

Molekulaarpatoloogia rakendamine

PERH-i patoloogiakeskuses

Kristiina Tamboom
laborispetsialist
Põhja-Eesti
Regionaalhaigla
patoloogiakeskus



Molekulaarpatoloogia on patoloogia valdkond, mis tegeleb haiguste uurimisega molekulaarsel tasandil: uurib rakkude ja kudede ebanormaalse funktsioneerimise molekulaargeneetilisi põhjuseid. Molekulaarpatoloogia hõlmab aspekte patoloogia, molekulaarbioloogia ja geneetika erialadest ja kasutab mitmeid molekulaardiagnostilisi meetodeid.

Molekulaarpatoloogiliste uuringute eesmärk on täpsustada haiguste diagnoosi ja prognoosi ning ennustavate markerite alusel aidata määrata sihtmärkravi. Sihtmärkravi on vähivähi liik, mis mõjutab organismis kasvajaspetsiifilist sihtmärki, milleks on vähirakkude kasvu, jagunemist ja levikut kontrollivad bioloogilised sihtmärk-molekulid (mis võivad kanda mutatsioone või muid geneetilisi muutusi, mis on spetsiifilised vähirakkudele). Selle ravi määramiseks on vaja teada, kas kasvaja on ravimi toimimiseks sihtmärk.

Vaade tagasi – kuidas kõik algas

Patoloogiasse molekulaarsete meetodite sissetoomise visioon oli tollasel Põhja-Eesti Regionaalhaigla (PERH) patoloogiakeskuse juhatajal dr Tiina Leismanil, tema initsiatiivil alustati molekulaarpatoloogia rakendamisega. Patoloogiakeskuses oli suurenenud vajadus molekulaarpatoloogiliste uuringute järele, kuna täpsem diagnoos, parem

prognoosi hindamine ja sihtmärkravi määramine põhineb lisaks morfoloogilistele muutustele ka molekulaarsete meetoditega saadud infol. Eesmärk oli komplekssete uuringuvastuste vormistamine. 2008. aasta sügisel, kui asusin tööle laborispetsialistina, alustasin molekulaarpatoloogia juurutamisega PERH-i patoloogiakeskuses.

Esmalt tuli kaardistada molekulaarsete meetodite vajadus ja teha rakendamise plaan. Kaardistuse tulemusena selgus, et patoloogiakeskuses vajalikest molekulaarsetest meetoditest – PCR (*polymerase chain reaction*), reaala-

PCR, sekveneerimine ja FISH (*fluorescence in situ hybridization*) – oli tol hetkel kõige mõistlikum alustada FISH meetodiga.

Seejärel tuli planeerida nõuetekohased molekulaarpatoloogia laboriruumid, mille otsimine, olgu etteruttavalt öeldud, kestis aastaid. Patoloogiakeskus asus kahes korpus: Mustamäel ja Hiiul. Algselt planeeriti laboriruumid patoloogiakeskuse Mustamäe D-korpusesse, kuid tööga alustati siiski Hiiu korpuses.

Patoloogiakeskuse renoveerimise planeerimise käigus töötati läbi mitmeid



Laboriuuringute kvaliteedi üheks näitajaks on välistes kvaliteedikontrollides osalemine. Oleme neis molekulaarpatoloogia meetoditega pidevalt ja edukalt osalenud, alates 2010. aastast FISH meetodiga ja alates 2016. aastast reaala PCR meetodiga.





Molekulaarpatoloogia meeskond: Annika Peterson, Kristiina Tamboom ja Evelin Anion.

tööversioone ja projekte. Eraldi paiknevad korpused koliti kokku minimaalselt renoveeritud Mustamäe D-korpusesse 2017. aastal. Patoloogiakeskuse jaoks valmis uus hoone (osa Y-korpusest) 2023. aasta kevadel, kuhu olid planeeritud ka nõuetekohased laboriruumid molekulaarpatoloogia labori jaoks, kuhu kolisime.

FISH meetodi rakendamine

Sisuline töö algas nn FISH projekti kirjutamisega, mis sisaldas infot meetodi kohta, ruumide kirjeldust, vajalike

seadmete loetelu, planeeritavate analüüside nimekirja, eeldatavat analüüside mahtu, reaktiivide kulu ja meetodi tasuvuse arvutust (seda tehti koostöös finantsteenistusega). Projektile saime haigla juhatusest heakskiidu ja võisime uue meetodi rakendamisega alustada.

FISH meetodi kasutuselevõttu lihtsustas asjaolu, et mõned selle meetodi rakendamiseks vajalikud seadmed nagu fluorestsentsmikroskoop ja hübriidisaator olid juba olemas ning laboriruumidele polnud keerulisi erinõudeid. Tulevalt molekulaarpatoloogias kasuta-

tavast analüüsimaterjalist, milleks on fikseeritud koeline või rakuline materjal, võtsime töösse interfaasi FISH analüüsid.

Praktiline töö algas FISH analüüside teostamisega 2009. aastal patoloogiakeskuse Hiiu korpuses immunohistokeemia labori ruumides. FISH meetod oli mulle tuttav, kuna olin seda kasutanud enda bakalaureusetöös.

Töö meditsiinilaboris oli aga isemoodi, sisaldades ka näiteks nõuetekohaste uuringuvastuste vormistamist. Alguses oli palju õppimist, esimesel

aastal käisin mitmes laboris, alustasin kõige lähemalt ehk Tartu geneetikakeskusest, kus Pille Tammur tutvustas sealset töökorraldust, kuid käisin ka teistes riikides end täiendamas ja kogemust saamas: Poolas HER2 FISH analüüside tegemise väljaõppel ja Rootsis stažeerimas onkohematoloogiliste kasvajatega seotud FISH analüüsidele spetsialiseerunud laboris.

Esimese analüüsina võtsime kasutusele HER2 FISH analüüsi 2009. aastal, kuna selle järele oli kõige suurem vajadus. HER2 geeni amplifikatsiooni on vaja tuvastada sihtmärkravi määramiseks ja HER2 FISH meetod on selleks nn kuldne standard. Järgmisel aastal analüüside menüü laienes nelja lümfoomi spetsiifilise FISH analüüsi võrra, mis aitas kaasa lümfoomi alatüüpide täpsustamisele. Edaspidi oleme vastavalt vajadusele FISH analüüside menüüd oluliselt laiendatud (vt tabel 1).

Reaalaja PCR meetodi rakendamine

Seoses uute sihtmärkravimite laialdase kasutuselevõtuga täppisonkoloogia rakendamisel suurenes vajadus määrata kasvajaspetsiifilisi somaatilisi mutatsioone, mida võiks nimetada ka ennustavateks ehk prediktivseteks markeriteks (*predictive marker*). Nende tuvastamiseks kasutasime uut meetodikat – reaalaja PCR. Kirjutasime uue projekti kasvajaspetsiifiliste mutatsioonide määramiseks reaalaja PCR meetodil, mis nii nagu FISH projekt sisaldas infot meetodi kohta, ruumide kirjeldust, vajalike seadmete loetelu jne. Ka

Tabel 1. FISH analüüsid sihtmärkravi määramiseks, diagnoosi täpsustamiseks ja prognoosi hindamiseks.

Diagnoos	Materjal	Geenid/aberratsioonid
Rinna- ja maovähk	FFPE	Sihtmärkravi määramiseks • HER2
Lümfoomid	FFPE, puutepreparaat	Diagnoosi täpsustamiseks: • t(8;14) IGH::MYC • t(11;14) IGH::CCND1 • t(14;18) IGH::BCL2 • t(14;18) IGH::MALT1 • t(11;18) BIRC3::MALT1 • MYC break, BCL2 break, BCL6 break
Sarkoomid	FFPE	Diagnoosi täpsustamiseks: • t(11;22) EWSR1::FLI1 • t(17;22) COL1A1::PDGFB • MDM2 ampl, EWSR1 break, SS18 break, USP6 break, FOXO1 break
Hulgimüeloom (plasmakomüeloom)	Luuüdist eraldatud CD138 positiivsed rakud	Prognostilised markerid, teostakse paneelina Esimeses etapis: • IGH break • t(4;14) IGH::FGFR3 • t(11;14) CCND1::IGH • t(14;16) IGH::MAF • del(17p13.1) TP53 • del(1p32) CDKN2C/ ampl (1p21) CKS1B • 5., 9. ja 15. kromosoomi arvu määramine Vajadusel teises etapis: • t(6;14) IGH::CCND3 • t(14;20) IGH::MAFB

sellele projektile saime haigla juhatuselt heakskiidu ja hakkasime seda meetodikat rakendama.

Sellega algas 2015. aastal patoloogiakeskuse molekulaarsete uuringute teine etapp. Võtsime kasutusele reaal-

aja PCR testid: EGFR geenis mutatsioonide tuvastamiseks mitteväikerakk-kopsuvähi puhul, BRAF geenis mutatsioonide tuvastamiseks melanoomi puhul ja KRAS ja NRAS geenides mutatsioonide tuvastamiseks kolorektaalvähi puhul.

Kuna patoloogiakeskuses puudusid nõuetekohased ruumid, alustasime reaalaja PCR analüüsidega PERH-i laboratooriumi pinnal, kus olid just hiljuti valminud moodsad molekulaardiagnostikale sobivad laboriruumid ja lahked kolleegid lubasid neid ühiselt kasutada.

Töömahtude suurenemise tõttu asus 2016. aastal molekulaarpatoloogia laborisse osakoormusega tööle bioanalüütik Annika Peterson ja aasta hiljem



Algusest peale on olnud oluline molekulaarpatoloogia valdkonda tutvustada ka patoloogidele ning kliinilisele osapoolale, selleks oleme pidanud mitmeid tutvustavaid loenguid molekulaarsete meetodite ja nende rakendamise kohta.



loodi teine laborispetsialisti ametikoht (praegu töötab sel ametikohal Evelin Anion), sellest ajast oleme töötanud kolmeliikmelise meeskonnana.

Alates 2019. aastast on kasutusel täisautomaatne reaala PCR süsteem, mis ei nõua laboriruumidelt eritingimusi ja see paikneb patoloogiakeskuses. Uue süsteemiga seoses oleme laiendanud ka pakutavate analüüside valikut (vt tabel 2).

Kvaliteedi edukäik

Laboriuuringute kvaliteedi üheks näitajaks on välistes kvaliteedikontrollides osalemine. Oleme neis molekulaarpatoloogia meetoditega pidevalt ja edukalt osalenud, alates 2010. aastast FISH meetodiga ja alates 2016. aastast reaala PCR meetodiga.

Ka infosüsteemidel on oluline roll laboriuuringute kvaliteedi tagamisel. Patoloogiakeskuses kasutusel olevat infosüsteemi (PIS-patoloogia infosüsteem) kasutame FISH uuringu vastuste edastamiseks alates 2014. aastast. Kolm aasta hiljem arendati PIS-is välja ka molekulaarpatoloogiliste uuringute osa detailsemalt, mis võimaldas molekulaarpatoloogiliste uuringute elektroonset tellimist, laboritöö toimingute märkimist ja vastuste vormistamist.

Kvaliteedialane töö sai suurema hoo sisse, kui Keiu Soorm alustas patoloogiakeskuses tööd kvaliteedijuhina 2016. aastal. Tema eestvedamisel ehitati üles meditsiinilaborile kehtestatud kvaliteedi- ja kompetentsinõuetele vastav kvaliteedisüsteem.

Nõuetele vastava süsteemi üles ehitamine ei olnud lihtne töö, alustasime

pikast loetelust, kuhu panime kirja kõik hetkel aktuaalsed koostamist vajavad dokumendid, nimekiri sai heidutavalt pikk.

Nõuete kohast vormistamist vajaksid meetodikate juhendid, seadmete juhendid ja toimikud, valideerimis- ja verifitseerimisaruanded, tööprotsesside dokumenteerimine jne. Tolleaegne laboratooriumi kvaliteedijuht Ave Lel-lep aitas seda protsessi ohjata ja oli oma kogemusega toeks.



Teaduse areng uute seoste leidmisel molekulaarsete muutuste ja haiguste vahel ning uute sihtmärkravimite kasutuselevõtt tingib kasutusel olevate meetodikate pideva arendamise ja analüüside menüü laiendamise ning uute meetodikate rakendamise vajaduse.

2019. aastaks olid dokumentatsioon ja tööprotsessid viidud vastavusse rahvusvahelise standardiga ja Eesti Akrediteerimiskeskuse esmahindamise tulemusena õnnestus patoloogiakeskuses saada akrediteerimistunnistus, kus oli kirjas: „... vastab EVS-EN ISO 15189:2012 nõuetele kui meditsiinilabor histopatoloogia, tsütopatoloogia, hematopatoloogia, molekulaarpatoloogia valdkonnas”. Alates sellest ajast oleme patoloogiakes-

kuses töötanud järjepidevalt vastavalt nõuetele.

Molekulaarpatoloogia uuringumaterjalid: FFPE ja ctDNA

Molekulaarpatoloogias enim kasutatav uuringumaterjal on formaliinis fikseeritud parafiini sisestatud (FFPE *formalin fixed paraffin embedded*) kude või rakud ehk patoloogialabori kõnepruugis lihtsalt koe-, tsüto- või

parafiinplokk. FFPE materjal erineb tavapärasest laborimeditiinis kasutatavast uuringumaterjalist mitmel põhjustel: sisaldab parafiini, formaliinis fikseerimine tekitab muutusi DNA-s ja materjal on heterogeenne.

Molekulaarpatoloogiliste analüüside puhul tuleb FFPE materjali eripära arvesse võtta: materjalid vajavad depa-rafineerimist; tuleb arvestada fikseerimisest tingitud DNA muutuste ja fragmentatsiooniga; materjali valikul on oluline arvestada kasvajakude hulka ja osakaalu; mikrotomeeritud koelõikude puhul on oluline arvestada, et rakutuomad ei ole terviklikud.

Kui FFPE materjal ei ole kättesaadav, siis kasutame nn vedelbiopsiat (*liquid biopsy*) ehk vereplasmas leiduvaid kasvajakude lagunemisel tekkinud DNA fragmente (*ctDNA circulating tumour DNA*) EGFR geenis mutatsioonide määramiseks (vt tabel 2).

Tabel 2. Reaala PCR analüüsid sihtmärkravi määramiseks.

Diagnoos	Materjal	Geenid/aberratsioonid
Mitteväikerakk-kopsuvähk	vereplasma	ctEGFR (<i>circulating tumour</i> EGFR)
Mitteväikerakk-kopsuvähk	FFPE	EGFR, KRAS, GeneFusion-test (ALK-, ROS1-, RET- ja MET-geeni 14 eksoni vahelejätmise)
Kolorektaalvähk	FFPE	KRAS, NRAS, BRAF, MSI (MSI staatus (MSI-H) võib viidata ka Lynch sündroomile)
Melanoom	FFPE	BRAF

Koostöö on oluline

Algusest peale on olnud oluline molekulaarpatoloogia valdkonda tutvustada ka patoloogidele ning kliinilisele osapolele, selleks oleme pidanud mitmeid tutvustavaid loenguid molekulaarsete meetodite ja nende rakendamise kohta. Mul on hea meel, et mind kui laborispetsialisti molekulaarpatoloogia alal on kaasatud mitmete interdistsiplinaarsete töörühmade töösse, kus oleme koostöös vastavalt vajadusele rakendanud uusi analüüse ja testimise algoritme. Koostöö onkoloogide ja patoloogidega on jätkuv, kuna uute molekulaarsetel muutustel põhinevate diagnostiliste klassifikatsioonide kasutuselevõtt ja lisanduvate sihtmärkravimite rakendamine vajab ka uute molekulaarsete markerite määramist.

Eelised molekulaarpatoloogia labori paiknemisest patoloogiakeskuses

Molekulaarpatoloogia uuringud viiakse läbi koostöös, kus lisaks laborispetsialistidele ja bioanalüütikutele annavad oma panuse ka patoloogid, sekretärid, meditsiinitehnika insenerid ning arhiivarid.

Koostöö patoloogidega on väga oluline, kuna patoloog valib kindlaksmääratud kriteeriumitele vastava FFPE materjali, mida saab kasutada edasiseks molekulaarpatoloogiliseks uuringuks.

Ühest kasvajamaterjalist valmistatakse üks kuni mitukümmend parafiinplokki ja preparaadi klaasi ning patoloog valib nende hulgas sobiliku materjali, lähtudes meetodikast: reaala PCR testide puhul peab see sisaldama piisavas koguses ja osakaalus kasvajakke, vajadusel märgistab makrodissektiooni teostamiseks vajaliku ala; FISH analüüside puhul tuleb märgistada spetsiifiline kasvajakoe ala preparaadi klaasil.

Samuti on oluline, et uuringumaterjal on patoloogiakeskuses kiiresti kättesaadav, seda ei ole vaja transportida ja parafiinplokist vajaliku materjali mikrotomeerimist on lihtne korraldada.

Lisaks võimaldab koostöö patoloogidega analüüside täpsustamist ja tulemuste korrelatsiooni jälgimist.



Koostöö onkoloogide ja patoloogidega on jätkuv, kuna uute molekulaarsetel muutustel põhinevate diagnostiliste klassifikatsioonide kasutuselevõtt ja lisanduvate sihtmärkravimite rakendamine vajab ka uute molekulaarsete markerite määramist.

PERH-i molekulaarpatoloogia analüüsid 2025. aastal

Praegu on molekulaarpatoloogias kasutusel kaks meetodikat: FISH ja reaala PCR. FISH analüüsides (vt tabel 1) tuvastame geneetilisi muutuseid sihtmärkravi määramiseks (HER2 FISH), diagnoosi täpsustamiseks erinevate lümfoomi ja sarkoomi alatüüpide puhul ning prognoosi hindamiseks hulgimüeloomi (ehk plasmarakk-müeloomi) puhul. Kokku on kasutusel 14 FISH analüüsi.

Reaala PCR testidega (vt tabel 2) tuvastame erinevate kasvajat (mitteväikerakk-kopsuvähk, kolorektaalvähk ja melanoom) puhul sihtmärkravi määramiseks vajalikke molekulaargeneetilisi muutuseid, kasutusel on seitse reaala PCR testi (ctEGFR, EGFR, KRAS, NRAS-BRAF, BRAF, MSI ja GeneFusion-paneel), mille abil saab määrata muutuseid kaheksas geenis (EGFR, KRAS, NRAS, BRAF, ALK, ROS1, RET ja MET geeni 14 eksoni vahelejätmise) ja mikrosatelliitide ebastabiilsust.

Reflex testing algoritmi kasutuselevõtt patoloogiakeskuses

Tavapraktikas on kasvajaspetsiifiliste mutatsioonide ehk prediktivsete markerite testimise tellijaks onkoloog, kes ootab histo- või tsütopatoloogilise uuringu vastuse ära ja tellib siis geneetilised testid, selline töökorraldus võib põhjustada viivitust sihtmärkraviga alustamisel.

Reflex testing algoritm tähendab kiiret reaktsiooni geneetiliste analüüside telli-

misel teatud diagnostiliste kriteeriumite alusel. Reflex testing on patoloogi algatatud geneetiline testimine, kus teatud vähivormide diagnoosimisel tellib patoloog multidistsiplinaarsetes töörühmades kokkulepitud kriteeriumite alusel kohe sihtmärkravi ennustavad geneetilised testid. Teostame need molekulaarpatoloogia laboris, saame analüüsid kiiresti tööses võtta, kuna ka uuringumaterjal on hõlpsalt kättesaadav.

Reflex testing algoritm hoiab kokku aega ja võimaldab kiiremini jõuda sihtmärkravi alustamiseni.

PERH-i paikmepõhistes multidistsiplinaarsetes töörühmades on kokku lepitud reflex testing algoritmi rakendamine järgmistel juhtudel:

- rinnavähi puhul, HER2 immuno-histokeemia 2+ tulemuse korral, mis on piiripealne tulemus, HER2 FISH analüüs, mis annab lõpliku tulemuse (alates 2019. aastast);
- kolorektaalvähi puhul: MSI-test (alates 2022. aastast);
- mitteväikerakk-kopsuvähi puhul: järjestikuselt testid EGFR, KRAS, GeneFusion (ALK, ROS1, RET geenifusioonid ja MET geeni 14 eksoni vahelejätmise) (alates 2023. aastast).

Vaade edasi

Teaduse areng uute seoste leidmisel molekulaarsete muutuste ja haiguste vahel ning uute sihtmärkravimite kasutuselevõtt tingib kasutusel olevate meetodikate pideva arendamise ja analüüside menüü laiendamise ning uute meetodikate rakendamise vajaduse.