v gastrointestinalnih stromalnih tumorjih, EGFR, KRAS in mutacije ALK v žlezemem karcinomu pljuč in mutacije BRAF v melanomu. Spremembe v številu genov (amplifikacije) in njihovi strukturi (translokacije) so prav tako pomembne za diagnozo in prognozo nekaterih bolezni. Do nedavnega smo za dokaz prisotnosti mutacij uporabljali metode 'majhnega obsega', kot so alelo-specifična reakcija s polimerazo (AS-PCR), sekvenciranje 'Sanger-dideoxy', sekvenciranje 'pyro' ali masna spektrometrija. Število kopij določenega gena in strukturne spremembe kromosomov pa smo določali in jih še vedno določamo s pomočjo 'fluorescentne in situ hibridizacije' (FISH). Razvoj novih tarčnih zdravil in vse večje število uporabnih bioloških označevalcev, ki so

diagnostično ali prognozično pomembni botrovali k razvoju novih načinov molekularnobioloških preiskav. Zaradi vse manjših biopsij oziroma histoloških vzorcev in vse večjega števila preiskav, ki jih je treba opraviti na majhnem vzorcu tkiva, so raziskovalci iskali nove možnosti molekularnih analiz, ki bi zadostile danim pogojem. Tehnike, ki omogočajo meritve enega samega biološkega označevalca, so v takšnih okoliščinah postale neuporabne. Razvili so povsem nov način molekularnobiološke preiskave, ki so jo poimenovali sekvenciranje nove generacije (Next generation sequencing, NGS).

NGS omogoča sočasno sekvenciranje velikih panelov različnih genov iz majhnih vzorcev tumorskega tkiva, v relativno kratkem času. NGS ali masivno vzporedno sekvenciranje je tehnološka novost, ki omogoča sočasno sekvenciranje več milijonov kratkih fragmentov molekule DNA, kar ima za posledico ogromno število sekvenciranih baznih parov v primerjavi z dosedanjimi standardnimi 'Sangerjevimi' metodami sekvenciranja. Trenutno najbolj priljubljena in uporabna platforma 'Illumina' sekvencira DNA s pomočjo sinteze, pri čemer uporablja kombinacijo modificiranega sekvenciranja 'shotgun' in dodanega fluorescentnega barvila na bazi nukleotidov. Tehnologija NGS omogoča simultano detekcijo substitucij, duplikacij, insercij, delecij in amplifikacij določenih regij molekule DNA, celotnega eksoma ali celotnega genoma ter detekcijo kromosomskih inverzij in translokacij. Sekvenciranje nove generacije je dober preskus tudi patologiji. Za razliko od tehnoloških novosti, ki so izostri- le klinični pomen patologije in izboljšale diagnostiko na kvantitativni osnovi, pa pomeni NGS nov zgodovinski kvalitativni preskok, ki bo pomembno vplival na patologijo, diagnostiko in zdravljenje v prihodnosti. Strm vzporedni razvoj različnih tehnologij genomskega sekvenciranja je vzpostavil konkurenčnost med različnimi proizvajalci, kar zagotavlja neprekinjen dvig kakovosti in hitrosti preiskav in hkrati znižuje stroške preiskave. Najhitreje tehnologije lahko že danes sekvencirajo celoten humani genom, 3 milijarde baz, v nekaj urah, stroški takšne preiskave pa so se v enem samem letu znižali za 8-krat in preiskava 'genom za tisoč dolarjev' je pred vrati.

Genomska patologija – patologija prihodnosti

Patologi bomo imeli v naslednjih letih enkratno priložnost, da s pomočjo svojega klasičnega morfološkega in molekularnega diagnostičnega znanja, s pomočjo NGS, pomembno preoblikujemo zdravstvo in omogočimo, da bo bolniku prilagojeno zdravljenje postalo nova realnost in ne zgolj privilegij za najbolj razvite družbe in najbogatejše posameznike. Za razliko od vseh dosedanjih tehnoloških izumov, ki so pomenili napredek patologije zaradi izboljšave kakovosti že vpeljanih preiskav, pa bo NGS zelo verjetno že kmalu nadomestila številne standardne diagnostične in prognozične preiskave v patologiji, ki danes predstavljajo temelj diagnostike in zdravljenja. Patologi smo neposredna povezava med analizo in interpretacijo podatkov ter nadaljnji postopki zdravljenja. Na

podlagi morfološke slike naročamo in izvajamo številne različne preiskave ter interpretiramo njihove rezultate, da bi postavili pravilno diagnozo in zagotovili optimalno zdravljenje. Patologova interpretacija rezultata katerekoli preiskave, in ne preiskava sama, je edina, ki dejansko vodi do izboljšav in napredka v zdravljenju in to velja tudi za NGS. Tako kot za standardne molekularnogenetske preiskave tudi za sekvencirani genom ali transkriptom bolnika velja, da sta brez vrhunskega medicinskega znanja in ustrezne klinične interpretacije brez vsakega pomena. Težko si predstavljamo, da bi lahko imela NGS, razdrobljena na številne možne specialnosti medicine, kakršenkoli oprijemljiv vpliv na zdravje ljudi. Patologija ima tako v svojih rokah možnost, da v bližnji prihodnosti izkoristi moč novosti ter jo uporabi za pridobitev pomembnih informacij o naravi različnih bolezni in omogoči nove osnove pristopov zdravljenja.

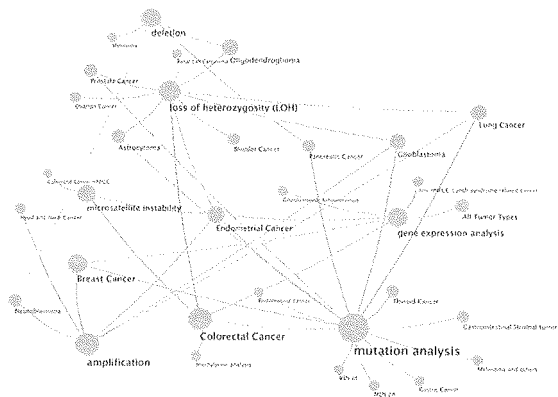
Genomska patologija bo torej v diagnostiki morala upoštevati obe, histopatološko in molekularno klasifikacijo bolezni, težava je v tem, da klasični znanstveniki nimajo potrebnega znanja histopatologije oz. medicine na sploh, patologi pa ne obvladamo dovolj dobro genomskih in molekularnih tehnik. Potrebovali bomo nov profil zdravnikov znanstvenikov - genomske oz. molekularne patologe. Genomski patologi so patologi prihodnosti. So zdravniki - znanstveniki nove generacije, ki tvorijo most med dvema, zgodovinsko ločenima kraljestvoma. So patologi, ki s svojim širokim znanjem in vrtilinami zapolnjujejo vrzel med osnovno znanostjo in medicino. Znanje, ki so ga pridobili od svojih prednikov, klasičnih morfoloških patologov, so združili z znanjem genomske tehnologije, da lahko kreirajo integrirane diagnoze bolezni, ki so osnovni pogoj za razvoj diagnostike in individualni pristop k zdravljenju posameznika. In zakaj ravno patologi? Eden od pomembnejših pogojev za genomske raziskave in razvoj genomskih diagnostičnih preiskav je izbor ustreznega tkivnega materiala. Številne genomske tehnologije delujejo na vzorcih zmrznjenega tumorskega tkiva in definitivna potrditev določenega bolezenskega označevalca ali prognostičnega indikatorja je odvisna od detekcije le tega v vzorcih bolnikov, ki so vključeni v prospektivne klinične študije. Ker so patologi glavna vrata, ki zagotavljajo ustrezno histološki material za študije, lahko bistveno vplivajo na njihov potek in rezultate. Še več. Patologi so edini, ki zanesljivo lahko prepoznajo bolezensko spremenjeno tkivo bolnika. Kako pomembno je znanje klasične, morfološke patologije, najlažje razložimo na primeru, ki jasno osvetli omejitve molekularnih preiskav: 50-70 % melanomov in približno 80 % benignih pigmentnih znamenj ima mutacijo BRAF. Molekularni biolog, ki v vzorcu z molekularno preiskavo potrdi prisotnost mutacije BRAF, lahko razume njen biološki in klinični pomen le, kadar ima na voljo patologove podatke, na katerem tkivu je bila opravljena molekularna preiskava. Brez te ključne izhodiščne informacije patologa bi bilo diagnosticiranje in zdravljenje zgolj na podlagi rezultatov molekularne analize le strel v temo, ki bi cilj zlahka zgrešil.

Če bodo podatki analize celotnega genoma postali ključna komponenta zdravstvenega sistema, se bosta morala patologija in celotni zdravstveni sistem torej soočiti z nekaterimi izzivi in ovirami. Treba bo (1) zagotoviti sredstva za

preiskave za vse zavarovance zdravstvenega sistema, (2) opredeliti klinični sistem, da bomo patologi na podlagi rezultatov NGS lahko kreirali uporabne in standardizirane izvide integriranih diagnoz, in (3) izobraziti novo generacijo patologov - genomske/molekularne patologe.

Vsak vidik genomske analize je uporaben in ga lahko zanesljivo uporabimo kot pomoč pri klinični interpretaciji. Pravilna klinična interpretacija rezultatov analize genoma zahteva integracijo rezultatov številnih preiskav, za katere so usposobljeni klasični patologi, in dodatno specializirano znanje s področja molekularne genetike in genomike. Za začetek bo treba definirati in validirati, kako, kdaj in kje bo analiza celotnega genoma nadomestila standardni nabor molekularnodiaagnostičnih preiskav, ki jih v diagnostiki uporabljamo danes. Glede na podatke Ameriškega združenja za molekularno patologijo (AMP) v vsakodnevni praksi trenutno uporabljamo 600 različnih preiskav za diagnozo in klinično interpretacijo genetskih lastnosti za več kot 90 različnih vrst solidnih tumorjev. Z umestitvijo različnih vrst preiskav (npr. mutacijske analize ali amplifikacijski testi) in različnih vrst tumorjev v posebne mreže so molekularni patologi izračunali, da bi lahko 85 % preiskav takoj nadomestili z NGS in pridobili enako uporabne podatke za diagnostiko in zdravljenje (slika 1).

Patologija prihodnosti bo potrebovala povsem novo, certificirano in klinično uporabno bazo podatkov, kjer bodo skrbno shranjeni in zaščiteni vsi rezultati genomskega sekvenciranja tumorjev posameznih bolnikov in ki jih bodo pri svojem delu lahko uporabljali tudi kliniki, tako za zdravljenje in sledenje bolnikov kakor tudi za namen raziskav. Le na ta način bomo lahko spoznanja genomske analize hitro širili in vgradili v standarde dobre integrirane oz. genomske patološke prakse.



Slika 1: Mreža rutinskih molekularnih preiskav in najpogostejših solidnih tumorjev, pri katerih molekularne preiskave uporabljamo za potrebe diagnostike ter ustreznega zdravljenja in preventive (Wall DP and Tonellato PJ. Medicine reports 2012).

Prihodnost patologije na Onkološkem inštitutu

Precej sreče je botrovalo dejstvu, da je Onkološki inštitut pred dobrimi desetimi leti, v sklopu gradnje prve faze novega inštituta, dobil tudi nov oddelek za patologijo, ki se je lahko po prostorih, opremi in patologih kosal z najboljšimi v Evropi. Dejstvo pa je, da smo v desetih letih, ob skromnih vlaganjih v patologijo, kljub stalnemu večanju obsega dela in tržne dejavnosti, zlasti zaostali na področju informatizacije in možnosti zaposlovanja in izobraževanja pomembnih in potrebnih kadrov. Skrajni čas je, da spoznamo pomen patologije in njene prihodnosti tudi za Onkološki inštitut (OI). Če bomo hoteli tudi v prihodnosti zdraviti državljane Slovenije po evropskih oz. najnovejših svetovnih priporočilih, bomo morali že v naslednjih nekaj letih na oddelku za patologijo zagotoviti standardizacijo vseh postopkov v delovnem procesu, implementirati novo tehnologijo, ki bo omogočala analizo genoma tumorskih tkiv, in vzpostaviti učinkovit informacijski sistem, ki bo omogočal elektronsko naročanje preiskav, sledenje vzorcev, kreiranje elektronskega standardiziranega izvida, statistično obdelavo pomembnih podatkov, vodenje arhiva blokov in stekel oz. tumorske banke in možnost povezovanja z arhivi izvidov drugih patologij. Zagotoviti bomo morali nove prostore, kadre, aparature in računalniško opremo in se tesneje povezovati z drugimi diagnostičnimi in raziskovalnimi oddelki na OI in z oddelki genomske patologije zunaj inštituta. Čas je, da izzivom damo prednost pred izgovori in ujamemo zadnji vlak za patologijo in medicino, ki jo naši bolniki potrebujejo in ki jo od nas terja naša zavezanost k napredku in boljši prihodnosti.

Zaključek

Ko so znanstveniki pred približno desetimi leti prvič v celoti sekvencirali humani genom, so mnogi že napovedovali, da bo ta izjemen podvig za vedno spremenil medicino. Vizija o možnosti hitre analize celotnega genoma je postala realnost. V rokah imamo nekakšen biološki recept za zdravje človeka – standard, ki nam omogoča odkritje genetskih korenin bolezni. Hkrati prinaša tudi vizijo o tem, kaj lahko medicina postane. Namesto uvrščanja bolnikov v številne diagnostične kategorije in zdravljenja v skladu s smernicami za posamezno kategorijo, bodo zdravniki lahko preverili natančne molekularne vzroke bolezni posameznika in ga zdravili s specifičnimi tarčnimi zdravili. Zaradi visokih stroškov genomske analize, tehnologija še ni del rutinskega diagnostičnega postopka v patologiji, toda že v bližnji prihodnosti naj bi s pomočjo tehnologije NGS zagotavljali natančno in pravočasno diagnozo, kar bo pomembno vplivalo na potek bolezni, preprečili škodljive in predpisovali koristne kombinacije zdravil in zagotovili optimalno zdravljenje, popolnoma prilagojeno posameznemu bolniku. Da bi v resnici prešli od teorije v prakso, bodo potrebne korenite spremembe celotnega zdravstvenega sistema, ne le patologije ali molekularne genetike. Investirati bomo morali v nove aparature, izobraževati

in zaposlovati nove izobražene kadre, zagotoviti prostore, implementirati sodoben informacijski sistem in standardizirane integrirane izvide. Za vse investicije in nova zdravila, ki so na obzorju in bodo 'izdelana po meri bolnika', pa bo treba spet zagotoviti denar. Le še nekaj časa je ostalo, da patologija izkoristi priložnosti, ki se ji ponujajo, in se uglaši s tehnološkimi novostmi moderne humane genomike. Pot do tja bo zahtevna in bo terjala prenovo patologije kot celote na državni ravni, če bomo želeli zagotoviti integracijo genomike v diagnostiko in njeno regulacijo z enakimi standardi, kot jih uporabljamo za vse druge preiskave v patologiji in dobri klinični praksi nasploh. Zahtevne računalniške analize humanega genoma in klinični pomen njihovih rezultatov bomo morali vgraditi v standardni diagnostični postopek. To je verjetno edina možnost, da bomo izkoristili potencial 'genoma za tisoč dolarjev' in omogočili, da medicina 'po meri bolnika' postane nekaj vsakdanjega za vse.

Viri in literatura

1. Berman DM, Bosenberg MW, Orwant LR et al. Investigative pathology: leading the post-genomic revolution. *Laboratory investigation* 2012. 92: 4-8.
2. Tonellato PJ, Crawford JM, Boguski MS, Saffitz JE. A national agenda for the future of pathology in personalized medicine: report of the proceedings of a meeting at the Banbury Conference Center on genome-era pathology, precision diagnostics, and preemptive care: a stakeholder summit. *Am J Clin Pathol* 2011. 135: 668-72.
3. Ulahannan D, Kovac MB, Mulholland PJ, Cazier JB and Tomlinson I. Technical and implementation issues in using next-generation sequencing of cancers in clinical practice. *Br J Cancer* 2013. 109: 827-835.
4. Kerick M, Isau M, Timmermann B, Sültmann H, Herwig R, Krobitch S et al. Targeted high throughput sequencing in clinical cancer Settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC Medical Genomics* 2011. 4: 68-82.
5. Wall DP and Tonellato PJ. The future of genomics in pathology. *Medicine Reports* 2012. 4: 14-19.
6. Haspel RL, Olsen JR, Berry A, Hill CE, Pfeifer JD, Schrijver I et al. Progress and Potential: Training in Genomic Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 138: 498-504.