

DIAGNOSTIČNI POMEN SEKVENCIRANJA NOVE GENERACIJE V PATOLOGIJI

Doc. dr. Barbara Gazić, dr. med., Oddelek za patologijo, Onkološki inštitut Ljubljana

Prof. dr. Jože Pižem, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Povzetek

V zadnjih desetih letih je postalo sekvenciranje nove generacije del rutinske diagnostike tumorjev v patologiji, brez katerega si sodobne diagnostike ne moremo več predstavljati. Izboljšale so se tudi tehnike izolacije DNA in RNA iz tkiva, tako da je postalo sekvenciranje nove generacije zanesljiva in robustna metoda. Široka uporaba v patološki diagnostiki tumorjev je pomembno prispevala k prepoznavanju novih vrst tumorjev in njihovih podtipov in prepoznavanju določenih vrst tumorjev na mestih in v organih, kjer pred tem niso bili opisani. Napredek v diagnostiki tumorjev mehkih tkiv z uporabo sekvenciranja nove generacije je primer, kjer je molekularna diagnostika ključno prispevala k razvoju histopatološke diagnostike. Diagnostika tumorjev osrednjega živčevja (gliomov) danes skoraj izključno temelji na molekularno-genetskih spremembah. Izkazalo se je tudi, da sekvenciranje nove generacije lahko prispeva k opredelitvi izvora zasevkov karcinoma v približno polovici primerov in hkrati omogoči določitev potencialnih terapevtskih tarč. Sekvenciranje nove generacije je postala standardna metoda v patologiji, ki je komplementarna drugim, dlje časa uveljavljenim metodam, predvsem imunohistokemiji, hkrati pa je omogočila pridobivanje novih spoznanj in prek primerjave molekularnih rezultatov in histopatološke slike vodila v izboljšanje same histopatološke diagnostike.

Uvod

Pred približno desetimi leti se je v molekularni diagnostiki začelo vse bolj uveljavljati sekvenciranje nove generacije, ki omogoča analizo večjega števila genov oziroma genetskih sprememb z eno samo analizo. Čeprav je bil na začetku v ospredju terapevtski oziroma prediktivni pomen (določanje genetskih sprememb, ki so pomembne za zdravljenje določenega tumorja), je veliko obetal tudi diagnostični pomen (ugotavljanje genetskih sprememb, ki omogočajo natančnejšo diagnostiko oziroma prepoznavanje določenih tumorjev).

Kot nova in učinkovita tehnologija je sekvenciranje nove generacije predstavljalo velike obete za natančnejšo in učinkovitejšo diagnostiko. Vendar je bilo že na začetku povezano s številnimi vprašanji. Katera tehnologija je najprimernejša za tkivo, fiksirano v formalinu in vklopljeno v parafin? Ker je sekvenciranje nove generacije povezano z razmeroma velikimi stroški, je bilo vprašanje, ali je bolje uporabiti manjše, tarčno usmerjene panele glede na diagnostično vprašanje, ali večje panele, ki so povezani z večjimi stroški, vendar dobimo z analizo več informacij in so uporabni pri različnih diagnostičnih vprašanjih.

Razvoj v zadnjih desetih letih

V zadnjih desetih letih je postalo sekvenciranje nove generacije del rutinske diagnostike tumorjev v patologiji, brez katerega si sodobne diagnostike ne moremo več predstavljati. Izboljšale so se tudi tehnike izolacije DNA in RNA iz tkiva, tako, da je postalo sekvenciranje nove generacije zanesljiva in robustna metoda.

Seveda je diagnostični pomen sekvenciranja nove generacije zelo različen na različnih področjih patologije. Na nekaterih področjih diagnostika tumorjev brez sekvenciranja nove generacije praktično ni več mogoča (npr. tumorji osrednjega živčevja, nekateri tumorji mehkih tkiv), na nekaterih področjih je vloga razmeroma omejena. Izkazalo se je, da je smiseln različen pristop glede na diagnostična vprašanja – v nekaterih primerih, kjer je nabor pričakovanih genetskih sprememb omejen, je smiselno uporabiti manjše, tarčne panele (npr. diagnostika melanocitnih tumorjev), v nekaterih primerih je smiselna uporaba večjih panelov (npr. diagnostika malignih tumorjev neznanega izvora). V nekaterih primerih, kjer iščemo genetske spremembe enega samega gena, je še vedno smiselna uporaba klasičnih in cenejših molekularnih metod (npr. ugotavljanje sprememb v genu *POLE* pri karcinomu endometrija, ugotavljanje sprememb v genu *GNAS* pri fibrozni displaziji).

Poudariti je treba, da je bilo v zadnjih desetih letih opredeljenih več tumorskih entitet, ki so definirane z novimi genetskimi spremembami. Torej postaja nabor genetskih sprememb, ki jih želimo analizirati in naj bi bile vključene v diagnostični panel, vse širši. Hkrati sledi razvoj komercialnih panelov z zamikom glede na nova spoznanja o genetiki tumorjev. To dejstvo in cilj po uporabi čim bolj usmerjenih panelov zaradi zmanjševanja stroškov narekuje potrebo po oblikovanju lastnih tarčnih panelov.

Pomemben vidik rutinske in široke uporabe sekvenciranja nove generacije v patološki diagnostiki tumorjev je, da je pomembno prispevala k prepoznavanju novih vrst tumorjev in njihovih podtipov, prepoznavanju določenih vrst tumorjev na mestih in v organih, kjer pred tem niso bili opisani, in k izboljšanju same histopatološke diagnostike – danes bolje prepoznamo določene histopatološke značilnosti tumorjev, ki so povezane z določeno vrsto tumorja ali celo določenimi genetskimi spremembami, kar

predstavlja navdušujoč napredek v patologiji – z uporabo stoletje stare tehnologije (obarvanih tkivnih rezin) smo danes sposobni pridobiti več informacij kot v preteklosti.

Izkazalo se je, da je ključno, da je sekvenciranje nove generacije in druga molekularna diagnostika integralni del patološke diagnostike, da se izvaja v laboratoriju za patologijo in da je za končno diagnozo tumorjev odgovoren specialist patologije, ki pri tem upošteva klinične, histopatološke, imunohistokemične in molekularno-genetske značilnosti določenega tumorja.

V nadaljevanju so predstavljena štiri izbrana področja, na katerih ima sekvenciranje nove generacije pomembno vlogo. V splošnem ocenjujemo, da je sekvenciranje nove generacije za postavitev pravilne diagnoze v splošnem indicirano v manj približno 0,5 % histopatoloških preiskav.

Tumorji mehkih tkiv

Diagnostika tumorjev mehkih tkiv je zahtevna, ker gre za številne različne tumorje z zelo različnim kliničnim potekom in so v splošnem precej redki. Večina tumorjev mehkih tkiv ima značilne genetske spremembe (največkrat genske fuzije), v nekaterih primerih genetska sprememba definira tumor. Pred sekvenciranjem nove generacije je bila poleg imunohistokemije glavna diagnostična metoda FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija). Zaradi pomembnih prednosti sekvenciranja nove generacije (opredelitev genske fuzije, vključno s fuzijskim partnerjem, zaznavanje fuzij z novimi, še ne opisanimi fuzijskimi partnerji, hkratna analiza številnih genov, ki so lahko udeleženi v fuzijah) je v zadnjih letih sekvenciranje nove generacije v veliki meri nadomestilo preiskavo FISH. Dodatno se je izkazalo, da je bolj občutljivo in zanesljivo od FISH. Sekvenciranje nove generacije je tudi skrajšalo čas do končne diagnoze, saj z eno analizo pokrijemo vse relevantne genetske spremembe, za razliko od FISH, pri katerem je šlo praviloma za stopenjsko diagnostiko.

Napredek v diagnostiki tumorjev mehkih tkiv z uporabo sekvenciranja nove generacije je primer, kjer je molekularna diagnostika ključno prispevala k razvoju histopatološke diagnostike. Treba pa je opozoriti, da je določena genetska sprememba pogosto prisotna v več različnih vrstah tumorjev (kar velja za tumorje mehkih tkiv in tumorje nasploh), neredko v tumorjih s povsem različnim kliničnim potekom, zato je izrednega pomena korelacija med histopatološko sliko, imunohistokemičnim profilom, klinično sliko in rezultati sekvenciranja nove generacije – v nasprotnem primeru lahko vodijo rezultati sekvenciranja nove generacije do napačne diagnoze.

Tumorji osrednjega živčevja

Diagnostika tumorjev osrednjega živčevja (gliomov) danes skoraj izključno temelji na molekularno-genetskih spremembah, zato je sekvenciranje nove generacije ključno za

zanesljivo in učinkovito diagnostiko. Poleg sekvenciranja nove generacije postaja standard v diagnostiki tumorjev osrednjega živčevja metilacijsko profiliranje.

Maligni tumorji nejasnega izvora

Sekvenciranje nove generacije je bilo obetavno pri opredeljevanju tumorjev nejasnega izvora, največkrat zasevkov nediferenciranih karcinomov in nediferenciranih malignih tumorjev nasploh. V splošnem je v teh diagnostičnih primerih pomembno, da za sekvenciranje nove generacije uporabimo čim večji panel, saj dobimo na ta način potencialno več informacij. Izkazalo se je, da sekvenciranje nove generacije lahko prispeva k opredelitvi izvora zasevkov karcinoma v približno polovici primerov in hkrati omogoči tudi določitev potencialnih terapevtskih tarč.

Pomembna ugotovitev v zadnjih letih, ki jo je omogočila široka uporaba sekvenciranja nove generacije, je, da pomemben del nediferenciranih/pleomorfnih tumorjev, predvsem v področju bezgavk (pazduha, vrat, ingvinalno), ki so bili v preteklosti opredeljeni kot nediferencirani ali pleomorfnih sarkomi, predstavlja nediferencirane melanome. Njihov prepoznavanje je ključna za ustrezno nadaljnje zdravljenje.

Melanocitni tumorji

Diagnostika melanocitnih tumorjev predstavlja v mnogih primerih velik diagnostični izziv. V zadnjih 10-15 letih so bile molekularno opredeljene različne vrste malignih tumorjev, vključno z gonilnimi spremembami in tistimi spremembami, ki so povezane z malignim potencialom. Sekvenciranje nove generacije omogoča z eno samo analizo ugotavljanje gonilnih genetskih sprememb, ki so značilne za določen tip melanocitnih tumorjev, in sekundarnih genetskih sprememb, povezanih z malignim potencialom (mutacija promotorja TERT, spremembe v številu kopij genov in kromosomskih regij in drugih), in je v veliko pomoč pri diagnostiki melanocitnih tumorjev. Zmanjša možnost tako prekomerne diagnoze melanoma kot zamenjave melanoma z ne-malignim melanocitnim tumorjem. Največji pomen ima v diagnostiki Spitz melanocitnih tumorjev. Sekvenciranje nove generacije je v zadnjih letih ključno prispevalo k izboljšanju diagnostike melanocitnih tumorjev v izbranih zahtevnih primerih, tako na račun ugotovljenih genetskih sprememb v določenem tumorju, kot na račun izboljšanja same histopatološke diagnostike (boljšega prepoznavanja določenih histopatoloških značilnosti, ki so povezane z določeno vrsto tumorja ali celo določeno genetsko spremembo). Sekvenciranje nove generacije je indicirano v 0,5-1 % vseh odstranjenih melanocitnih tumorjev.

Sekvenciranje nove generacije in imunohistokemične preiskave

Pred desetimi leti ni bilo jasno, v kolikšni meri bo sekvenciranje nove generacije nadomestilo imunohistokemične preiskave. V nasprotju s pričakovanji so se vzporedno

s sekvenciranjem nove generacije razvijale tudi imunohistokemične preiskave. Tako imamo danes na voljo mnoga protitelesa, ki specifično zaznavajo določene genetske spremembe in lahko v veliki meri nadomestijo molekularne metode, vključno s sekvenciranjem nove generacije. Prednost imunohistokemičnih preiskav je njihova dostopnost, so cenovno ugodne in omogočajo rezultate v nekaj urah. Primeri takšnih preiskav so BRAFV600E (zaznavanje mutacij v različnih tumorjih), FOSB (tumorji s fuzijami FOSB), H3G34W (mutacija histona H3, značilna za gigantocelične tumorje kosti), CAMTA1 (zaznavanje fuzij CAMTA1, ki so značilne za epiteloidni hemangioendoteliom), STAT6 (zaznavanje fuzije STAT6, značilen za solitarni fibrozni tumor), panTRK (zaznavanje fuzij genov *NTRK1-3* v različnih tumorjih) in številni drugi.

Po drugi strani se je zaradi zelo specifičnih in zato diagnostičnih imunohistokemičnih preiskav ter sekvenciranja nove generacije zmanjšala potreba po uporabi manj specifičnih imunohistokemičnih preiskav – tako danes v mnogih primerih napravimo manj teh preiskav, diagnostika pa je bolj zanesljiva.

Zaključek in pogled naprej

Sekvenciranje nove generacije je postala standardna metoda v patologiji, ki je komplementarna drugim, dlje časa uveljavljenim metodam, predvsem imunohistokemiji. Na nekaterih področjih patologije ključno prispeva k zanesljivi diagnostiki, kar pomembno vpliva na nadaljnjo obravnavo bolnika, hkrati pa je sekvenciranje nove generacije omogočilo pridobivanje novih spoznanj in prek primerjav molekularnih rezultatov in histopatološke slike vodilo v izboljšanje same histopatološke diagnostike.

Danes se poleg sekvenciranja nove generacije z uporabo različno velikih panelov vse bolj uveljavlja sekvenciranje celotnega transkriptoma, eksoma in genoma, tudi na tkivu, fiksiranem v formalinu in vklopljenem v parafin. Metilacijsko profiliranje (določanje metiloma), ki se je pred leti najprej uveljavilo v diagnostiki tumorjev osrednjega živčevja, se vse bolj uveljavlja tudi na drugih področjih in je predvsem pomembno pri prepoznavanju tumorjev, ki jih z drugimi metodami ne moremo opredeliti.

Podobno kot je sekvenciranje nove generacije prispevalo k izboljšanju histopatološke diagnostike (danes »pod mikroskopom vidimo več in prepoznamo več«), si lahko v prihodnje obetamo z uporabo umetne inteligence, ki temelji na analizi slike.

Že več let poslušamo napovedi, da bodo nove tehnologije (npr. sekvenciranja nove generacije) povsem spremenile diagnostiko v patologiji in nadomestile mikroskopski pregled. Do zdaj se je izkazalo, da je mikroskopski pregled (histopatološka slika) še

vedno najpomembnejši del patološke diagnostike, katere pomen se je z novimi tehnologijami v splošnem celo povečal. V bližnji prihodnosti kaže, da bodo nove tehnologije dodatno prispevale k izboljšanju diagnostike, da pa ne bodo izpodrinile trenutno široko uveljavljenih metod (histopatološka slika, imunohistokemija, sekvenciranje nove generacije). Živimo v času res velikega razvoja patologije, ki hkrati predstavlja gonilo razvoja zdravljenja tumorjev.

Viri in literatura

1. Pižem J, Šekoranja D, Matjašič A et al. The role of molecular diagnostics in aneurysmal and simple bone cysts - a prospective analysis of 19 lesions. *Virchows Arch* 2021;479:795-802.
2. Šekoranja D, Zupan A, Matjašič A, Boštjančič E, Calonje E, Pižem J. Role of Targeted Sequencing in Routine Diagnostics of Spitz Melanocytic Neoplasms- An Analysis of 70 Cases., *J Cutan Pathol* 2025;52:141-153.
3. Iro AK, Agaimy A. Dedifferentiated and Undifferentiated Melanoma: The Chameleon of Surgical Pathology. *Surg Pathol Clin* 2026;19:103-118.