

Dokąd zmierza współczesna patologia?

Patologia jest dziedziną medycyny, która łączy nauki teoretyczne z dziedzinami klinicznymi, zajmując się, m.in. wyjaśnianiem przyczyn i skutków chorób. Praktyczna rola patologa w procesie diagnostyczno-terapeutycznym polega w chwili obecnej nie tylko na postawieniu rozpoznania, ale także na określeniu czynników mogących determinować przebieg danego schorzenia, jak również wpływających (np. w chorobach onkologicznych) na sposób zastosowanego leczenia. Niniejszy artykuł ma na celu scharakteryzowanie procesu diagnostyki histopatologicznej, który różni się znacząco od tego, co jeszcze niedawno było standardową metodą diagnostyczną w tej dziedzinie.

Rozpoznanie histopatologiczne stanowi efekt analizy zmian morfologicznych w pobranych tkankach, niekiedy także materiale tworzonym przez pobrane pojedyncze komórki ze zmienionych narządów (badanie cytopatologiczne), dokonywany przez patomorfologa. Nieodzownym elementem tego procesu jest ścisła konfrontacja badania mikroskopowego z obrazem klinicznym (objawami, odchyleniami w badaniach laboratoryjnych itp.). Ten związek przed ponad 50 laty był określony przez prof. Laskowskiego terminem histoklinika i w dalszym ciągu stanowi podstawę klasycznej diagnostyki histopatologicznej. Ocena zmian w badaniu mikroskopowym polega na interpretacji obserwowanych obrazów przez patologa. W związku z tym jest ona obciążona dużą dozą subiektywizmu. Do dzisiaj jesteśmy tego świadkami w działach patologii, w których nowo wprowadzane techniki (immunohistochemia, genetyka molekularna) nie wnoszą istotnych i rozstrzygających o rozpoznaniu informacji. Przykładem tego może być diagnostyka nowotworów melanocytarnych, a pytanie czy mamy do czynienia ze zmianą łagodną, czy z czerniakiem może być nierozstrzygnięte w kilku procentach analizowanych guzów. Rodzi się zatem pytanie, co zmieniło zasadniczo współczesne postępowanie w diagnostyce patomorfologicznej.

Badania immunohistochemiczne

Dokładne określenie obecności białkowych markerów tkankowych zrewolucjonizowało histopatologię lat 80. ubiegłego wieku. Świadczy o tym zarówno wprowadzanie różnego rodzaju przeciwciał ujawniających antygeny tkankowe do codziennej praktyki, jak i wynikający z tego ogromny postęp w diagnostyce histopatologicznej. Można wskazać tu na istotny wzrost liczby jednostek chorobowych, jakie zdefiniowano w końcu XX wieku w wyniku zastosowania tej metody. Odzwierciedla to również widoczny obecnie trend umieszczania immunofenotypu, np. nowotworów, wśród wykładników diagnostycznych rekomendowanych przez Światową Organizację Zdrowia (tzw. *blue books*, czyli klasyfikacje nowotworów opracowywane pod agendą WHO). Ekspansja immunohistochemii w diagnostyce patologicznej jest szybka, czego doświadcza w sensie negatywnym m.in. mikroskopia elektronowa, wyparta przez tę technikę w wie-

lu dziedzinach histopatologii, poza np. diagnostyką schorzeń kłębuszków nerkowych czy też chorób nienowotworowych mózgu. Warto wspomnieć, że jeszcze w latach 90. XX w. immunohistochemia opierała się na wielu przeciwciałach, które wykrywały jedynie antygeny nieutralne (lub zabezpieczone w wyniku natychmiastowego zamrażania, które nie denaturowało białek). Później, pojawiły się z jednej strony techniki „odkrywające” białka zdenaturowane w wyniku utrwalenia w formalinie (trawienie enzymami, gotowanie w kuchence mikrofalowej, autoklawach etc.), z drugiej – bardziej specyficzne przeciwciała, które wykrywały także zachowane epitopy antygenów tkankowych.

Wśród nowych jednostek, które wyodrębniono w oparciu o immunofenotypowanie, można wymienić anaplastyczny chłoniak wielkokomórkowy (*anaplastic large cell lymphoma*, ALCL). Jego atypowa morfologia w połączeniu z klinicznym obrazem rozsianego procesu w węzłach chłonnych, powodowały, że przed erą immunohistochemii był on rozpoznawany jako rozsiew przerzutowego raka czy czerniaka o nieznanym punkcie wyjścia lub jako choroba układowa z kręgu złośliwej histiocytozy. Dopiero stwierdzenie obecności markerów limfocytarnych oraz antygeny aktywacji limfocytów Ki-1 (obecnie określanego jako antygen CD30), spowodowało poprawną jego diagnostykę oraz optymalizację jego leczenia. Innym nowotworem, który dzięki immunohistochemii udało się wyodrębnić spośród innych morfologicznie podobnych guzów, jest nowotwór podścieliska przewodu pokarmowego (*gastrointestinal stromal tumor*, GIST). Uprzednio traktowany był jako nowotwór złośliwy mięśni gładkich (*leiomyoblastoma*) lub komórek osłonek nerwów obwodowych. Jednak specyficzny obraz kliniczny (tendencja do rozsiewu w jamie brzusznej, najczęściej z zaawansowaniem przerzutów do wątroby), wskazywał na odmienność histogenetyczną i klasyfikacyjną tych zmian. Ekspresja CD34 i CD117 oraz niestała obecność markerów mięśniowych potwierdziła odrębność tej grupy guzów. Dodatkowo jej zdefiniowanie umożliwiło leczenie celowane, ze względu na obecność w nich częstych mutacji w receptorach posiadających specyficzną aktywność kinazy tyrozynowej, których zablokowanie powodowało regresję zmian nowotworowych.

Immunohistochemia odgrywa zatem nie tylko rolę narzędzia diagnostycznego; jest także czynnikiem, którego uwzględnienie może modyfikować postępowanie terapeutyczne. Ma bowiem ogromne znaczenie, w określeniu tzw. czynników predykcyjnych w leczeniu onkologicznym, czego przykładem może być rak piersi. Przed erą fenotypizowania nowotworów, raporty patologiczne w tym guzie były dość zwięzłe. Określały m.in. typ raka, jego stopień zróżnicowania, doszczętność resekcji czy też zajęcie węzłów chłonnych. Obecnie niezbędnym elementem badania patomorfologicznego w tym nowotworze jest ocena ekspresji receptorów steroidowych — estrogenowego (ER, estrogen receptor) i progesteronowego (PgR, progesteron receptor), a także

stanu receptora HER2 i markera proliferacji Ki-67. Ich obecność lub brak w tkance raka determinuje odmienny typ leczenia systemowego. Według zaleceń Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (ASCO, American Society of Clinical Oncology) ekspresję ER i PgR powinno się oceniać w każdym pierwotnym guzie piersi; ocenę w guzie przerzutowym zaleca się, jeśli może to mieć wpływ na wybór metody leczenia. Stan receptora HER2 metodą IHC określa się wyłącznie w materiale tkankowym (biopsja gruboigłowa, wycinek tkankowy), ponieważ niezbędne jest prawidłowe zachowanie w materiale błon komórkowych (a nie w jądrach komórek, jak w przypadku receptorów steroidowych). W ocenie IHC receptora HER2 stosuje się czterostopniową skalę (HER2 0, 1+, 2+, 3+). Z klinicznego punktu widzenia wynik 0 i 1+ określany jest jako ujemny, a 3+ jako dodatni. Wynik ekspresji 2+ w badaniu IHC jest określany jako graniczny lub niejednoznaczny i wymaga oceny amplifikacji genu HER2, co najczęściej wykonuje się metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Około 15-20% raków piersi określonych metodą IHC jako HER2 2+ wykazuje amplifikację genu HER2 i są one traktowane jako nowotwory HER2-dodatnie. Stan receptora HER2 powinien być oznaczany w każdym rozpoznanym histopatologicznie inwazyjnym raku piersi oraz w przypadkach wznowy, jeśli wcześniej nie wykonano takich oznaczeń.

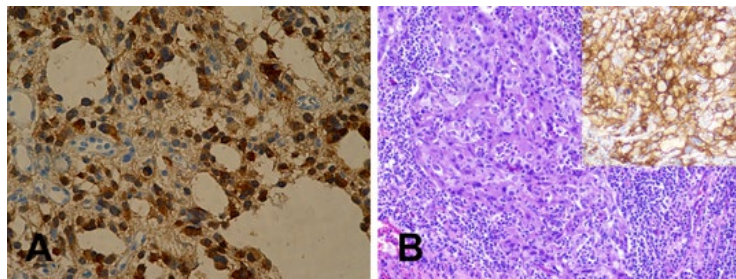
Można zatem skonkludować, że immunohistochemia odegrała i odgrywa obecnie istotną rolę w histopatologii oraz w medycynie klinicznej.

Genetyka molekularna

Mniej więcej w tym samym czasie, w jakim do zakładów patomorfologii zawitała immunohistochemia, dynamiczny rozwój odnotowywała inna dziedzina naukowa – genetyka molekularna. Duży wpływ na jej oddziaływanie na histopatologię dał się zaobserwować w końcu XX w., choć już wcześniej wyjaśnianie przez nią podstaw niektórych chorób stopniowo zmieniał nasze rozumienie medycyny. O zastosowaniu genetyki w patomorfologii zdecydowały także nowe techniki, które z jednej strony umożliwiły znaczące skrócenie czasu przeprowadzenia analiz, z drugiej strony pozwoliły na wykorzystanie tkanek, które w patomorfologii stanowią główny materiał diagnostyczny, tzn. tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w postaci bloków parafinowych.

W ostatnich latach jesteśmy świadkami wyjątkowo szybkiego postępu w zrozumieniu molekularnego podłoża chorób. Wynika on z jednej strony z wprowadzenia wydajnych, zautomatyzowanych technik mini- i mikrodysekcji, pozwalających na precyzyjne wyselekcjonowanie komórek i grup komórek do dalszych analiz genetycznych. Z drugiej strony, możliwy jest dzięki dynamicznemu rozwojowi technik sekwencjonowania nowej generacji (*next generation sequencing*, NGS), pozwalających na analizy nawet pojedynczych komórek.

Jak uprzednio wspomnieliśmy, genetyka molekularna wykazała, że część chorób może być determinowana za-



Przykłady współczesnego zastosowania immunohistochemii w diagnostyce patomorfologicznej. A. Wykrycie zmutowanej formy IDH1 pozwala na rozpoznanie glejaków o rozlanym typie wzrostu (tu: skąpodrzewiaka), co może mieć znaczenie w materiałach drobnych, pochodzących np. z nacieku obrzeża tego nowotworu mózgu. B. Lity gruczolakorak płuca z intensywnym naciekiem limfocytarnym wykazywać może silną ekspresję białka PD-L1 (wstawka), co może być istotnym czynnikiem determinującym leczenie wzmagające immunologiczną odpowiedź przeciwnowotworową u chorych z tym nowotworem.

burzeniami chromosomalnymi i genowymi. Należy przywołać tu badania prof. Janusza Limona z naszej Uczelni, który wykrył w 1986 r. obecność powtarzalnego zaburzenia w tłuszczakomięśnaku myksoidalnym (translokacja między chromosomami 12 i 16), które obecnie stanowi ważny element diagnostyczny tego guza. Wspomniana translokacja jest jednym z wielu odkrytych w ostatnich latach charakterystycznych zaburzeń molekularnych. Wśród licznych przykładów wyszczególnić można mięsak maziówkowy (translokacja pomiędzy chromosomami X i 18), rak śluzowo-naskórkowy (translokacja pomiędzy chromosomami 11 i 19) czy *epithelioid haemangi endothelioma* (translokacja pomiędzy chromosomami 1 i 3). Specyficzne zaburzenia chromosomalne, poza wartością diagnostyczną, mogą także nieść informację predykcyjną dla danej terapii (amplifikacja genu *HER2* w raku sutka) lub prognozy (amplifikacja genu *NMYC* w nerwiaku zarodkowym). W praktyce klinicznej, powyższe zaburzenia wykrywa się wykorzystując dedykowane im specyficzne sondy za pomocą technik cytogenetyki takich jak fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) i chromogeniczna hybrydyzacja in situ (*chromogenic in situ hybridization*, CISH) – różnią one sposobem wyznakowania i detekcji sond. Rozwój diagnostyki molekularnej to nie tylko rozdrabnianie grup chorób na coraz mniejsze, zdefiniowane molekularnie podtypy. Istotnym przykładem przeciwnego trendu jest wykrycie tej samej charakterystycznej translokacji (doprowadzającej do powstania genu fuzyjnego *NAB2-STAT6*) w dwóch nowotworach: *solitary fibrous tumor* (SFT) i *haemangiopericytoma* (HPC). Dzięki temu odkryciu możliwe było zdefiniowanie wspólnego pochodzenia obu nowotworów, które obecnie uznawane są za dwie postaci tej samej choroby. Szczególna jego wartość związana jest także z faktu, iż translokacja skutkuje stałą ekspresją białka STAT6 w jądrach komórek, która jest obecnie jednym z podstawowych kryteriów diagnostycznych tego nowotworu.

Postępy we wprowadzaniu nowoczesnych technologii do praktyki klinicznej szczególnie wyraźnie widać w diagnostyce nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

Odkrycie mutacji w genach kodujących dehydrogenazę izocytrynianową (IDH, enzym będący ogniwem cyklu Krebsa) było przełomem w zrozumieniu biologii glejaków o niskiej złośliwości histologicznej. Była to też pierwsza mutacja opisana w genie kodującym kluczowy enzym metaboliczny (które wcześniej uznawane były za niezwiązane z nowotworzeniem *ex definitione*), a opracowanie mutacyjnie-specyficznych przeciwciał umożliwiło wdrożenie jej analizy do rutynowej diagnostyki patologicznej. Powiązanie charakterystycznych zaburzeń genetycznych z obrazem histologicznym i przebiegiem klinicznym zrewolucjonizowała klasyfikację tych nowotworów, która oparta jest obecnie na integracji cech histologicznych i molekularnych. Podobny kierunek zmian zaobserwować można w diagnostyce rdzeniaków; różnica polega, jednak, na braku jednoznacznego powiązania pomiędzy morfologią i typem molekularnym. Z tego powodu dąży się do niezależnego sklasyfikowania obu aspektów nowotworu, a ich połączenie zapewnia najbardziej wiarygodne prognozowanie przebiegu klinicznego i pozwala na adekwatny dobór terapii dla danego chorego. Opisane powyżej analizy oparte są na zmianach w genomie, jednak w ostatnich latach coraz większe znaczenie mają także badania epigenetyczne, czyli definiujące zmiany w ekspresji genów w zależności od potranslacyjnych modyfikacji histonów, metylacji regionów promotorowych oraz niekodującego RNA (mikroRNA, lncRNA). W ostatnich latach opisane zostały profile metylacji genomu specyficzne dla konkretnych typów nowotworów, których aplikacja w diagnostyce postulowana jest przez niektóre ośrodki badawcze. Podsumowując, cechy molekularne chorób szeroko wniknęły do diagnostyki patomorfologicznej, stanowiąc istotny parametr nie tylko diagnostyczny, ale także mający znaczenie terapeutyczne, np. w nowotworach. Wspomniane już wcześniej zastosowanie terapii nakierowanej (celowanej) na określony i charakterystyczny marker komórki guza, determinuje bardzo wybiórcze leczenie doprowadzające do zahamowania procesu rozrostowego.

Dokąd zmierzamy?

Autorzy science-fiction roztaczają różnorodne, barwne wizje przyszłości świata. Analogicznie, w przypadku patologii, dostrzec można kilka niezależnych trendów, które, w zależności od innych, trudnych do przewidzenia zmian, mogą definiować formę przyszłej diagnostyki patologicznej. Jednym z nich, symetrycznie do nurtu zmian w radiologii, jest dążenie do przestrzennego uniezależnienia patologa od laboratorium. Telepatologia oparta jest na skanowaniu wybarwionych preparatów i ocenie przygotowanego w ten sposób obrazu komputerowego. Na obecną chwilę wiąże się to z dwoma kategorycznymi problemami, które przekreślają jej użyteczność praktyczną. Po pierwsze, prawidłowa ocena i opracowanie makroskopowe materiału jest podstawą właściwej diagnostyki mikroskopowej, a możliwość ponownego wglądu do materiału często bywa nieodzowna. Można wyobrazić sobie powsta-

nie systemów analogicznych do robotów chirurgicznych da Vinci, lecz obecnie zdalna ocena makroskopowa nie jest wykonalna. Po drugie, optyka nawet dość przeciętnych mikroskopów zapewnia jakość i głębię obrazu, do której daleko jest możliwościom najlepszych skanerów. Tym samym, rozmaite niuanse, które często determinują możliwość postawienia prawidłowego rozpoznania, mogą być znacznie trudniejsze lub wręcz niemożliwe do wychwycenia. Innym kierunkiem rozwoju, specyficznemu dedykowanemu nowotworom, jest wykorzystywanie na coraz większą skalę szeroko zakrojonych analiz zaburzeń genetycznych i epigenetycznych jako markerów diagnostycznych, prognostycznych i predykcyjnych. Obecnie takie badania są wykonywane głównie w celach naukowych, a w rutynowej diagnostyce mają marginalne znaczenie. Wynika to z wysokich kosztów analiz i relatywnie jeszcze dość niskiej wartości praktycznej ich wyniku; można jednak prognozować, że koszty będą powoli maleć, a przydatność będzie systematycznie wzrastać wraz z kumulacją danych i dostępnością rosnącej liczby terapii celowanych. Trzecim kierunkiem rozwoju eksplorowanym w ostatnich latach jest zautomatyzowana komputerowa analiza obrazów histologicznych. Rozwój technik uczenia maszynowego i wykorzystania tzw. *big data* zainspirowało firmę IBM do stworzenia projektu Doctor Watson – systemu sugerującego potencjalne rozpoznania na podstawie wprowadzonych danych klinicznych w oparciu o ogromną bazę historycznych przypadków. W przypadku histopatologii nie powstały jeszcze analogiczne projekty na aż tak wielką skalę, ale wiele zespołów na całym świecie pracuje nad różnymi rozwiązaniami zmierzającymi w tym kierunku. Czas pokaże jaka będzie faktyczna funkcjonalność i przydatność kliniczna opisanych powyżej koncepcji.

dr Michał Bienkowski, prof. Wojciech Biernat,
Katedra Patomorfologii



rys. Alina Boguszewicz