

SLOVENSKO ZDRAVNIŠKO DRUŠTVO

KANCEROLOŠKO ZDRUŽENJE

ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA

in

ZVEZA SLOVENSKIH DRUŠTEV ZA BOJ PROTI RAKU

19. ONKOLOŠKI VIKEND

ZBORNİK

GENI IN RAK

Kulturni center Laško
Laško, 26. in 27. maj 2006

Generalni pokrovitelj prireditve



sanofi aventis

Ker je zdravje neprecenljivo

SLOVENSKO ZDRAVNIŠKO DRUŠTVO

KANCEROLOŠKO ZDRUŽENJE

ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA

in

ZVEZA SLOVENSKIH DRUŠTEV ZA BOJ PROTI RAKU

19. ONKOLOŠKI VIKEND

ZBORNİK

GENI IN RAK

Kulturni center Laško
Laško, 26. in 27. maj 2006

Generalni pokrovitelj prireditve



sanofi aventis

širimo zdravila in pomagamo živeti

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-006-036.8-083(082)

ONKOLOŠKI vikend (19 ; 2006 ; Laško)

Geni in rak : zbornik / 19. onkološki vikend, Laško, 26. in 27. maj 2006 ; [organizatorji] Slovensko zdravniško društvo, Kancerološko združenje [in] Onkološki inštitut Ljubljana in Zveza slovenskih društev za boj proti raku ; [uredniki J. Žgajnar ... et al.]. - Ljubljana : Kancerološko združenje Slovenskega zdravniškega društva : Onkološki inštitut : Zveza slovenskih društev za boj proti raku, 2006

ISBN 961-6377-17-5 (Zveza slovenskih društev za boj proti raku)

1. Gl. stv. nasl. 2. Žgajnar, Janez, 1963- 3. Slovensko zdravniško društvo. Kancerološko združenje 4. Onkološki inštitut (Ljubljana)
5. Zveza slovenskih društev za boj proti raku
226586112

VSEBINA

| | |
|--|----|
| GENI IN RAK - NEKATERE ETIČNE DILEME Jože Trontelj | 5 |
| KARCINOGENEZA - NASTANEK RAKASTIH CELIC Srdjan Novaković | 11 |
| KAJ JE POVZROČILA JEDRSKA NESREČA V ČERNOBILU Nikola Bešić | 16 |
| CITOGENETIKA V ONKOLOGIJI Nadja Kokalj Vokač | 20 |
| GENSKE MIKROMREŽE Radovan Komel | 28 |
| METODE IN TEHNIKE DOLOČANJA MUTACIJ V MOLEKULARNI ONKOLOGIJI Damjan Glavač | 31 |
| MUTATION ANALYSIS IN FAMILIAL BREAST CANCER PATIENTS Erik Teugeles, Jacques De Grève | 35 |
| ONKOLOŠKO GENETSKO SVETOVANJE Janez Žgajnar | 39 |
| DEDNI RAK DOJK IN JAJČNIKOV Janez Žgajnar, Mateja Krajc, Nikola Bešić, Marko Hočevar, Cvetka Bilban Jakopin, Katarina Lokar, Srdjan Novaković, Vida Stegel, Miljeva Rener, Aleš Vakselj | 42 |
| POTEK GENETSKEGA SVETOVANJA IN TESTIRANJA NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA Katarina Lokar, Janez Žgajnar, Mateja Krajc, Nikola Bešić, Marko Hočevar, Cvetka Bilban Jakopin, Srdjan Novaković, Vida Stegel, Miljeva Rener, Aleš Vakselj | 46 |
| GENETSKO SVETOVANJE IN TESTIRANJE PRI SLOVENSКИH DRUŽINAH Z RAKOM DOJK IN/ALI JAJČNIKOV Mateja Krajc, Janez Žgajnar, Nikola Bešić, Marko Hočevar, Cvetka Bilban Jakopin, Katarina Lokar, Srdjan Novaković, Vida Stegel, Miljeva Rener, Aleš Vakselj, Erik Teugeles, Jacques De Grève | 48 |

DOKAZOVANJE MUTACIJ V *BRCA1* GENU Z ANALIZO TALITVENE
KRIVULJE PCR PRODUKTOV

Srdjan Navaković, Vida Stegel, Mateja Krajc, Janez Žgajnar,
Nikola Bešić, Marko Hočevar, Cvetka Bilban Jakopin, Katarina Lokar . . . 59

DEDNI RAK ŠIROKEGA ČREVESA

Mateja Krajc, Janez Žgajnar, Nikola Bešić, Marko Hočevar,
Cvetka Bilban Jakopin, Katarina Lokar, Srdjan Novaković, Vida Stegel . . . 63

MIKROSATELITNA NESTABILNOST PRI KOLOREKTALNIH
KARCINOMIH

Metka Ravnik-Glavač 68

MEDULARNI RAK ŠČITNICE - DEDNA BOLEZEN

Damijan Bergant, Damjan Glavač 72

DEDNA OBLIKA MALIGNEGA MELANOMA

Barbara Perić, Magdalena Avbelj, Marko Hočevar 78

GENI IN NASTANEK MELANOMA

Barbara Perić, Magdalena Avbelj, Marko Hočevar 83

DRUGI PRISPEVKI UDELEŽENCEV

PREVALENCA MUTACIJE GENA *BRCA2* PRI MOŠKIH
Z RAKOM DOJKE V SLOVENIJI

Barbara Černivc, Nikola Bešić, Katarina Lokar, Mateja Krajc,
Srdjan Novaković, Cvetka Bilban Jakopin, Marko Hočevar,
Janez Žgajnar 85

ALI JE *BRCA 1-2* MUTACIJA PRI BOLNICAH Z DVOJNIM
PRIMARNIM RAKOM JAJČNIKOV IN DOJK VEDNO PRISOTNA?

Mirjam Cvelbar, Marjetka Uršič Vrščaj, Stelio Rakar 86

MOLEKULARNO BIOLOŠKE PREISKAVE
LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLEZNI Z UPORABO KLASIČNE
METODE PCR

Ira Koković, Rastko Golouh, Janez Jančar, Andreja Zidar,
Srdjan Novaković 89

GENI IN RAK – NEKATERE ETIČNE DILEME

Jože Trontelj

Klinični center Ljubljana

Povzetek

Razvoj znanosti na področju reproduktivne medicine in človeške genetike je omogočil ravnanja, ki utegnejo imeti daljnosežne posledice za posameznika, njegovo potomstvo in človeško družbo. Poleg pomembnih koristi pa novo znanje odpira tudi težavna etična vprašanja. Med temi so stigmatizacija in diskriminacija na račun genetske dediščine, zloraba genetskih podatkov pri zaposlovanju in v zavarovalništvu, genetsko presejanje, ki mu sledijo evgenični ukrepi, komercialna ponudba genetskega testiranja brez ustreznega svetovanja, vprašanja o ravnanju z arhiviranimi biološkimi vzorci. Prispevek se nekoliko podrobneje dotika dveh področij: predvsaditvenih in predrojstnih genskih preiskav ter prokreacije "terapevtskih" otrok za namene zdravljenja hudo bolnih otrok. Predvsaditvena in predrojstna diagnostika sta povezani z izločitvijo zarodkov, pogosto tudi zdravih, ki je lahko podobna nekdanji evgeniki. Pridobivanje "terapevtskih" otrok pa pomeni instrumentalizacijo človeškega življenja; nadaljnja usoda teh otrok je lahko vprašljiva.

Vse, kar biologija in medicina na področju človeške genetike danes zmoreta, ni in ne more biti sprejeto. Nekateri etični in zakonski standardi na področju človeške genetike že obstajajo, druge pričakujemo. Pomembno je, da jih dobimo ob pravem času – pozna uvedba le stežka spremeni že uveljavljeno prakso. Enako pomembno je tudi prizadevanje za čim večje mednarodno soglasje vsaj v najbolj načelnih vprašanjih.

Uvod

Znanost vse bolj odstira tudi dednost, prirojeno sposobnost živih bitij, da ohranjajo istovetnost vrste, ob hkratnem zagotavljanju raznolike, a edinstvene in neponovljive identitete posameznega bitja. Prav ta variabilnost posameznikov je eden od pogojev za razvoj novih dednih sposobnosti v tekmi za obstanek in s tem tudi za razvoj vrst. *Istovetnost, raznolikost in edinstvenost imajo v etiki status pomembnih vrednot.* Človek je te vrednote po eni strani spoštoval, po drugi pa tudi vedno izpodkopaval, na primer tako, da je z zavestno, včasih tudi nenamerno izbiro vplival na dedne lastnosti populacij rastlin in živali, pa tudi lastne vrste. Znanost mu je omogočila vse globlje

razumevanje zapletenih mehanizmov, v roke pa mu je dala tudi močna orodja in načine za posege vanje. Ob tem je razumljivo, da so se z vse večjo ostrino začela pojavljati stara in tudi nova etična vprašanja. Napovedi usodnih posledic, ki jih utegnejo imeti taki posegi za posameznika in za njegovo potomstvo, pa tudi za človeško družbo nasploh, so javnost zgrozile. Tako je prav na tem področju prišlo do etičnih razprav, konvencij in zakonov, ki so prvič v zgodovini znanosti prehiteli znanost samo, v tem, da so poskusili urejati ali propovedati ravnanja, ki niti teoretično še niso bila ali celo še danes niso možna. Taka je na primer prepoved kloniranja človeških bitij ali spreminjanja genoma človeških kličnih celic z namenom, da bi povzročili dedne spremembe potomcev.

Kje so etična vprašanja

Novo znanje, še bolj pa uporaba novih orodij na ljudeh prinašata dobrodošle koristi, odpirata pa tudi pomembna etična vprašanja. Med njimi so vsaj kratke omembe vredna na primer naslednja:

- Dedne pomanjkljivosti še vedno lahko stigmatizirajo in so lahko povod za diskriminacijo. Zlasti v nekaterih kulturah je genetska bolezen ali prizadetost v rodbini povezana s občutji sramu in krivde. Posebnost genetskega podatka je, da ni le zasebna stvar njegovega nosilca, ampak je obenem tudi skupna stvar rodbine. Ob tem pa so različni pogledi na pacientovo dolžnost, da razkrije svojo genetsko napako ostalim članom rodbine, za katere bi utegnil biti podatek o možnosti njihove lastne prizadetosti pomemben.
- Med sposobnostjo medicine diagnosticirati gensko napako in njeno možnostjo, da stori nekaj terapevtsko ali profilaktično učinkovitega, zeva vse širša vrzel. Pacienta večkrat obremenimo s slabo novico, ne da bi mu lahko bistveno pomagali. Nekateri etiki svarijo: moderni trendi resda stavijo na iskrenost in odprtost, na zrelost ljudi in njihovo pravico, da so o vsem obveščeni. A iskrenost in odprtost sta lahko vprašljivi, kadar pacientu ni mogoče pomagati. Genetsko testiranje mladoletnih oseb za boleznijo poznejšega nastanka po stališču Usmerjevalnega odbora za bioetiko Sveta Evrope pred polnoletnostjo ni dovoljeno, če za bolezen ni na razpolago niti učinkovita preventiva ne terapija.
- Pri večini dedno pogojenih boleznijo gre za posledico skupnega delovanja gena ali več genov z dejavniki okolja. Napoved prihodnje boleznijo kakor tudi profilaksa sta zgolj po ugotovitvi enega gena negotovi, s tem pa je negotovost tudi razmerje med stroškom (v širšem smislu, predvsem za bolnika) in učinkom. Etičnost profilaktičnih posegov je tedaj težko ocenljiva.
- Ponudbi predvsaditvene ali predrojstne genske diagnoze sta povezani z uničenjem neuporabljenih zarodkov oziroma s splavom kot opcijo v primeru genske napake – to pa je za mnoge etično težko sprejemljivo.
- Arhivi bioptičnih vzorcev vsebujejo vsegostvo potencialnega novega znanja. Njihova uporaba pa ni povsem neproblematična. Eno od vprašanj je, ali si je treba pridobiti privolitev oseb, od katerih izvirajo. Odgovor ni vedno enak.

- Farmakogenomika odpira nove možnosti individualno ukrojene terapije. A celo farmakogenomika ni brez etičnih vprašanj (problemi zaupnosti osebnih genetskih podatkov, možnost diskriminacije uporabe, ki si jo bodo lahko privoščili veliki proizvajalci zdravil).
- Otroci “rešitelji”: ali so moralno neoporečen pojav ali pomenijo nevarno zlorabo? O tem več v nadaljevanju.
- Genetsko presejanje: kako doseči ravnotežje med paternalističnim načelom dolžne skrbi na eni strani in osebno svobodo ter avtonomnostjo posameznika na drugi. Državni programi izkoreninjanja dednih bolezni so po današnjih gledanjih etično vprašljivi ali celo nesprejemljivi.
- Neposredna komercialna ponudba genetskih testov uporabnikom je etično sporna. Testiranje brez genetskega svetovanja ni primerno. Oviedska konvencija in protokol o človeški genetiki v osnutku ga celo zahtevata že pred odločitvijo za test; v primeru pomembnih posledic, zlasti za druge člane rodbine in za načrtovanje družine pa je treba svetovanje zagotoviti tudi po opravljenem testu, da bi pacientu pomagali primerno se odzvati na rezultate testa. Pri tem se je treba posebej ozirati na psihološko stanje in socialni položaj prizadete osebe. Pred odločitvijo za testiranje so potrebna dovolj izčrpna pojasnila o namenu, naravi in nevarnostih posega ter o njegovih posledicah, tudi za morebitne odločitve o rojstvu otrok, o pomenu za druge rodbinske člane. Pojasnila morajo biti podana na razumljiv in nesugestiven način.

Kaj lahko stori medicina danes na podlagi novega genetskega znanja – in kaj od tega je lahko etično sporno? V tem prispevku se lahko dotaknem le enega ali dveh od teh vprašanj. Na našem srečanju bo tekla beseda o rakah, ki sodijo v skupino z močno gensko etiološko komponento, kar tudi polje etične razprave nekoliko zoži.

O predvsaditveni in predrojstni genski diagnostiki

Junija 2001 je veliko pozornosti zbudilo poročilo iz Chicaga, da so zdravniki iz tamkajšnjega Inštituta za reproduktivno genetiko pomagali preprečiti prenos na potomstvo gen za Li-Fraumenijev sindrom, dedno nagnjenost k več vrstam raka zaradi mutacije gena P53. Zdrav otrok se je rodil po zunajtelesnem spočetju, izbran s pomočjo predvsaditvene (predimplantacijske) genske diagnoze izmed 18 zarodkov *in vitro*. Enajst zarodkov je nosilo gen z napako, ki so ga dobili od očeta, 7 ga ni imelo. Dva so vnesli v maternico, en otrok se je rodil. Poročilo ne omenja, kaj se je zgodilo z ostalimi 16 zarodki. Poleg navdušenja je poročilo zbudilo tudi etične dvome in vprašanje: ali ne gre za evgeniko nove vrste? Kritiki so spomnili: evgenika v ZDA ni nekaj prvič videne-ga. Evgenične sterilizacije duševno manj razvitih so bile v ZDA znane od začetka prejšnjega stoletja: leta 1907 je bilo primerov te vrste 3000, leta 1937 pa že več kot 21.000. Zdaj imamo nov način preprečevanja rojstev otrok, ki si jih družina in družba ne želita.

Predvsaditena genska diagnostika nekaterim ni sprejemljiva. Danes nimamo soglasja o moralnem statusu človeškega zarodka. Nekaterim je zlasti zarodek in vitro le *potencialno* človeško bitje, s katerim je mogoče svobodo razpolagati kot s koščkom človeškega tkiva. Drugi mu priznavajo dostojanstvo in pravico do življenja, enako kot jo ima že rojen otrok. Tem seveda ni sprejemljivo dejstvo, da je v postopku treba žrtvovati ne samo življenja zarodkov z gensko napako, ampak tudi življenja neprizadetih nadštevilih zarodkov. Potem pogosto tudi ni absolutno gotovosti, da bo mutirani gen res povzročil bolezen, in če jo bo, kako huda bo.

Pred meseci je HFEA (Human Fertility and Embryology Authority) med britanskimi državljani opravila anketno študijo o pogledih na predvsaditveno diagnostiko. Tu je tudi vprašanje o sprejemljivosti razširjenih indikacij, n.pr. za genske mutacije z manjšo penetranco, n.pr. za raka dojke, jajčnika, debelega črevesa, pa tudi za motnje intelektualnega razvoja. Objava rezultatov je napovedana za to pomlad. Nihče ne more zanikati, da so vsaj nekatere od omenjenih bolezni zelo hude in se je morda težko zanašati na pogoste preventivne preglede in zgodnjo diagnozo glede na znani genetski status. Po drugi strani pa bodo v postopku nedvomno izločeni in uničeni tudi zarodki z dobrim potencialom za razvoj v ljudi, ki bi se veselili svojega življenja in bi bili dragoceni člani družine in družbe. Med temi so gotovo zarodki, ki nikoli ne bi zboleli za boleznijo, zaradi katere jim je odvzeta pravica do življenja. Zagovorniki predvsaditvene genske diagnostike zarodkom sicer ne odrekujejo spoštovanja, ki gre človeškemu življenju. A težko je izpodbijati kritiko, da spoštovanje dostojanstva človeškega zarodka pomeni več kot samo vztrajanje pri tem, da bo usmritev opravljena za dovolj pomemben cilj.

Za žensko, za njenega partnerja in včasih tudi družino pa je še bolj travmatska predrojstna diagnoza genetske bolezni in posledični splav. Občutja krivde, pa če so še tako iracionalna, so tu še močnejša in lahko trajajo vse življenje. Priznati pa je treba, da imajo včasih podlago v medicinskih dejstvih, ki so za posamezni primer sicer nepreverljiva, v statističnem vzorcu pa veljajo: nekateri od teh splavov iz medicinskih indikacij so tudi po medicinskih merilih nepotrebni.

Pri vprašanih te vrste je treba vedno imeti pred očmi pojav, ki bi mu moderno lahko rekli *kolateralna škoda*. Medicina v zadnjem času veliko pozornosti posveča avtonomiji bolnika in prednosti njegove individualne koristi. Tako se pogosto premalo sprašuje po širšem pomenu svojih ravnanj: kaj to ali ono pomeni za spoštovanje človekovega dostojanstva *nasploh*, za odnos do človeškega življenja *kot vrednote*. To se utegne kmalu poznati na našem odnosu do najšibkejših, na našem ravnanju z ljudmi na obrobju družbe, posebno z bolniki, invalidi, hudo bolnimi, revnimi, dementnimi, umirajočimi. A dovolj bo, če pomislimo na otroke, ki se bodo rodili z gensko napako, kljub morebitni ponudbi od države plačanega programa predvsaditvene (ali predrojstne) diagnostike. Tak otrok in vsa družina utegneta biti stigmatizirana, ker je prišlo do rojstva, ki ga ne bi smelo biti (*»wrongful life«*).

Otroci spočeti in rojeni kot sredstvo za zdravljenje

Napredek transplantacijske medicine je sprožil nove pritiske in težke moralne dileme v nekaterih nesrečnih družinah. Gre za poskuse, da bi hudo bolnemu otroku z gensko okvaro rešili življenje z ustrezno presaditvijo celic, tkiva ali organa idealno sorodnega bratca ali sestrice, spočetega oz. spočete nalašč v ta namen. To seveda pomeni zunajtelesno oploditev, zagotovitev večjega števila zarodkov in skrbno izbiro tkivno najsorodnejšega za vnos v telo matere. Če se postopek posreči, dobi družina novega člana, tako imenovanega terapevtskega otroka, rešilnega bratca ali sestrico, otroka za rezervne dele. Popkovnična kri kot vir matičnih celic ni problematična; nekoliko bolj je kostni mozeg, posebno če so potrebni ponavljajoči se odvzemi, kar pa je pravilo; še bolj problematičen je odvzem ledvice.

BBC News je 31. januarja letos poročal o 2-letnem otroku Jamieju Whitakerju, ki je rešil življenje zdaj 5-letnemu bratcu Charlieju z redko Diamond-Blackfa-novo anemijo, zdravljivo le z matičnimi celicami sorodnega dajalca.

Komisija za človeško genetiko (Human Genetics Commission, HGC) je v poročilu opozorila, da je treba raziskati, kako je z blaginjo otrok, rojenih v ta namen, ni pa za kako ostrejšo ukrepanje: *“Težko bi bilo prepovedati staršem, da bi spravili na svet še otroka-rešitelja, če imajo otroka s smrtno nevarno boleznijo.”* Vendar se HGC zavzema za raziskavo, ki bi zajela vse otroke, rojene po predvsaditveni genetski diagnozi. Predvsaditvena genska diagnostika naj pri OBMP ne bi postala nekakšna obvezna rutina! Kot je menila baronica Helena Kennedy, predsednica HGC: *“Najti moramo ravnotežje med pravico do samoodločanja parov o rojstvu otrok, pravico otrok do blaginje in širšimi interesi družbe.”*

Toda Josephine Quintavalle, direktorica CORE (Comment on Reproductive Ethics), meni drugače: *“Prav tega smo se bali. A na to bi morali misliti, preden smo otroke porabili kot budre v družbenem eksperimentu. Teško si zamislimo, kako je otrokom, rojenim v teh okoliščinah, in kaj lahko pričakujejo v prihodnosti.”*

Ne gre pa samo za etično spornost na ravni posameznega primera. Tu je morda kdaj niti ni, novi otrok je lahko enako ljubljen kot prejšnji, družina je rešena hude stiske. Škodo bi občutila družba, če bi se polagoma taka praksa razširila še na manj dramatične primere: to bi pomenilo, da je instrumentalizacija, popredmetenje človeškega življenja sprejemljivo. To pa bi lahko imelo daljnosežne učinke na količino dostojanstva, ki ga bi bila družba še pripravljena priznati človeškemu bitju in človeškemu življenju.

Sklepna misel

Že ta bežni opis dveh zgledov kaže, kako se z napredkom medicinskih znanosti in tehnologij zastavljajo nova etična vprašanja. Potrebna bo primer-na občutljivost in modrost, pa tudi učinkovita zdravstvena politika, da ne bomo zabredli v ravnanja, ki bodo prinesla več slabega kot dobrega. Politika

pa bo morala priti s svojimi rešitvami ob pravem času. Ko se je kako ravnanje že uveljavilo v praksi, ga je težko spremeniti. Med državami, ki imajo gensko tehnologijo in znanost so gledanja na nekatera etična vprašanja zelo različna: tak je primer moralnega statusa človeškega zarodka. Kljub temu se je treba potruditi za čim večje mednarodno soglasje in skupne etične standarde. Tudi ta dragocena prizadevanja bolj ali manj uspešno tečejo v več uglednih mednarodnih organizacijah in forumih.

Viri in literatura

1. Additional Protocol to the Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine, on the prohibition of cloning human beings. Ets N°: 168.
2. Additional Protocol to the Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine, concerning transplantation of organs and tissues of human origin. ETS N°: 186, Strasbourg, 2001.
3. Concern over žspare part' babies, <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health46633396.stm>, 31. Jan. 2006.
4. Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being With Regard to the Application of Biology and Medicine. Council of Europe Treaty Series, No. 164. Oviedo: Council of Europe, 1997: 1-12.
5. Kilner JF, Mitchel CB. Challenges for the future of genetic medicine. The Center for Bioethics and Human Dignity, April 23, 2004. <http://www.cbhd.org/resources>.
6. Review of of the human fertilisation and embryology act : a public consultation. Department of Health 2005. <http://www.catholicdoctors.org.uk>.
7. The protection of human embryo in vitro. Report by the Working Party on the Protection of the Human Embryo and Fetus (CDBI-CO-GT3). Steering Committee on Bioethics (CDBI). CDBI-CO-GT3 (2003) 13, Strasbourg, 2003.
8. Trontelj J. O etični ceni »terapevtskega« kloniranja človeka. *Isis* 2002; 11 (1): 44-6.
9. Trontelj J, Balažič J. O posegih v truplo, ki niso del rutinske obdukcije, in o ravnanju z biološkim materialom človeškega izvora. *Isis* 2004; 13 (5): 33-5.
10. Working document on the applications of genetics for health purposes. CDBI/INF (2003) 3, Council of Europe, Strasbourg, 2003.

KARCINOGENEZA – NASTANEK RAKASTIH CELIC

Srdjan Novaković

Onkološki inštitut Ljubljana

Povzetek

Rakasta pretvorba celice je odvisna od skupnega delovanja mutagenih snovi – iniciatorjev in nemutagenih snovi – promotorjev. Skupaj prizadenejo ekspresijo genov (še posebej je pomembna ekspresija regulatornih genov), stimulirajo celično proliferacijo in spodbujajo delitev tistih celic, ki imajo poškodovano DNA. Med bolj znanimi snovmi, ki povzročajo nastanek raka, so karcinogeni dejavniki kemičnega izvora, razni virusi in različne vrste sevanja, kot so UV svetloba in ionizirajoče sevanje. V nastanek raka sta vpleteni predvsem dve skupini genov in sicer protoonkogeni in tumorski supresorski geni. Prvi so med procesom karcinogeneze spodbujeni k čimvečji ekspresiji, medtem ko so drugi spremenjeni na takšen način, da je njihova ekspresija zmanjšana ali da je njihov produkt funkcionalno neaktiven. Na sam proces karcinogeneze vplivajo tudi drugi dejavniki, ki ne povzročajo sprememb v nukleotidnem zaporedju DNA in jih imenujemo epigenetski dejavniki.

Uvod

Prve korake k razumevanju karcinogeneze predstavljajo opažanja kirurga Percivala Potta iz sredine 18. stoletja. Opisal je povezavo med številom bolnikov z rakom skrotuma in kronično izpostavljenostjo sajam pri dimnikarjih. Na potrditev tovrstnih povezav smo morali čakati do 50-ih let prejšnjega stoletja, ko so profesionalno izpostavljenost delavcev v tekstilni in usnjarski industriji, ter proizvodnji različnih barvil in gume, povezali s povečanim številom obolelih za rakom mehurja. Vzroke za nastanek tega raka so pripisali aromatičnim spojinam – aminom, ki so jih s pridom uporabljali v omenjenih industrijskih panogah brez kakršnekoli zaščite.

Danes, več kot 50 let po teh odkritjih, še vedno ne poznamo vseh podrobnosti, ki bi razkrivale natančen potek procesa nastanka raka. Najnovejše študije s tega področja so nedvoumno potrdile obstoj na stotine dejavnikov, ki s svojim delovanjem lahko preusmerijo normalno celico na pot rakaste pretvorbe. Vse te dejavnike, ki so sposobni izzvati nastanek rakaste celice, imenujemo karcinogeni dejavniki. Proces, v katerem se normalna celica preoblikuje v rakasto, pa imenujemo karcinogeneza ali onkogeneza.

Karcinogeneza kot večstopenjski proces

Sam proces karcinogeneze je dolgotrajen in zapleten. Na splošno govorimo o treh osnovnih stopnjah, ki vključujejo vrsto različnih podstopenj: **i) iniciacija, ii) promocija in iii) progresija**. Ob predpostavki, da tumor nastaja iz ene same spremenjene celice, je jasno, da je prvi pogoj za kopičenje in izražanje nastalih sprememb v celici njihovo dedovanje v naslednjih generacijah celic. Ob tem zapletenem procesu govorimo o dvojni vlogi karcinogenih dejavnikov. Prva vrsta karcinogenih dejavnikov deluje kot mutageni impulz in neposredno spremeni celični genetski zapis. S tem povzroči mutacije, ki se prenašajo na naslednje generacije celic. Druga vrsta karcinogenih dejavnikov vpliva na vzorce izražanja cele vrste genov, ki spremenijo izražanje nekaterih kritičnih genov (ter nastanek in delovanje njihovih produktov) brez neposrednega vpliva na DNA zaporedje. Ta način delovanja imenujemo epigenetsko delovanje. Prav tako pri epigenetskih spremembah kot pri genetskih spremembah je potrebno, da se novi vzorec »vtisne v na novo zasnovan celični spomin« in se kot tak prenese v naslednje generacije celic.

Da bi celica »zaživela« kot rakasta celica, mora torej nakopičiti celo vrsto sprememb in si pridobiti lastnosti, ki jo naredijo relativno neodvisno od ustaljenih mehanizmov v normalnih celicah. Ker so ti mehanizmi odvisni od vrste celice oz. tkiva, iz katerega celica izhaja, so kombinacije sprememb oz. lastnosti, ki jih rakasta celica mora pridobiti, različne za različne vrste raka. Na splošno lahko strnemo vse te lastnosti rakastih celic v nekaj kategorij. **1) Samozadostnost za lastno proliferacijo**. To pomeni, da so vsi (ali vsaj večina) potrebni signali za podvojevanje regulirani znotraj same celice neodvisno od okolja in signalov iz okolja. **2) Neodzivnost na signale, ki uravnavajo število celičnih delitev**. Vsaka celica ima v svojem »spominu« vgrajeno določeno število celičnih delitev. To število je skrbno uravnavano preko različnih mehanizmov, ki se aktivirajo z diferenciacijo in s »staranjem« celice. Rakasta celica se preprosto izogne delovanju teh mehanizmov in se nekontrolirano deli. **3) Neodzivnost na signale, ki sprožajo apoptozo**. Ob hujših napakah na celični DNA se v normalni celici sprožijo popraviljalni mehanizmi, ki bodisi napako popravijo, bodisi celico - ob večjih napakah preusmerijo v programirano celično smrt - apoptozo. Celica mora na svoji poti maligne transformacije postati neodzivna na te mehanizme, da bi omogočila prenos mutacije in njeno izražanje v hčerinskih celicah. S tem si rakasta celica pridobi še eno pomembno lastnost in to je **4) Genetska nestabilnost**. To pomeni, da so rakaste celice mnogo bolj dojemljive za razne spremembe, kar jim omogoča hitrejšo in boljše prilagajanje na vplive iz okolja. **5) Preureditev tvorbe citokinov in izražanja celičnih antigenov**. S prilagoditvijo tvorbe citokinov in izražanjem antigenov si celica zagotovi dve stvari hkrati: slabšo prepoznavnost za imunski sistem in s tem imunsko neodzivnost, ter neposredno delovanje na celice v okolju. Pomembna je njihova produkcija angiogenih dejavnikov, ki omogočajo neovaskularizacijo tumorskega tkiva. **6) Zmožnost prehoda rakastih celic v limfni in krvni obtok**. Razvoj ožilja v

tumorju omogoča tudi razširitev bolezni v oddaljene organe – metastaziranje.

7) Pritrditev v drugih organih in ponovna klonalna rast.

Glede na procese, ki so vpleteni v nastanek raka in na čas potreben, da se vsi dogodki zgodijo, se je dolgo časa govorilo o raku kot o bolezni starostnikov. Danes o raku ne govorimo samo kot o bolezni starostnikov, pač pa kot o genski bolezni, ki se izraža na dva različna načina. To sta - kot posledica somatskih mutacij - **sporadični rak** ali kot posledica mutacij v spolnih celicah - **dedni rak**. Ob upoštevanju kompleksnosti nastanka rakaste celice ter števila potrebnih dogodkov, da si celica zagotovi vse spremembe in uspešno konča pot maligne preobrazbe, je jasno, da preko spolnih celic podedovane mutacije, ki destabilizirajo genom, močno skrajšajo sam proces nastanka raka. Zato je za vse dedne rake značilno, da nastanejo mnogo prej kot sporadični primeri in da so osebe prizadetih družin mnogo bolj ogrožene za različne vrste raka.

Karcinogeni dejavniki

V grobem ločimo karcinogene dejavnike na fizikalne, kemične in biološke. Skupna lastnost vseh ne glede na izvor je, da spremenijo celično DNA. Spremenijo jo bodisi tako, da izzovejo mutacije – mutageni dejavniki, ali da spremenijo izražanje genov brez poseganja v strukturo DNA – epigenetski dejavniki.

Epigenetski dejavniki se izražajo predvsem tako, da celico vzpodbujajo in jo konstantno silijo v ekspresijo določenih genov. Med karcinogenezo se spremeni metilacija protoonkogenov, tumorskih supresorskih genov ter genov, ki so odgovorni za DNA popravilne mehanizme v celici. Hipermetilirajo in s tem utišajo se tumorski supresorski geni ter geni odgovorni za popravljanje nastalih napak na DNA. Hipometilirajo in s tem aktivirajo pa se protoonkogeni in geni odgovorni za tumorsko metastaziranje. Sam proces metilacije naj bi bil tudi neposredno povezan z nastankom mutacij. Tako naj bi hipermetilacija predpogojevala nastanek točkovnih mutacij, mutacij zaradi spremembe bralnega okvirja, mutacij z drugim pomenom in delecij. Vse našete mutacije pripeljejo do izgube funkcije genov. Nasprotno pa naj bi bila hipometilacija možen vzrok za kromosomske mutacije (preureditve in aneuploidijo), ki potencirajo izražanje ponovljenih genov.

Fizikalni karcinogeni dejavniki delujejo na strukturo DNA z različnimi visokoenergetskimi delci. Pri tem lahko neposredno poškodujejo celično DNA ter povzročijo mutacije ali pa le-te sprožijo z delovanjem prostih radikalov, ki so nastali po obsevanju. Vsaka vrsta sevanja je lahko potencialno nevarna za strukturo DNA, vendar med bolj raziskane prištevamo UV svetlobo in ionizirajoče sevanje.

Kemični karcinogeni dejavniki delujejo na dva načina: **i)** tako, da z vezavo na nukleotide v DNA destabilizirajo vezi med komplementarnimi nukleotidi ali **ii)** kot dejavniki, ki se vežejo med nukleotidi in povzročijo napake pri podvoje-

vanju DNA. Med pomembnejše karcinogene dejavnike prištevamo aflatoksine, heterociklične aromatske amine, benzopirene, *N*-nitrozamine, katrane in akrilamid.

Med biološke karcinogene dejavnike prištevamo predvsem razne viruse. Na celično DNA delujejo na dva načina: **i**) neposredno povzročijo mutacije ob svojem pomnoževanju ali **ii**) posredno s svojimi promotorji vplivajo na izražanje določenih genov. Med pomembnejše viruse, za katere obstajajo dokazi o karcinogenem delovanju, spadajo virus hepatitisa B (hepatocelularni karcinom), Epstein Barrov virus (Burkittov limfom, nazofaringealni karcinom), humani T limfocitotropni virus 1 (HTLV-1 – T celična levkemija/limfom odraslih) ter virus humane imunske pomanjkljivosti (HIV – Kaposijev sarkom).

Protoonkogeni in tumorski supresorski geni

Gene, ki so neposredno vpleteni v nastanek karcinogeneze, lahko v grobem razdelimo na skupino, ki je odgovorna za celično delitev ter podvojevanje DNA in skupino, ki je odgovorna za preverjanje podvojene DNA ter nadzor celičnega ciklusa. Med prve prištevamo protoonkogene, ki spadajo med t.i. zgodnje celične gene, med druge pa tumorske supresorske gene.

Onkogeni, ki so pravzaprav spremenjeni protoonkogeni, vključujejo gene, ki kodirajo za različne rastne faktorje, receptorje ali signalne prenašalce in jedrne transkripcijske faktorje. V to skupino uvrščamo več kot 100 različnih genov. Med procesom maligne transformacije se ponavadi spremenijo v promotorskih regijah, kar ima za posledico nekontrolirano prepisovanje in nastajanje produkta. Na njihovo stopnjo izražanja poleg mutacij odločilno vpliva stopnja metilacije. Med onkogene s pomembnim vplivom na nastanek raka uvrščamo skupini *ras* in *myc* onkogenov. Proteini, ki jih kodirajo *ras* onkogeni, so na celičnih membranah in so soudeleženi pri prenosu signalov tako za rastne faktorje kot za mitogene dejavnike. Za razliko od proteinov, ki jih kodira *ras*, so proteini, ki jih kodira *myc*, jedrni fosfoproteini (*c-myc*, *N-myc* in *L-myc*). Ti proteini so pomembni transkripcijski faktorji za različne gene.

Za razliko od protoonkogenov, ki se med karcinogenezo prekomerno izražajo, so tumorski supresorski geni neaktivni. Inaktivirajo se na dva načina: tako, da je prisotna mutacija v delu, ki kodira strukturne proteine ali tako, da je regulatorna regija hipermetilirana. V obeh primerih je rezultat enak – odsotnost aktivnega proteina, ki bi kontroliral celični ciklus in preverjal pravilnost podvojene DNA. V prvem primeru je vzrok neaktiven mutiran protein in v drugem blokirana transkripcija gena. Zanimivo je, da se ta dva mehanizma pri tumorskih supresorskih genih velikokrat dopolnjujeta. Tako je pri tistih osebah, ki so podedovale mutacijo v enem alelu tumorskih supresorskih genov, najpogostejši razlog za neaktivnost drugega alela prav hipermetilacija. Težko je reči, kateri od tumorskih supresorskih genov je najpomembnejši, kajti vsi so pomembni. Zato se bom omejil le na tiste, ki so najbolj znani in raziskani. Retinoblastomski gen – *Rb* so prvič opisali na začetku 90-ih let in predstavlja prototip tumorskega supresorskega gena. Neaktivnost tega gena ima za

posledico nekontrolirano celično delitev (natančneje prehod v S fazo celičnega ciklusa). *p53* nosi tudi ime »varuh genoma« in ima verjetno najbolj pomembno funkcijo med vsemi tumorskimi supresorskimi geni. Za razliko od *Rb*, ki so ga dokazali mutiranega v glavnem pri retinoblastomu, je mutiran *p53* povezan z nastankom vsaj polovice znanih malignih bolezni. Tudi vloga *p53* je nekoliko drugačna od vloge *Rb*. Medtem ko predstavlja *Rb* predvsem kontrolni gen za celično delitev, je *p53* nekakšna zasilna zavora, ki deluje tako na regulacijo celičnega ciklusa kot tudi na aktivacijo apoptoze v primeru, da popravilni mehanizmi niso uspešno opravili svoje naloge. Poleg *Rb* in *p53* velja omeniti vsaj še *BRCA1* in *BRCA2* kot tumorska supresorska gena povezana z dednim rakom dojke, ter *APC* in *DCC* pri karcinomih širokega črevesa.

Zaključek

Karcinogeneza je kompleksen proces, med katerim mora priti do radikalnih sprememb na celični DNA. Pri tem je pomembno, da spremembe nastanejo tako na protoonkogenih kot tudi na tumorskih supresorskih genih. Vse nastale spremembe morajo biti ireverzibilne in se morajo kot take prenesti na naslednjo generacijo celic. Po iniciaciji karcinogenih sprememb še ne govorimo o rakasti celici, kajti za to je potrebna še faza promocije, ko se spremenjena celica deli in tako izraža vse pridobljene nove lastnosti. Natančnih mehanizmov in povezav o tem, kateri geni morajo biti spremenjeni za razvoj določene vrste raka, še ne poznamo. Zato so novejša raziskava usmerjene prav v odkrivanje pomembnih genskih povezav med nastankom raka kot tudi (ali celo predvsem) v to, katere so tiste celice, ki imajo možnost nadaljevanja in ponovitve klona v oddaljenih organih. Vsa ta dejstva so osnova za razumevanje biologije raka in učinkovito zdravljenje in preventivo.

Viri in literatura

1. DeVita TV, Hellman S, Rosenberg AS, editors. Principles and practice of Oncology 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editors. Molecular biology of the cell 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
3. Rubin P, editor. Clinical Oncology. A Multidisciplinary Approach for Physicians and Students 7th edition. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1993.
4. Karpinets TV, Foy BD. Tumorigenesis: the adaptation of mammalian cells to sustained stress environment by epigenetic alterations and succeeding matched mutations. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1323-34.
5. Kisseljova NP, Kisseljev FL. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochem* 2005; 70: 743-52.

KAJ JE POVZROČILA JEDRSKA NESREČA V ČERNOBILU

Nikola Bešić

Onkološki inštitut Ljubljana

Jedrska elektrarna Černobil leži v Ukrajini in je blizu tromeje z Belorusijo in Rusijo. Do eksplozije enega od jedrskih reaktorjev elektrarne v Černobilu je prišlo 26. aprila leta 1986. V naslednjih desetih dneh se je v atmosfero sprostil več kot 10^{19} Bq različnih radioizotopov. Predvidevajo, da so se radioizotopi sproščali v ozračje občasno. Na obseg kontaminacije določenega področja so vplivali smer vetra in drugi meteorološki pogoji, med drugim, kje je deževalo iz oblakov, v katerih je bil radioaktivni material, od reliefa, na katerega so padle te padavine, in od načina odtekanja voda, v katerih je bil radioaktivni material. V prvih desetih dneh po eksploziji reaktorja so vetrovi večinoma pihali proti severu ali proti jugu. Radioaktivne padavine so padle na celo področje Belorusije (z izjemo okrožja Vitebsk), velik del Ukrajine, majhen del Rusije in na nekatere dele Skandinavije. V »koktejl« radioizotopov, ki se je sprostil ob jedrski nesreči v Černobilu, je ^{137}Cs najpomembnejši vir dolgotrajnega sevanja, saj ima razpolovni čas približno 30 let.

V Ukrajini, Belorusiji in Rusiji so mobilizirali približno 600.000 likvidatorjev, to je ljudi, ki so sodelovali pri čiščenju kontaminiranega področja s polmerom 30 km okoli reaktorja in prekritju reaktorja s sarkofagom. Med likvidatorji je bilo 120.000 Belorusov, od tega 5.500 žensk. Ker je primanjkovalo opreme za merjenje radioaktivnosti, ni znano, kakšno dozo obsevanja so prejeli posamezni likvidatorji. Po podatkih Beloruskega registra raka je incidenca raka večja pri likvidatorjih kot pri ostalih prebivalcih Belorusije. Incidenca je pogostejša pri raku debelega črevesa (9,4% proti 3,6%), ledvic (8% proti 6,5%), sečnega mehurja (6,5% proti 3,8%), ščitnice in raku pljuč. Tisti likvidatorji, ki živijo na področjih s sevanjem, večjim od 555 kBq/m^2 zaradi prisotnosti ^{137}Cs , imajo dvakrat večjo incidenco raka grla, sapnika, sapnic in pljuč, kot tisti, ki živijo v področjih, kjer je sevanja manj kot 185 kBq/m^2 .

S ^{137}Cs je najbolj onesnaženo področje Belorusije v okrožju Gomel, v katerem je živel približno 1,5 milijona prebivalcev. Iz dela tega okrožja so morali zaradi izredno velikega sevanja izseliti približno 135.000 prebivalcev. Pred jedrsko nesrečo je bila v okrožju Gomel smrtnost zaradi raka manjša kot v preostalih delih Belorusije. Po jedrski nesreči se je smrtnost zaradi raka v tem okrožju v petnajstih letih povečala kar za dvakrat. V letih 1990-2000 se je v okrožju Gomel povečala incidenca raka debelega črevesa, ščitnice in sečnega mehurja, medtem ko se incidenca raka pljuč ni zmanjšala tako kot v drugih delih

Belorusije. V okrožju Gomel sedaj bolnice zbolevajo zaradi raka dojke 15 let prej kot v okrožju Vitebsk. Zaradi zgodnjega raka dojke so še posebno ogrožene ženske, ki živijo na podeželju, saj so zaradi načina življenja izpostavljene dvakrat večjemu sevanju kot tiste ženske, ki živijo v urbanem okolju.

V Sloveniji so po jedrski nesreči v Černobilu leta 1996 zaznali za približno 50% povišane vsebnosti ^{137}Cs in ^{90}Sr v mleku in mesu, ki pa so se že naslednje leto zmanjšale na vrednosti pred letom 1996. Leta 1987 je prst v Murški Soboti povprečno letno sevala $4,8 \text{ kBq/m}^2$, v Ljubljani $25,5 \text{ kBq/m}^2$ in v Kobaridu $32,2 \text{ kBq/m}^2$, leta 1997 pa v Murški Soboti $4,4 \text{ kBq/m}^2$, v Ljubljani $5,7 \text{ kBq/m}^2$ in v Kobaridu $6,5 \text{ kBq/m}^2$. Leta 1997 je bila v Sloveniji povprečna celoletna prejeta doza sevanja za odraslo osebo zaradi radionukleotidov v okolju samo 58 mikroSv. Toda tudi sedaj je v Sloveniji še vedno prisotno povečano gama žarčenje prsti zaradi radioaktivnih padavin po nesreči v Černobilu, ki dosega 15-20% naravnega ozadja.

Avstrijski viri navajajo, da je kar 2% ob jedrski nesreči v Černobilu sproščene ^{137}Cs padlo na teritorij Avstrije. Radioaktivne padavine v Avstriji so v glavnem padle na dve področji: severno območje je segalo od meje s Češko proti zahodu v predelu Alp in se nadaljevalo v Nemčijo na južno Bavarsko, medtem ko je južno segalo od zahodne Madžarske, čez avstrijsko Koroško proti severni Italiji. Glede na to, da je vreme bilo aprilsko, kar pomeni, da so vladale zelo spremenljive vremenske razmere v tistem obdobju, so regionalne spremembe glede kontaminacije zemlje s ^{137}Cs na področju Avstrije celo v razmerju 1:100. Na srečo je bilo najmanj radioaktivnih padavin v gosto naseljenih nižinskih predelih in poljedelskih območjih. Največ radioaktivnih padavin je padlo v gorskem svetu in na predelih, poraslih z gozdom, zato so lahko gobe, gozdni sadeži in divjačina, ter mleko nekaterih krav, ki se pasejo na visokogorskih planinah še vedno kontaminirani s ^{137}Cs . Tirologi iz Celovca pripisujejo porast incidence raka ščitnice in večji delež bolj agresivnih tumorjev sevanju zaradi radioaktivnih padavin po jedrski nesreči v Černobilu. Večina avtoritet na področju povezave med sevanjem in nastanom raka pa meni, da v zahodnoevropskih državah večino porasta incidence karcinoma ščitnice lahko pripišemo predvsem bolj razširjeni uporabi ultrazvoka in tankoigelne aspiracijske biopsije v diagnostiki bolezni ščitnice ter natančnejši histološki preiskavi z operacijo odstranjenih ščitnic. V prid temu govori večji delež manjših karcinomov, še posebno tistih, ki so manjši kot 1 cm.

Že več kot 50 let je znano, da je perkutano obsevanje vzrok za nastanek raka ščitnice. Ob poskusu z atomsko bombo leta 1954 na Marshallovih otokih je bilo sevanju izpostavljeno 245 ljudi. Skoraj 80% doze, ki so jo prejeli, je bilo na račun izotopov s kratkim razpolovnim časom, med katerimi so medicinsko še posebno pomembni izotopi joda (^{131}I , ^{132}I , ^{133}I), saj se aktivno kopičijo v ščitnici. Po 34 letih je imelo od teh 245 oseb kar 22% oseb gomolje v ščitnici in kar 7% raka ščitnice, kar je več kot v neobsevani populaciji iz istega območja, med katerimi je imelo gomolj v ščitnici le 1,5% populacije, raka ščitnice pa samo 0,5% populacije.

Tudi ob jedrski nesreči v Černobilu so se v ozračje sprostile velike količine ^{131}I

in drugih izotopov joda. Na dozo radiojoda, ki jo je dobil posameznik, so vplivli trije faktorji: stopnja kontaminacije z ^{131}I , stopnja kopičenja ^{131}I v ščitnici in velikost ščitnice. Odziv zdravstvene službe ni bil ustrezen, saj ni bilo opozoril, da se ne sme uživati kontaminirane hrane, preparate stabilnega joda pa so začeli profilaktično deliti šele deset dni po nesreči. Doza, ki jo je akumulirala ščitnica, je bila večja pri otrocih, še posebno pri dojenčkih in tistih, ki so bili mlajših od petih let. Otroci, ki jih niso evakuirali iz kontaminiranih področij, so 85% doze, prejete na ščitnico, dobili z mlekom, le 15% prejete doze je šlo na račun izotopov s kratkim razpolovnim časom. Ocenjujejo, da je bila pri otrocih na kontaminiranem območju povprečna doza na ščitnico v Belorusiji 700 mSv, medtem ko je bila v Ukrajini in Rusiji med 100 in 200 mSv. V zahodni Evropi je bila zaradi černobilske nesreče povprečna doza pri otrocih do nekaj mSv, pri odraslih pa od 5 do 10-krat manjša kot pri otrocih. Za primerjavo, povprečno naravno sevanje v Franciji je 2,4 mSv na leto.

V kontaminiranih predelih Belorusije in Ukrajine je že prej kot v štirih letih po jedrski nesreči prišlo do naraščanja incidence raka ščitnice pri otrocih. Znano je, da po obsevanju v več kot 90% nastane papilarni karcinom ščitnice in da obsevanje ne vpliva na pogostost drugih vrst raka ščitnice. Do leta 2003 je bilo registriranih več kot 1.500 primerov raka ščitnice v populaciji dveh milijonov otrok, ki so bili ob nesreči mlajši kot 15 let. Zaradi raka ščitnice je do leta 2003 umrlo približno 20 otrok. V Belorusiji, ki je bila najbolj prizadeta, je bila incidenca v letih 1986 do 2000 13,5 na 100.000 otrok, pred nesrečo pa je bila incidenca manj kot 1 na 100.000 otrok. Za razliko od odraslih bolnikov z rakom ščitnice, kjer je delež žensk proti moškim pet proti ena, je delež bolnikov, mlajših od 15 let glede na spol približno ena proti ena. Rak, ki je nastal zaradi nesreče v Černobilu, je bolj agresiven pri mlajših otrocih (kar v 49% gre za tumorski stadij T4, 7% bolnikov ima oddaljene zasevke). Pri mlajših otrocih je latentna doba od izpostavljenosti sevanju do nastanka karcinoma krajša, ker so pri zelo majhnih otrocih ščitnične celice v procesu aktivne replikacije.

Ret-PTC proto-onkogen zajema 21 eksonov na kromosomu 10q11-2 in kodira membranski receptor za tirozin kinazo. Ob normalnih pogojih je receptor za tirozin kinazo aktiviran le ob prisotnosti liganda v receptorju. Mutiran gen pa za aktivacijo ne potrebuje liganda in tudi brez prisotnosti liganda aktivira tirozin kinazo, ki sproži vrsto mehanizmov, ki povzročijo genetsko nestabilnost in preprečijo apoptozo celice. Na pogostost prerazporeditve ret-PTC proto-onkogenega vpliva geografsko področje, iz katerega izvirajo bolniki, starost ob diagnozi in laboratorijske metode za detekcijo. Pri bolnikih, ki niso bili obsevani, je prerazporeditev ret-PTC proto-onkogenega prisotna n 2,5 do 35%. Pri karcinomi, nastalih zaradi nesreče v Černobilu, je prerazporeditev ret-PTC proto-onkogenega pogostejša in se pojavlja v 35-85%. Pri otrocih z rakom ščitnice iz Belorusije in Ukrajine je prišlo pogosteje do prerazporeditve ret-PTC₁ ali ret-PTC₃ proto-onkogenega. Mutacija ret-PTC₃ proto-onkogenega je povezana s prisotnostjo solidne rasti tumorja na histološkem materialu, bolj agresivnim kliničnim potekom bolezni in se je pojavljala pogostje prvih nekaj let po jedrski nesreči. Mutacija ret-PTC₁ proto-onkogenega je povezana z nas-

tankom klasičnega papilarnega karcinoma ščitnice, za katerega je značilen manj agresiven potek bolezni. Ta mutacija je pogostejša pri bolnikih, ki so zboleli več kot pet let po jedrski nesreči. Otroci z rakom ščitnice, ki niso bili obsevani, imajo podobno pogosto mutirani ret-PTC proto-onkogen kot odrasli bolnici iz istega geografskega in etničnega področja. Dejstvo, da so prerazporeditev ret-PTC proto-onkogeni našli pri papilarnem mikrokarcinomu ščitnice, govori v prid zgodnjega dogodka v karcinogenezi. Pri enem bolniku z multifokalnim karcinomom imamo lahko različne mutacije ret-PTC proto-onkogeni, kar je lahko dokaz, da so nastanek teh tumorjev sprožili različni dogodki.

Zaključimo lahko, da je incidenca raka večja na območjih, ki so zelo kontaminirana z radioaktivnim materialom. Na našo srečo območje srednje Evrope po jedrski nesreči v Černobilu ni bilo zelo kontaminirano z radioaktivnim materialom. Zaradi prepoznih in neustreznih preventivnih ukrepov s preparati stabilnega joda je po černobilski nesreči v Ukrajini, Belorusiji in Rusiji veliko otrok dobilo raka ščitnice. Izpostavljenost radioaktivnemu jodu v otroštvu lahko sproži mutacijo ret-PTC proto-onkogeni in povzroči papilarni karcinom ščitnice. Mutacija ret-PTC₃ proto-onkogeni je povezana z bolj agresivnim kliničnim potekom bolezni.

Viri in literatura

1. Okeanov AE, Sosnovskaya EY, Priatkina OP 2004 A national cancer registry to assess trends after the Chernobyl accident. *Swiss Med Wkly* **134**:645-649.
2. Schlumberger M, Pacini F. Oncogenes and tumor suppressor genes. In Schlumberger M, Pacini F (eds) *Thyroid tumors*. Paris: Editions Nucleon; 2003; 63-84.
3. Schlumberger M, Pacini F. Consequences of the Chernobyl accident and atmospheric contamination by radioiodine. In Schlumberger M, Pacini F (eds) *Thyroid tumors*. Paris: Editions Nucleon; 2003; 273-292.
4. Gomez Segovia I, Gallowitsch HJ, Kresnik E, Kumnig G, Igerc I, Matschnig S, Stronegger WJ, Lind P 2004 Descriptive epidemiology of thyroid carcinoma in Carinthia, Austria: 1984-2001. Histopathologic features and tumor classification of 734 cases under elevated general iodination of table salt since 1990: population-based age-stratified analysis on thyroid carcinoma incidence. *Thyroid* **14**:277-286.
5. Bossew P, Ditto M, Falkner T, Eberhardt H, Kienzl K, Rappelsberger U 2000 Contamination of Austrian soil with caesium-137. *J Environmental Radioactivity* **55**:187-194.
6. Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidchik EP, Miccoli P, Pinchera A, Pacini F 2001 RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: Studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:3211-3216.
7. <http://www.sigov.si/ursjv/porocila/ang/97/annual/HTNL/9.html> and radiological safety in Slovenia – Annual report 1997

CITOGENETIKA V ONKOLOGIJI

Nadja Kokalj Vokač

Splošna bolnišnica Maribor

Povzetek

Molekularna citogenetika igra pomembno vlogo v genetiki raka, pri diagnostiki in ugotavljanju specifičnih kromosomskih sprememb. Je eno osnovnih orodij v odkrivanju genov, pomembnih v patogenezi rakastih bolezni. V poznih 80. letih prejšnjega stoletja so se razvile številne tehnike, ki temeljijo na metodi fluorescenčne in situ hibridizacije (FISH). Najpomembnejše med njimi so interfazni FISH, večbarvni FISH (M-FISH, SKY) in primerjalna genomska hibridizacija (PGH). V zadnjem času pa se uveljavlja tehnologija mikromrež. Digitalna kariotipizacija, PGH na mikromrežah in tehnika oligonukleotidnih mikromrež, so tehnike, ki so prevzele vodilno vlogo v raziskavah raka.

V Laboratoriju za medicinsko genetiko mariborske bolnišnice smo razvili vse osnovne molekularno citogenetske metode, razen čip tehnologije. Molekularne citogenetske tehnike uporabljamo pri diagnostiki levkemij in limfomov ter nekaterih solidnih tumorjih. V tem prispevku je prikazana uporaba FISH-a, interfaznega FISH-a, večbarvnega FISH-a in PHG pri posameznih primerih levkemij. Razpravljamo tudi o pomnožitvah onkogenega Her2 pri diagnostiki raka dojke ter pogostejših kromosomskih preureditvah pri raku mehurja.

FISH – fluorescenčna in situ hibridizacija

Metode FISH na interfaznih jedrih so prinesle revolucionarno možnost v citogenetski diagnostiki in predvsem v kliničnih aplikacijah. Tehnike temeljijo na edinstveni sposobnosti vezave enojne DNA verige – DNA sonde na komplementarno tarčno mesto v genomu. Sondo vizualiziramo z direktnim označevanjem s fluorokromi konjugiranimi na nukleotide ali indirektno z imunološkim barvanjem molekul biotina oz digoxigenina vezanega na nukleotide. Tarčna sekvenca je vidna tako v metafazi kot v interfazi celičnega ciklusa.

Poznamo tri vrste DNA sond, ki nudijo različne aplikacije: centromerno specifične, lokus specifične in kromosomsko specifične DNA sonde.

Visoka senzitivnost, specifičnost in hitrost FISH preiskav omogoča klinično uporabnost v citogenetiki in patologiji (1,2). Glavna omejitev metode je v detekciji samo specifičnih strukturnih ali številčnih kromosomskih sprememb,

ki pa se da preseči z drugimi tehnikami kot so M-FISH, SKY, CGH in Array-CGH.

Specifične kromosomske preureditve in njihova vloga pri diagnostiki levkemij

Vloga kromosomskih sprememb v patologiji je bolj poznana pri hematoloških malignih stanjih kot pri solidnih tumorjih. Tako uravnotežene kot neuravnotežene kromosomske preureditve so opisane pri različnih malignih stanjih in igrajo specifično vlogo pri razvoju napredovanju bolezni. Predpostavlja se, da imajo uravnotežene spremembe direktno vlogo v onkogenezi, medtem ko so neuravnotežene spremembe bolj posledica sekundarnega napredovanja tumorjev (3).

Posledica uravnoteženih kromosomskih sprememb so pogosto himerični celični proteini, ki imajo ključno vlogo v malignem procesu. Njihova vloga je lahko v stimulaciji celične rasti in tirozin kinazni aktivnosti, kot je v primeru translokacije t(9;22) pri KML, zaradi BCR/ABL fuzije in translokacije t(8;21) pri AML, zaradi AML1/ETO fuzije. Antiapoptotično deluje spremenjena aktivnost BCL2 gena kot posledica t(14;18) pri folikularnem B-celičnem limfomu. V primeru translokacije t(15;17) pa je spremenjeno delovanje PML in RARA proteinov. PML se inaktivira in vodi v izgubo proapoptotične aktivnosti, spremenjeno delovanje receptorja za retinoično kislino pa blokira mieloidno diferenciacijo (4,5,6).

Poleg translokacij so pomembne številčne spremembe, amplifikacije in delecije, ki povzročajo presežke in primanjkljaje v genomu in so vzrok za nekontrolirano proliferacijo. Pri mielodisplastičnem sindromu (MDS) se pri 50% bolnikov pojavljajo delecije 5q- ali primanjkljaji celotnih kromosomov 5 in 7 ter dodatni kromosom 8. Spremembe so z izjemo 5q- vezane na slabo prognozo (7). Pravtako je slab prognostičen znak delecija 17p pri B celični KLL, ki vodi v agresivno obliko bolezni, medtem ko je delecija 13q relativno dober prognostičen znak (8).

Odkrivanje citogenetsko pomembnih klonov je ključno za spremljanje bolezni, terapijo in ugotavljanje relapsa. FISH se uporablja za ugotavljanje uspešnosti terapije pri spremljanju pojavljanja fuzijskih genov ABL/BCR in PML/RARA.

Uporabnost FISH-a se kaže tudi pri drugih vrstah levkemij in limfomov. Tabela 1 prikazuje najpogostejše citogenetske spremembe, ki imajo diagnostično vrednost pri hematoloških malignih stanjih.

Solidni tumorji

Vrednost citogenetske analize pri vrednotenju pojavljanja bolezni se je pokazala tudi pri solidnih tumorjih.

Pri raku mehurja nam diagnostiko karcinoma tranzicijskih celic omogoča določitev številčnih sprememb kromosomov 3, 7 in 17 ter delecije gena p16

Tabela 1. Najbolj pogosti in pomembni citogenetski markerji pri levkemijah in limfomih, kjer je FISH metoda izbire za diagnostiko in sledenje bolezni.

| | | | |
|--|----|----------------------|------------------------------|
| t(9;22)(q34;q11.2) | | BCR-ABL | Kronična mieloična levkemija |
| t(8;21)(q22;q22) | | AML1/ETO | AML z (8;21) (M2, M4-FAB) |
| inv(16)(p13q22) t(16;16)(p13q22) | or | CBFb/MYH11 | AML (M4Eo-FAB) |
| t(15;17)(q22;q12) | | PML/RARa | APL (M3-FAB) |
| 11q23 rearrangements | | MLL | AML z 11q23 nepravilnostmi |
| 5q- | | Možen supresorni gen | 5q- sindrom: MDS |
| t(8;14)(q24;q32) t(8;22)(q24;q11) or t(2;8)(p12;q24) | or | c-MYC | Burkitt limfom |
| t(14;18)(q32;q21) | | BCL-2 | Folikularni limfom |
| t(11;14)(q13;q32) | | BCL1, cycline D1 | Limfom plaščnih celic |
| t(2;5)(p23;q35) | | ALK | T-elični anaplastični limfom |

na 9p21 kromosomu. FISH analiza daleč presega pomen drugih testov, vključno s citopatologijo (11).

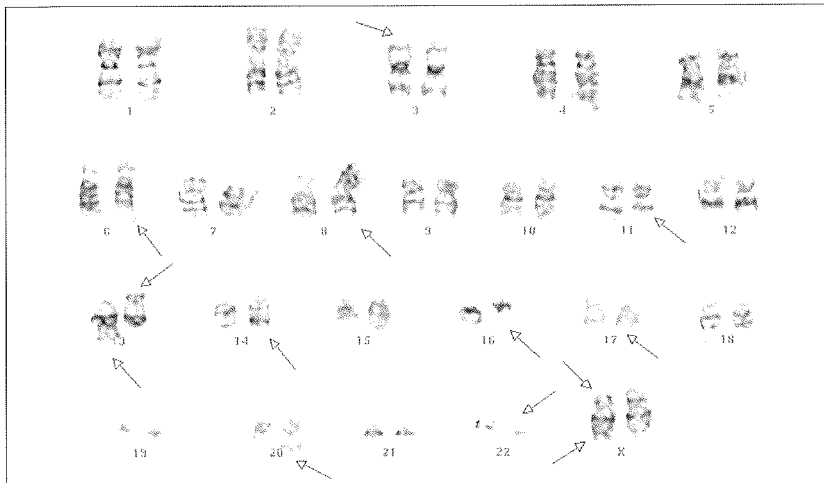
V Laboratoriju za medicinsko genetiko SBM smo v letu 2005 pregledali 36 bolnikov, pri 6-tih smo našli številčne kromosomske spremembe, pri enem pa delečije p16 genov.

Poznana je tudi tesna povezava med Her2/neu gensko amplifikacijo na kromosomu 17q in slabo prognozo pri metastazirani obliki raka dojke. Her2/neu amplifikacija se odlično odziva na specifično terapijo s trastuzumabom (Herceptin), ki je humano protitelo proti Her2 proteinskem receptorju. Bolnice zdravljene z dodatno terapijo s Herceptinom kažejo dober odgovor in visoko preživetje. Zato je zgodnje ugotavljanje Her2/neu amplifikacij bistveno pri prognozi in zdravljenju bolezni. Prednost FISH-a pred imunohistokemično analizo (ICH) pa je v visoki specifičnosti in senzitivnosti metode, saj po ICH dobimo visok odstotek lažno pozitivnih in tudi lažno negativnih primerov. V našem laboratoriju smo v letu 2005 testirali 64 ICH 2+ pozitivnih primerov in potrdili Her2 amplifikacijo le pri 21-tih.

M-FISH (Multicolour FISH)

Poleg klasične FISH tehnike so se razvile številne druge metode, ki izhajajo iz FISH-a in omogočajo dodatne aplikacije. M-FISH uporablja tehniko označevanja celotnih kromosomov. S kombinacijo 5 različnih barvil lahko dosežemo diferencialno označevanje vsakega kromosoma z drugo barvo in simultano analizo vseh kromosomov. M-FISH se uporablja za analizo marker kromosomov, derivativnih kromosomov in kompleksnih kariotipov. Omejitve tehnike so v resoluciji subtilnih delečij in amplifikacij, nezmožnosti odkrivanja intrakromosomskih inverzij in insercij (13,14,15). Z M-FISH je bilo odkritih nekaj diagnostično pomembnih preureditev, kot je t(5;11) pri 7% otroških AML (16). Resnič-

na vrednost M-FISH-a je v analizi kompleksnih kariotipov, kot je primer pacienta AL (Slika 1), ki smo ga analizirali v našem laboratoriju s pomočjo Ochtachrome Multiprobe Device System (Cytocell), ki uporablja simultano analizo vseh kromosomov s pomočjo kombinacije treh različno obarvanih kromosomov na 8 poljih.



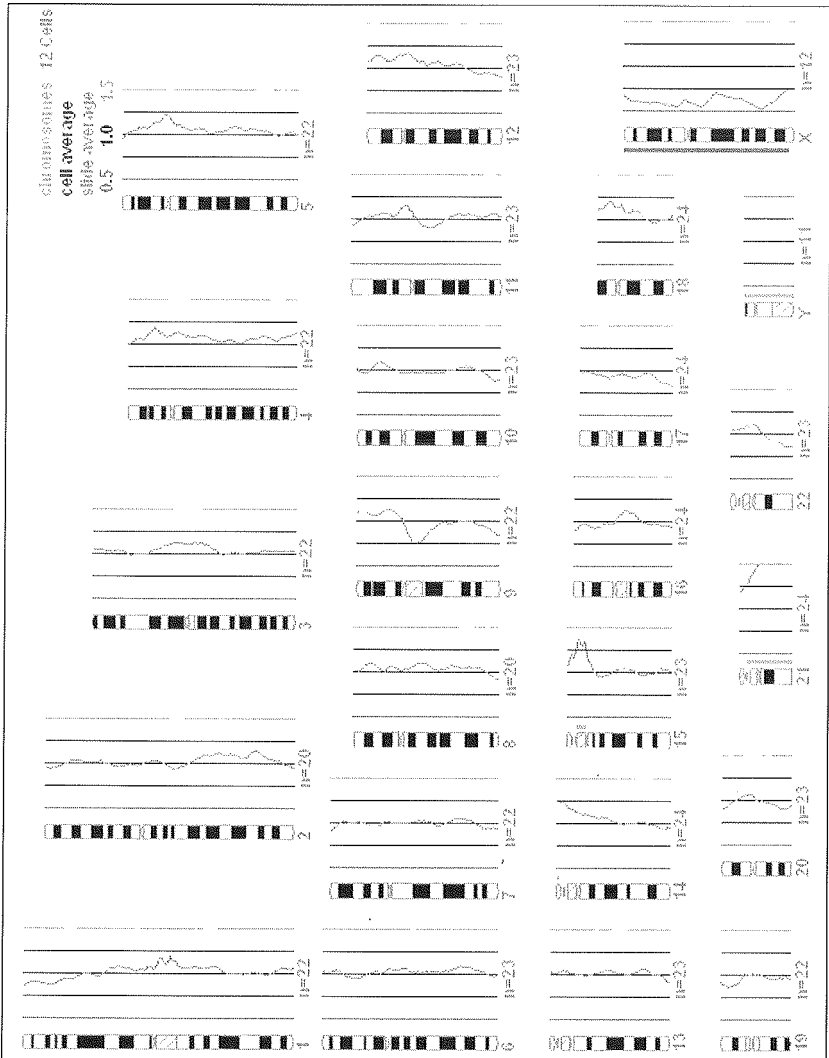
Slika 1. Kompleksni kariotip primera akutne levkemije.

46,X,der(X)t(X;3)(q28;p25)t(X;16)(p14;q12),der(3)t(X;3)(q28;p25),der(6)t(X;6)(p14;q25),
i(8)(q10),del(11)(q14q23),der(13)t(5;13)(q34;p11),der(13)t(13;14)(q22;q11),inv(14)(q11q32),der(16)t(X;16)(q28;q12),r(17)(p13q21),der(20)t(17;20)(q21;q13),22p+.

PGH – primerjalna genomna hibridizacija

Možnost primerjave patološkega DNA z normalno DNA na normalnih kromosomih je prelomnega pomena v molekularno-citogenetskih tehnikah. To nam omogoča primerjalna genomna hibridizacija (17). Princip, ki ga PGH uporablja je tudi osnova za najnovejše tehnike mikromrež (array-CGH).

PGH je robustna FISH metoda, ki omogoča analizo celotnega genoma v smislu ugotavljanja presežkov in primanjkljajev, vendar z omejeno resolucijo (2-10 Mb). Prednost metode pred ostalimi je v tem, da ne potrebujemo več deljivih celic in slike patoloških kromosomov. Analiza se dela na testnih normalnih kromosomih kamor hibridiziramo različno obarvano testno in referenčno DNA, ki tekmujeta za vezna mesta. Razlika v barvi hibridizacije ter računalniška analiza nam omogoči prikaz pomika v desno ali levo na krivulji vzdolž kromosoma in s tem ugotavljanje presežkov oz. primanjkljajev v genomu. Področja v genomu z visokim številom amplifikacij so izhodiščna mesta za identifikacijo genov, ki igrajo vlogo v patogenezi (18). Na sliki 2 prikazujemo primer uporabe PGH v našem laboratoriju: analiza bolnika z dendritično levkemijo z visoko amplifikacijo kromosoma 21.



Slika 2. Primer PGH profila, ki prikazuje amplifikacijo kromosoma 21 pri bolniku z dendritično levkemijo.

PGH na mikromrežah (array CGH)

Tehnika PGH je osnova za tehnologijo mikromrež, le da so pri mikromrežah testne kromosome nadomestili čipi s kloni BAC-ov, cDNA ali oligonukleotidov (19), kar omogoča večjo resolucijo, ki je omejena z velikostjo uporabljene sonde. Mikromreže, ki pokrivajo celoten genom vsebujejo klone razporejene

na 1Mbp intervala razdalje. Resolucijo lahko povečamo z visoko-resolucijskimi mikromrežami, ki vsebujejo prekrivajoče se klone BAC-ov (20). Glavna prednost PGH na mikromrežah je v možnosti odkrivanja subtilnih sprememb v celotnem genomu. Prvi rezultati pri analizi limfomov so pokazali kriptične amplifikacije številnih genov (BCL2, CCD1, CCD2, JAK2, FG4MDM2...) (21) ali n.pr. pri AML tandemske duplikacije/amplifikacije MLL gena.

Zaključek

Maligni fenotip je rezultat vsaj šestih posamičnih sprememb v celici: neodvisnost signalizacije, izguba apoptoze, odpornost do zaviralcev celične rasti, nesposobnost proliferacije, ohranjanje angiogeneze in zmožnost invazije oz. metastaziranja (22). Sposobnost vpogleda nad celotnim biokemičnim dogajanjem v malignih celicah je ključnega pomena v izvajanju terapije. V tabeli 2

Tabela 2. Primerjava različnih citogenetskih tehnik

| Primerjava različnih citogenetskih tehnik | | | |
|---|--------------------|--|---|
| Tehnike | Ločljivost | Prednosti | Omejitve |
| Klasična citogenetika – proganje kromosomov | 10Mb | Rutinska laboratorijska praksa. Pregled celotnega genoma. | Potrebna živa kultura celic in metafazni kromosomi. |
| Matafazni FISH | 1-10Mb | Odkrivanje določenih DNA sprememb. Večja ločljivost kot klasična citogenetika. | |
| M-FISH | 2-3 Mb | Najbolj senzitivna od vseh metafaznih analiz. Pregled celotnega genoma. | |
| PGH | 50kb-10Mb | Zelo visoka senzitivnost. Živa celična kultura ni potrebna. Pregled celotnega genoma. | Tehnična zahtevnost. Potrebna visoko kvalitetna DNA. Potrebni visoko kvalitetni testni kromosomi. |
| Interfazni FISH | 50-100 kb | Zelo visoka senzitivnost in specifičnost. Živa celična kultura ni potrebna. Možna analiza na eni celici. | Ni pregleda čez celi genom. |
| PGH na mikromrežah | 40-100kb 3-4 Mb | Višja senzitivnost in specifičnost kot PGH. Genom-wide scan. | Tehnično zelo zahtevna in draga metoda. Zahteva visoko kvalitetno DNA. |
| FISH na iztegnjeni DNA molekuli | 1-5 kb | Zelo natančna analiza genoma.. Ni potrebna živa celična kultura. | Tehnično izredno zahtevna metoda. |

je pregled citogenetskih tehnik, ki se trenutno uporabljajo pri analizi raka ter njihovih prednosti in pomankljivosti. Opisane metode so pomemben del v procesu diagnostike in sledenja bolezni. So tudi osnova za analize v bodočnosti pri kompleksnih študijah na ekspresijskih in proteomskih mikromrežah.

Viri in literatura

1. Kjeldsen E, Kovarrra S. FISH technique, FISH probes and their applications in medicine and biology: an overview. In: FISH Technology. Rautenstrauss B, Liehr T (Eds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, 3-50; 2002.
2. Wang N. Methodologies in cancer cytogenetics and molecular cytogenetics. *Am.J.Med.genet.* 2002;115:118-124.
3. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. Secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities: balanced rearrangements vs. Genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16:155-163.
4. Cory S, Adams JM. The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev.Cancer* 2002;2:647-656.
5. Slupianek A, Hoser G, Majsterek I et al. Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of hematology-dependent recombination repair, prolongation of G2/M phase and protection from apoptosis. *Mol.Cell.Biol.* 2002;22:4189-4201.
6. Redner RL. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. *Leukemia* 2002;16: 1927-1932.
7. Padau RA, McGlynn H. molecular, cytogenetics and genetic abnormalities in MDS and secondary AML. In: *Myelodysplastic Syndromes and Secondary Acute Myelogenous Leukemia*. Rosa A, Mundle S (Eds), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 111-158; 2001.
8. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 2000;343:1910-1916.
9. van der Burg M, Poulsen TS, Hunger SP et al. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:895-908.
10. Wang YL, Bagg A, Pear W, Nowell PC, Hess JL. Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:97-111.
11. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G et al. Clinical evaluation of a multitarget fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J.Urol.*2002;168:1950-1954.
12. Sauer T, Wiedswag G, Boudjema G, Christensen H, Karensen R. Assessment of Her2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice? *APMIS* 2003;111:444-450.
13. Speicher MR, Ballard SG & Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics*1996;12:368-375.
14. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494-497.

15. Jalal SM & Law ME. Utility of multicolor fluorescent in situ hybridization in clinical cytogenetics. *Genetics in Medicine* 1999; 1:181-186.
16. Johansson B., Mertens F., Mitelman F. Primary vs. Secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities: balanced rearrangements vs. Genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 1996;16:155-163.
17. Brown J, Huang J, Greshock J et al. A cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in 2 children with acute myeloid leukemia and apparently normal karyotypes, identified by a multiplex fluorescent in situ hybridization telomere assay. *Blood* 2002;99:2526-2531.
18. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudor D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-821.
19. Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000;37:348-357.
20. Albertson DG, Pinkle D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 2003;12 (Spec No 2): R145-R152.
21. Krzywinski M, Bosdet I, Smailus D et al A set of BAC clones spanning the human genome. *Nucleic Acids Res* 2004;32:3651-3660.
22. Wessendorf S, Schwaenen C, Kohlhammer H, Kientle D, Wrobel G, Barth TF, Nessling M, Moller P, Dohner H, Lichter P, Bentz M. Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2003;22:1425-1429.
23. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
24. Cunningham MJ. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. *J.Pharmacol.Toxicol. methods* 2000;44:291-300.

GENSKE MIKROMREŽE

Radovan Komel

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Uvod

Z objavo nukleotidnega zaporedja človeškega genoma v znanstvenih revijah *Science* in *Nature* se je začelo obdobje tako imenovane funkcijske genomike, ko bo potrebno raziskati vseh 35.000 – 40.000 človeških genov in ugotoviti njihovo vlogo oz. vlogo njihovih proteinskih produktov v življenju celice. Za družbo večkrat slišimo, da je vstopila v 'postgenomsko obdobje', ki ga bodo zaznamovali že omenjena nova spoznanja v genomiki in v z njo povezani biotehnologiji, nanotehnologiji in novi materiali ter skokovit napredek računalništva in informatike. Če smo do sedaj v biokemiji, biologiji in z njima povezanimi biotehnološkimi in biomedicinskimi vedami preučevali posamezne fenomene in nato spoznanja povezovali, je za funkcijsko genomiko in njeno 'mlajšo sestro' sistemsko biologijo značilno, da celico obravnava kot sistem sočasnosti in prepletenosti tisočerih molekul in dogodkov, ter da v preučevanju zapletenih mrež soodvisnosti išče vzorce, značilne za trenutno fiziološko oziroma patofiziološko stanje celice, kot tudi ključne molekulske igralce, ki so nekakšne 'kretnice' pri celičnih odločitvah in njihovemu usmerjanju.

Orodja funkcijske genomike

Ker celico obravnavamo kot sistem molekul in njihovih interakcij, so se vede za njihovo preučevanje razvile v številne '-omike'. Tako transkriptomika obravnava celični transkriptom, ki ocenjuje kvantiteto in vrsto vseh v preučevanih razmerah navzočih mRNA. Proteomika obravnava celični proteom, prav tako kvantiteto in vrsto vseh navzočih proteinov, pa tudi njihove medsebojne interakcije. Njena spoznanja razširja strukturna biokemija, ki preučuje trodimenzionalno zgradbo proteinov in njene posledice za njihovo delovanje in aktivnost. Metabolomika se ukvarja s celičnim metabolomom, kvantitativno navzočnostjo celičnih metabolitov, njihovimi interakcijami in interakcijami s celičnimi komponentami. Vse skupaj pa povezuje sistemska biologija, odločno podprta z bioinformatiko, ki naj bi ponudila globalna spoznanja o medsebojni prepletenosti celičnih molekul v preiskovanih fizioloških razmerah.

Mikromreže

Mikromreže ali bio-čipi so majhne steklene ali silikonske ploščice, običajno velike kot mikroskopsko objektno stekelce, na katere nanesimo na tisoče gensko-specifičnih sond, in nam zato omogočajo globalno preučevanje transkriptomov, v primeru protienskih bio-čipov pa tudi proteomov. Gensko-specifična sonda je krajša enoverižna molekula DNA, komplemetarna delu nukleotidnega zaporedja preiskovanega gena; lahko gre za umetno sintetiziran 70 bp dolg oligonukleotid ali pa za nekoliko daljšo cDNA, ki jo pridobimo z verižnim pomnoževanjem (PCR) omenjenega odseka gena. V točko na omenjeni podlogi, ki ni dosti večja od enega mikrona, vežemo nekaj sto ali tisoč molekul omenjene sonde, nato na sosednjo točko enako količino molekul sonde nekega drugega gena, in tako naprej. Tako v primeru visokogostotnih bio-čipov na en čip vežemo tudi do 20.000 različnih gensko-specifičnih sond, v primeru nizkogostotnih bio-čipov pa do nekaj tisoč gensko-specifičnih sond.

Iz bolnega (npr. malignega) tkiva izoliramo vse mRNA, kjer je količina posamezne vrste mRNA odraz intenzivnosti izražanja njenega gena. Isto naredimo iz okolnega zdravega tkiva. RNA iz patološkega tkiva označimo z zelenim fluorescenčnim barvilom, tiste iz zdravega tkiva pa z rdečim barvilom. Z obema populacijama preplavimo bio-čip in vsaka molekula ene vrste mRNA iz patološkega tkiva bo tekmovala s tistimi iz zdravega tkiva za vezavo na molekule svoje gensko-specifične sonde, ki so pritrjene na bio-čipu. Če bo specifičnih mRNA iz patološkega tkiva več, se bo točka na bio-čipu obarvala bolj zeleno, in obratno, v primeru, da jih bo manj, bo obarvanje bolj rdeče. V primeru enakega izražanja omenjenega gena bo točka obarvana rumeno.

Celoten bio-čip po opravljenem poskusu izgleda kot mreža rdeče, zeleno in rumeno obarvanih pik, ki za vsak gen posebej povedo način oziroma intenziteto njegovega izražanja v patološkem oziroma zdravem tkivu, skupaj pa dajo nekakšen pikčast vzorec, ki si ga lahko zamislimo kot 'prstni odtis' preučevanega fiziološkega stanja celice. Če z bioinformacijskimi posegi točke razvrstimo po funkcijskih vlogah, celičnem položaju ali strukturnih družinah genov, lahko celo pridobimo bolj izrazito podobo, ki neko fiziološko stanje razlikuje od nekega drugega stanja celice.

Onkogeneza

Vemo, da je v nastanek raka vpletenih večje število onkogenov in proti-onkogenov. Onkogeni se značilno povečano izražajo ali pa so njihovi proteinski produkti preveč aktivni, medtem ko je za proti-onkogene v malignosti značilno, da njihovo izražanje upade ali pa je celo odsotno. Preučevanje posameznih genov raka je redko pripeljalo do zadovoljivih spoznanj o mehanizmu nastajanja in napredovanja bolezni, saj so nam iz eksperimenta ušli številni drugi geni, ki so odgovorni, da celico privedejo v stanje, ko napake v onkogenih in odpovedi proti-onkogenov usodno posežejo v njeno fiziologijo.

Mikromreže v nasprotju s tem omogočajo vpogled v celovitost izražanja genov in lahko dajo informacijo o nagnjenosti k bolezni že v predrakastih stanjih, o obliki in stanju že nastale bolezni, kot tudi o težnjah oziroma oblikah njenega napredovanja. To so seveda želje, ki jih bo napredek v raziskavah iz funkcijske genomike morda že zelo kmalu udejanjil in mikromreže zdravniku lahko ponudil kot dobro diagnostično in prognostično orodje. Ker je rak sistemska in v veliki meri tudi individualna bolezen, bodo mikromreže verjetno posegle tudi na področje tako imenovane 'osebne medicine'. S preučevanjem sočasnosti in prepletenosti molekularnih dogodkov bomo morda že v bližnji prihodnosti lahko prepoznali molekularna križišča oziroma ključne igralce v onkogenezi in razvijali zdravila s tarčnim delovanjem nanje, brez nepotrebnih stranskih učinkov na druge proteine celice in organizma. Taka zdravila razvijajo že danes in jih poznamo kot 'biološka zdravila'.

Viri in literatura

1. M. Schena: *Microarray Analysis*. Wiley-Liss Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.
2. A.D. Baxevanis, B.F.F. Ouellette: *Bioinformatics*. Wiley-Interscience, New York, 2001.
3. F.Macdonald, C.H.J. Ford, A.G. Casson: *Molecular Biology of Cancer*. BIOS Scientific Publishers, London, New York, 2004.

METODE IN TEHNIKE DOLOČANJA MUTACIJ V MOLEKULARNI ONKOLOGIJI

Damjan Glavač

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Povzetek

Sekveniranje celotnega človeškega genoma in določitev genomske strukture večine od okoli 32000 genov je veliko pripomoglo k boljšemu razumevanju molekularnih osnov mnogih bolezni in pospešilo razvoj novih molekularno genetskih testov. Pri genetskih boleznih, kjer je bolezenski gen znan, je odkritje mutacije najbolj zanesljiva diagnostična metoda in osnovni pogoj za uspešno in učinkovito molekularno diagnostiko. Metode in tehnike za odkrivanje mutacij v bolezenskih genih delimo na raziskovalne in diagnostične. Raziskovalne so bolj zahtevne in bolj splošno uporabne, medtem ko so diagnostične pogostokrat razvite samo za določeno bolezen, določen gen ali skupino genov in omogočajo hitrejšo in natančno diagnostiko. Poleg tradicionalnih tehnik za diagnostiko, kot so citogenetske tehnike in tehnike, ki temeljijo na hibridizaciji DNA s posebnimi označevalci so se razvile nove, katerih osnova je pomnoževanje v verižni reakcija s polimerazo (PCR). To so predvsem analiza konformacij enoverižnih DNK (single stranded conformational polymorphism – SSCP), analiza heterodupleksov (heteroduplex analysis – HA), denaturacijska visokoločljivostna tekočinska kromatografija (DHPLC - Denaturing High Performance Liquid Chromatography) in metodologija TaqMan. Metoda hkratnega pomnoževanje od ligacije odvisnih sond (MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) omogoča odkrivanje odstopanja v številu kopij DNA. V zadnjih letih pa se je razvila predvsem tehnologija DNA mikromrež, ki omogoča hkratno analizo velikega števila genov s pomočjo hibridizacije označenih sond na vnaprej pripravljena analizna mesta na mreži. Najnovejša prizadevanja diagnostike gredo v smeri kombiniranja več tehnologij v enotnem miniaturiziranem sistemu za biološko in klinično analizo v t.i. "laboratoriju na čipu". Nove tehnologije bodo omogočile mnogo hitrejšo in predvsem natančnejšo opredelitev bolezni.

Genetske bolezni

Poznamo približno 6000 genetskih bolezni in okoli 1200 genov za katere so že razvili diagnostične metode odkrivanja mutacij v teh genih. Za molekularno

diagnostiko v onkologiji je še posebno pomembno ugotavljanje napak v približno 100 onkogenih in za tumorje zaviralnih genih. Za ugotavljanje večine mutacij teh genov pa praviloma ne moremo uporabiti samo ene metode ali tehnike. Mutacije, ki jih lahko pričakujemo v teh genih, so praviloma različnih velikostnih redov in zaenkrat ne poznamo ene same univerzalne metode za njihovo odkrivanje (Tabela 1).

Tabela 1 Velikost mutacije v odvisnosti od uporabljene metode za njeno določevanje

| Velikost mutacije | Vrsta mutacije | Metoda odkrivanja mutacij |
|-------------------------------------|--|--|
| < 1 bp | metilacija (5-metil-C > C) | MLPA, sekveniranje metiliranih citozinov |
| 1 bp | tranzicije, transverzije (A>G, C>T...) | SSCP, DHPLC, sekveniranje |
| 1–10 bp | delecija, insercija, podvajanje | SSCP, DHPLC, sekveniranje |
| 10–10 ² bp | delecije, insercije, inverzije, podvajanje | SSCP, DHPLC, sekveniranje |
| 10 ² –10 ³ bp | celotni ekson(i) ± intron(i) | SSCP, DHPLC, sekveniranje |
| 10 ³ –10 ⁵ bp | celotni gen | MLPA, citogenetske metode |
| 10 ⁶ –10 ⁷ bp | več sosednjih genov | citogenetske metode, Southern |
| 10 ⁷ –10 ⁸ bp | segmenti kromosoma/celotni kromosom | citogenetske metode |

Določanje mutacij in polimorfizmov

Mutacija pomeni vsako spremembo v zaporedju nukleotidov DNK, ki se praviloma izraža v bolezenskem fenotipu. Posledica mutacij so različni zapisi DNK pri določenem genu ali aleli. Če se alela homolognega genskega para razlikujeta, pravimo, da gre za heterozigotno stanje, če sta enaka, pa govorimo o homozigotu. Homozigotna stanja so povezana predvsem z genetskimi boleznimi, ki se dedujejo recesivno, heterozigotna stanja pa z boleznimi, ki se dedujejo dominantno. Prve mutacije in polimorfizme so ugotavljali z uporabo restrikcijskih nukleaz. Znanih je več kot 300 restrikcijskih endonukleaz, ki prepoznajo t. i. palindromska zaporedja na dvoverižni DNK in na takem mestu cepijo DNK. Uporabljajo se tudi pri metodi Southernovega prenosa s katerim analiziramo odseke DNK, ki so precej veliki, običajno več kot 1000 baznih parov, zato se metoda v diagnostiki uporablja predvsem za odkrivanje večjih okvar v genomu, tj. večjih delecij, insercij ali duplikacij. Metoda prenosa po Northernu je precej podobna, le da pri njej uporabimo RNK namesto DNK, metoda prenosa Western pa se uporablja za proteine. Metoda verižne reakcije s polimerazo osnovna metoda oz. prva stopnja molekularne diagnostike, saj omogoča pomnoževanje poljubnega odseka DNK, dolgega tudi do več 1000 baznih parov v zadostni množini (do 1 mikrograma), ki je potrebna za nadaljnje diagnostične postopke (na primer reakcijo z restrikcijsko endonukleazo, hibridizacijo, analizo mutacij s SSCP, analizo heterodupleksov ali drugo

metodo, dot-blot analizo ali sekvenčno reakcijo). Analiza konformacij enoverižnih DNK (single stranded conformational polymorphism – SSCP) in analiza heterodupleksov (heteroduplex analysis – HA) sta po pomnoževanju določene odseka DNK v verižni reakciji s polimerazo med najpogostejšimi tehnikami za odkrivanje napak v bolezenskih genih. Enoverižna DNK se v nedenaturacijski raztopini zvije v specifično sekundarno strukturo, odvisno od njenega zaporedja. Verige DNK, ki se ločijo celo za 1 nukleotid, lahko zavzamejo drugačno konformacijo – trodimenzionalno strukturo enoverižne DNK. Te razlike v strukturi lahko opazimo v različnem potovanju verig – konformacij po elektroforezi na poliakrilamidnem gelu v primerjavi s kontrolno DNK, brez mutacije. Njeni prednosti sta predvsem hitrost in nezapletenost, vendar pa ni stoodstotno občutljiva in jo je včasih težko interpretirati, še zlasti, kadar se pojavijo metastabilne konformacije. Podobna metoda je analiza heterodupleksov (heteroduplex analysis – HA) ki se pogosto uporablja v kombinaciji s SSCP, saj jo lahko izvajamo pri zelo podobnih pogojih elektroforeze. Heterodupleksi so dvoverižne strukture DNK, ki nastanejo po denaturaciji enoverižnih DNK, če obe verigi nista popolnoma enaki. Zlasti močne strukture heterodupleksov nastanejo pri manjših delecijah ali insercijah do 10 baznih parov, ki so pogoste pri mnogih onkogenih in za tumorje zaviralnih genih. Metoda denaturacijske visokoločljivostne tekočinske kromatografije (DHPLC - Denaturing High Performance Liquid Chromatography) temelji na zaznavanju sprememb DNK na podlagi nastanka in ločevanju heterodupleksov. Za razliko od SSCP je njena občutljivost skoraj 100%, ker je optimalne pogoje analize heterodupleksov mogoče zelo natančno napovedati. Metoda hkratnega pomnoževanje od ligacije odvisnih sond (MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) omogoča odkrivanje odstopanja v številu kopij DNA in je primerna predvsem za določanje delecij in duplikacij, ki jih je z drugimi metodami težko določiti. Metoda TaqMan je novejša metoda, primerna za zelo hitro in natančno genotipizacijo velikega števila vzorcev, obenem pa na osnovi sledenja PCR v realnem času omogoča tudi natančno kvantifikacijo izražanja genov. Metodo TaqMan odlikuje predvsem visoka občutljivost in specifičnost, odsotnost "post-PCR" korakov, zmanjšano tveganje kontaminacije s prenosom, zmožnost obdelave velikega števila vzorcev, kratek čas analize in skoraj popolna avtomatizacija. Edina metoda, s katero neposredno dokažemo mesto mutacije, je določevanje nukleotidnega zaporedja oziroma sekvenčna analiza. Kljub pomembnemu napredku v zadnjih letih zaradi avtomatizacije in hitrosti izvedbe ter neradioaktivnim postopkom je metoda še vedno precej draga in zamudna, zato se v molekularni diagnostiki običajno uporablja v zadnji stopnji, ko je treba vzorec DNK, v katerem smo odkrili mutacijo z drugimi metodami, potrditi oziroma točno določiti mesto okvare. DNK-mikromreže (DNA microarrays) omogočajo analizo celotnega genoma. Hibridizacije potekajo na t. i. DNK-čipih z visoko ločljivostjo. Ločimo DNK-mikromreže, s katerimi ugotavljamo razlike v izražanju posameznih genov, in DNK-mikromreže, s katerimi določamo polimorfizme in mutacije v posameznih genih ali skupini genov.

Viri in literatura

1. Glavač D, Dean M., Application of Heteroduplex Analysis for Mutation Detection in Disease Genes, *Human Mutation* 1995; 6: 281-287.
2. Pfeifer GP, ed. Technologies for detection of DNA damage and mutations, New York : Plenum press, 1996: 241-251.
3. Cotton RGH, Edkins E, Forrest S. Eds. Mutation detection, Oxford: Oxford University Press, 1998.

MUTATION ANALYSIS IN FAMILIAL BREAST CANCER PATIENTS

Erik Teugeles, Jacques De Grève

Free University of Brussels

Abstract: Using a combination of three complementary screening techniques we investigated 186 Slovenian families with 2 or more cases of breast/ovarian cancer and found a cancer predisposing mutation in 57 families (30%). When considering families with more than 4 breast cancer cases or with at least one ovarian tumour, the mutation recovery rate rises to 50%. The BRCA1/2 mutations found in the Slovene population are distributed over the whole length of both genes but because of the high incidence of a few of these mutations, a restricted molecular screening covering only four DNA fragments can identify two third of them. A limited screen can thus be offered to persons that do not meet the strict intake criteria. Finally, since the genetic cancer predisposing factor seems to be missed in a significant fraction of the families (50% of Slovenian families), efforts are made worldwide (1) to ameliorate the screening efficiency of the BRCA1/2 genes and (2) to identify other breast cancer predisposing genes.

Breast cancer is a very common disease affecting some 10% of western women. Although the disease occurs mostly in the sporadic form, familial clustering is observed in about 10% of the cases. Linkage analyses performed in the early nineties, aimed to identify the chromosomal regions involved in this genetic cancer predisposition, indicated that 2 loci located at 17q21 and 13q12 must be responsible for the disease in 80% of high risk families. Two breast cancer predisposing genes, BRCA1 and BRCA2, were identified respectively in 1994 and 1995. From that moment on, molecular analyses of the BRCA1 and BRCA2 genes became possible, and knowing the disease causing mutation in a particular family became a very important tool for the counselling of this family.

BRCA1 and BRCA2 are very large genes organized in respectively 23 and 27 exons. Moreover, it became rapidly clear that the identified mutations are distributed over the whole length of the coding sequences. Mutation screening thus appeared to be a time and money consuming enterprise and the need for selective intake criteria was obvious. Today, mutation analysis of the full coding sequence of BRCA1 and BRCA2 can be offered by the majority of the genetic diagnostic laboratories, although the used screening techniques may vary somehow.

In our laboratory (VUB Brussels) we use a combination of 3 different techniques to screen the BRCA1/2 genes. The analyses are performed on genomic DNA prepared from blood samples of cancer affected persons.

The Protein Truncation Test (PTT) is applied for the analysis of the few large exons. Genomic stretches of DNA obtained by PCR are used *IN VITRO* to generate the corresponding protein sequences. These proteins are subsequently analysed on a polyacrylamide gel. A control person (with wild type DNA sequences) will generate a protein with a specific length. However, a patient carrying a nonsense or frameshift mutation in one allele will in addition show a second band on a protein gel, the smallest one corresponding to the mutant form. The advantage of the PTT technique is that it is less time consuming, can be applied on relatively large PCR fragments (and thus convenient for the analysis of large exons), and all identified mutations can be classified as cancer predisposing since they generate truncated proteins. Disadvantage is that we miss the missense mutations. However, this is not seen as very disturbing since only very few missense mutations can be classified as cancer predisposing at this moment. The majority of them are benign polymorphisms or are reported as "unclassified variants" and thus non-informative for clinical purposes.

The Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) is used to analyse all the remaining protein encoding small exons (57 in total). PCR fragments are first generated for each of these exons. The fragments are then heat denatured and renatured. When performed on a control sample (both alleles being identical and wild type), this will generate only one type of double stranded DNA molecules. However, heterozygous mutation carriers will generate 4 different types of DNA duplexes: 2 homoduplexes and 2 heteroduplexes. These 4 duplex molecules have each a specific temperature at which the DNA strands will separate. When loaded and run on a polyacrylamide gel in which an increasing denaturing gradient has been build up, fragments will migrate until they reach a position in the gel where the DNA strands will separate. Since a 40 base pair long sequence with high GC content (the GC clamp) was added artificially at one end of the PCR fragment (via a modified PCR primer), the DNA strands will not totally separate but remain attached at one extremity. This will result in the generation of a conformation that prevents further migration through the gel. Heterozygous mutant samples will thus show 4 bands after gel migration, control samples only one. The DGGE method works well on 200-300 base pair long DNA fragments, and is thus adequate for the analysis of small exons. In contrast to the PTT method, DGGE picks up the missense mutations, but since most of them are benign polymorphisms, many "false positives" will be identified.

The two techniques presented here above are able to detect mutations affecting only one or a few nucleotides (missense, nonsense, insertions or deletions a few nucleotides long). However, more recently several groups reported deletions or duplications involving one or several consecutive exons. These mutations are probably generated when a recombination occurs between mis-

aligned sequences. Since the intronic sequences of BRCA1 are very rich in repetitive elements (e.g. Alu repeat), misalignments and subsequent recombinations can be expected and are indeed observed. Such mutations are almost not encountered in the BRCA2 gene. In the past, mutations involving large stretches of DNA could be identified using time consuming techniques such as Southern blots, but recently a new approach was developed (MLPA) that is currently used for the routine screen of BRCA1.

We applied the BRCA genetic analysis on 186 Slovene families, and a cancer predisposing mutation was detected in 57 of them. Although the mutations were dispersed over the whole length of the BRCA1 and BRCA2 coding sequences, 5 distinct mutations occurred very frequently in the population. This clustering has very important consequences for the genetic screen. Indeed, since the analysis of only 4 PCR fragments led to the identification of the cancer predisposing mutations in 39 of the 57 BRCA1/2 positive Slovene families (68%), the genetic screen will always be initiated at these 4 particular DNA regions. Moreover, persons or families who do not strictly meet the including criteria for the genetic screen can be submitted to a restricted analysis (e.g. women with bilateral breast cancer or women who developed breast and ovarian cancer). A population based study can eventually be performed on the Slovene population to estimate the frequency of BRCA mutations in isolated breast cancer patients (male or female).

One of the mutations frequently occurring in the Slovene population (IVS16-2A>G) was found exclusively in Slovenia or at the Slovenian border in Italy, while 2 other recurrent mutations (1806C>T and 5382insC) have been encountered in many other countries. Very unexpected is the frequent occurrence of cancer predisposing missense mutations affecting one of the conserved residues that define the RING finger motif located near the protein NH₂ terminus (encoded by exon3 and exon5 of BRCA1).

In breast cancer only families (no cases of ovarian cancer) with 5 or more cancer patients we could identify a BRCA1/2 mutation in about 50% of the families. When less breast cancer cases occurred in the family, the mutation recovery rate also decreases (e.g. only 12% in families with 2 breast cancer cases). A possible explanation for this observation is the occurrence of several sporadic breast cancers within a same family. A similar decrease of the recovery rate is not observed however in families with breast and ovarian cancer. In those families the mutation recovery rate is 50% independently of the number of cancer affected relatives, confirming the hereditary nature of the disease even in families with a restricted number of cancer patients. Since the highest observed mutation recovery rate in Slovene families is 50% even in those families with a high number of affected relatives (and with ovarian cancer), we may suppose that a whole set of cancer predisposing mutations escape to our attention. At least part of them might be located in BRCA1 and/or BRCA2 but are not detectable with the currently used screening techniques (e.g. mutations located in the promoter region or within intronic

sequences distal from the intron/exon junctions). Mutations located in other genes can also be responsible for the frequent occurrence of breast (and ovarian) cancer in a fraction of the families. However such genes, with a clear dominant cancer predisposing phenotype comparable to what is observed with BRCA1 or BRCA2 mutations, have not been reported yet.

References

1. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M and the Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 1998; 62:676-89.
2. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu
3. Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266:66-71.
4. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N,
5. Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995;378:789-92.
6. Krajc M, De Greve J, Goelen G, Teugels E. BRCA2 founder mutation in Slovenian breast cancer families. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:879-82.
7. Teugels E, De Brakeleer S, Goelen G, Lissens W, Sermijn E, De Greve J. De novo Alu element insertions targeted to a sequence common to the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 2005; 26:284.

ONKOLOŠKO GENETSKO SVETOVANJE

Janez Žgajnar

Onkološki inštitut Ljubljana

Uvod

Onkološko genetsko svetovanje je področje, ki doživlja izjemen razvoj. S pomočjo biotehnologije vedno podrobneje spoznavamo vzroke za razvoj rakov, med katerimi so mnogi dedni. V pričujočem prispevku so predstavljena načela onkološkega genetskega svetovanja.

Osnove onkološkega genetskega svetovanja

Rak je bolezen, ki ima svoj vzrok v mutaciji ali mutacijah DNK (deoksiribonukleinska kislina), zaradi katerih se celice nenadzorovano delijo in postanejo nesmrtno. Večinoma gre za mutacije, ki se v celici kopičijo ščasoma v toku življenja. Ob kombinaciji ravnopravnih mutacij celica postane maligna. Takim rakom pravimo **sporadični** raki.

Pri okoli 10% bolnikov z rakom ugotavljamo kopičenje istih vrst raka v družini, bolniki zbolevaro mlajši od povprečja za posameznega raka, pogostejši so bilateralni raki parnih organov. Takim rakom pravimo **familiarni** raki. Sumimo lahko, da je vzrok za tak vzorec zbolevarja deden. Familiarni raki, za katere poznamo gen (ali gene), ki mutirani privedejo do bolezni, pa se imenujejo **dedni** raki. Familiarni in dedni raki so predmet Onkološkega genetskega svetovanja.

Za onkološko genetsko svetovanje veljajo enaka pravila kot za genetsko svetovanje nasploh. Genetsko svetovanje je definirano kot »proces komunikacije, ki se ukvarja s človekovimi stiskami povezanimi s pojavljanjem (ali ogroženo-stjo) genetske napake v družini«. V tem procesu sodeluje eden, ali več, za to usposobljenih ljudi, ki imajo za nalogo:

1. razložiti vse medicinske vidike obravnavane genetske napake (diagnostika, verjeten potek bolezni in možnosti zdravljenja)
2. razložiti vpliv dedovanja na pojav bolezni in ogroženost družinskih članov
3. predstaviti vse vrste razpoložljivih ukrepov v soočanju s povečano ogroženostjo
4. izbrati ukrepe, ki so najprimernejši, upoštevaje stopnjo ogroženosti, življenjske cilje družine, etična in verska načela družine.
5. Najbolje prikrožiti izbiro ukrepov za vsakega člana družine posebej

Načela, ki jih moramo pri genetskem svetovanju upoštevati so:

1. sodelovanje ogroženih oseb je prostovoljno
2. nujen je podpis soglasja
3. svetovalec ne sme vsiljevati ukrepov kadar ni dokazov, da je ena izbira boljša od druge.
4. upoštevanje psihosocialnih in čustvenih vidikov soočanja z dedno ogroženostjo
5. zaupnost

Namen onkološkega genetskega svetovanja je poiskati posameznike in družine, kjer bi bil vzrok za pogosto zbolevanje za nekaterimi raki lahko deden in jim svetovati najprimernejše ukrepe. Z ukrepi želimo zmanjšati zbolevanje in/ali umrljivost za rakom, ter olajšati življenjsko stisko oseb iz ogroženih družin.

Onkološko genetsko svetovanje ima več stopenj:

1. ocena verjetnosti dednega raka.

Ocena temelji na natančni družinski anamnezi. Zbrati moramo čimveč podatkov o vseh boleznih v družini (vsaj za prvi dve koleni) in biti pozorni na: histološko diagnozo, starost ob pojavu bolezni, bilateralnost ali multiple rake. Histološke diagnoze zbolelih sorodnikov moramo preveriti. Pomembni so tudi podatki o zdravih članih družine. Pri oceni ogroženosti za nekatere rake (dojka, široko črevo) so nam na voljo matematični modeli, s katerimi izračunamo verjetnost mutacije v družini in verjetnost, da bo preiskovana oseba v svojem življenju zbolela za določenim rakom.

Če je verjetnost, da je zbolovanje za rakom (ali raki) v družini posledica mutacije znanega gena dovolj visoka, svetujemo genetsko testiranje

2. genetsko testiranje

Danes poznamo številne gene, katerih mutacije povzročajo rake. Genetsko testiranje svetujemo takrat, ko je verjetnost mutacije pri preiskovani osebi vsaj 10%. Pri avtosomnem dedovanju testiramo najprej, če je le mogoče, že zbolelega člana družine; verjetnost, da bomo našli mutacijo je tako kar dvakrat višja, kot če bi testirali npr. sorodnika v prvem kolenu .

Pri razlagi rezultata genetskega testiranja moramo upoštevati

- **analitsko zanesljivost testa**

Izvid testiranja je odvisen od natančnosti testa in kako skrbno je bil izveden

- **klinični pomen testa**

Pomeni verjetnost, da bo preiskovana oseba, kjer smo našli mutacijo, zbolela za določenim rakom. Odvisna je ne samo od najdene mutacije, temveč tudi od vrste mutacije in okolja iz katerega oseba izhaja. Slednje lahko vpliva na penetranco mutacije (penetranca pomeni verjetnost, da se

lastnost zapisana v genih, izrazi), zato je lahko pomen mutacije v različnih okoljih različen. Oboje govori, kako pomembno je opraviti raziskave v vsakem okolju posebej (tudi v Sloveniji).

- **klinična uporabnost test**

Zanima nas, kakšno korist bo imel nosilec mutacije, če se odloči za predlagane ukrepe. Ukrepe, ki jih predlagamo nosilcem mutacij, lahko razdelimo v tri skupine

- **Presejanje (skrining).**

Namen je s pogostimi kontrolami odkrivati čim zgodnejše stadije bolezni

- **Ukrepi za zmanjševanje ogroženosti**

- **Ukrepi za dvig kakovosti življenja**

3. svetovanje pri nedednem raku

Kot smo že omenili, pogosto najdemo družine, ki so močno ogrožene za nekatere rake, z genetskim testiranjem pa mutacije ne najdemo. Razlogov za večjo ogroženost je lahko več (še neznan gen, nizka penetranca mutacije, multifaktorsko dedovanje, okolje..) Ne glede na negativen izvid testiranja tudi tem družinam predlagamo ukrepe, največkrat pogoste kontrole.

DEDNI RAK DOJK IN JAJČNIKOV

Janez Žgajnar, Mateja Krajc, Nikola Bešič, Marko Hočevar, Cvetka Bilban Jakopin, Katarina Lokar, Srdjan Novaković, Vida Stegel, Miljeva Rener, Aleš Vakselj

Onkološki inštitut Ljubljana

Enako kot za druge rake, tudi za rak dojk in jajčnikov velja, da jih je velika večina sporadičnih in le okoli 5 % dednih. **Dedni raki dojk** so večinoma posledica mutacij genov BRCA1 in BRCA 2 in le redko drugih genov v sklopu nekaterih sindromov (Li-Fraumeni- mutiran p53, Cowden – mutiran PTEN, Muir-Torre- mutirana MSH2, MLH1, Peutz-Jeghorsk, ataxia –teleangiectasia). **Dedni raki jajčnikov** so v 90% posledica mutacij BRCA1 in BRCA 2, v približno 10% rakov pa so v sklopu HNPCC –mutirana gena hMLH1 ali hMSH2. Dednega raka dojk ne moremo obravnavati ločeno od dednega raka raka jajčnikov, ker so vzrok za obe bolezni v večini primerov mutacije istih genov, BRCA 1 in BRCA 2. Gena BRCA 1 (BREAST CANCER) in BRCA 2 so odkrili sredi 90 let v družinah s kopičenjem raka dojk in jajčnikov. Prvo odkriti je dobil ime BRCA 1 (leži na 17 kromosomu) ter drugo odkriti BRCA 2 (leži na 13 kromosomu). Spadata med t.i. tumorske zaviralce (angleško »tumor supressor gene). Za oba gena je značilno, da sta zelo velika in da imata po več področij z repetitivnimi (ponavljajočimi) sekvencami; zaradi obojega je genetsko testiranje tehnično zelo zahtevna naloga.

Posledice mutacij genov BRCA1 in BRCA 2 so pogostejše zbolevanje za nekaterimi raki pri nosilcih teh okvar. Verjetnost, da bo ženska, nosilka take okvare, v svojem življenju zbolela za rakom dojk, je kar med 40-80% (sicer med 6-10%); zelo velika je tudi verjetnost, da bo zbolela za rakom jajčnikov in sicer med 20-40% (sicer med 1-2%). Zapisane številke so zgolj orientacijske; pomembno je namreč, kateri od obeh genov je mutiran in za katero mutacijo gre. Pri mutacijah gena BRCA 1 je ogroženost za rak dojk in jajčnikov bližje zgornjim vrednostim, pri BRCA 2 pa, vsaj za rak jajčnikov, spodnjim. (Ogroženost za raka jajčnikov pri nosilkah mutacij BRCA 2 je višja, če mutacija leži na t.i. »ovarian cluster region«) Nosilke mutacij gena BRCA 1 zbolevalo v povprečju mlajše kot nosilke mutacij BRCA 2.

Mutacija BRCA 2 močno poveča ogroženost za rak dojk tudi pri moških. Rak dojk je med moškimi sicer zelo redka bolezen in predstavlja manj kot 1% rakov dojk. Med nosilci mutacije BRCA 2 pa jih zbolijo tudi do 15%.

Zelo je pomembna tudi vrsta mutacije in kje na genu je do nje prišlo. Ogroženost za zbolevanjem (penetranca) je lahko mnogo nižja, kot na primer pri mutaciji gena BRCA2 odkriti med Islandci, kjer je za rak dojk pri ženskah le okoli 40 %.

V nekaterih zaključenih in zaprtih skupinah ljudi (narodnostnih ali zemljepisnih), se pojavljajo za to skupino tipične mutacije. Take mutacije so našli pri številnih narodih, na primer pri Judih, Islandcih, Nizozemcih in - kot kaže - tudi v Sloveniji. To genetsko testiranje močno poenostavi in tudi poceni.

V družinah, v katerih je mutacija navzoča, najdemo kopičenje bolezni, sorodniki zbolevaro v mlajših letih, več je tudi primerov, ko se bolezen pojavi na obeh dojkah. Raki dojk pri nosilkah mutacij BRCA 1 so v povprečju bolj maligni (visoka malignostna stopnja, negativni estrogenski receptorji, negativni progesteronski receptorji, negativen Her-2- po genskem podpisu sodijo med »basal type« rake dojk), kar pa ne drži za BRCA 2.

Mutacije genov BRCA 1 in BRCA 2 so povezane z večjo ogroženostjo tudi za nekatere druge rake. Pri nosilcih mutacij gena BRCA 1 je ogroženost za raka širokega črevesa 2 krat večja kot pri nenosilcih. Mutacija gena BRCA 2 je povezana s kar 7 krat večjo ogroženostjo za raka prostate pri moških. Mutacija BRCA2 povezana tudi z povečano ogroženostjo za raka trebušne slinavke, želodca in melanomom.

Gledano s strogimi genetskimi merili se bolezen prenaša avtosomno recesivno, glede na visoko verjetnost zbolevanja nosilcev mutacij pa govorimo kar o avtosomno dominantnem načinu dedovanja.

Ukrepi pri nosilcih mutacij BRCA 1 ali BRCA2

Na voljo je več različnih ukrepov, ki pa imajo vsi pomankljivosti. O vseh možnostih se z nosilcem mutacij BRCA 1 ali BRCA 2 natančno pogovorimo. Prizadeti osebi prepustimo izbiro, ki ji najbolj ustreza.

1. Pogoste redne kontrole

Dojka:

- redno mesečno samopregledovanje (10. dan od začetka zadnje menstruacije) od 18 leta naprej
- klinični pregled vsakih 6 mesecev od 25 leta naprej
- mamografija 1x letno od 25-35 leta naprej
- ultrazvok 1x letno od 25-35 leta naprej
- magnetna resonanca dojk

Namen pogostih kontrol je odkriti bolezen čimbolj zgodaj. V oporo so nam podatki nekaterih raziskav, ki kažejo, da aktivno mamografsko presejanje za rak dojk lahko zmanjša smrtnost za to boleznijo tudi do 30%. Ti izzidi seveda ne veljajo samoumevno tudi za nosilce mutacij genov BRCA 1 ali BRCA2. V zadnjem času se kot rutinska preiskava vse bolj uveljavlja magnetna resonanca, ki je v primerjavi z ostalimi slikovnimi preiskavami mnogo bolj občutljiva preiskava pri tej skupini žensk

Jajčnik:

- klinični pregled 1x letno od 30-35 leta naprej
- transvaginalni ultrazvok 1x letno od 30-35 leta naprej
- CA 125 1x letno od 30-35 leta naprej

Uspešnost zgodnjega odkrivanja raka jajčnikov je manj prepričljiva, kljub temu pa ostaja ena od možnih izbir.

2. Preprečevanje nastanka bolezni z zdravili (Kemopreventiva)

Nekatere raziskave so namreč dokazale uspešno preprečevanje raka dojk pri določenih skupinah žensk z uporabo zdravil, t.i. selektivnimi blokatorji hormonskih receptorjev. Zanesljivih podatkov o ospešnosti te strategije ni, zato danes kemopreventivo pri nosilcih mutacij genov BRCA 1 ali BRCA 2 lahko predlagamo le okviru kliničnih raziskav.

Vse kaže, da uporaba oralne kontracepcije pri nosilkah mutacij BRCA 1 in BRCA 2 zniža ogroženost za rakom jajčnikov. Sporna ostaja uporaba hormonskega nadomestnega zdravljenja po opravljeni profilaktični ovariectomiji pri mladih ženskah.

3. Kirurški posegi

Dojka

- Odstranitev obeh dojk
- Obojestranska odstranitev dojk s takojšnjo rekonstrukcijo (z umetnimi vsadki ali z lastnim tkivom - reznji)
- Obojestranska podkožna odstranitev dojk z ohranitvijo bradavice in kožnega kolobarja in takojšnja rekonstrukcija

Najuspešnejši, in obenem najnasilnejši način zmanjševanja ogroženosti za rak dojk je kirurški poseg. Odstranitev obeh dojk (profilaktična mastektomija) zmanjša verjetnost za rak dojk za približno 85-90%. Odstranitev obeh dojk je, kljub morebitni rekonstrukciji, zelo nasilen poseg v celovitost ženske s hudimi psihičnimi posledicami. Število žensk, ki se odloči za tak poseg je zelo odvisno od okolja, v katerem živijo. Še pred nekaj leti se je v Evropi, v nasprotju z ZDA, za to možnost odločilo zelo malo žensk. V zadnjih letih pa je število teh posegov tudi v Evropi (in Sloveniji) vedno večje. Ker je odločitev za odstranitev obeh dojk težka mora imeti ženska za premislek na voljo vsaj pol leta časa ali več.

Jajčnik

- Kirurška odstranitev jajčnikov z jajcevodi

Daleč najuspešnejša metoda preprečevanja raka jajčnikov je odstranitev jajčnikov skupaj z jajcevodi (ogroženost zmanjša za 98%). Odločitev za ta poseg je lažja kot to velja za dojke, čeprav še vedno ne lahka. Ker gre

večinoma za mlade ženske, s tem posegom povzročimo predčasno menopavzo in z njo povezane težave. Kljub temu smo mnenja, da velja premisliti o tem posegu kmalu po tem, ko si ženska ustvari družino. Z odstranitvijo jajčnikov se zmanjša tudi ogroženost za raka dojke za približno 50%. Zanimivo je, da se ogroženost zmanjša tudi pri nosilkah BRCA 1 mutacij, pri katerih so tumorji hormonsko neodvisni – pojav še ni pojasnjen, odpira pa številna vprašanja biologije tumorjev.

Viri in literatura

1. American society of Clinical Oncology policy statement update: Genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2003; 21:2397-2406
2. Ang P, Garber JE. Genetic susceptibility for breast cancer—risk assessment and counseling. *Semin Oncol* 2001; 28(4):419-433.
3. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposing syndromes. *J Clin Oncol* 2005; 23 (2) :276-292
4. Hodgson SV and Maher ER, ed. A practical guide to Human cancer genetics, 2th ed. Cambridge: Cambridge university press, 1999
5. Kriege M, Brekelmans CT, Boetes C et al. Efficacy of MRI in mammography for breast cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *NEJM* 2004; 351 : 427-437
6. Mahowald MB et al, ed. Genetics in the clinic, St. Louis, Mosby, Inc., 2001
7. Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten WL et al. Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with BRCA 1 or BRCA 2 mutation. *NEJM* 2001; 345: 159-164
8. Narod S, Offit K. Prevention and management of hereditary breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(8): 1656-1663
9. Prat J, Ribe A, Gillardo A. Hereditary ovarian cancer. *Human Pathology* 2005; 36: 861-870.
10. Spletna stran National Cancer Institute

POTEK GENETSKEGA SVETOVANJA IN TESTIRANJA NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA

Katarina Lokar, Janez Žgajnar, Mateja Krajc, Nikola Bešić,
Marko Hočevnar, Cvetka Bilban Jakopin, Srdjan Novaković,
Vida Stegel, Miljeva Renner, Aleš Vakselj

Onkološki inštitut Ljubljana

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana smo začeli v februarju 2001 z genetskim svetovanjem za dedni rak dojke in jajčnikov. Postopoma smo oz. širimo dejavnost še na druge oblike dednega raka. Dejavnost izvaja multidisciplinarni tim, ki ga sestavljajo zdravniki različnih specialnosti (kirurg, radioterapevt, ginekolog, rentgenolog, psihiater, itd.), medicinska sestra, molekularni biolog, psiholog.

Prvi stik pacienta z Ambulanto za onkološko genetsko svetovanje je največkrat po telefonu. K nam jih napatijo onkologi, ginekologi, osebni zdravniki, Centri za bolezni dojke, družinski člani pri katerih je bila ugotovljena mutacija, zelo pogosto pa se ljudje obrnejo na nas sami, ko zasledijo informacije o naši ambulanti v medijih. Medicinska sestra v prvem pogovoru pacientu na kratko razloži potek genetskega svetovanja ter mu pošlje vprašalnik za zbiranje družinskih podatkov (rodovnik) in informativno gradivo. Ko pacient vrne izpolnjen vprašalnik, sledi nadaljnja obravnava pacienta/družine.

Pred genetskim svetovanjem medicinska sestra iz poslanih podatkov nariše rodovnik, po dogovorjenih metodah oceni ali so izpolnjeni kriteriji za genetsko svetovanje, naredi oceno tveganja za nastanek bolezni in oceno verjetnosti mutacije v družini. Ko so vsi družinski podatki zbrani in analizirani, medicinska sestra predstavi družino ostalim članom multidisciplinarnega tima na rednih mesečnih sestankih. Medicinska sestra informira člane tima tudi o manjkajočih ali nezanesljivih podatkih, o posebnostih družine ter o željah pacienta glede svetovanja in testiranja. Glede na vse zgoraj navedeno se tim dogovori ali je smiselno povabiti pacienta v ambulanto, ali je smiselno opraviti genetsko testiranje ter katere preventivne ukrepe oziroma program kontrol bi pacientu priporočili glede na ocenjeno tveganje za nastanek bolezni in verjetnosti mutacije. Pacientom, ki ne izpolnjujejo kriterijev za genetsko svetovanje, pošljemo priporočila z obrazložitvijo, ostale povabimo v ambulanto na genetsko svetovanje.

Na onkološkem genetskem svetovanju poteka s pacientom razgovor o dejavnih tveganja za nastanek raka, o genih in dednem raku, o poteku in rezultatih genskega testiranja, o zanesljivosti in omejitvah testov, o koristih in tveganjih testiranja, o možnih ukrepih ob večji ogroženosti, o zaupnosti in zaščiti podat-

kov ter o prostovoljnosti testiranja. V primeru, ko ne obstaja verjetnost dednega sindroma v družini (kar je bilo ugotovljeno na timskem sestanku) pacientu testiranja ne ponudimo. Za pacienta izdelamo program kontrol glede na njegovo/njeno ogroženost. Sledenje pacienta/družine je s tem zaključeno oz. se stik ponovno vzpostavi ob spremembah v družini (pojav novega raka).

V primeru verjetnosti dednega sindroma, pacientu oz. drugemu, bolj primernemu družinskemu članu, ponudimo gensko testiranje. Če pacient zavrne testiranje, mu izdelamo program kontrolnih pregledov za nosilce mutacije. Sledenje pacienta/družine je s tem zaključeno oz. se stik ponovno vzpostavi na željo pacienta. Če se pacient odloči za testiranje, pred odvzemom krvi podpiše informirano soglasje.

Nadaljni ukrepi so odvisni od rezultata testa in od želja pacienta. Negativnemu izvidu (ni mutacije) sledi sporočanje rezultata, po-testno svetovanje in izdelava programa kontrolnih pregledov. Sledenje pacienta/družine je zaključeno oz. je odvisno od potreb pacienta/družine. Pozitivnem testu (mutaciji) sledi sporočanje rezultata, po-testno svetovanje, izdelava programa kontrolnih pregledov in preventivnih ukrepov, testiranje sorodnikov, po potrebi pogovor s psihologom, psihiatrom ter letni obiski ambulate za onkološko genetsko svetovanje.

GENETSKO SVETOVANJE IN TESTIRANJE PRI SLOVENSКИH DRUŽINAH Z RAKOM DOJK IN/ALI JAJČNIKOV

Mateja Krajc¹, Janez Žgajnar¹, Nikola Bešić¹, Marko Hočevar¹,
Cvetka Bilban Jakopin¹, Katarina Lokar¹, Srdjan Novaković¹,
Vida Stegel¹, Miljeva Rener¹, Aleš Vakselj¹, Erik Teugeles²,
Jacques De Grève²

¹ Onkološki inštitut Ljubljana

² Free University of Brussels

Uvod

V začetku leta 2001 smo na Onkološkem inštitutu v Ljubljani pričeli z rutinskim onkološkim genetskim svetovanjem in testiranjem osebam oz. družinam, pri katerih sumimo, da gre za dedno obliko raka. Pri veliki večini oseb, ki so obiskale to ambulantno, je šlo za sum, da gre za dedno obliko raka dojke in jajčnikov. Omenjeni vrsti raka predstavljata poleg raka širokega črevesa in danke najpogostejšo vrsto dednega raka. V prispevku bomo opisali svoje izkušnje z onkološkim genetskim svetovanjem in testiranjem pri dednem raku dojke in/ali jajčnikov.

Namen

Dedni rak dojke in/ali jajčnikov večinoma povzročata mutirana tumorska supresorska gena *BRCA1* in *BRCA2*. Ogroženost za nastanek raka dojke je pri nosilcih mutiranih genov *BRCA1/2* (pri slednjem tudi pri moških) zelo velika, saj do 70. leta starosti znaša 60–80 odstotkov. Ob tem je treba poudariti, da je splošna, doživljenjska ogroženost žensk za nastanek raka dojke v Sloveniji 5,5 %. Tudi ogroženost za nastanek raka jajčnikov je pri nosilkah mutacij večja in znaša 30–40 odstotkov pri mutaciji gena *BRCA1* (do 70. leta starosti) in 20 odstotkov pri mutaciji gena *BRCA2*. Mutacije omenjenih genov so povezane tudi z večjo ogroženostjo za nastanek nekaterih drugih vrst raka; gen *BRCA1* povezujemo z nastankom raka širokega črevesa, *BRCA2* pa z nastankom raka trebušne slinavke, ustne votline, želodca in prostate. Od prve identifikacije in kloniranja obeh genov so znanstveniki vpisali v bazo podatkov BIC (Breast Cancer Information Core) že več kot 3700 različnih predispozirajočih mutacij, ki se pojavljajo po vsej dolžini obeh genov. Največkrat se določen tip mutacije pojavlja le v neki družini. Pri nekaterih skupinah ljudi pa se specifična mutacija lahko pojavlja večkrat v različnih družinah. Imenujemo jo mutacija founder. Do sedaj so jo največkrat odkrili pri aškenazi Judih, Islandcih in Nizozemcih. Ta mutacija zelo

poenostavi in poceni genetsko testiranje, kadar je v neki populaciji dovolj pogosta.

Naš namen je identifikacija ogroženih družin in ugotavljanje pogostnosti in tipa mutacij, ki se pojavljajo pri slovenski populaciji ter svetovanje o možnih preventivnih ukrepih pri posameznikih.

Materiali in metode

Indikacije za napotitev žensk v Ambulanto za onkološko genetsko svetovanje so naslednje: vsaj dve sorodnici v prvem/drugem kolenu, ki sta imeli raka na dojkah/jajčnikih, kadar gre za rak dojke pred 40. letom, bilateralni rak dojke ali rak dojke in jajčnikov pri isti bolnici, moški z rakom dojke. Testiranje smo po predhodnjem svetovanju in pisnem soglasju udeležencev opravili pri vseh družinah, kjer smo ugotavljali več kot 10 % verjetnost, da bomo mutacijo našli. Za računanje ogroženosti uporabljamo tudi računalniška programa BRCAPRO® in Myriad®. Ocena ogroženosti se ugotavlja za vsako družino posebej in sicer v okviru multidisciplinarnega tima, ki ga sestavljajo medicinska sestra, psiholog in zdravniki različnih specialnosti: onkološki kirurg, radioterapevt, ginekolog, radiolog, medicinski genetik in genetski svetovalec.

Analizo mutacij na genih *BRCA1/2* izvajamo z različnimi presejalnimi testi v Laboratoriju Medicinske genetike, Oddelka za onkologijo na Svobodni univerzi v Bruslju (Vrije Universiteit Brussel). Tako uporabljamo na velikih eksonih obeh genov (ekson 11 na *BRCA1* in eksona 10 in 11 na *BRCA2*) PTT – test (Protein Truncation Test), druge manjše eksone obeh genov in konca 5' in 3' velikih eksonov pa analiziramo s DGGE – testom (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Dobljene PCR fragmente nato analiziramo na sekvencionerju (ALF express automatic sequencer – Pharmacia). Vzorce, ki pokažejo ne-normalne vrhove (mutacija ali polimorfizem), pozneje sekvencioniramo (Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit – USB) in ugotavljamo tip mutacij. Mutacijo founder pa testiramo s hitro metodo za ugotavljanje ponavljajoče se mutacije, ki temelji na PCR. Uporabljamo poseben modificiran primer, ki ustvari specifično restriksijsko mesto v divjem tipu fragmenta, ne pa v mutiranem PCR-fragmentu.

Rezultati

Od oktobra 1999 do maja 2005 je bilo preko specialistov različnih specialnosti v našo ambulanto napotenih 371 bolnikov in njihovih svojcev (341 žensk in 30 moških). Vsi so pred prvim obiskom dobili osnovno informacijo o svetovanju in testiranju ter izpolnili vprašalnik o družinski obremenjenosti. Kriterijem za genetsko testiranje ali presejanje je zadostilo 217 pacientov iz 153 družin. Pet posameznikov (štiri ženske in en moški), ki so izpolnjevali pogoje za testiranje se ni odločilo za test. Testiranje smo tako opravili pri 212 posameznikih iz 148 družin.

Diagnosticirali smo 67 nosilcev mutacij (59 žensk in 8 moških) iz 40 družin (Tabela 1). *BRCA 1* mutacijo smo našli pri 40/148 (27.0%) družinah in pri 67/212 (31.6%) testiranih posameznikih.

Identificirali smo osem *BRCA1* mutacij (1806C>T, 300T>G, 300T>A, 310G>A, 5296del4, 5382insC, 967ins7, 962del4) pri 25 družinah (pri 41 posameznikih) in sedem *BRCA2* mutacij (IVS16-2A>G, 1756G>T, 2041insA, 3493C>T, 4206ins4, 5579insA, 5837TC>AG,) pri 15 družinah (pri 26 posameznikih).

Mutacija IVS16-2A>G na *BRCA2* genu je bila najdena pri devetih družinah (17 posameznikih). Pri devetih družinah (11 posameznikov) smo našli mutacije na petem exonu na *BRCA1* genu (300T>G, 300T>A in 310G>A). Pri osmih družinah (15 posameznikov) smo diagnosticirali mutacijo 1806C>T na *BRCA1* genu. Mutacija 5382insC na *BRCA1* genu je bila najdena pri treh družinah (devet posameznikov). Mutacija 967ins7 na genu *BRCA1* je bila najdena pri dveh družinah (dva posameznika).

Vse ostale mutacije (5296del4, 962del4 na *BRCA1* genu in 5579insA, 3493C>T, 4206ins4, 5837TC>AG, 2041insA, 1756G>T na *BRCA2* genu) smo diagnosticirali le po enkrat (Tabela 1).

Tabela 1: *BRCA1* in *BRCA2* mutacije pri slovenskih družinah z rakom dojke in/ali jajčnikov.

| Mutacija: | Exon: | Št. družin: | Št. posameznikov |
|--------------|-------|-------------|------------------|
| BRCA1 | | | |
| 1806C>T | 11 | 8 | 15 |
| 300T>G | 5 | 5 | 7 |
| 300T>A | 5 | 4 | 4 |
| 310G>A | 5 | 1 | 1 |
| 5296del4 | 19 | 1 | 1 |
| 5382insC | 20 | 3 | 9 |
| 967ins7 | 11 | 2 | 2 |
| 962del4 | 11 | 1 | 2 |
| SKUPAJ | 4 | 25 | 41 |
| BRCA2 | | | |
| IVS16-2A>G | 17 | 9 | 17 |
| 5579insA | 11 | 1 | 1 |
| 3493C>T | 11 | 1 | 2 |
| 4206ins4 | 11 | 1 | 3 |
| 5837TC>AG | 11 | 1 | 1 |
| 2041insA | 10 | 1 | 1 |
| 1756G>T | 10 | 1 | 1 |
| SKUPAJ | 3 | 15 | 26 |

Fenotipi družin z *BRCA1/2* mutacijo:

V Tabeli 2a in 2b so prikazane diagnoze, starosti ob diagnozi ter število obolelih za posameznim rakom pri vsaki družini posebej. Sešteli smo tudi sorodnike v prvem kolenu, ki so stari več kot osemnajst let in so zboleli za rakom. Sindrom dednega raka dojke smo našli pri petnajstih družinah, pri eni pa smo našli sindrom dednega raka jajčnikov.

Ne glede na BRCAPRO® in Myriad® izračun smo po predhodnjem soglasju testirali osemnajst moških z rakom dojke in pri treh (16.6%) smo mutacijo tudi

Tabela 2a: Fenotipi družin z BRCA1 mutacijo.

| Družina | Spol in diagnoza testiranega (starost ob diagnozi) | Tip mutacije – BRCA1 | Št. sorodnikov nad 18 let z rakom / Št. vseh sorodnikov nad 18 let | Vsi bolniki z rakom v posamezni družini (starost ob diagnozi), sorodniki v prvem kolenu – krepek tisk (bold) |
|---------|--|----------------------|--|---|
| 1 | F, OC (54) | 1806C>T | 5/10 | 4BC (50,42, 69,-), 1 OC (50), 1CC (56), rak jezika (45) |
| 2 | F, BC (25) | 1806C>T | 1/3 | 1 OC (47) , 1 pan Ca (61), 1CC (-), 1GC (60) |
| 3 | F, BC (50) | 1806C>T | 2/6 | 2BC (36,49) , 1 Ca jeter (-), 1 Ca grla (-) |
| 4 | F | 1806C>T | 1/3 | 1BC+OC (34,48) , 1BC (34), 1OC (62) |
| 5 | F, OC (32) | 1806C>T | 0/3 | 1 OC (54), 1BC (45), 2LC (63,-), 1 Ca grla (53) |
| 6 | F, BC+OC (53, 56) | 1806C>T | 1/10 | 2CC (50,74) |
| 7 | F, BC+OC (62,62) | 1806C>T | 1/4 | 1BC (53) |
| 8 | F, OC (48) | 1806C>T | 2/6 | 4BC (38,48,53,61) |
| 9 | F, BC (50) | 300T>G | 2/7 | 1 OC (52), 2BC (64,70) , 1Ca maternice (50) |
| 10 | F, BC+OC+BC (39,75,52) | 300T>G | 2/8 | 1OC (55), 1CC (-) |
| 11 | F, BC (46) | 300T>G | 3/6 | 1BC+BC (49,62) , 1BC (79), 4CC (42,66,78,88) , 2GC (96,-) , 1 pan Ca (57), 1 pro Ca (70) |
| 12 | F, BC+BC (34,43) | 300T>G | 2/6 | 1 OC (36) , 1BC (50), 1 pro Ca (63) , 1 Ca požiralnika (52) |
| 13 | F, OC (69) | 300T>G | 1/8 | 1BC (38) |
| 14 | F | 300T>A | 1/5 | 1BC+BC (40,40) , 2BC (50,70) |
| 15 | F, BC (55) | 300T>A | 1/7 | 1BC (39) |
| 16 | F, BC+BC (36,40) | 300T>A | (-) | Ca larynx (-) |
| 17 | F, BC+BC+OC (38, 48, 52) | 300T>A | 300T>A | 3/7 1 BC+OC (-,-), 1 BC (68) , 1 Ca jeter (80) , 1GC(70) |
| 18 | F, BC (45) | 310G>A | 1/2 | 1 OC (60) , 1BC (40), 1CC (-), 2 levkemija (20,62) |
| 19 | F, BC+BC (50,66) | 5296del4 | 2/9 | 2 BC (39,41) , 1 OC (36) |
| 20 | F, BC (23) | 5382insC | 3/9 | 2BC (34,-) , 1CC (-), 1 levkemija (58) , 1MM (25) , 2 sarkom (-,-) |
| 21 | F, BC+BC (33,46) | 5382insC | 2/7 | 1 OC (50), 1CC (45) |
| 22 | F, BC+BC (34,36) | 5382insC | 0/5 | 1BC (44), 1Ca maternice (71) |
| 23 | F, BC (35) | 962del4 | 1/3 | 1 OC+BC+BC (61,63,66) |
| 24 | F, OC (57) | 967ins7 | 1/5 | 1 OC (68) , 1GC (73), 1 Ca sečnega mehurja (61), 1LC (-) |
| 25 | F, BC (52) | 967ins7 | 3/9 | 2 BC (33,49), 1 BC+panCa (60,60) |

Legenda:

F - ženska, M- moški

OC - rak jajčnikov, BC - rak dojki, MM - maligni melanom, CC - rak širokega črevesa, pan - trebušna slinavka, GC - rak želodca, pro - prostata, LC - rak pljuč, Ca - rak, (-) ni podatka

našli (dva sta imela mutacijo IVS16-2A>G , eden pa 4206ins4 mutacijo, obe na *BRCA2* genu).

Kot je razvidno iz Tabel 2a in 2b se fenotipi družin z *BRCA1/2* mutacijami med seboj razlikujejo glede na starost ob diagnozi in tipu raka, ki se pojavlja v posamezni družini. Vsaj zaenkrat, tipa mutacije ne moremo povezovati z družinskim fenotipom. Povprečna starost ob diagnozi pri nosilcih *BRCA1* mutacij je 48.5 let, pri nosilcih *BRCA2* mutacij pa 50.7. Razlika ni bila statistično potrjena, P=0.26.

Tabela 2b: Fenotipi družin z *BRCA2* mutacijo.

| Družina | Spol in diagnoza testiranega (starost ob diagnozi) | Tip mutacije – <i>BRCA2</i> | Št. sorodnikov nad 18 let z rakom / Št. vseh sorodnikov nad 18 let | Vsi bolniki z rakom v posamezni družini (starost ob diagnozi), sorodniki v prvem kolenu – krepek tisk (bold) |
|---------|--|-----------------------------|--|--|
| 26 | F, BC (30) | IVS 16-2A>G | 1/3 | 2 MBC (64,65) , 1 OC(-), 6BC (68,79,-,-,-) |
| 27 | F, BC (29) | IVS 16-2A>G | 0/4 | 1BC (42) |
| 28 | F, BC+BC (51,53) | IVS 16-2A>G | 3/6 | 3BC (36,60,64) , 1 Ca grla (-), 1LC (50) |
| 29 | F, BC (55) | IVS 16-2A>G | 3/7 | 7 BC (32,39,39,40,42,43,45) , 1 BC+BC (50,57) , 2CC (50,74), 1 pan Ca (49) |
| 30 | F, BC (38) | IVS 16-2A>G | 1/3 | 2 BC (41,45), 1 BC+BC+pan Ca (48,52,66) , 1 LC (70) |
| 31 | F, OC+BC+BC (39,58,58) | IVS 16-2A>G | 1/8 | 2BC (58,68) , pan Ca (60), 1 Ca ščitnica (-) |
| 32 | F, BC (60) | IVS 16-2A>G | 4/10 | 3BC (33,50,51) , 1CC (62), 1 levkemija (65) |
| 33 | F,BC+BC (55,60) | IVS 16-2A>G | 2/11 | 2BC (50,51) , 1 pro Ca (50) |
| 34 | F, BC (54) | IVS 16-2A>G | 1/4 | 1BC+OC (53,73), 3BC (54,42,-) , 1CC (-), 1GC (85) |
| 35 | F, BC+OC (35,50) | 3493C>T | 3/6 | 1BC (39) , 1GC (44) , 1 Ca maternični vrat (22) |
| 36 | M, MBC (50) | 4206ins4 | 1/5 | 1 OC (40) , 1BC (59) |
| 37 | F, OC+BC (73,74) | 5579insA | 0/3 | Ni drugih rakov v družini |
| 38 | F, BC+BC (41,43) | 5837TC>AG | 1/5 | 1BC+BC (57,72), 2BC (40,50), 1pan Ca (25), 1CC (70), 1 Ca žolčnika (75) |
| 39 | F, BC (51) | 1756G>T | 3/9 | 1 BC+GC (30, 68) , 1 BC (38) , 1 levkemija (67) |
| 40 | M, no Ca | 2041insA | 3/5 | 5BC (36,43,55,60,73) , 1LC(60) |

Legenda:

F - ženska, M- moški

OC – rak jajčnikov, BC – rak dojk, MBC – moški rak dojk, CC – rak širokega črevesa pan – trebušna slinavka, GC – rak želodca, pro - prostata, LC – rak pljuč, Ca - rak, (-) ni podatka

Tabeli 3a in 3b prikazujeta seštevek posameznikov z *BRCA1* ali *BRCA2* mutacijo z isto diagnozo. Opaziti je predvsem razliko med številom rakov dojk. Pri družinah z *BRCA1* mutacijo je v družini povprečno 2.6 primerov raka dojk, pri družinah z *BRCA2* mutacijo pa je to število skoraj še enkrat višje, in sicer 4.3.

Moške rake dojk smo našli le pri družinah z mutacijo na *BRCA2* genu. Za vse ostale rake imamo za enkrat še premajhno število pozitivnih družin, da bi lahko iz rezultatov karkoli sklepali.

Tabeli 3a in 3b prikazujeta seštevek posameznikov z *BRCA1* ali *BRCA2* mutacijo z isto diagnozo. Opaziti je predvsem razliko med številom rakov dojk. Pri družinah z *BRCA1* mutacijo je v družini povprečno 2.6 primerov raka dojk, pri družinah z *BRCA2* mutacijo pa je to število skoraj še enkrat večje, in sicer 4.3.

Rake dojk pri moških smo našli le pri družinah z mutacijo na *BRCA2* genu. Za vse ostale rake imamo za enkrat še premajhno število pozitivnih družin, da bi lahko iz rezultatov karkoli sklepali.

Tabela 3a: Število bolnikov z rakom iz 25 *BRCA1* pozitivnih družin

| | BC | OC | CC | GC | pan Ca | levkemija | pro Ca | Ca maternice | sarkom |
|---|----|----|----|----|--------|-----------|--------|--------------|--------|
| Št. bolnikov z rakom iz 25 <i>BRCA1</i> pozitivnih družin | 64 | 17 | 9 | 4 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |

Legenda:

OC – rak jajčnikov, BC – rak dojk, CC – rak širokega črevesa, GC – rak želodca, pan – trebušna slinavka, pro – prostata, Ca – rak

Tabela 3b: Število bolnikov z rakom iz 15 *BRCA2* pozitivnih družin

| | BC | OC | CC | GC | MBC | pan Ca |
|---|----|----|----|----|-----|--------|
| Št. bolnikov z rakom iz 15 <i>BRCA2</i> pozitivnih družin | 65 | 6 | 5 | 3 | 3 | 3 |

Legenda:

BC – rak dojk, OC – rak jajčnikov, CC – rak širokega črevesa, GC – rak želodca, MBC – rak dojk pri moškem, pan – trebušna slinavka, Ca – rak

Zaključki

Testiranje genov *BRCA1* in *BRCA2* je ponudilo nove možnosti svetovanja družinam, kjer se rak dojke in/ali jajčnika pojavljata pri več krvnih sorodnikih iste družine. V Sloveniji se svetovanje, ki temelji na analizi mutacij nudi relativno kratek čas in zanimalo nas je, kakšna je odzivnost naše populacije na tak tip svetovanja. Na začetku našega projekta smo preko Centra za bolezni dojk na svetovanje aktivno vabili bolj ogrožene družine. Informacija o možnem svetovanju in testiranju se je hitro razširila in sedaj na svetovanje prihajajo pacienti, ki jih napotijo zdravniki različnih specialnosti, največkrat splošni/družinski zdravniki ali ginekologi. Pri nas opažamo, da se visok odstotek ljudi, ki ustrezajo pogojem za testiranje, za test tudi odloči. Le pet posameznikov (3.3%) iz

153 družin se za test ni odločilo. Druge raziskave poročajo o višjih številkah. V Belgiji recimo, testiranje odkloni okoli dvajset odstotkov pacientov. Ta razlika gre najverjetneje na račun »predizbora« ljudi, ki pridejo na svetovanje. V ambulanto prihajajo v glavnem že informirani pacienti, ki si želijo testiranja in/ali informacije o realni oceni ogroženosti. Drug možen razlog za visok odziv na ponujeno testiranje pa je še vedno dokaj visoka raven zaupanja, ki so jo deležni slovenski zdravniki. Vsekakor pa je visoka odzivnost lahko tudi potrditvev pravilnega multidisciplinarnega pristopa k genetskemu svetovanju in testiranju. Pri raziskavi smo opazili, da se informacija o mutaciji v družini ne razširi na vse možne in/ali mogoče nosilce. Krvni sorodniki, ki bi lahko podedovali mutacijo, se v nizkem odstotku udeležijo svetovanja. Vzroka za ta pojav ne poznamo, saj zaenkrat še nimamo pravnega mehanizma, preko katerega bi lahko prišli v stik s krvnimi sorodniki. Verjetno nekateri ne želijo vedeti podatka o možni mutaciji in posledični večji ogroženosti, drugi pa najbrž ne dobijo ustrezne informacije od sorodnika, pri katerem smo mutacijo že našli in najbrž sploh ne vedo, da možnost testiranja obstaja. Ta problem opisujejo tudi druge raziskave. Zadnje kažejo, da je informacija, ki jo sorodnikom posredujejo že testirani posamezniki največkrat nepopolna in da si skoraj večina želi svetovanja in tudi testiranja za dedni rak dojke in/ali jajčnika.

Zanimal nas je tudi vzorec mutacij, ki se pojavlja pri slovenski populaciji in fenotip teh družin. Predstavljamo rezultate prvih 148 testiranih družin z rakom dojke in/ali jajčnika. Poročamo o visoki stopnji detekcije mutacij (27.0%), kar je več, kot v primerljivi literaturi in kaže, da smo izbrali primerno metodo selekcije posameznikov, ki ustrezajo testiranju. Identificirali smo 15 različnih mutacij pri 40-tih družinah. Več mutacij smo našli na *BRCA1* genu, kar je v skladu z literaturo.

Najbolj pogosta mutacija, ki se pojavlja pri slovenskih družinah z rakom dojke in/ali jajčnikov je IVS16-2A>G mutacija na *BRCA2* genu. To je mutacija, o kateri smo že poročali in je bila odkrita najprej, dokazali pa smo tudi njen founder učinek. Do sedaj so jo opisovali le dvakrat, enkrat je o njej poročal dr. Santarosa iz Aviana, mesta v Italiji, ki je od slovenske meje oddaljen 50 km. Drugič pa je o mutaciji poročala družba Myriad; našli naj bi jo pri američanih, ki izvirajo iz zahodne evrope. To mutacijo bi radi še naprej raziskovali in jo povezali s klinično-patološkimi značilnostmi tumorjev pri nosilcih mutacij.

Druga zelo pogosta mutacija, ki smo jo diagnosticirali pri 8/40 družinah je 1806C>T mutacija na *BRCA1* genu. Ta mutacija je znana kot švedska founder mutacija, našli pa so jo tudi pri Špancih, Nemcih, Avstrijcih, Italijanih in Nizozemcih.

Desetkrat smo našli mutacije na petem eksonu *BRCA1* gena. 300T>G je najbolj pogosta in se velikokrat pojavlja tudi pri naših sosedih Italijanih. Literatura poroča o tej mutaciji tudi na Poljskem, Češkem in Madžarskem.

Kot vidimo, se vse tri mutacije pojavljajo tudi pri sosednjih državah; Avstriji, Italiji in na Madžarskem, na žalost pa nimamo podatkov o mutacijah v državah bivše Jugoslavije. Le ena objavljena raziskava o mutacijah v Srbiji opisuje

BRCA1 5382insC mutacijo, ki je znana kot židovska mutacija in se pogosto pojavlja v centralni in vzhodni Evropi. Pri nas smo to mutacijo našli pri treh družinah.

Mutacije 1806C>T, 300T>G, 300T>A, 5382insC na *BRCA1* genu in IVS16-2A>G na *BRCA2* genu predstavljajo 72.5 % vseh diagnosticiranih mutacij pri populaciji, ki živi na področju Slovenije.

Kot je razvidno iz Tabele 2a in 2b, zaenkrat ne moremo poročati o razlikah med fenotipi družin glede na posamezen tip mutacije. Potrebovali bi večji vzorec za dokazovanje statistično značilnih razlik. Pri družinah z *BRCA1/2* mutacijami poleg raka dojke in jajčnikov opažamo še rak trebušne slinavke, rak širokega črevesa, rak prostate, rak žrela, rak želodca, rak maternice in še nekaj drugih posamičnih rakov, kar je v skladu z literaturo.

V Sloveniji smo uvedli rutinsko genetsko svetovanje in testiranje za *BRCA1/2* mutacije pri družinah, kjer se rak dojke in/ali jajčnikov pojavlja bolj pogosto kot pri splošni populaciji. Pacienti kažejo velik interes za svetovanje in testiranje, informacija o mutaciji v družini, pa se slabo prenaša med sorodniki. Identificirali smo pet najpogostejših mutacij (1806C>T, 300T>G, 300T>A, 5382insC na *BRCA1* genu in IVS16-2A>G na *BRCA2* genu), ki se pojavljajo pri slovenski populaciji in pokrivajo 72.5% vseh odkritih mutacij. Te informacije bodo služile tako drugim državam, kot tudi našim laboratorijem, saj je s poznavanjem najbolj pogostih mutacij v regiji, svetovanje in testiranje lahko bolj natančno, hitreje in cenejše.

Viri in literatura

1. Lynch HT, Fain PR, Golgar D, Albano WA, Mailliard JA, McKenna P. Familial breast cancer and its recognition in an oncology clinic. *Cancer* 1981 Jun 1;47(11):2730-9.
2. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998 Mar;62(3):676-89.
3. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, . A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 1994 Oct 7;266(5182):66-71.
4. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 1995 Dec 21;378(6559):789-92.
5. Burke W, Daly M, Garber J, Botkin J, Kahn MJ, Lynch P, McTiernan A, Offit K, Perlman J, Petersen G, Thomson E, Varricchio C. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. *BRCA1* and *BRCA2*. Cancer Genetics Studies Consortium. *JAMA* 1997 Mar 26;277(12):997-1003.
6. Breast Cancer Information Core Internet Website. (http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/) 2005

7. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997 May 15;336(20):1401-8.
8. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 1996 May;13(1):117-9.
9. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, Hogervorst FB, Hageman S, Arts PJ, Ligtenberg MJ, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 1997 Nov;17(3):341-5.
10. Krajc M, De Greve J, Goelen G, Teugels E. BRCA2 founder mutation in Slovenian breast cancer families. *Eur J Hum Genet* 2002 Dec;10(12):879-82.
11. Incidenca raka v Sloveniji 2002. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Slovenski registri raka, 2005.
12. Hogervorst FB, Cornelis HS, Bout M, van VM, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B, Klijn JG, Vasen HF, Meijers-Heijboer H. . Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 1995 Jun;10(2):208-12.
13. Ganguly T, Dhulipala R, Godmilow L, Ganguly A. High throughput fluorescence-based conformation-sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) identifies six unique BRCA2 mutations and an overall low incidence of BRCA2 mutations in high-risk BRCA1-negative breast cancer families. *Hum Genet* 1998 May;102(5):549-56.
14. Armstrong K, Calzone K, Stopfer J, Fitzgerald G, Coyne J, Weber B. Factors associated with decisions about clinical BRCA1/2 testing. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Nov;9(11):1251-4.
15. Goelen G, Teugels E, Bonduelle M, Neyns B, De GJ. High frequency of BRCA1/2 germline mutations in 42 Belgian families with a small number of symptomatic subjects. *J Med Genet* 1999 Apr;36(4):304-8.
16. Sermijn E, Goelen G, Teugels E, Kaufman L, Bonduelle M, Neyns B, Poppe B, De PA, De GJ. The impact of proband mediated information dissemination in families with a BRCA1/2 gene mutation. *J Med Genet* 2004 Mar;41(3):e23.
17. Yazici H, Bitisik O, Akisik E, Cabıoglu N, Saip P, Muslumanoglu M, Glendon G, Bengisu E, Ozbilen S, Dincer M, Turkmen S, Andrulis IL, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast/ovarian families and young breast cancer patients. *Br J Cancer* 2000 Sep;83(6):737-42.
18. Osorio A, Barroso A, Martinez B, Cebrian A, San Roman JM, Lobo F, Robledo M, Benitez J. Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Br J Cancer* 2000 Apr;82(7):1266-70.
19. Santarosa M, Viel A, Dolcetti R, Crivellari D, Magri MD, Pizzichetta MA, Tibiletti MG, Gallo A, Tumolo S, Del TL, Boiocchi M. Low incidence of BRCA1 mutations among Italian families with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer* 1998 Nov 23;78(5):581-6.
20. Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber BL. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997 May 15;336(20):1409-15.

21. Hamann U, Haner M, Stosiek U, Bastert G, Scott RJ. Low frequency of BRCA1 germline mutations in 45 German breast/ovarian cancer families. *J Med Genet* 1997 Nov;34(11):884-8.
22. Santarosa M, Dolcetti R, Magri MD, Crivellari D, Tibiletti MG, Gallo A, Tumolo S, Della PL, Furlan D, Boiocchi M, Viel A. BRCA1 and BRCA2 genes: role in hereditary breast and ovarian cancer in Italy. *Int J Cancer* 1999 Sep 24;83(1):5-9.
23. Johannsson OT, Staff S, Vallon-Christersson J, Kytola S, Gudjonsson T, Rennstam K, Hedenfalk IA, Adeyinka A, Kjellen E, Wennerberg J, Baldetorp B, Petersen OW, et al. Characterization of a novel breast carcinoma xenograft and cell line derived from a BRCA1 germ-line mutation carrier. *Lab Invest* 2003 Mar;83(3):387-96.
24. De B, V, Radice P, Pasini B, Stagi L, Pensotti V, Mondini P, Manoukian S, Conti A, Spatti G, Rilke F, Pierotti MA. Characterization of ten novel and 13 recurring BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Italian breast and/or ovarian carcinoma patients. *Mutations in brief* no. 178. Online. *Hum Mutat* 1998;12(3):215.
25. Santarosa M, Viel A, Dolcetti R, Crivellari D, Magri MD, Pizzichetta MA, Tibiletti MG, Gallo A, Tumolo S, Del TL, Boiocchi M. Low incidence of BRCA1 mutations among Italian families with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer* 1998 Nov 23;78(5):581-6.
26. Baudi F, Quaresima B, Grandinetti C, Cuda G, Faniello C, Tassone P, Barbieri V, Bisegna R, Ricevuto E, Conforti S, Viel A, Marchetti P, et al. Evidence of a founder mutation of BRCA1 in a highly homogeneous population from southern Italy with breast/ovarian cancer. *Hum Mutat* 2001 Aug;18(2):163-4.
27. Ottini L, D'Amico C, Noviello C, Lauro S, Lalle M, Fornarini G, Colantuoni OA, Pizzi C, Cortesi E, Carlini S, Guadagni F, Bianco AR, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in central and southern Italian patients. *Breast Cancer Res* 2000;2(4):307-10.
28. Turchetti D, Cortesi L, Federico M, Bertoni C, Mangone L, Ferrari S, Silingardi V. BRCA1 mutations and clinicopathological features in a sample of Italian women with early-onset breast cancer. *Eur J Cancer* 2000 Oct;36(16):2083-9.
29. van Der LM, Wysocka B, Brozek I, Jassem J, Limon J, Olah E. Founder BRCA1 mutations and two novel germline BRCA2 mutations in breast and/or ovarian cancer families from North-Eastern Poland. *Hum Mutat* 2000 May;15(5):480-1.
30. Perkowska M, Brozek I, Wysocka B, Haraldsson K, Sandberg T, Johansson U, Sellberg G, Borg A, Limon J. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland. *Hum Mutat* 2003 May;21(5):553-4.
31. Janiszewska H, Haus O, Lada-Swieciak A, Pasinska M, Laskowski R, Szymanski W, Gorski B, Lubinski J. Frequency of three BRCA1 gene founder mutations in breast/ovarian cancer families from the Pomerania-Kujawy region of Poland. *Clin Genet* 2003 Dec;64(6):502-8.
32. van Der LM, Szabo C, Besznyak I, Liszka G, Csokay B, Pulay T, Toth J, Devilee P, King MC, Olah E. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int J Cancer* 2000 Jun 1;86(5):737-40.
33. Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, Zidovska J, Novotny J, Petruzalka L, Szabo C, Matous B. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* 2005;7(5):R728-R736.
34. Papp J, Raicevic L, Milasin J, Dimitrijevic B, Radulovic S, Olah E. Germline mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Yugoslav breast/ovarian cancer families. *Oncol Rep* 1999 Nov;6(6):1435-8.

35. Lubinski J, Phelan CM, Gadirian P, Lynch HT, Garber J, Weber B, Tung N, Horsman D, Isaacs C, Monteiro AN, Sun P, Narod SA. Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene. *Fam Cancer* 2004;3(1):1-10

DOKAZOVANJE MUTACIJ V BRCA1 GENU Z ANALIZO TALITVENE KRIVULJE PCR PRODUKTOV

Srdjan Novaković, Vida Stegel, Mateja Krajc, Janez Žgajnar,
Nikola Bešić, Marko Hočevar, Cvetka Bilban Jakopin,
Katarina Lokar

Onkološki inštitut Ljubljana

Povzetek

Rak dojke je z nekaj več kot 1000 novimi bolnicami na leto na prvem mestu po številu obolelih žensk za rakastimi boleznimi v Sloveniji. Številka vključuje sporadične in dedne oblike raka dojk. Dedne oblike raka dojke so najpogostejše povezane z mutacijami v *BRCA1* in *BRCA2* genih. Zato se številni strokovnjaki s tega področja zavzemajo za genetsko testiranje bolnikov, pri katerih obstaja sum na dedno obliko bolezni. Testiranje bolnic/kov in njihovih sorodnikov je dokaj težavno zaradi zahtevnosti metod genetskega testiranja, stroškov testiranja in nezadostnega poznavanja in predvidevanja vseh možnih vplivov dokazane mutacije pri nastanku raka dojke. V tem delu predstavljamo osnovne metodološke podatke za odkrivanje petih različnih mutacij v *BRCA1* genu pri bolnicah/kih s karcinomom dojke in njihovih sorodnikih. Mutacije 1806C>T, 300T>G, 300T>A, 310G>A, 5382insC določamo s pomočjo polimerazne verižne reakcije (PCR) v realnem času in analizo talitvene krivulje. Primerjava z direktnim sekveniranjem je pokazala, da je uporabljena metoda dovolj občutljiva in hitra za dnevno rutinsko določanje mutacij v DNA izolirani iz periferne krvi.

Uvod

Pet do 10% vseh primerov raka dojk so dedna oblika te bolezni. Od vseh dednih rakov dojk so le-ti posledica mutacij v genu *BRCA1* v približno 20% do 40% in v genu *BRCA2* v 10% do 35%. Incidenca raka dojk je pri nosilkah/cih mutacij v genu *BRCA1* okrog 50%. Poleg tega imajo nosilci teh mutacij povečano tveganje za nastanek raka jajčnikov, širokega črevesa in prostate.

V primeru, da poznamo vrsto in mesto mutacije, jih lahko relativno enostavno in hitro dokažemo. Ena skupina metod za hitro določanje mutacij temelji na pomnoževanju tistih delov gena, kjer mutacijo pričakujemo, ter vezavi specifičnih sond na pomnoženo DNA. Iz nastalih razlik v talitveni krivulji pri nemutiranih in mutiranih genih potrdimo prisotnost mutacij. V tem prispevku prikazu-

jemo določanje znanih mutacij v genu *BRCA1* - 1806C>T, 300T>G, 300T>A, 310G>A, 5382insC z uporabo PCR v realnem času.

Materiali in metode

Genomsko DNA smo izolirali iz periferne krvi preiskovancev s pomočjo »DNA blood isolation kit« (Quiagen, Hilden, Germany). Primerje in sonde smo zasnovali in oblikovali v našem laboratoriju, sintetizirala pa jih je firma TIB Molbiol (Berlin, Germany).

PCR v realnem času in analizo talitvene krivulje smo opravili na Light Cycler-ju (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) po navodilih proizvajalca (Light Cycler Fast Start master hybridization probes, Roche Molecular Biochemicals). Če na kratko povzamem - DNA smo pomnožili s pomočjo PCR z našimi primerji. K mešanici smo dodali še specifične hibridizacijske sonde, ki so nosile fluorescentna barvila. Po končani PCR smo opravili talitveno analizo produktov, na katerih so bile vezane sonde, ter ugotovili prisotnost mutacij.

Rezultati in diskusija

Različne vrste raka so povezane z mutacijami v genih *BRCA1* in *BRCA2*. Med najpogostejšimi so rak dojk, jajčnikov, trebušne slinavke, prostate, jajcevodov, rak grla, ter levkemije in limfomi pri odraslih. Kljub številnim vrstam rakov, ki nastanejo kot posledica mutacij v omenjenih genih, so nosilke/ci teh mutacij predvsem rizične/i za nastanek raka dojk in/ali jajčnikov. Mutacije v genih *BRCA1* in *BRCA2* povečajo verjetnost nastanka raka dojk glede na normalno populacijo tudi za 10x. Tveganje za nastanek raka jajčnikov je pri nosilkah mutacij v genu *BRCA1* glede na normalno populacijo 5-7x večje, medtem ko je pri nosilkah mutacij v genu *BRCA2* nekoliko manjše in je 2-3x večje kot pri normalni populaciji.

Upoštevajoč, da je slovenska populacija dokaj etnično omejena in da je rak dojk na prvem mestu od vseh rakastih bolezni pri ženskah v Sloveniji, smo leta

Tabela 1. Mutacije pri slovenskih bolnikih, ki smo jih določali z metodo PCR v realnem času ter z analizo talitvene krivulje produktov.

| Vrsta mutacije | Število preiskovancev | Število določenih mutacij | Št. LC pozitivnih/št. s sekv. reak. potrjenih * |
|----------------|-----------------------|---------------------------|---|
| 1806C>T | 177 | 12 | 12/12 |
| 300 T>G | 31 | 4 | 4/4 |
| 300T>A | 5 | 0 | 0/2 |
| 310G>A | 2 | 1 | 1/1 |
| 5382insC | 17 | 4 | 4/4 |

* število pozitivnih vzorcev, ki smo jih določili z metodo PCR v realnem času in analizo talitvene krivulje produktov na Light Cycler-ju (LC)/število vzorcev, ki smo jih potrdili s sekvencno analizo

2001 začeli z genetskim svetovanjem in testiranjem oseb, ki so navajale več primerov raka dojk ali jajčnikov v družini.

Na Onkološkem inštitutu Ljubljana določamo prvenstveno tiste mutacije, ki so se izkazale kot najbolj pogoste v slovenskih družinah. Med te sodijo mutacije v genu *BRCA1* - 1806C>T, 300T>G, 300T>A, 310G>A, 5382insC in pridobljena slovenska mutacija IVS162A>G v genu *BRCA2*. Metoda, ki smo jo uvedli za testiranje mutacij 1806C>T, 300T>G, 310G>A in 5382insC v genu *BRCA1*, popolnoma korelira z rezultati sekvenčne analize, ki je bila opravljena v Laboratory of Medical Genetics - Vrije University Brussels (Tabela 1). V primeru mutacije 300T>A pa s to metodo nismo uspeli potrditi prisotnosti mutacij, ki so jih sicer dokazali s sekvenčno analizo.

Zaključek

Na osnovi naših rezultatov in rezultatov sodelovanja z laboratorijem iz Bruslja lahko zaključimo, da smo uspešno zasnovali in oblikovali primerje in sonde za dokazovanje mutacij 1806C>T, 300T>G, 310G>A in 5382insC v genu *BRCA1*. Po optimizaciji je metoda PCR v realnem času in analiza talitvene krivulje produktov izredno občutljiva (senzitivna) in kot taka uporabna za določanje mutacij. Čeprav smo primerje za mutacijo 300T>A pravilno izbrali in pripravili, metoda ni bila dovolj občutljiva in je torej neuporabna za rutinsko določanje te mutacije.

Viri in literatura

1. Roest PAM, Roberts RG, Sugino S, van Omen GJB, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutation. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1719-21.
2. Hayashi K, Wenz HM, Inazuka M, Tahira T, Sasaki T, Atha DH. SSCP analysis of point mutations by multicolor capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2001; 163: 109-26.
3. Myer RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T. Detection of single base substitution in total genomic DNA. *Nature* 1985; 313: 495-8.
4. Foy CA, Parkers HC. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem* 2001; 47: 990-1000.
5. Wilhelm J, Pingout A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003; 4: 1120-8.
6. Gerard P, Pindolia MS, Worsham MJ. A rapid and sensitive approach to mutation detection using real-time polymerase chain reaction and melting curve analyses, using *BRCA1* as example. *Mol Diagn* 1999; 4: 241-6.
7. DeVita TV, Hellman S, Rosenberg AS, editors. Principles and practice of Oncology 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
8. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Science* 2003; 302: 643-6.

9. Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1215-23.
10. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997; 336: 1401-8.

DEDNI RAK ŠIROKEGA ČREVEESA

Mateja Krajc, Janez Žgajnar, Nikola Bešić, Marko Hočevar,
Cvetka Bilban Jakopin, Katarina Lokar, Srdjan Novaković,
Vida Stegel

Onkološki inštitut Ljubljana

Rak širokega črevesa (RŠČ) se pojavlja tako pri moških kot pri ženskah in je eden najpogostejših rakov nasploh ter drugi najpogostejši vzrok smrti med malignimi boleznimi. Največkrat se RŠČ pojavlja sporadično, kjer zbolita le eden ali dva sorodnika. Včasih pa zasledimo družine, kjer se RŠČ pojavlja bolj pogosto. Pri 20 odstotkih novo odkritih RŠČ ugotavljamo dedno obliko raka, za katero je značilno, da več posameznikov iste družine v več generacijah zbolijo za RŠČ in/ali za raki, ki so povezani z RŠČ. Ti bolniki so pogosto mlajši in zbolevalo pred petdesetim letom. Nekateri bolniki z dednim RŠČ pa lahko zbolijo tudi za več kot enim rakom.

Kako se deduje RŠČ?

Nastanek dednega RŠČ povezujemo z dedovanjem genetske spremembe (napake), zaradi katere je oseba, ki to napako podeduje, bolj ogrožena. Torej verjetnost, da se RŠČ pojavi pri nekom, ki to gensko spremembo podeduje, je večja glede na splošno populacijo, ni pa nujno, da se rak tudi razvije.

Genetsko zasnovo podedujemo tako po mami kot po očetu. Ta genska informacija »pove« našemu telesu, kako naj se razvija in raste. Posamezni deli te genetske zasnove se imenujejo geni. Včasih pride do napake v določenem genu in gen zato ne deluje pravilno. Taka napaka se imenuje mutacija. Znano je, da je osnovna funkcija nekaterih genov ta, da varujejo naše telo pred razvojem raka. V primeru, da ima posameznik mutacijo na takem genu, le-ta ne more delovati pravilno in varovalne funkcije ni več. Taka oseba ima zato večjo verjetnost za razvoj raka, govorimo torej o večji ogroženosti. Ni pa nujno, da se rak tudi razvije.

Dednost RŠČ je precej kompleksna in se pojavlja v okviru več sindromov. Oglejmo si dva najpogostejša.

1. DEDNI NEPOLIPOZNI RAK DEBELEGA ČREVEESA ali HNPCC (hereditary nonpolyposis colon cancer)

HNPCC predstavlja 2-3 odstotke vseh rakov širokega črevesa. Kljub imenu "nepolipozni", pri tem sindromu najdemo adenomatozne polipe, čeprav jih je malo. Ta oblika raka širokega črevesa se pogosteje pojavlja v desnem širokem

črevesu. HNPCC se deduje avtosomno dominantno. To pomeni, da imajo nosilci mutacije (okvare) na genu, ki je odgovoren za razvoj HNPCC, 50-odstotno verjetnost, da mutacijo prenesejo na svoje potomce. Lahko pa povemo tudi drugače; otroci nosilcev mutacije imajo 50-odstotno verjetnost, da mutacije **ne podedujejo** in imajo isto ogroženost za razvoj RŠČ kot njihovi vrstniki, ki družinske obremenjenosti nimajo.

80 odstotkov nosilcev mutacije bo za časa njihovega življenja zbolelo za RŠČ, v povprečni starosti 44 let. Zelo pogosti so tudi drugi raki izven širokega črevesa. Verjetnost, da bodo nosilci mutacije zboleli za karcinomom endometrija, je do 60%, jajčnika do 12%, želodca do 19% ter v nekaj odstotkih še za rakom sečil, ledvic, žolčnika, centralnega živčnega sistema in ozkega črevesa.

Kakšni so simptomi pri HNPCC?

Večina bolnikov s polipi in/ali rakom debelega črevesa in rektuma je **brez težav. Včasih** pa lahko opazimo določene **opozorilne znake**:

1. svetlo rdečo kri v blatu
2. obdobja zaprtja in driske
3. krčevita bolečina v področju želodca
4. odvajanje tankega blata
5. pogost občutek napihnjenosti v predelu trebuha
6. počasno in nenamerno izgubljanje telesne teže

Poudariti pa je treba, da ni varno čakati na te opozorilne znake. Pomembno je, da osebe, ki so družinsko ogrožene, začno dovolj zgodaj s kontrolnimi pregledi, pa čeprav se dobro počutijo in nimajo zgoraj opisanih težav.

Diagnostični kriteriji

Ker se HNPCC klinično lahko kaže različno, je bila nujna uvedba kriterijev, po katerih sindrom spoznamo.

1. Vsaj trije sorodniki z RŠČ; od teh eden v prvem kolenu. Ostala dva sorodnika morata biti v dveh zaporednih generacijah, vsaj eden je moral zboleli pred 50. letom starosti.
2. Osebe, ki so zbolele za dvema rakoma, povezanima z HNPCC.
3. Osebe z RŠČ in sorodnikom v prvem kolenu z RŠČ in/ali s povezanim rakom in/ali kolorektalnim adenomom; vsaj eden od rakov odkrit pred 45 letom starosti in adenom odkrit pred 40 letom starosti.
4. Osebe z RŠČ ali karcinomom endometrija, zbolele pred 45 letom starosti.
5. Osebe z RŠČ, zbolele pred 45 letom starosti.
6. Osebe z adenomi, mlajše od 45 let.

Kako poteka testiranje?

Test mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) in genetsko testiranje

HNPCC povzročajo mutacije na enem od petih do sedaj znanih genov (hMLH1, hMSH2, hMSH6, PMS1 in PMS2). Za kar 95 odstotkov vseh HNPCC so odgovorne mutacije na prvih dveh genih, hMLH1 in hMSH2.

Testiranje se izvaja po dveh poteh:

Test mikrosatelitne nestabilnosti (MSI) se uporablja za ugotovitev verjetnosti, da je tumor posledica mutacije (okvare) na enem izmed naštetih genov. Pri 90-95 odstotkih oseb z mutacijami hMLH1 in hMSM2 najdemo mikrosatelitno nestabilnost; vedeti pa moramo, da jo najdemo tudi pri okoli 15 odstotkih sporadičnih RŠČ.

Ponavadi se test opravi na koščku tumorja, ki ga kirurgi odvzamejo med operacijo. Koščki tumorjev se hranijo v patoloških laboratorijih.

Genetsko testiranje za mutacije (okvare) na enem od petih genov se, če je le možno, opravi najprej pri najmlajšem obolelem družinskem članu, ki po predhodni privolitvi odda krvni vzorec. Glede na ta rezultat pa potem obravnavamo še druge družinske člane.

Kakšni so ukrepi pri ugotovljenem HNPCC?

1. POGOSTE KONTROLE

Upošteva večjo ogroženost za RŠČ in pojavnost drugih rakov pri HNPCC začnemo z pogostimi kontrolami v mlajših letih. Za vsako družino in družinskega člana se izdelava program kontrolnih pregledov.

2. PROFILAKTIČNI KIRURŠKI POSEGI

Upoštevati moramo, da dokazov o uspešnosti kirurških posegov v zmanjševanju smrtnosti pri nosilcih mutacij v do sedaj objavljeni literaturi ni. Vseeno pa priporočajo preventivno odstranitev debelega črevesa pri

- osebah s HNPCC, pri katerih so odkrili adenome
- osebah s HNPCC, ki ne želijo pogostih kontrol

Kot možen ukrep pri ženskah z HNPCC pa opisujejo tudi preventivno odstranitev maternice in odstranitev jajčnikov z jajcevodi.

2. Familiarna adenomatozna polipoza (FAP)

FAP je dedna bolezen odgovorna za 1 odstotek vseh RŠČ. Vzrok za FAP je mutacija gena APC. Bolniki s to mutacijo imajo 50-odstotno verjetnost, da bodo okvaro prenesli na svoje potomce. Z drugimi besedami lahko tudi rečemo, da imajo potomci bolnikov s FAP 50-odstotno verjetnost, da bolezni **ne podedujejo**.

Pri bolnikih najdemo od več sto do več tisoč polipov po širokem črevesu, ki se začnejo pojavljati v povprečju v starosti 16 let. Razen izjem se bo pri vseh prizadetih osebah razvil RŠČ, v povprečni starosti 39 let.

Klinična diagnoza

Diagnozo postavimo na dva načina:

1. Če najdemo več kot 100 adenomatoznih polipov;

2. Multipli adenomatozni polipi pri osebi, ki je več kot 50-odstotno ogrožena, da ima FAP.

Bolniki s FAP imajo lahko prirojeno hipertrofijo pigmentnega epitela retine, adenome dvanajstnika in polipe fundusa želodca. Bolj so ogroženi tudi za nekatere rake izven širokega črevesa, kot so: karcinom dvanajstnika (do 10 %), ščitnice, trebušne slinavke in želodca ter hepatoblastom pri otrocih do 10 leta starosti.

Genetsko testiranje

Podobno kot pri HNPCC tudi tu za ugotavljanje mutacije (okvare) na APC genu potrebujemo vzorec krvi.

Ukrepi pri FAP

1. Pogoste kontrole

Priporočena preiskovalna metoda je sigmoidoskopija. **Večina strokovnjakov priporoča začetek kontrol že v zgodnjih najstniških letih.**

2. Profilaktični kirurški posegi

Odstranitev širokega črevesa je edina zanesljiva preprečitev razvoja RŠČ. Če se odločimo za ohranitev danke, je nujno bolnika nadzirati zaradi možnega razvoja raka danke.

Za odstranitev širokega črevesa se odločimo, ko pri kontroli najdemo polipe.

3. Kemopreventiva

Mnogo obetajo inhibitorji COX 2 (ciklooksigenaza 2), ki dokazano zmanjšujejo nastanek polipov. Neznano ostaja, če znižujejo tudi umrljivost. Kemopreventiva zato ostaja domena raziskav.

Koristi genetskega svetovanja in testiranja

Posamezniki, ki se zavedajo večje ogroženosti za razvoj rakave bolezni in vedo, da so nosilci mutacije na genih, ki so odgovorni za razvoj FAP in HNPCC, lahko lažje in z večjo gotovostjo soodločajo pri programu kontrol in rednih pregledov. Kot je razvidno iz napisanega, svetujemo posameznikom, ki so bolj ogroženi za razvoj raka širokega črevesa, redne kontrole, ki se začno veliko prej kot pri splošni populaciji. Po drugi strani pa lahko posamezniki, ki niso nosilci ogrožujoče mutacije, opustijo drastične programe kontrol in profilaktičnih ukrepov. Negativen izid testa lahko tako predstavlja olajšanje tako za preiskovano osebo kot za njene sorodnike.

Nezanemarljivo pa je tudi poznavanje zdravega načina življenja in sprememba življenjskih navad v luči zmanjšanja tveganja za razvoj rakavih obolenj.

Za oceno tveganja pri posamezniku potrebujemo družinsko drevo z natančnimi podatki o obolenju posameznih družinskih članov za več generacij. V

primeru, da ugotavljamo večjo ogroženost, svetujemo genetsko testiranje najprej najmlajšemu obolelemu, če je to seveda mogoče.

Za genetsko testiranje se vsak posameznik odloča samostojno in svobodno.

Tveganja in omejitve genetskega testiranja

Za posameznike, ki so nosilci mutacij in vedo za visoko ogroženost za določene rake, je ta informacija lahko veliko breme. Čustvene stiske, depresija ali jeza pogosto spremljajo to spoznanje. Pri sorodnikih, kjer mutacijo nismo odkrili, pa velikokrat opažamo občutek krivde.

V določenih primerih pa je negativen rezultat lahko neinformativen, kar pomeni, da z zagotovostjo ne moremo trditi, da testirana oseba ni nosilka mutacije, in da je ogroženost za zbolevanje za rakom še vedno neznana.

Če se za test ne odločite

Odločitev za genetsko testiranje je svobodna in morebitna odklonitev testiranja je vaša pravica in ne sme v ničemer vplivati na vaše razmerje z zdravnikom. V primeru, da se ne odločite za genetsko testiranje, vam bomo svetovali program kontrol glede na vašo družinsko obremenjenost.

Zaupnost

Vsi podatki o rezultatu testiranja so tajni, osebje pa zavezano k molčečnosti v skladu z zakonom. Prav tako podatkov o testiranju in izvidu testiranja nima od vas nihče pravice zahtevati, niti jih niste dolžni nikomur posredovati.

Ostali člani družine

Svetujemo, da vsak član prizadete družine opravi pogovor z zdravnikom, ki se ukvarja z genetskim svetovanjem. Odločitev o tem je seveda povsem svobodna in vsakdo ima tudi pravico "NE VEDETI" in odkloniti tako pogovor kot morebitno genetsko testiranje.

O vseh naštetih možnostih se lahko temeljito pogovorite z zdravnikom, ki vam bo svetoval vam najbolj ustrezen ukrep.

Svoja vprašanja, želje ali pripombe lahko pošljete na naslov:
Ambulanta za onkološko genetsko svetovanje,
Onkološki inštitut, Zaloška 2, 1105 Ljubljana.

Dodatne informacije dobite tudi:

- po telefonu: sestra Katarina Lokar 01 522 26 74
- elektronski pošti (klokar@onko-i.si)
- na spletni strani Onkološkega inštituta: www.onko-i.si

MIKROSATELITNA NESTABILNOST PRI KOLOREKTALNIH KARCINOMIH

Metka Ravnik-Glavač

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Povzetek

Mikrosatelitna nestabilnost (angl. kratica MSI) je fenomen, za katerega so značilne majhne delecije ali insercije v kratkih ponavljajočih se zaporedjih v tumorski DNA v primerjavi z normalno DNA istega človeka. Približno 10% vseh kolorektalnih karcinomov je mikrosatelitno nestabilnih, medtem ko je MSI značilnost kar več kot 90% tumorjev bolnikov s sindromom Lynch. Bolniki z MSI tumorji imajo boljšo prognozo, vendar zdravljenje s kemoterapijo s fluorouracilom pri njih ni uspešno. MSI status tumorjev pomeni tudi prvo selekcijsko stopnjo pri presejanju sindroma Lynch. Za določitev MSI smo razvili nov multipleksni sistem za pomnoževanje mikrosatelitne DNA s petimi kvazi-monomorfnimi markerji. Nadaljnja strategija za presejanje sindroma Lynch, ki temelji izključno na molekularnogenetskih spoznanjih (metilaciji promotorja gena MLH1 in mutacijska analiza nekaterih genov DNA popravljalnega mehanizma), je stopnjo določitve podedovanih mutacij povečala s približno 65% na 87% in nam omogočila identificirati nove bolnike s sindromom Lynch. Sindrom Lynch je najpogostejša avtosomno dominantno dedovana predispozicija za kolorektalni karcinom. Nosilci mutacije imajo 70-80% doživljenjsko tveganost, da razvijejo sindrom Lynch, zato je potrebno, da v družinah, kjer je ta sindrom prisoten, ugotovimo, kdo od družinskih članov nosi mutacijo. Genetsko svetovanje in genetsko testiranje rizičnih sorodnikov, spremljanje in preventiva s kolonoskopijo in kemoprevencijo omogočajo, da bolezen zasledimo v zgodnji še ozdravljivi obliki, kar je povezano z zmanjšanjem stroškov zdravljenja in najpomembnejše s povečanjem preživetja bolnikov.

Predstavitev

Mikrosatelitna nestabilnost (angl. kratica MSI za Microsatellite Instability) je fenomen, katerega značilnost so delecije ali insercije znotraj tandemskih ponovitev v tumorski DNA v primerjavi z normalno DNA istega posameznika. Mikrosatelitno nestabilnost so najprej opazili pri kolorektalnem karcinomu, kjer je bilo približno 10% tumorjev mikrosatelitno nestabilnih. Z ozirom na mikrosatelitno stanje lahko tumorje razvrstimo v tri skupine: visiko mikrosatelitno nestabilni (MSI-H) tumorji so nestabilni na vsaj 40% testiranih marker-

jih; nizko nestabilni (MSI-L) tumorji izražajo mikrosatelitno nestabilnost na manj kot 40% testiranih markerjih; mikrosatelitno stabilni (MSS) tumorji niso nestabilni na nobenem markerju. MSI tumorji predstavljajo tudi posebno skupino tumorjev, ki ima specifične klinično-patološke značilnosti, bolniki s to vrsto tumorjev pa imajo ugodnejšo prognozo.

80-90% vseh mikrosatelitno nestabilnih kolorektalnih tumorjev je sporadičnih, ostali pa pripadajo bolnikom z dednim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom, imenovanim tudi sindrom Lynch.

Sindrom Lynch je najpogostejša avtosomno dominantno dedovana predispozicija za nastanek kolorektalnega karcinoma. Najobičajnejši način diagnosticiranja te bolezni je na osnovi družinske anamneze po amsterdamskih kriterijih I in II. V družini s sindromom Lynch so vsaj trije bolniki s kolorektalnim karcinomom ali z drugim karcinomom, povezanim s sindromom Lynch (materice, želodca, ovarija, hepatobiliarnega in urinarnega trakta, možganov ali kože) v dveh zaporednih generacijah in vsaj en bolnik je mlajši od 50 let. Tumorji bolnikov s sindromom Lynch imajo visoko stopnjo mikrosatelitne nestabilnosti, bolniki pa imajo podedovano mutacijo v enem od genov, ki kodirajo proteine sistema za popraviljanje napak pri podvojevanju DNA (ang. kratica MMR za Mismatch Repair). Pri analizi mutacij v genih MMR so ugotovili, da pri velikem številu bolnikov iz družin, ki so ustrezale amsterdamskim kriterijem, niso odkrili podedovane mutacije, po drugi strani pa so bile mutacije odkrite pri bolnikih iz družin, ki niso izpolnjevale amsterdamskih kriterijev. Zato je bilo potrebno razviti novo metodologijo za odkrivanje družin s sindromom Lynch. Tukaj opisujemo našo strategijo za presejanje sindroma Lynch, ki temelji izključno na molekularnogenetskih spoznanjih in je stopnjo določitve podedovanih mutacij povečala s približno 65% na 87%.

Molekularnogenetski pristop za odkrivanje visoko mikrosatelitno nestabilnih tumorjev in sindroma Lynch

Molekularnogenetska strategija temelji na določanju mikrosatelitne nestabilnosti v novoodkritih primarnih kolorektalnih karcinomih. Določitev tumorjev, ki so visoko mikrosatelitno nestabilni, je pomembna iz dveh vidikov: 1) omogoča odkrivanje posebne skupine sporadičnih MSI-H tumorjev. Bolniki s to vrsto tumorjev imajo boljšo prognozo in pri njih je uspešnejša drugačna kemoterapija, 2) predstavlja prvo stopnjo pri molekularni identifikaciji bolnikov s sindromom Lynch. Narejeno je bilo že veliko študij, da bi določili najprimernejši in najbolj občutljivejši set markerjev za odkrivanje visoko mikrosatelitno nestabilnih tumorjev, ki so vključevale tako dinukleotidne kot tudi mononukleotidne mikrosatelitne markerje. Izdelali smo metodologijo, ki temelji na hkratni analizi petih kvazimonomorfnih mononukleotidnih markerjev in pri kateri ni potrebno analizirati normalnega tkiva bolnikov. Testirali smo jo na 595 novoodkritih kolorektalnih karcinomih. 43 (7.2%) karcinomov je bilo visoko mikrosatelitno nestabilnih. Glavni molekularni vzrok mikrosatelitne nestabilnosti sporadičnih kolorektalnih karcinomov je hipermetilacija promotorka gena MLH1, karci-

nomov bolnikov s sindromom Lynch pa mutacije v genih MMR. Vsem MSI-H tumorjem smo zato najprej določili stanje metilacije promotornega gena MLH1. 8/43 (18.6%) tumorjev ni imelo hipermetilacije, zato smo jih nadalje analizirali na prisotnost mutacij v genih MMR. V 7/8 (87.5%) tumorjih smo odkrili mutacijo in s tem prisotnost sindroma Lynch.

Smiselnost molekularnogenetskega določanja sindroma Lynch

Izbira molekularnogenetskega pristopa za odkrivanje družin s sindromom Lynch je pomembna iz več razlogov:

- 1) V številnih deželah ni mogoč dostop do registrov dednih oblik raka.
- 2) Tudi, če registri obstajajo, so številne mutacije v genih MMR našli v družinah, ki niso izpolnjevale amsterdamskih kriterijev.
- 3) Ne glede na to, ali družina izpolnjuje amsterdamske kriterije, končno diagnozo sindroma Lynch lahko postavimo šele z odkritjem mutacije.

Potreba po populacijskem presejanju mikrosatelitno nestabilnih kolorektalnih karcinomov in sindroma Lynch postaja vse pomembnejša zaradi uspehov v preventivi po kolonoskopskih pregledih in obetov v kemopreventivi. V 15-letnem projektu, kjer so pri rizičnih posameznikih in nosilcih mutacije izvajali kolonoskopijo na vsake 3 leta, so več kot za polovico zmanjšali rizičnost za kolorektalni karcinom in zmanjšali umrljivost za približno 65%. Ker imajo nosilci mutacije 70-80% doživljenjsko tveganje za kolorektalni karcinom, je smiselno določiti družinske člane s prisotno mutacijo. Številne novejšje študije so pokazale, da je odločitev za genetsko testiranje precej pogosta, če genetsko svetovanje temelji na osebni in pozorni posveti. Po molekularnogenetskem presejanju je mogoče spremljati družine s sindromom Lynch s preventivnimi pregledi in posegi za preprečevanje razvoja bolezni.

Zaključek

Približno 10% sporadičnih kolorektalnih karcinomov in več kot 90% kolorektalnih karcinomov bolnikov s sindromom Lynch je mikrosatelitno nestabilnih. Zaradi dovolj dobrega poznavanja molekularnih mehanizmov in razvoja občutljivih in dovolj hitrih metodologij lahko zaključimo, da je postalo smiselno populacijsko presejanje mikrosatelitno nestabilnega kolorektalnega karcinoma in sindroma Lynch na molekularno genetski osnovi. Bolniki z MSI-H tumorji imajo boljšo prognozo, ne glede na status tumorja ob diagnozi v primerjavi z bolniki z MSS tumorji in pri njih so uspešnejši drugačni načini kemoterapije. Pokazali smo, da bolnike s sindromom Lynch lahko uspešno določimo na osnovi analize MSI, metilacijskega statusa promotornega gena MLH1 in nadaljne mutacijske analize genov MMR. Genetsko svetovanje in genetsko testiranje rizičnih sorodnikov, spremljanje in preventiva s kolonoskopijo in kemoprevencijo omogočajo, da bolezen zasledimo v zgodnji še ozdravljivi

obliki, kar je povezano z zmanjšanjem stroškov zdravljenja in najpomembnejše s povečanjem preživetja bolnikov.

Viri in literatura

1. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429): 558-61.
2. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22): 5248-57.
3. Ravnik-Glavač M, Potočnik U, Glavač D. Incidence of germline hMLH1 and hMSH2 mutations (HNPCC patients) among newly diagnosed colorectal cancers in a Slovenian population. *J Med Genet* 2000; 37(7):533-6.
4. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6):1453-6.
5. Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6):763-9.
6. Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumour microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002; 123(6): 1804-11.
7. Aktan-Collan K, Mecklin JP, de la Chapelle A, Peltomaki P, Uutela A, Kaariainen H. Evaluation of a counselling protocol for predictive genetic testing for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 2000; 37 (2):108 –13.

MEDULARNI RAK ŠČITNICE - DEDNA BOLEZEN

Damijan Bergant¹, Damjan Glavač²

¹ Onkološki inštitut Ljubljana

² Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Uvod

Medularni rak ščitnice (MTC) je rak prafolikularnih ali C-celic ščitnice, ki so del APUD sistema. Predstavlja 3-11% ščitničnih rakov, s skoraj enako ogroženostjo obeh spolov.

Tumor je pritegnil posebno pozornost raziskovalcev zaradi raznolike klinične slike, sinteze in izločanja bioaktivnih snovi, od katerih je najpomembnejši kalcitonin, ki je praktično idealen tumorski označevalec. MTC je zanimiv tumor tudi zaradi spremljajočih endokrinopatij (multipla endokrinopatija 2 (MEN2)) in predvsem dejstva, da je lahko sporadična ali dedna bolezen. Slednjo ima 25 do 30% bolnikov z MTC, odstotek pa je po podatkih iz literature odvisen tudi od intenzivnosti presejalnih programov.

Patogeneza sporadičnega MTC ni znana, razvoj pa poteka preko predstopnje - hiperplazije C celic.

MTC se pojavlja dedno v sindromih MEN 2A, 2B in FMCT. Deduje se avtosomno dominantno z visoko prodornostjo a različno izraznostjo. Vznik dedne oblike MTC je posledica zarodnih točkastih mutacij *RET proto-onkogene*, ki potem spremenjen vsposbudi procese maligne transformacije C-celic. Bolnik navadno mutacijo podeduje in je prisotna tudi pri drugih članih krvnega sorodstva, lahko pa nastane »na novo«. RET onkogen z 21 eksoni vključuje tirozin kinazni receptor, ki ima svoj izvenselični cisteinski in znotrajcelični tirozin-kinazni del. Na katerem delu nastane mutacija, v veliki meri določa klinično sliko, kar potrjujejo rezultati presejalnih programov in spremljanje bolnikov. Stalnost povezave med genotipom in fenotipom ima že klinični pomen pri načrtovanju preventivne odstranitve ščitnice

Zdravljenje vseh oblik MTC je kirurško. Totalna tireoidektomija s centralno disekcijo vratnih bezgavk je operacija izbora.

Dedne oblike MTC

Dedna oblika MTC brez drugih endokrinopatij (FMCT)

Dedna oblika MTC brez drugih boleznih sindroma MEN 2 je bila prvič opisana 1986. Od sporadične oblike MTC jo ločimo s pozitivno družinsko anamnezo in

dokazom zarodne mutacije. Mutacije na eksonu 11 (kodon 630) in na eksonu 10 (kodon 609, 611, 618, 620) so najpogosteje odgovorne za FMTC in redkeje za MEN 2A. Do 10% FMCT pa povzročijo tudi mutacije znotrajceličnega tirozin-kinaznega predela gena na eksonu 13 (kodoni 768, 790, 791), eksonu 14 (kodon 804) in eksonu 15 (kodon 891).

Glede na rezultate retrospektivnih študij FMCT klinično poteka najbolj benigno. Podrobnejšo delitev na FMTC in »druge FMTC« določa število družinskih članov z MTC. Tako gre za FMTC, če so v družini vsaj 4 bolniki z MTC, pri družinah z dvema ali tremi bolniki pa govorimo o drugih FMTC. Delitev je nastala z namenom, da se izognemo možnosti nepravilne klasifikacije bolnikov z MEN 2A, kjer se lahko feokromocitom (PHEO) pojavi kasneje kot MTC, primarni hiperparatireoidizem (PHPT) pa ni izražen.

MEN 2A

Točkasta zarodna mutacija na eksonu 11, kodon 634, je odgovorna za približno 80% MEN 2A. Sindrom v 10-60% dopolnjuje še PHEO in v 10-35% primarni PHPT. (13-16) PHEO je približno v 50% bilateralen, malignen pa je v manj kot 10%.

Simptomatika PHEO je lahko zabrisana in hipertenzija je v zgodnjem stadiju bolezni redka in po nekaterih študijah je kar 7% - 37% bolnikov brez vseh težav. Zmerno zvišane vrednosti kalcija in I-PTH sta praktično edini znamenji PHPT v sklopu MEN 2A. PHPT se razvija počasi in klinična slika ne odraža patoloških sprememb kot sta hiperplazija obščitnic in adenomi.

Med variante MEN 2A uvrščajo tudi MTC in cutaneus lichen amiloidozo – srbečo dermatozo na koži med lopaticama ter MTC in Hirschsprungovo bolezen.

MEN 2B

Deden sindrom predstavljajo MTC, PHEO v približno 30% -60% ter ganglionevromatoza sluznic s tipično marfanoidno postavo bolnikov in redko zadebelitve živčnih končičev roženice. Ganglionevromatoza se lahko pojavlja v vseh sluznicah, najpogosteje pa prizadene sluznico ust, jezik in očesne veznice, kar daje bolnikom še dodatno tipičen izgled. V 90% prizadene tudi GIT. Obstipacije in megakolon v otroštvu sicer lahko dajo značilno klinično sliko Hirschsprungove bolezni, a pri bolnikih z MEN 2B gre za ganglionevromatozo in ne agangliomatozo sluznice širokega črevesja kot pri Hirschsprungovi bolezni. V literaturi opisani primeri sočasnega pojava MEN 2 in Hirschsprungove bolezni pri bolniku so primeri MEN 2A.

MTC je v sklopu MEN 2B po kliničnem poteku najbolj malignen. Klinično se manifestira že v ranem otroštvu in je v 90% jasno izražen in napredoval že v prvem desetletju življenja. Mutacije na znotrajceličnem tirozin-kinaznem delu RET proto-onkogenega (ekson 16 kodon 918) pri 95% bolnikov z MEN 2B povzročijo razvoj tipične klinične slike. Po navedbah nekaterih avtorjev kar 50% teh mutacij nastane »de novo«, kar lahko daje varljiv vtis sporadičnosti.

Diagnostika MTC in presajanje

Diagnostika klinično izraženega MTC se ne razlikuje od diagnostike drugih ščitničnih tumorjev.

Diagnozo MTC dokončno potrdimo z imunocitokemičnim dokazom TC v FNAB razmazih in histoloških preparatih.

Dedne oblike MTC lahko odkrivamo s presejanjem (screening) krvnih sorodnikov bolnika z MTC. »Klasično« **presejanje** s stimulacijskim testom s penta-gastrinom omogoča zgodnje odkrivanje MTC in njegove razvojne predstopnje HCC pri krvnih sorodnikih, ki še nimajo ali še ne opazijo znamenj bolezni. »Klasično« presejanje ni izvedljivo pri vsakem preiskovancu, saj je kontraindicirano pri nosečnicah, novorojenčkih, bolnikih z akutnimi razjedami želodca in/ali dvanajstnika, astmatikih, bolnikih s koronarno boleznijo in visokim krvnim pritiskom, znani pa so tudi sopojava pri testiranju. Rezultate presejanja omejujejo tudi tehnični pogoji, vključno z lažno pozitivnimi in negativnimi rezultati stimulacijskega testa. Ker s »klasičnim« presejanjem ugotavljamo prisotnost MTC pri ogroženih sorodnikih v določenem času, moramo v primeru negativnega izvida preiskavo ponavljati letno vsaj do preiskovančevega 45. leta.

S »klasičnim« presejanjem lahko odkrivamo le MTC, drugih spremljajočih bolezni sindroma MEN 2 pa ne.

Genetsko presejanje ima namen odkriti nosilce specifičnih mutacij *RET proto-onkogen*a pred razvojem MTC pri krvnih sorodnikov bolnika z MTC, pri katerem smo določeno mutacijo že dokazali. Že enkratna genske analize krvi »ogroženih« sorodnikov omogoča določiti nosilce specifičnih mutacij *RET proto-onkogen*a, kar pomeni razvoj MTC tekom preiskovančevega življenja v več kot 90%.

Gensko analizo krvi ponovimo le pri odkriti mutaciji, pred zdravljenjem bolnika, da bi se izognili morebitni tehnični napaki (zamenjava vzorca krvi itd.) Genetsko presejanja praktično nima kontraindikacij, zahteva pa še bolj poglobljeno razlago namena in izvedbe presejanja ter razlago rezultatov, ki so dokočni.

Vsi preiskovanci morajo pisno potrditi pristanek na genetsko testiranje po določilih internih predpisov oz. zakona. Odkrita in potrjena specifična mutacija *RET protoonkogen*a je indikacija za preventivno odstranitev ščitnice.

Pri pregledovanih krvnih sorodnikih brez mutacij so možnosti za razvoj MTC enake kot pri ostali populaciji.

S poznavanjem povezav med genotipom in fenotipom lahko poleg MTC predvidimo tudi morebitno večjo možnost drugih bolezni sindroma MEN 2

Naši bolniki

V času 1979 – 2003 smo genetsko testirali 69 od 98 bolnikov z MTC. Mutacije smo našli pri 14 (20.2%) bolnikih in pri 16 od 31 sorodnikov (51.6%).

Namen

Z genetskim presejanjem smo želeli odkriti nosilce mutacij in tako morebitni MTC v čim bolj začetni fazi. Zanimal nas je tudi odnos med najdenim geno-

tipom (mutacijo) in fenotipom (klinično sliko) dednih MTC pri naših bolnikih – predvsem povezavo med mutacijami, velikostjo tumorja, stadijem, spremljajočim PHEO in PHPT in starostjo bolnikov ob diagnozi MTC.

Rezultati

Pri naših bolnikih smo našli mutacije kodonov 618, 634, 790 in pri eni bolnici z MTC 2B kodona 918. Slednja je zaradi jasne klinične slike in dejstva, da je bila mutacija dokazana v tumorju, izpuščena iz nadaljnjih preglednic.

Z genetskim presejanjem smo odkrili 3 nosilce mutacij, pri katerih se MTC še ni razvil, kar je potrdila histologija po opravljeni preventivni tiroidektomiji (TONOMO).

V tabeli 1 so zbrani podatki o bolnikih z mutacijo kodona 634. Te mutacije smo odkrili pri 15 (50%) bolnikih (5M in 10Ž), starih 18-76 let, iz šestih družin. PHEO in PHPT sta bila prisotna le v tej skupini bolnikov, in sicer 12 bolnikov s PHEO in 6 s PHPT.

Tabela 1. Podatki o bolnikih z mutacijo kodonov 634

| Št. bol | Številka družine | Številka bolnika | Starost ob diag. | Spol | Mutacija (exon 11) | PHEO | PHPT | TNM | STADIJ |
|---------|------------------|------------------|------------------|------|--------------------|------|------|----------|--------|
| 1 | 4 | 87 | 44 | Ž | Cys-634-Tyr | R | 0 | T2bN0M0 | 2 |
| 2 | 4 | 91 | 18 | M | Cys-634-Tyr | 0 | 0 | T1bN0M0 | 1 |
| 3 | 4 | 96 | 23 | Ž | Cys-634-Tyr | 0 | 0 | T1bN0M0 | 1 |
| 4 | 4 | 88 | 41 | Ž | Cys-634-Tyr | R | 0 | T1bN1bM0 | 3 |
| 5 | 4 | 95 | 23 | M | Cys-634-Tyr | R | 0 | T1bN0M0 | 1 |
| 6 | 4 | 90 | 19 | M | Cys-634-Tyr | L | 0 | T4bN1bM0 | 3 |
| 7 | 9 | 98 | 55 | Ž | Cys-634-Tyr | 0 | 0 | T2bN1bM0 | 3 |
| 8 | 3 | 82 | 76 | Ž | Cys-634-Gly | BIL | AD | T2bN0M0 | 2 |
| 9 | 3 | 83 | 42 | Ž | Cys-634-Gly | BIL | AD | T2bN1bM0 | 3 |
| 10 | 2 | 4 | 23 | Ž | Cys-634-Arg | BIL | 0 | T2bN1bM0 | 3 |
| 11 | 2 | 80 | 52 | Ž | Cys-634-Arg | BIL | AD | T2bN1bM0 | 3 |
| 12 | 2 | 51 | 33 | Ž | Cys-634-Arg | R | 0 | T2bN1bM0 | 3 |
| 13 | 2 | 3 | 34 | M | Cys-634-Arg | R | 1 | T3bN1bM0 | 3 |
| 14 | 11 | 73 | 28 | Ž | Cys-634-Arg | BIL | AD | T1bN1bM0 | 3 |
| 15 | 12 | 114 | 30 | M | Cys-634-Arg | BIL | H | T1bN1bM0 | 3 |

“Index” bolniki povdarjeni; Št - številko; bol – bolniki; Ž – ženski; M – moški; PHEO – feokromocitom; PHPT – primarni hiperparatireoidizem; AD – adenom; H – hiperplazija, D – desno; L - levo; TNM - UICC tumorska klasifikacija (1997)

Mutacije kodona 618 smo odkrili pri 9 (30%) bolnikih starih 12-65 let (3M in 6Ž) iz štirih družin. V tej skupini je bila tudi bolnica z MTC in Hirschprungovo boleznijo v otroštvu, kar je redek primer, še posebej v povezavi z mutacijo kodona 618.

Mutacije kodona 790 smo dokazali pri 5 (16.6%) bolnikih starih 16-74 let (1M in 4Ž) iz treh družin.

Pri bolnikih z mutacijo kodonov 618 in 790 smo dokazali le MTC (FMTC) oziroma smo pri treh opravili preventivno tireoidektomijo (2 bolnici z mutacijo kodona 790 in ena z mutacijo kodona 618) kjer histološko ni bilo MTC. Tabela 2.

Tabela 2. Podatki o bolnikih z mutacijo kodonov 618 in 790

| Št. bol. | Številka s družine | Številka bolnika | Starost ob diagnozi | Spol | Exon | Mutacija | TNM | STADIJ |
|----------|--------------------|------------------|---------------------|------|------|---------------------|-----------------|----------|
| 1 | 1 | 86 | 22 | Ž | 10 | Cys -618-Ser | T2bN0M0 | 2 |
| 2 | 1 | 24 | 57 | M | 10 | Cys -618-Ser | T2bN0M0 | 2 |
| 3 | 1 | 55 | 31 | Ž | 10 | Cys-618-Ser | T2bN0M0 | 2 |
| 4 | 1 | 94 | 12 | M | 10 | Cys-618-Ser | T1bN1bM0 | 3 |
| 5 | 5 | 101 | 12 | Ž | 10 | Cys -618-Ser | T0N0M0 | 0 |
| 6 | 5 | 97 | 43 | Ž | 10 | Cys -618-Ser | T2bN1bM0 | 3 |
| 7 | 5 | 41 | 28 | Ž | 10 | Cys-618-Ser | T1bN1aM0 | 3 |
| 8 | 10 | 70 | 36 | Ž | 10 | Cys -618-Phe | T2aN1aM0 | 3 |
| 9 | 13 | 85 | 65 | M | 10 | Cys -618-Phe | T3aN1bM0 | 3 |
| 10 | 6 | 103 | 20 | Ž | 13 | Leu-790-Phe | T0N0M0 | 0 |
| 11 | 6 | 62 | 36 | Ž | 13 | Leu-790-Phe | T2aN1aM0 | 3 |
| 12 | 7 | 109 | 51 | Ž | 13 | Leu-790-Phe | T0N0M0 | 0 |
| 13 | 7 | 8 | 16 | M | 13 | Leu-790-Phe | T2aN1aM0 | 3 |
| 14 | 14 | 84 | 74 | Ž | 13 | Leu-790-Phe | T2aN0M0 | 2 |

“Index” bolniki povdarjeni; Št - številko; bol - bolniki; Ž - ženski; M - moški; TNM - UICC tumorska klasifikacija (1997)

Zanimala nas je tudi povezava med starostjo in spolom naših bolnikov z MTC ob diagnozi ter najdenimi mutacijami. Glede opažanja in majhno število bolnikov smo se odločili in združili bolnike z mutacijami v cisteinskem delu RET proto-onkogenega (kodona 618, 634) in jih primerjali z bolniki z mutacijami v tirozin-kinaznem delu (kodon 790). Rezultati so prikazani v Tabeli 3.

Tabela 3. Starost bolnikov ob diagnozi glede na spol in mutacije

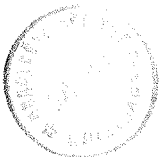
| Spol | Število bolnikov | Mutacije na kodonu/eksonu | Starost Mediana±SD |
|--------|------------------|----------------------------|----------------------------|
| Ženske | 16 4 | 618/10 in 634/11 790/13 | 34.5 ± 15.6 43.5 ± 27.1 |
| Moški | 8 1 | 618/10 in 634/11 790/13 | 26.5±18.0 16 |

SD - standardna deviacija

Zaključek

Jasne so prednosti genetskega presejanja pred »klasičnim« presejanjem s stimulacijskim testom in pomen preventivnih tireoidektomij.

V naši maloštevilni seriji se nakazuje povezava med velikostjo tumorja, stadijem MTC ob diagnozi, starostjo bolnikov in določeno mutacijo RET proto-onkogenega - predvsem pri bolnicah z mutacijo kodona 790. Možen kasnejši vznik MTC ali manj agresiven potek pri teh bolnikih primerjalno z drugimi mutacijami lahko upoštevamo pri načrtovanju preventivne tireoidektomije.



DEDNA OBLIKA MALIGNEGA MELANOMA

Barbara Perić¹, Magdalena Avbelj², Marko Hočevar¹

¹ Onkološki inštitut Ljubljana

² Klinični center Ljubljana

Uvod

Maligni melanom kože je vse do osemdesetih let veljal tako v svetu kot v Sloveniji za relativno redko bolezen. V zadnjih dvajsetih letih pa incidenca raste s podvojitvijo vsakih 6 do 10 let. Incidenca malignega melanoma kože torej narašča hitreje kot incidenca drugih oblik raka. V Sloveniji je bila v letu 2001 incidenca malignega melanoma kože 13,2 na 100.000 prebivalcev, kar nas v primerjavi z drugimi evropskimi državami uvršča v zgornjo polovico. Višjo incidenco imajo v ZDA, v letu 2004 18 na 100.000 prebivalcev, in v Avstraliji, kjer je incidenca v letu 2004 kar 35 na 100.000 prebivalcev. Vzporedno z incidenco pa narašča tudi umrljivost. 5-letno preživetje bolnikov z malignim melanomom kože pade s 96% na 12% v primeru napredovale bolezni. Ker zbolijo pogosto mladi ljudje in zaradi omejenih možnosti zdravljenja v primeru napredovale oblike bolezni, je vse več raziskav usmerjenih v preventivo in zgodnje odkrivanje bolezni.

Dejavniki tveganja za pojav malignega melanoma so tako dejavniki okolja, kot tudi spremembe genoma. Na incidenco vplivajo geografska lokacija, izpostavljenost sončnim žarkom in tip kože. 10% bolnikov z malignim melanomom ima pozitivno družinsko anamnezo. Na splošno predstavlja pozitivna družinska anamneza 2-krat večje tveganje za pojav malignega melanoma.

Ko govorimo o družinski obliki malignega melanoma, to lahko razdelimo v tri skupine: sporadične primere melanoma, ki se naključno kopičijo v določenih družinah, družinsko obliko melanoma, ki je posledica nizko penetrantnih alelov, in družinsko obliko, ki je posledica visoko penetrantnih alelov. To zadnjo obliko imenujemo tudi dedna oblika malignega melanoma in je relativno redka, v to skupino sodi približno 1% vseh melanomov. O dedni obliki malignega melanoma govorimo, ko se ta pojavi pri dveh ali več posameznikih znotraj družine, značilno 10 do 20 let prej kot pri sporadičnih primerih, poleg tega pa imajo posamezniki pogosto multiple primarne melanome. V primeru družin, katerih člani imajo maligni melanom kože in/ali atipične nevuse, govorimo o FAMMM (Familial Atypical Multiple Mole/Melanoma) sindromu .

Visoko penetranten CDKN2A gen

CDKN2A gen na lokusu 9p21 je tumor supresorski gen, povezan z dedno obliko malignega melanoma. Produkt gena sta proteina p16 in p14ARF. Oba

proteina imata skupen drugi in tretji ekson, prvi ekson pa je različen. Ob nastanku p16 se prepíše ekson 1a, ob nastanku p14ARF pa ekson 1b. p16 inhibira kompleks ciklina D in kinaze 4 (CDK 4) ali kinaze 6 (CDK 6), kar posledično zavre fosforilacijo proteina Rb (protein retinoblastoma), celični cikel pa se ustavi v fazi G₁. Okvarjen protein p16 omogoči fosforilacijo proteina Rb, vstop v S fazo in prezgodnje nadaljevanje celičnega cikla. p14ARF prepreči razgradnjo p53, kar zaustavi tako fazo G₁ kot G₂. Poleg tega vpliva tudi na transkripcijske faktorje, na katere se veže protein Rb. Večina mutacij se nahaja na eksonu 1a ali na drugem eksonu. Pogostost teh mutacij naraste s približno 0.01% v splošni populaciji na 40% v družinah z dedno obliko malignega melanoma. Mutacije na drugem eksonu inaktivirajo tako p16 kot p14ARF. Do sedaj so odkrite le tri mutacije, ki se nahajajo na eksonu 1b. Pri bolniku z multiplimi primarnimi melanomi je bila dokazana insercija na eksonu 1b, v družini s štirimi obolelimi člani delecija, opisana pa je tudi substitucija pri dveh članih družine z malignim melanomom.

Spremenjen CDKN2A najdemo pri 50% družin s FAMM sindromom, a povezava gena s številom in displazijo nevusov še ni povsem jasna. CDKN2A je visoko penetranten gen, saj je tveganje za pojav malignega melanoma pri nosilcih mutacije, do osemdesetega leta starosti v Evropi 53%, v ZDA 76%, v Avstraliji pa kar 91%. Podatek kaže, da na penetranco mutacije gena CDKN2A znatno vpliva tudi količina UV žarkov v okolju, v katerem živimo.

Pri majhnem številu družin je opisana mutacija visoko penetrantnega CDK4 gena na kromosomu 12, ki inhibira vezavo proteina p16, v zadnjem času pa so raziskave pokazale da se na kratki ročici kromosoma 1 (1p22) nahaja lokus, ki je prav tako udeležen pri nastanku malignega melanoma (1,2).

Nizko penetrantni aleli, gen MC1R

Tudi nizko penetrantni aleli zvečajo tveganje za pojav malignega melanoma. Eden od teh genov je gen za receptor melanokortina (MC1R gen). Izpostavljenost UV žarkom zveča tvorbo melanina prek slabo poznanih mehanizmov, ki vključujejo direkten učinek žarkov na melanocite, MSH (melanocit stimulirajoči hormon ali melanotropin), aktivacijo melanocitov ter parakrini učinek dušikovega monoksida, ki ga izločajo keratinociti. MSH se veže na melanokortin-1-receptor melanocitov (MC1R) in stimulira tvorbo melanina. Ta je sestavljen iz dveh kemično različnih oblik pigmenta. Evmelanin, prevladujoč pigment pri ljudeh s temnejšo poltjo, je rjavo-črn in deluje fotoprotektivno. Rdeče-rumen feomelanin ima šibek fotoprotektivni učinek, ob fotoaktivaciji pa nastanejo kisikovi prosti radikali, ki delujejo citotoksično in mutageno. Razmerje evmelanin/feomelanin v koži posameznika je odgovorno za različne tipe kože. Pri rdečelascih je prevladujoč pigment v koži in laseh feomelanin, poleg tega pa tvorijo manj evmelanina, zato je njihova koža ob izpostavljenosti soncu hitro opečena in le malo porjavi. Kakšno bo razmerje pigmentov v koži, je odvisno od oblike MC1R. Gen za MC1R se nahaja na lokusu 16q24.3. Za ta gen je značilna visoka stopnja polimorfizma v populaciji, tveganje za pojav melano-

ma pa se pri nosilcu določenega alela zveča za 2 do 4-krat, a je znatno manjše kot v primeru mutacije CDKN2A. Določeni aleli so povezani z različnimi fenotipi oz. različnimi kliničnimi tipi kože. Trije aleli (Arg151Cys, Arg160Trp in Asp294His) so povezani s fenotipom, katerega značilnosti so rdeči lasje, pege in svetla polt, ki ne porjavi, ter predstavlja večje tveganje za nastanek malignega melanoma. Pri nosilcih enega od teh alelov se zveča tveganje kljub temnejši, olivni polti. Poleg tega so nekateri aleli MC1R gena verjetno udeleženi pri nastanku malignega melanoma, neodvisno od njihovega učinka na fenotip. Največje tveganje je morda povezano z alelom Asp84Glu. V avstralski populaciji je 72% bolnikov z melanomom nosilcev vsaj enega od opisanih alelov, v Veliki Britaniji pa 28% preiskovancev. Poleg tega so raziskave pokazale, da naraste penetranca mutacije CDKN2A v prisotnosti enega od opisanih alelov s 50% na 84%, ob tem pa se zniža povprečna starost pojava bolezni z 58 na 37 let (3,4).

Družinska oblika malignega melanoma v Sloveniji

V Sloveniji je predstavljalo začetek raziskav določanje prisotnosti mutacije na eksonih gena CDKN2A, ki kodirajo protein p16, pri osebah z družinsko obliko malignega melanoma. Raziskovalno delo poteka v sodelovanju z genetskim laboratorijem Pediatrične klinike v Ljubljani od leta 2002. Sprva je bilo preiskanih 10 družin z družinsko obliko melanoma. V 50% preiskovanih družin je bila dokazana prisotnost funkcionalno pomembne mutacije CDKN2A gena, kar je več kot je opisano v raziskavah na drugih populacijah. Pri vsaki od petih družin je prisotna druga mutacija, dve od teh do sedaj še nista bili opisani.

V družini s tremi bolniki je bila odkrita nova točkovna mutacija, substitucija v drugem eksonu, ki spremeni aminokislinsko zaporedje proteina p16. Prva bolnica je zbolela v starosti 57 let s štirimi sinhronimi primarnimi melanomi, v naslednjih dveh letih pa je bil odkrit še peti primarni melanom. Poleg nje so heterozigotni nosilci mutacije še štirje sorodniki. Mlajši sorodnik v drugem kolenu je zbolel v starosti 30 let, kar velja za zgoden začetek bolezni, poleg tega pa smo pred kratkim odkrili melanom tudi pri sorodniku v prvem kolenu, ki je zbolel v starosti 41 let.

Pri drugi družini je bila ugotovljena substitucija na področju izrezovalnega zaporedja na meji drugega eksona. Do sedaj je bila opisana le podobna mutacija na istem mestu, ki povzroči moteno izrezovanje drugega eksona in nastanek nefunkcionalnih proteinov p16 in p14ARF.

V tretji družini je bolnik z multiplimi primarnimi melanomi, ki je homozigot za točkovno mutacijo v prvem eksonu, ki povzroči zamenjavo aminokislin in je opisana pri dveh družinah v Italiji in Franciji.

Četrta odkrita mutacija je bila pogosto opisana predvsem v Franciji ter v centralni in severni Italiji. Tudi v tem primeru gre za mutacijo drugega eksona in zamenjavo aminokislin.

Mutacija, odkrita pri peti družini, je prisotna tudi drugje v Evropi in v Avstraliji. Najdemo jo na prvem eksonu, posledica pa je zamenjava aminokislin (5).

Trenutno na Onkološkem inštitutu poteka določanje prisotnosti mutacij genov CDKN2A in MC1R na do sedaj zbranih vzorcih DNK 44 bolnikov z družinsko obliko melanoma. Preiskujemo eksone, ki so potrebni za nastanek proteina p16, in ekson 1b, kjer se lahko nahaja mutacija, ki prizadene izključno delovanje p14ARF. Poleg tega skušamo ugotoviti, kateri od opisanih alelov gena MC1R, ki so povezani z večjim tveganjem za razvoj melanoma, so prisotni v slovenskih družinah. S pomočjo rezultatov bomo določili prevalenco in penetranco gena CDKN2A in gena MC1R pri slovenskih družinah z malignim melanomom.

Ker želimo naše znanje in rezultate primerjati z rezultati raziskovalnih skupin z vsega sveta, smo leta 2005 postali člani GenoMELA. Organizacija, ki je bila ustanovljena leta 1996, se je sprva imenovala Melanoma Genetics Consortium in je združevala le inštitute iz Velike Britanije, Švedske, Pensilvanije in Avstralije. Njen namen je bil predvsem odkriti visoko penetrantne gene malignega melanoma. Da pa bi lahko pojasnili, kako se spreminjajoča količina sončnih žarkov, različni tipi kože in prisotnost mutacije enega ali več genov združijo v nastanek melanoma, je potrebno združiti podatke številnih bolnikov z različnih geografskih leg. Melanoma Genetics Consortium je zato razširil svoje članstvo in se preimenoval v GenoMEL, kar označuje projekt, ki združuje številne ustanove iz Evrope, ZDA in Avstralije. Namen tega je pojasniti genetsko osnovo nastanka melanoma, pojasniti interakcijo odkritih genov z okoljem, oceniti tveganje, ki ga predstavljajo navade povezane s sončenjem, ter vse to predstaviti na svetovnem spletu. Naša udeležba bo omogočila slovenskim bolnikom, njihovim svojcem in širši javnosti dostop do kvalitetnih podatkov o dejavnih tveganja in preprečevanju ter odkrivanju in zdravljenju malignega melanoma.

Zaključek

Kljub velikemu napredku na področju zdravljenja malignega melanoma sta zgodnje odkritje in kirurško zdravljenje še vedno najpomembnejša dejavnika, ki vplivata na preživetje. Poznavanje genov, ki so povezani z večjim tveganjem za nastanek malignega melanoma, nudi možnost genskega testiranja, pri odkritih osebah z visokim tveganjem pa zgodnje odkritje malignega melanoma. Trenutno se gensko testiranje izvaja le v raziskovalne namene. Odsotnost znane mutacije v neki družini namreč ne izključuje zvečanega tveganja za nastanek melanoma, saj so lahko vključeni še neznani geni. Poleg tega v primeru odkrite mutacije ne moremo predvideti, kdaj se bo pojavila bolezen in v kakšen bo njen potek. Kljub temu je smiselno ponuditi testiranje bolnikom z dvema ali več obolelimi člani družine in bolnikom z več kot dvema primarnima melanomoma. Žal enotnega priporočila za nadaljnjo obravnavo nosilcev mutacij še nimamo. Bolnika, ki je nosilec mutacije, je potrebno poučiti o pomenu samopregledovanja. Svetujejo se tudi polletni pregledi pri specialistu, v primeru klinično sumljivih kožnih sprememb, pa se je bolje odločiti za zgodnjo odstranitev, kot za spremljanje in opazovanje. Pomembna je seveda tudi

uporaba zaščitnih sredstev in izogibanje pretirani izpostavljenosti sončnim žarkom.

Kljub temu, da je zaporedje dogodkov, ki pripeljejo do nastanka melanoma šele pred nekaj leti postalo predmet raziskav upamo, da bodo rezultati teh izboljšali predvsem preprečevanje bolezni in zaustavili naraščajočo incidenco melanoma.

Viri in literatura

1. Tsao H, Sober AJ, Niendorf BK, Zembowicz A. Case 6-2004: a 48-year-old woman with multiple pigmented lesions and a personal and family history of melanoma. *N Engl J Med* 2004; 350: 924-932.
2. de Snoo FA, Bergman W, Gruis NA. Familial melanoma: a complex disorder leading to controversy on DNA testing. *Fam Cancer* 2003; 2(2): 109-116.
3. Gibbs P, Brady BM, Robinson WA. The genes and genetics of malignant melanoma. *J Cutan Med Surg* 2002; 6(3): 229-235.
4. Kennedy C, Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* 2001; 117(2): 294-300.
5. Avbelj M, Hocevar M, Trebusak-Podkrajsek K, Krzisnik C, Battelino T. A novel L94Q mutation in the CDKN2A gene in a melanoma kindred. *Melanoma Res* 2003; 13(6): 567-570.

GENI IN NASTANEK MELANOMA

Barbara Perić¹, Magdalena Avbelj², Marko Hočevar¹

¹Onkološki inštitut Ljubljana

²Klinični center Ljubljana

Nastanek malignega melanoma je posledica tako učinkov okolja (izpostavljenosti UV žarkom), kot tudi genotipa posameznika, ki je tem učinkom okolja izpostavljen. Tveganje je torej tako kot pri drugih vrstah raka povezano z geni in okoljem. Vse več raziskav je posvečenih boljšemu razumevanju dejavnikov tveganja in preprečevanju bolezni. Incidenca malignega melanoma namreč povsod po svetu še vedno narašča.

Medtem ko je bila karcinogeneza nekaterih drugih tumorjev že dobro raziskana in poznana, pa to za melanom ni veljalo. Leta 1996 se je zato skupina inštitutov iz Velike Britanije, Švedske, Pensilvanije in Avstralije povezala v organizacijo z imenom Melanoma Genetics Consortium, katere namen je bil odkrivanje visoko penetrantnih genov malignega melanoma. Rezultati so pomagali razumeti, kateri geni predstavljajo visoko tveganje za pojav melanoma, in postavili temelje nadaljnjemu raziskovanju interakcij genov in okolja.

Tako danes vemo, da so del nastanka melanoma visoko penetrantni geni CDKN2A (posebnost tega sta dva različna proteina, p16 in p14ARF, ki nastaneta kot posledica uporabe različnih bralnih okvirjev), CDK4 in novo odkriti gen na lokusu 1p22, ki jih pogosto najdemo pri osebah z dednim melanomom. V to skupino sodi približno 1% bolnikov. Pozitivna družinska anamneza je prisotna pri 10% bolnikov, nastanek melanoma pri teh pa je povezan z nizko penetrantnimi geni. Najbolje raziskan je gen MC1R, ki določa tip melanina v koži.

Da bi pojasnili, kako se spreminjajoča količina sončnih žarkov, različni tipi kože in prisotnost mutacije enega ali več genov združijo v nastanek melanoma, je potrebno združiti podatke številnih bolnikov z različnih geografskih leg.

Zato je Melanoma Genetics Consortium razširil svoje članstvo in se preimenoval v GenoMEL, kar označuje projekt, ki združuje številne ustanove iz Evrope, ZDA in Avstralije. Namen tega je pojasniti genetsko osnovo nastanka melanoma, pojasniti interakcijo odkritih genov z okoljem, oceniti tveganje, ki ga predstavljajo navade povezane s sončenjem, ter vse to predstaviti na spletu v obliki, ki bo dostopna in v pomoč bolnikom in širši javnosti. Član GenoMEL-a je od leta 2005 tudi Onkološki inštitut Ljubljana.

V Sloveniji smo leta 2002 pričeli določati prisotnost mutacije na eksonih gena CDKN2A, ki kodirajo protein p16. Z delom smo pričeli v sodelovanju z Pedia-

trično kliniko. Trenutno na Onkološkem inštitutu poteka določanje prisotnosti mutacij genov CDKN2A in MC1R na do sedaj zbranih vzorcih DNK 44 bolnikov z družinsko obliko melanoma. S pomočjo GenoMEL-a bodo rezultati naše raziskave postali del napredka, ki bo v pomoč tako bolnikom kot zdravnikom.

PREVALENCA MUTACIJE GENA BRCA2 PRI MOŠKIH Z RAKOM DOJKE V SLOVENIJI

Barbara Černivc, Nikola Bešić, Katarina Lokar, Mateja Krajc, Srdjan Novaković, Cvetka Bilban Jakopin, Marko Hočevnar, Janez Žgajnar

Onkološki inštitut Ljubljana

Povzetek

Izhodišče: Rak dojke pri moških je redka bolezen. Rak dojke pri nekaterih bolnikih nastane zaradi mutacije gena BRCA1 ali gena BRCA2. Tveganje za nastanek raka dojke pri moških močno poveča mutacija gena BRCA2.

Namen: Za slovensko populacijo podatkov o prevalenci mutacije gena BRCA2 še nimamo. Namen naše prospektivne populacijske epidemiološke raziskave je ugotoviti, kakšna je prevalenca mutacije gena BRCA2 pri moških z rakom dojke v Sloveniji.

Material in metode: Na Onkološkem inštitutu smo zbrali podatke o 139 moških, ki so zboleli za rakom dojke od leta 1975 do 2006. Živih je še 41 bolnikov in te smo pisno povabili na genetsko svetovanje in gensko testiranje. Kri so analizirali v Laboratoriju za onkološko genetiko Svobodne univerze v Bruslju. Mutacije genov BRCA1 oziroma BRCA2 so ugotavljali s testoma PTT in F-CSGE in sekvencioniranjem vzorcev z nenormalnimi vrhovi.

Rezultati: Genetsko testiranje je bilo izvedeno pri 25 moških. Mutacijo gena BRCA2 smo ugotovili pri štirih moških. Pri treh od njih smo našli slovensko founder mutacijo gena BRCA2 IVS 16-2a>G. Mediana starost vseh bolnikov z rakom dojke je bila 57 let (od 17 do 86 let). Mediana starost bolnikov z mutacijo gena BRCA2 je bila 60 let, ostalih bolnikov pa 57 let. Med bolniki z rakom dojke z mutacijo in tistimi brez mutacije nismo ugotovili statistične razlike glede starosti ($p=0,65$) ali stadija bolezni ($p=0,43$).

Zaključek: Prevalenca mutacije gena BRCA2 pri bolnikih z rakom dojke v Sloveniji je 16%.

ALI JE BRCA1-2 MUTACIJA PRI BOLNICAH Z DVOJNIM PRIMARNIM RAKOM JAJČNIKOV IN DOJK VEDNO PRISOTNA?

Mirjam Cvelbar¹, Marjetka Uršič-Vrščaj², Stelio Rakar³

¹ Zdravstveni dom Novo mesto

² Onkološki inštitut Ljubljana

³ Klinični center Ljubljana

Povzetek

Ozadje: Rak jajčnikov povzroča, tako v Sloveniji kot drugod po svetu, največjo smrtnost med ginekološkimi raki. Odkrivanje zgodnjih stadijev bolezni je ob odsotnosti ustreznega presejalnega testa za celotno populacijo žensk najbolj uspešno v skupini žensk z visokim tveganjem. Najpomembnejši znani dejavnik tveganja za nastanek raka jajčnikov je BRCA1-2 mutacija. Ta se klinično pogosto kaže skozi pozitivno družinsko onkološko anamnezo glede raka jajčnikov in dojk. Ali so pri ženskah s pozitivno družinsko anamnezo glede raka jajčnikov in dojk oziroma s prisotno BRCA1-2 mutacijo prav tako kot v splošni populaciji pomembni tudi drugi znani dejavniki tveganja za nastanek raka jajčnikov in patomorfološki napovedni dejavniki, ostajajo še vedno odprta vprašanja. **Izhajajoč iz nedavnih izsledkov, da je pri dvojnem primarnem raku jajčnikov in dojk BRCA1-2 mutacija prisotna vsaj v 86-87,5%, smo prisotnost dvojnega primarnega raka jajčnikov in dojk privzeli kot surogatno genetsko mero za BRCA1-2 mutacijo** in ocenili, da je ta skupina bolnic najprimernejša za analizo. Namen naše raziskave je bil preverjenje hipoteze, da so pri bolnicah z dvojnimi primarnimi rakom (epitelni rak jajčnikov in rak dojk) in torej predvidoma z BRCA1-2 mutacijo, tudi drugi dejavniki tveganja, poleg specifične družinske onkološke anamneze, pa tudi neugodni patomorfološki napovedni dejavniki bolj izraženi kot pri bolnicah s samo enojnim, sporadičnim epitelnim rakom jajčnikov.

Metode: Primerjali smo preiskovano skupino 31 bolnic z dvojnimi primarnimi rakom, in sicer epitelnim rakom jajčnikov in rakom dojk, z drugo, kontrolno skupino, v katero smo vključili 62 bolnic z enojnim, sporadičnim, epitelnim rakom jajčnikov, brez pozitivne specifične familiarne onkološke anamneze. Podatke o bolnicah, ki smo jih dobili iz Registra raka za Slovenijo, smo dopolnili s pregledom klinične dokumentacije bolnic. Za vsako bolnico smo izpolnili pripravljene protokol in dobljene podatke analizirali. Primerjali smo druge klinične dejavnike tveganja poleg specifične družinske onkološke anamneze

in klinične ter patomorfološke napovedne dejavnike. Za statistično analizo smo uporabljali opisno statistiko, hi-kvadrat test in t test.

Rezultati: Nakazan je bil večji delež pozitivne nespecifične družinske onkološke anamneze v preiskovani skupini, ki pa ni dosegel 5%-ne statistične značilnosti. V prokreativnih dejavnikih tveganja med preiskovano in kontrolno skupino nismo našli značilnih razlik. Mejno značilno je bil prisoten večji delež preiskovanih bolnic, ki so bile ob diagnozi raka jajčnikov v starostnem razredu 45-59 let. Rak jajčnikov je bil v preiskovani skupini značilno pogostejše ugotovljen že v I. stadiju, čeprav se v načinu odkrivanja bolezni skupini nista razlikovali. Prav tako nismo našli razlik med skupinama v porazdelitvi stopenj diferenciacije tumorja in v porazdelitvi patohistoloških tipov tumorja.

Zaključki: Izsledki raziskave niso potrdili naše osnovne hipoteze, ampak so pri dejavnikih tveganja za rak jajčnikov le nakazali nekatere razlike med skupinama. Pri napovednih dejavnikih pa so v skupini bolnic z dvojnimi primarnimi rakom jajčnikov in dojk pokazali celo značilno večji delež I. stadija bolezni ob diagnozi. S tem je **postavljena pod vprašaj tudi domneva, ki izhaja iz nedavnih drugih raziskav v majhnih serijah in na kateri smo zasnovali našo raziskavo, da je pri skoraj vseh bolnicah z dvojnimi primarnimi rakom jajčnikov in dojk prisotna BRCA1-2 mutacija. Pri tej mutaciji so namreč glede na izsledke z genskim testiranjem podprtih raziskav tumorji agresivnejši. Sodeč po naših rezultatih so bolj verjetno bolnice z BRCA1-2 mutaciji le podskupina v skupini bolnic z dvojnimi primarnimi rakom jajčnikov in dojk, kar nakazujejo tudi nekatere druge raziskave. Na to kažejo tudi nekateri preliminarni podatki genetskega testiranja preiskovanih bolnic na Onkološkem inštitutu v Ljubljani.**

Seveda upoštevajoč relativno majhno število bolnic, vključenih v našo raziskavo, naši rezultati lahko služijo le za grobo oceno. Majhno število preiskovanih bolnic tudi v naši raziskavi je posledica nizke incidence dvojnega primarnega raka jajčnikov in dojk, kar predstavlja težavo pri tovrstnih preiskavah povsod po svetu, poleg tega pa je dodatna omejitev v naših razmerah majhnost slovenske populacije.

Za področje primarnega zdravstvenega varstva v Sloveniji glede odkrivanja raka jajčnikov rezultati naše raziskave nakazujejo pomen natančne splošne in še posebno specifične družinske onkološke anamneze glede raka jajčnikov in dojk. Iz pregledane klinične dokumentacije bolnic je bilo razvidno, da je ta pristop v klinični praksi premalo uveljavljen.

Rezultati kažejo tudi na pomen diagnostične opredelitve nespecifičnih simptomov, in to predvsem pri tistih bolnicah, ki imajo pozitivno specifično in/ali splošno družinsko onkološko anamnezo, saj to lahko pomeni odkritje raka jajčnikov v zgodnjem, I. stadiju, ki je prognostično bistveno ugodnejši.

Glede odkrivanja žensk z večjim tveganjem za raka jajčnikov s pomočjo genetskega testiranja in/ali genetskega svetovanja, naši rezultati poudarjajo

pomen ovrednotenja družinske anamneze tudi pri bolnicah z dvojnimi primarnim rakom jajčnikov in dojk, kar bo v korist njihovim sorodnicam.

Za področje zdravljenja rezultati naše raziskave kažejo na potrebnost natančnejšega sledenja bolnic z rakom jajčnikov ali dojk in obenem pozitivno splošno in/ali specifično družinsko onkološko anamnezo.

Ključne besede: rak jajčnikov, rak dojk, BRCA1-2 mutacija, dvojni primarni rak, dejavniki tveganja, napovedni dejavniki.

MOLEKULARNO BIOLOŠKE PREISKAVE LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLEZNI Z UPORABO KLASIČNE METODE PCR

Ira Koković, Rastko Golouh, Janez Jančar, Andreja Zidar,
Srdjan Novaković

Onkološki inštitut Ljubljana

Uvod

Določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifičnih genetskih sprememb ima pomembno vlogo v diagnostiki limfoidnih neoplazem, saj omogoča ločevanje med neoplastičnimi lezijami in reaktivnimi procesi. Klonalno populacijo limfoidnih celic lahko dokažemo s pomnoževanjem preurejenih genov, ki kodirajo težko verigo imunoglobulina (IgH) pri B-celičnih limfomih in γ verigo receptorja T (TcR γ) pri T-celičnih limfomih. Z metodo PCR lahko dokažemo tudi kromosomsko translokacijo t(14;18)(q32;q21) oziroma preurejeno področje bcl-2/IgH pri folikularnem limfomu. Uvedli smo tehnike za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifične kromosomske translokacije t(14;18), ki temeljijo na polimerazni verižni reakciji.

Metode

Opravili smo molekularno biološko preiskavo 168 biopsij različnih limfoproliferativnih boleznih, ki jih nismo mogli opredeliti s klasičnimi morfološkimi in imunofenotipskimi metodami. Tkivne vzorce fiksirane v formalinu in vklopljene v parafin smo zbirali na Oddelku za patologijo Onkološkega inštituta v času od 1997-2005. DNA smo izolirali po ustaljeni metodi. Preurejene gene za IgH in TcR γ smo pomnožili z uporabo oligonukleotidnih začetnikov, ki se prilagajajo na ohranjena področja variabilnih (angl. variable, V) in spajalnih (angl. joining J) genskih segmentov. Pomnožene produkte smo analizirali z gelsko elektroforezo v 10% poliakrilamidnem gelu, obarvanem z etidijevim bromidom, in fotografirali pod UV svetlobo.

Rezultati

Z uporabo novih, molekularnih metod smo določili klonalnost pri 146/167 analiziranih primerov (87,4%). Štiriinpetdeset lezij (32,3%) je bilo monoklon-skih in 92 lezij (55,1%) poliklon-skih. Pri 21 primerih (12,6%) nismo mogli

določiti klonalnosti: 3 primeri so bili oligoklonalski, 12 primerov smo opredelili kot »monoklonsko v poliklonskem ozadju« in 6 primerov je bilo negativnih. Upoštevajoč rezultate tako klasičnih histopatoloških, kot molekularnih preiskav, smo določili tip limfoidne neoplazije pri 94,6% primerov. Od tega je bilo 31,5% B-celičnih limfomov, 21,4% T-celičnih limfomov, 4,8% primerov Hodgkinove bolezni in 36,9% reaktivnih limfoidnih proliferacij. Pri preostalih 5,4% primerov nismo mogli določiti tip limfoidne proliferacije. Preiskali smo tudi 26 limfoproliferacij suspektnih za folikularni limfom. Pri 8 primerih (30,8%) smo dokazali kromosomsko translokacijo t(14;18)(q32;q21), 15 primerov (57,7%) je bilo negativnih in 3 primeri (11,5%) so bili nekonkluzivni.

Zaključki

Opisane molekularne metode so enostavne, hitre in uporabne tudi na majhnih količinah formalinsko fiksiranega, v parafin vklopljenega tkiva. V času sodobnih tehnik genomike in proteomike, določanje klonalnosti in specifičnih genetskih sprememb s klasičnimi metodami PCR še vedno prispeva pomembne klinične in diagnostične informacije.

SODELAVCI 19. ONKOLOŠKEGA VIKENDA

Magdalena Avbelj

Klinični center Ljubljana

Damijan Bergant

Onkološki inštitut Ljubljana

Nikola Bešić

Onkološki inštitut Ljubljana

Mirjam Cvelbar

Zdravstveni dom Novo mesto

Barbara Černivec

Onkološki inštitut Ljubljana

Rastko Golouh

Onkološki inštitut Ljubljana

Cvetka Bilban Jakopin

Onkološki inštitut Ljubljana

Jacques De Grève

Free University of Brussels

Damjan Glavač

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Marko Hočevar

Onkološki inštitut Ljubljana

Janez Jančar

Onkološki inštitut Ljubljana

Nadja Kokalj Vokač

Splošna bolnišnica Maribor

Ira Koković

Onkološki inštitut Ljubljana

Radovan Komel

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Mateja Krajc

Onkološki inštitut Ljubljana

Katarina Lokar

Onkološki inštitut Ljubljana

Srdjan Novaković

Onkološki inštitut Ljubljana

Barbara Perić

Onkološki inštitut Ljubljana

Stelio Rakar

Klinični center Ljubljana

Metka Ravnik-Glavač

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Miljeva Rener

Onkološki inštitut Ljubljana

Mirko Omejc

Klinični center Ljubljana

Vida Stegel

Onkološki inštitut Ljubljana

Pavel Skok

Splošna bolnišnica Maribor

Erik Teugeles

Free University of Brussels

Jože Trontelj

Klinični center Ljubljana

Marjetka Uršič-Vrščaj

Onkološki inštitut Ljubljana

Aleš Vakselj

Onkološki inštitut Ljubljana

Branko Zakotnik
Onkološki inštitut Ljubljana

Andreja Zidar
Onkološki inštitut Ljubljana

Janez Žgajnar
Onkološki inštitut Ljubljana

OSEMNAJST ONKOLOŠKIH VIKENDOV

I.

ONKOLOŠKI DIAGNOSTIČNI MOZAIK
ZDRAVLJENJE OPERABILNEGA RAKA DOJK
ŠMARJEŠKE TOPLICE
6. IN 7. MAREC 1992

II.

RAK MATERNIČNEGA TELESA
MALIGNI TUMORJI MEHKIH TKIV
ŠMARJEŠKE TOPLICE
20. IN 21. NOVEMBER 1992

III.

MALIGNI EPITELNI TUMORJI KOŽE
HODGKINOVA BOLEZEN
ŠMARJEŠKE TOPLICE
2. IN 3. APRIL 1993

IV.

POKLICNE BOLEZNI IN RAK
ZDRAVLJENJE BOLEČINE
ŠMARJEŠKE TOPLICE
22. IN 23. OKTOBER 1993

V.

NE-HODGKINOV LIMFOM
MALIGNI TUMORJI NA MODIH
ŠMARJEŠKE TOPLICE
8. IN 9. APRIL 1994

VI.

KOLOREKTALNI RAK
SPREMLJANJE UMIRAJOČEGA BOLNIKA
ŠMARJEŠKE TOPLICE
21. IN 22. OKTOBER 1994

VII.

RAK GLAVE IN VRATU
ŠMARJEŠKE TOPLICE
31. MAREC IN 1. APRIL 1995

VIII.
Okrogli mizi
DETEKCIJA RAKA DOJK
DETEKCIJA GINEKOLOŠKEGA RAKA
ŠMARJEŠKE TOPLICE
24. IN 25. NOVEMBER 1995

IX.
DIAGNOSTIČNI ALGORITMI RAKA
V AMBULANTI SPLOŠNE PRAKSE
LAŠKO
12. IN 13. APRIL 1996

X.
MEDICINA IN ALTERNATIVA V ONKOLOGIJI
LAŠKO
25. IN 26. OKTOBER 1996

XI.
RAK PREBAVIL
LAJŠANJE KRONIČNE BOLEČINE
BLED
18. IN 19. APRIL 1997

XII.
RAK PROSTATE
PARAPAREZA ONKOLOŠKEGA BOLNIKA
LAŠKO
21. IN 22. NOVEMBER 1997

XIII.
RAK PRI OTROCIH
POSTOJNA
17. IN 18. APRIL 1998

XIV.
PLJUČNI RAK
RAK ŠČITNICE
LAŠKO
(odpovedano 6. in 7. november 1998)
12. IN 13. APRIL 1999

XV.
DRUŽINSKI ZDRAVNIK IN RAK
LJUBLJANA
6. IN 7. OKTOBER 2000

XVI.
DOKTRINI ZDRAVLJENJA BOLNIKOV Z
MALIGNIMI LIMFOMI IN BOLNIC Z RAKOM RODIL
LAŠKO
22. IN 23. NOVEMBER 2002

XVII.
NOVOSTI V ONKOLOGIJI IN
SMERNICE ZA OBRAVNAVO BOLNIC Z RAKOM DOJK IN
BOLNIKOV Z MALIGNIM MELANOMOM
LAŠKO
04. IN 05. JUNIJ 2004

XVIII.
PALIATIVNA OSKRBA BOLNIKOV Z RAKOM
LAŠKO
10. IN 11. JUNIJ 2005

XIX. Onkološki vikend so finančno podprli:

SANOFI - AVENTIS (generalni pokrovitelj)

AMGEN

ASTRAZENECA UK Limited

CSC-PHARMA d.o.o.

ELI LILLY (Suisse) S.A.

FONDACIJA "Docent dr. J. Cholewa"

GSK Glaxo Smith Kline d.o.o.

GRÜNENTHAL, d.o.o.

JANSSEN-CILAG

KULTURNI CENTER LAŠKO

MEDIAS International d.o.o.

MEDIS d.o.o.

MERCK d.o.o.

MSD Merck Sharp&Dohme

NOVARTIS PHARMA SERVICES INC.

ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA

PFIZER

PHARMASWISS d.o.o.

PIVOVARNA LAŠKO

ROCHE farmacevtska družba d.o.o.

SCHERING AG

SCHERING-PLOUGH CE AG

ZVEZA SLOVENSКИH DRUŠTEV ZA BOJ PROTI RAKU



30. 05. 06

Aranesp® (darbepoetin alfa)

je edino eritropoetično sredstvo,
odobreno za **odmerjanje**
enkrat na 3 tedne pri vseh
nemieloičnih malignomih.

UČINKOVITOST:

Hematopoetski odziv* pri 74% analiziranih bolnikov.¹

HITROST:

Aranesp® na 3 tedne zagotavlja hitro izboljšanje ravni hemoglobina.¹

PREPOSTOST:

Nova 500- μ g brizga zdravila Aranesp® omogoča preprosto in učinkovito zdravljenje z manj injekcijami.



**Učinkovito in hitro odpravljanje anemije
je preprostejše kot kdajkoli.**

Literatura: 1. Glaspy J, Appelbaum S, Henry D, et al, and the Darbepoetin Alfa 20010162 Study Group. Effects of darbepoetin alfa (Aranesp®) timing with chemotherapy administration: a randomized study. Poster predstavljen na: The 8th International Conference on Geriatric Oncology-Cancer in the Elderly. The 4th Meeting of SIOG; November 21-22, 2003, Rim, Italija.

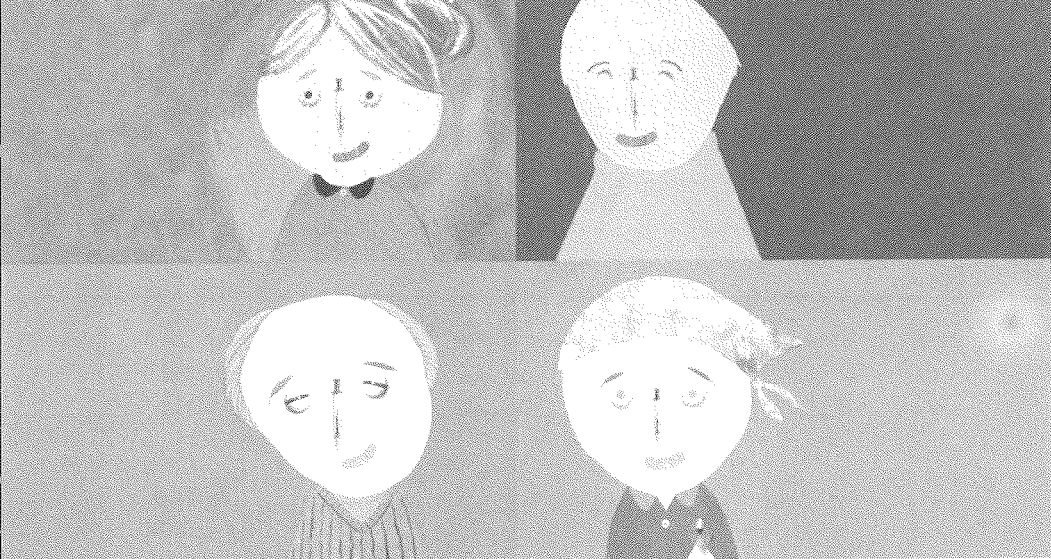
*Hematopoetski odziv = zvišanje hemoglobina ≥ 20 g/l ali celotni hemoglobin ≥ 120 g/l

AMGEN
Onkologija

NOVO Q3W
Aranesp®
(darbepoetin alfa)

Manj injekcij.
Več časa za življenje.





Neulasta® omogoča preprosto, močno zaščito

Močna zaščita pred nevtropeničnimi zapleti

Preprosto odmerjanje enkrat na cikel kemoterapije

Prilagojena zaščita z enim samim samouravnanim odmerkom

Dobro prenašanje: varnostne značilnosti so podobne kot pri filgrastimu

Neulasta® je indicirana za skrajšanje nevtropenije in zmanjšanje incidence febrilne nevtropenije pri bolnikih, ki dobivajo citotoksično kemoterapijo zaradi malignoma (z izjemo kronične mieloične levkemije in mielodisplastičnih sindromov).

AMGEN®

Neulasta®
(pegfilgrastim)



* Bolnice po menopavzi, ki imajo zgodnji invazivni rak dojke s pozitivnimi estrogenskimi receptorji in se ne more zdraviti s tamoksifenom zaradi povečanega tveganja za tromboembolizem ali nenormalnosti endometrija.

Arimidex vodilni zaviralec aromataze

anastrozol

Kratka Informacija o zdravilu Arimidex 1 mg

Sestava: Filmsko obložena tableta vsebuje 1 mg anastrozola.

Indikacije: Adjuvantno zdravljenje žensk po menopavzi, ki imajo zgodnji invazivni rak dojke s pozitivnimi estrogenskimi receptorji in se ne morejo zdraviti s tamoksifenom zaradi povečanega tveganja za tromboembolizem ali nenormalnosti endometrija. Zdravljenje napredovalnega raka dojke pri ženskah po menopavzi. Učinkovitost pri bolnicah z negativnimi estrogenskimi receptorji ni bila dokazana razen pri tistih, ki so imele predhodno pozitiven klinični odgovor na tamoksifen. Odmerjanje in način uporabe: 1 tableta po 1 mg peroralno, enkrat na dan. Pri zgodnjem raku je priporočljivo trajanje zdravljenja 5 let.

Kontraindikacije: Arimidex je kontraindiciran pri: ženskah pred menopavzo, nosečnicah in doječih materah, bolnicah s hujšo ledvično odpovedjo (očistek kreatinina manj kot 20 ml/min (oziroma 0,33 ml/s)), bolnicah z zmernim do hudim jetrnim obolenjem in bolnicah, ki imajo znano preobčutljivost za anastrozol ali za katerokoli drugo sestavino zdravila. Zdravila, ki vsebujejo estrogen, ne smete dajati sočasno z Arimidexom, ker bi se njegovo farmakološko delovanje izničilo. Tamoksifena se ne sme uporabljati skupaj z Arimidexom,

ker lahko pride do zmanjšanja njegovega delovanja.

Posebna opozorila in previdnostni ukrepi: Uporabe Arimidexa ne priporočamo pri otrocih, ker njegova varnost in učinkovitost pri njih še nista raziskani. Menopavzo je potrebno biokemično določiti pri vseh bolnicah, kjer obstaja dvom o hormonskem statusu. Ni podatkov o varni uporabi Arimidexa pri bolnicah z zmerno ali hudo jetrno okvaro ali hujšo ledvično odpovedjo (očistek kreatinina manj kakor 20 ml/min (oziroma 0,33 ml/s)). Ni podatkov o uporabi Arimidexa z analogi LHRH. Te kombinacije zdravil se ne sme uporabljati zunaj kliničnih preskušanj. Pri ženskah z osteoporozo ali pri ženskah s povečanim tveganjem za razvoj osteoporoze je treba določiti njihovo mineralno gostoto kosti z denzitometrijo, na primer s slikanjem DEXA na začetku zdravljenja, pozneje pa v rednih intervalih. Po potrebi je treba začeti z zdravljenjem ali preprečevanjem osteoporoze in to skrbno nadzorovati. Ni verjetno, da bi Arimidex zmanjšal bolnično sposobnost za vožnjo ali upravljanje s stroji. Ker pa so med uporabo Arimidexa poročali o splošni oslabelosti in zaspanosti, je potrebna previdnost pri vožnji in upravljanju strojev, dokler simptoma trajata.

Nosečnost in dojenje: Arimidex je mcd nosečnostjo in dojenjem kontraindiciran. Neželeni učinki: Najpogostejši neželeni učinki s navali vročine, suhost vagine in redčenje las. Ostali neželeni učinki vključujejo gastrointestinalne motnje (anoreksija, slabost, bruhanje, diareja), astenijo, bolečine/okorelost v sklepih, zaspanost, glavobol in izpuščaje. Občasna poročila navajajo krvavitev iz nožnice, I se pretežno pojavlja pri bolnicah z napredovalnim obolenjem raka na dojki v prvih tednih po prehodu z dotedanjega hormonskega zdravljenja na zdravljenje z Arimidexom. Če krvavitev traja dlje časa, so potrebne dodatne preiskave. Hiperholesterolemija, običajno blaga do zmerna. O povišanih nivojih gama-GT in alkalne fosfataze so poročali le občasno. Vzročna povezanost omejenih sprememb ni bila ugotovljena. Medsebojno delovanje z drugimi zdravili: Zdravila, ki vsebujejo estrogen, ne smete dajati sočasno z Arimidexom, ker bi se njegovo farmakološko delovanje izničilo. Tamoksifena se ne sme uporabljati skupaj z Arimidexom, ker lahko pride do zmanjšanja njegovega delovanja. Vrsta ovojnine in vsebina: Pretisni omoti iz PVC in aluminija, ki vsebujejo 28 tablet v škatlici. Režim izdaje zdravila: Rp/Spec Datum priprave informacije: oktober 2005 Pred predpisovanjem, prosimo, preberite celoten povzetek temeljnih značilnosti zdravila.

Vodilni z GEMZARjem

GEMZAR je indiciran za zdravljenje:

- ◆ nedrobnoceličnega karcinoma pljuč
- ◆ adenokarcinoma trebušne slinavke
- ◆ karcinoma sečnega mehurja
- ◆ karcinoma dojke in
- ◆ karcinoma ovarijev

GEMZAR®
(gemcitabin)

Krajši povzetek glavnih značilnosti zdravila

Gemzar 200 mg prašek za raztopino za infundiranje, Gemzar 1 g prašek za raztopino za infundiranje

sestava zdravila: 200 oz. 1 g gemcitabina, manitol, natrijev acetat, klorovodikova kislina in/ali natrijev hidroksid (za uravnavanje pH).
 Terapevtske indikacije: Lokalno napredovali ali metastatski karcinom sečnega mehurja, v kombinaciji z drugimi citostatsičnimi zdravili. Lokalno napredovali ali metastatski nedrobnocelični karcinom pljuč, v kombinaciji z drugimi citostatsičnimi zdravili. Lokalno napredovali ali metastatski adenokarcinom trebušne slinavke, pri bolnikih v dobrem splošnem stanju z zadostnimi rezervami kostnega mozga. Lokalno napredovali ali metastatski karcinom dojke v kombinaciji s paklitakselom pri bolnicah, pri katerih je prišlo do relapsa bolezni po predhodnem predoperativnem in/ali dopolnilnem zdravljenju s citostatiki. Predhodno zdravljenje mora vključevati antracikline, razen če so kontraindicirani. Lokalno napredovali ali metastatski epiteljski karcinom ovarijev, v kombinaciji s karboplatinom, pri bolnikih z relapsom bolezni po vsaj 6-mesečnem obdobju brez relapsa po zdravljenju prvega izbora na osnovi platinne.

Odmerjanje in način uporabe: Karcinom sečnega mehurja (v kombinaciji s cisplatinom 70 mg/m², odrasli in starejši): Priporočeni odmerek gemcitabina je 1000 mg/m², dan kot infuzija v 30 minutah. Odmerek damo 1., 8. in 15. dan vsakega 28-dnevnega ciklusa. Cisplatin damo 1. dan vsakega 28-dnevnega ciklusa. Ta štiri-dnevni ciklus nato ponavljamo. Karcinom dojke (uporaba v kombinaciji s paklitakselom, paklitaksel 175 mg/m² odrasli in starejši): Priporočamo uporabo gemcitabina v kombinaciji s paklitakselom absolutno koncentracijo granulocitov vsaj 1.500 (x 10⁹/l) in hematokrita nad 30%. Pri zdravljenju po tretjedenski shemi je priporočeni odmerek gemcitabina 1250 mg/m² površine telesa, dan kot 30-minutna intraven-

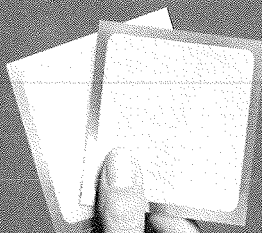
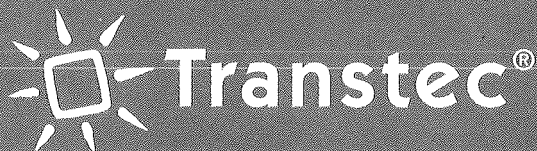
tekočim ciklusom zdravljenja ali ob naslednjem ciklusu zdravljenja znižamo glede na individualno opazovano toksičnost. Pri zdravljenju po štredenski shemi je priporočeni odmerek gemcitabina 1000 mg/m² površine telesa, dan kot 30-minutna intravenaska infuzija 1., 8. in 15. dan ciklusa zdravljenja (28 dni). Karcinom jajčnika (uporaba v kombinaciji, odrasli): Priporočamo gemcitabin v kombinaciji s karboplatinom, z uporabo 1000 mg/m² gemcitabina 1. in 8. dan vsakega 21-dnevnega ciklusa, v obliki 30-minutne intravenaske infuzije. Po gemcitabinu 1. dan damo karboplatin, da dosežemo ciljno AUC 4,0 mg/ml x minuto. Karcinom trebušne slinavke, odrasli in starejši: Priporočeni odmerek gemcitabina je 1000 mg/m² površine telesa, ki ga dajemo kot intravenasko infuzijo v 30 minutah. To ponavljamo enkrat tedensko v obdobju do 7 tednov, ki mu sledi enotedenska prekinitev. V naslednjih ciklusih Gemzar dajemo enkrat tedensko v obdobju treh tednov, ki mu sledi enotedenska prekinitev. Odmerek lahko med tekočim ciklusom zdravljenja ali ob naslednjem ciklusu zdravljenja znižamo glede na individualno opazovano toksičnost. Odmerek lahko z vsakim ciklusom ali med tekočim ciklusom znižamo glede na toksičnost, izraženo pri bolniku. **Kontraindikacije:** Preobčutljivost za gemcitabin ali katero od pomožnih snovi. Bolnikom z zmerno do hudo okvarjenim jetrnim delovanjem ali hudo okvarjenim ledvičnim delovanjem Gemzar ne smemo dajati. **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** Podaljšanje časa infuzije in skrajšanje priporočene intervala med odmerki povežeta toksičnost. Gemcitabin moramo pri bolnikih z blago do zmerno okvarjenim ledvičnim delovanjem in pri bolnikih z blago okvarjenim jetrnim delovanjem uporabljati previdno. Če se pojavijo kakršnikoli znaki mikroangiopatske hemolitične anemije je treba zdravljenje z Gemzarjem prekiniti. Dajanje gemcitabina bolnikom s sočasnimi jetrnimi zaveski ali hepatitisom, alkoholizmom ali jetrno cirozo v preteklosti lahko povzroči poslabšanje osnovnega popuščanja delovanja jeter. Pri bolnikih z okvarjenim delovanjem kostnega mozga je treba zdravljenje začeti previdno. Moških, zdravljenih z Gemzarjem, odvdušujemo spočetje otroka med zdravljenjem in do 6 mesecev po njem. Pred vsakim odmerkom je treba preve-

neželene učinke, povezane z dihalo, je višje pri bolnikih s karcinomom pljuč in pljučnimi zaveski, kot pri drugih tipih tumorjev. V primeru intersticijske pnevmonitis skupaj s pljučnimi infiltrati ter hudih, redko smrtnih pljučnih neželenih učinkih, denimo pljučnem edemu, intersticijskem pnevmonitisu in sindromu akutne dihalne stiske je treba zdravljenje z Gemzarjem prekiniti. Gemcitabin pri otrocih niso preučevali. **Interakcije:** Ob sočasni radioterapiji (obsevanja istočasno ali v roku 5-7 dni pred kemoterapijo ali po njej) gemcitabin deluje radiosenzitivirajoče, poročali pa so tudi o obsevalnih poškodbah na ciljnih tkivih.

Neželeni učinki: Obsevalna toksičnost in odpočitek obsevanja; Zelo pogosti: levkopenija, trombocitopenija, anemija, dispneja, slabost, bruhanje, povišane vrednosti AST, ALT in alkalne fosfataze, alergijski izpuščaj, pogosti s slabljenjem, blaga protenurija in hematurija, edem in periferi edem, gripo podobna simptom, kašelj, inicit, znojenje, motnje spanja, povišana temperatura in astenija; Pogosti: febrilna neutropenija, anoreksija, glavobol, zaspanost, nespečnost, darenja, zaprtje, stomatitis, povišane vrednosti bilirubina, znojenje, srbenje, alopecija, mialgija, bolečine v hrbtu, stiskanje, edem obraza; Manj pogosti: pljučni edem, bronhospazem, intersticijski pnevmonitis; Redki: miokardni infarkt, popuščanje srca, aritmija, hipotenzija, sindrom dihalne stiske pri odraslih, povišane vrednosti gama-GT, luščenje, tvorba mehurjev in razjed, odpoved ledvic, hemolitično-uremični sindrom; Zelo redki: trombocitopenija, anafilaktoidna reakcija, klinični znaki periferne vaskulitise in gangrene, hude kožne reakcije, vključno z luščenjem in buloznimi vbrstmiti. **Imetnik dovoljenja za promet:** Eli Lilly Holdings Limited, Kingscote Road, Basingstoke, Hampshire, RG21 6XA Velika Britanija
 Način in režim izdaje zdravila: H-Zdravlo se izdaja le na recept, uporablja pa se samo v bolnišnicah.
 Datum revizije besedila: 22.04.2005

Eli Lilly (Slovenija) S.A., Podružnica v Ljubljani
Dunajska 156, 1000 Ljubljana, Slovenija
Tel.: (01) 5800 010, faks: (01) 5691 705

L.00.



| | | | | | | | |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| zjutraj | pon. | tor. | sre. | čet. | pet. | sob. | ned. |
| zvečer | čet. | pet. | sob. | ned. | pon. | tor. | sre. |

2x na teden

Prvi in edini obliž z aplikacijo dvakrat na teden

Buprenorfin - edinstveni opioid

Močna in dolgotrajna analgezija

Ugodnejši varnostni profil v primerjavi z ostalimi močnimi opioidi

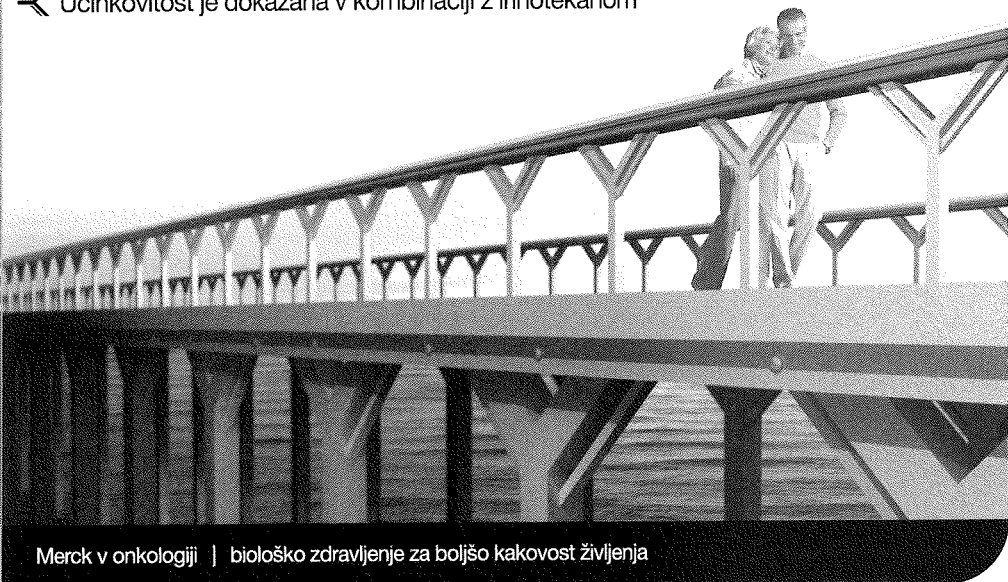
ERBITUX®

CETUKSIMAB

Zavira EGFR - odpira nove možnosti

Ciljno usmerjeno zdravljenje metastatskega raka debelega črevesa in danke

- ↳ Visoko specifično monoklonsko IgG1 protitelo, ki kompetitivno inhibira receptorje za epidermalni rastni faktor (EGFR)
- ↳ Učinkovitost je dokazana v kombinaciji z irinotekanom¹



Merck v onkologiji | biološko zdravljenje za boljšo kakovost življenja

Erbitux 2 mg/ml ractopina za infundiranje (skrajšana navodila za uporabo)

Cetuximab je čimeno monoklonsko IgG1 protitelo, ki je usmerjeno proti receptorju za epidermalni rastni faktor (EGFR). **Terapevtske Indikacije:** Zdravilo Erbitux je v kombinirani terapiji z irinotekanom indicirano za zdravljenje bolnikov z metastatskim rakom debelega črevesa in danke z ekspresijo receptorjev za epidermalni rastni faktor (EGFR), in sicer po neuspešni citotoksični terapiji, ki je vključevala tudi irinotekan. **Odmerjanje in način uporabe:** Zdravilo Erbitux infundirajte enkrat na teden z intravensko infuzijo prek linijskega filtra. Začetni odmerek je 400 mg/m² telesne površine. Naslednji tedenski odmerki so vsak po 250 mg/m². Priporočljivo je, da z zdravljenjem s cetuximabom nadaljujete do napredovanja osnovne bolezni. **Kontraindikacije:** Zdravilo Erbitux je kontraindicirano pri bolnikih z znano hudo preobčutljivostno reakcijo (3. ali 4. stopnje) na cetuximab. **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** Pojav hude preobčutljivostne reakcije (3. ali 4. stopnje) zahteva takojšnjo in stalno ubliniteljno terapijo s cetuximabom. **Neželeni učinki:** Pri približno 5% bolnikov se lahko pojavijo preobčutljivostne reakcije. Približno polovica teh reakcij je hudih. Pri približno 5% bolnikov lahko pričakujemo konjunktivitis. O dispneji so poročali pri 25% bolnikov z rakom debelega črevesa in danke v zadnjem stadiju. Hude kožne reakcije se pojavijo v približno 15%, predvsem nastopajo v obliki aknam podobnega izpuščaja in/ali motenj nohtov. Če se pri bolniku pojavi huda kožna reakcija (stopnje 3), smete zdravljenje nadeljevati le, če se je reakcija pomnila do 2. stopnje. **Pakiranje:** 1 viala po 50 ml. Vsak ml ractopine vsebuje 2 mg cetuximabom.

Ve nadaljnje informacije so vam na voljo pri: Merck d.o.o., Dunajska cesta 119, 1000 Ljubljana, tel.: 01 560 38 10, faks: 01 560 3831, el. pošta: info@merck.si

¹ Dunningham D et al., Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *New ENG J Med* 2004; 351(4): 337-345

PRVI IN EDINI ANTAGONIST NEVROKININ-1 (NK₁) RECEPTORJEV¹



EMEND^{®†}
(aprepitant)

**Preprečevanje akutne in zapoznele
slabosti in bruhanja**

- **Preprečevanje navzeje in bruhanja,
povezanih z zmerno emetogeno kemoterapijo raka¹**
- **Preprečevanje akutne in zapoznele navzeje in bruhanja,
povezanih z zelo emetogeno terapijo raka s cisplatinom¹**

**NOVA
indikacija**



Merck Sharp & Dohme, inovativna zdravila d.o.o.
Šmartinska cesta 140, 1000 Ljubljana, Slovenija
Tel.: 01/52 04 201, faks: 01/52 04 349, 52 04 350

Literatura: 1. Arhiv MSD, Slovenija.

Prosimo, da pred predpisovanjem preberete
priložen Povzetek glavnih značilnosti zdravila.

Zdravilo se izdaja le na zdravniški recept (H/Rp).

[†]Zaščitena blagovna znamka MERCK & Co., Inc., Whitehouse Station, N. J., ZDA.

EMEND 80mg trde kapsule
EMEND 125 mg trde kapsule
SL-EMEA/HC/0527/11

SKRAJŠAN POVZETEK GLAVNIH ZNAČILNOSTI ZDRAVILA
Pred predpisovanjem, prosimo, preberite celoten Povzetek glavnih značilnosti zdravila, ki ga dobite pri naših strokovnih sodelavcih!

Sestava:
EMEND 125 mg trde kapsule in EMEND 80 mg trde kapsule.
Ena 125 mg kapsula vsebuje 125 mg aprepitanta. Ena 80 mg kapsula vsebuje 80 mg aprepitanta. Pomembne snovi: saharoza, mikrokristalna celuloza (E460), hidroksipropilceluloza (E463), natrijev laurilsulfat, želatina, litanov dioksid (E171) - 125 mg kapsule pa se rdeči železov oksid (E172), rumeni železov oksid (E172), šelak, kalijev hidroksid, črni železov oksid (E172).

Terapevtske indikacije:
Preprečevanje akutne in zapoznele navzee in bruhanja povezanih z zelo emetogeno kemoterapijo rakca s cisplatinom.
Preprečevanje navzee in bruhanja, povezanih z zmerno emetogeno kemoterapijo rakca.
EMEND se daje v sklopu kombiniranega zdravljenja (glejte poglavje 4.2 v Povzetku glavnih značilnosti zdravila).

Odmerjanje in način uporabe:
EMEND je na voljo v obliki 80 mg in 125 mg trdih kapsul.
EMEND se daje 3 dni po shemi zdravljenja, ki vključuje kortikosteroid in antagonist 5-HT₃. Priporočeni odmerek zdravila EMEND je 125 mg peroralno prvi dan ter 80 mg enkrat na dan drugi in tretji dan.

Podatki o učinkovitosti pri kombiniranju z drugimi kortikosteroidi in antagonistih 5-HT₃ ni dovolj.
EMEND se lahko jemlje s hrano ali brez. Trdo kapsulo je treba pogoltniti celo.
Starejši bolniki: Pri starejših bolnikih odmerka ni treba prilagajati.

Okvara ledvic: Pri bolnikih z okvaro ledvic in pri bolnikih s končno ledveno odpovedjo, ki se zdravijo s hemodializo, odmerka ni treba prilagoditi.
Okvara jeter: Pri bolnikih z blago okvaro jeter odmerka ni treba prilagajati. Pri bolnikih z zmerno okvaro jeter so podatki omejeni, podatki pri bolnikih s hudo okvaro jeter ni na voljo.
Otroci in mladostniki: Varnost in učinkovitost pri otrocih in mladostnikih nista znani. Uporabe pri bolnikih, ki so mlajši od 18 let, zato ne priporočamo.

Kontraindikacije:
Preobčutljivost za zdravilno učinkovino ali katero koli pomožno snov.
Zdravila EMEND se ne sme uporabljati sočasno s pimozidom, terfenadinom, z astemizolom ali s cisapridom.

Posredna opozorila in previdnostni ukrepi:
Podatki o uporabi pri bolnikih z zmerno okvaro jeter niso znani. Podatki o uporabi pri bolnikih s hudo okvaro jeter ni na voljo. Pri teh bolnikih je treba aprepitant uporabljati previdno.
EMEND je treba uporabljati previdno pri bolnikih, ki sočasno jemljejo zdravila, ki se primarno presnavljajo s CYP3A4. Zato je treba previdno uporabljati kemoterapevte, ki se presnavljajo s CYP3A4. Se posebej je previdnost potrebna pri sočasnem dajanju irinotekana, saj lahko kombinacija poveča toksični učinek.

Pri sočasni uporabi EMEND-a z alkaloidi ržnega rožička (ergot alkaloidi), ki so substrat za CYP3A4, se lahko zviša plazemska raven teh zdravil.
Sočasna uporaba EMEND-a z varfarinom zmanjša protrombinski čas, izražen kot INR (*International Normalised Ratio*). Pri bolnikih, ki se neprenehoma zdravijo z varfarinom, je treba INR skrbno spremljati med zdravljenjem z zdravilom EMEND in 2 tedne po vsakem 3-dnevem ciklusu zdravljenja z EMEND-om.

Med jemanjem EMEND-a se lahko zmanjša učinkovitost oralnih kontraceptivov. Med zdravljenjem z EMEND-om in dva meseca po zadnjem odmerku EMEND-a je treba uporabljati alternativna ali dodatna kontracepcijska sredstva. Sočasnemu jemanju EMEND-a in zdravil, ki močno inducirajo aktivnost CYP3A4 (npr. rifampicin, fenitoin, karbamazepin, fenobarbital), se je treba izogibati, ker kombinacija povzroči zmanjšanje plazemskih koncentracij aprepitanta. Sočasna

uporaba EMEND-a in šentjanževke ni priporočljiva. Potrebna je previdnost pri sočasni uporabi EMEND-a in zdravil, ki zavirajo aktivnost CYP3A4 (npr. ritonavir, ketokonazol, klaritromicin, telitromicin), ker kombinacija povzroči zvišanje plazemskih koncentracij aprepitanta.
Bolniki z redkimi dednimi motnjami fruktozno intoleranco, malabsorpcijo glukoze in galaktoze ali insuficienco saharoze-izomaltaze ne smejo jemati tega zdravila.

Medsebojno delovanje z drugimi zdravili in druge oblike interakcij:
Aprepitant je substrat, zmedni zaviralec in induktor CYP3A4. Aprepitant je tudi induktor CYP2C9.

Kot zmedni zaviralec CYP3A4 lahko aprepitant zviša plazemske koncentracije sočasno uporabljenih zdravil, ki se presnavljajo s CYP3A4. AUC peroralno vzetih substratov CYP3A4 se lahko poveča do približno 3-krat. Pri sočasnem jemanju s substrati CYP3A4 svetujemo previdnost.

EMEND-a se ne sme uporabljati skupaj s pimozidom, terfenadinom, z astemizolom ali s cisapridom. Aprepitant zavira CYP3A4, zaradi česar bi se lahko zvišale plazemske koncentracije tega zdravil, kar bi lahko povzročilo resne ali življenjsko ogrožajoče reakcije.

Kot zmeden induktor CYP2C9 in blag induktor CYP3A4 in glukuronidacije, lahko aprepitant zniža plazemske koncentracije substratov, ki se izločajo po koncu zdravljenja z EMEND-om. Indukcija substratov CYP2C9 in CYP3A4 je prehodna, maksimalni učinek pa je dosežen v 3-5 dneh po koncu 3 dnevnega zdravljenja z zdravilom EMEND. V tem obdobju svetujemo previdnost pri dajanju peroralnih zdravil, ki se presnavljajo s CYP3A4.

Pokazano je bilo, da aprepitant inducira presnavljanje S₁ varfarina in tolbutamida, ki se presnavljata s CYP2C9. Sočasno dajanje EMEND-a in teh ali drugih zdravil, ki se presnavljajo s CYP2C9, denimo fenitoina, lahko zniža plazemske koncentracije teh zdravil, zato svetujemo previdnost.

EMEND nima medsebojnega vpliva z digoksinom, zato verjetno ne interagirata s P-glikoproteinskimi prenašalci.

Kontraindikacije:

Doksameterol: Pri sočasnem jemanju z EMEND-om je treba običajni peroralni odmerek zmanjšati za približno 50%.
Mefenazolin: Pri sočasni uporabi z EMEND-om je treba običajni intravenski odmerek mefloksidolona zmanjšati za približno 25% običajni peroralni odmerek metilprednizolona pa za približno 50%.

Kemoterapevtiki: V kliničnih raziskavah so EMEND uporabljali skupaj z naslednjimi kemoterapevtiki, ki se predvsem ali delno presnavljajo s CYP3A4: etopozid, vinorebin, docetaksel in paklitaksel. Odmerkov teh zdravil niso prilagajali glede na morebitno medsebojno delovanje zdravil. Svetujemo previdnost; pri bolnikih, ki dobivajo taka zdravila, je lahko potreben dodaten nadzor.

Midazolam: Pri sočasni uporabi z EMEND-om je treba upoštevati možne učinke zvišanih plazemskih koncentracij midazolama in drugih benzodiazepinov, ki se presnavljajo predvsem s CYP3A4 (alprazolam, triazolam).
EMEND poveča AUC midazolama, ki je občutljiv substrat za CYP3A4.

Varfarin: Pri bolnikih, ki se dolgotrajno zdravijo z varfarinom, je treba protrombinski čas (INR) skrbno nadzorovati med zdravljenjem z zdravilom EMEND in 2 tedna po vsakem 3-dnevem ciklusu zdravljenja z EMEND-om.
Tolbutamid: EMEND je pri jemanju po shemi 125 mg prvi dan ter 80 mg drugi dan in tretji dan zmanjšal AUC tolbutamida (ki je substrat za CYP2C9), ki so ga bolniki prejimali v enkratnem odmerku 500 mg per os od začelom 3-dnevne sheme odmerjanja EMEND-a ter 4., 8. in 15. dan, in sicer za 23% 4. dan, za 28% 8. dan in za 15% 15. dan.

Oralni kontraceptivi: Med jemanjem EMEND-a se lahko zmanjša učinkovitost oralnih kontraceptivov. Med zdravljenjem z EMEND-om in dva meseca po zadnjem odmerku EMEND-a je treba uporabljati alternativne ali dodatne kontracepcijske metode.
Antagonisti 5-HT₃: V kliničnih raziskavah medsebojnega delovanja aprepitant ni imel klinično pomembnih učinkov na farmakokinetiko ondansetrona in granisetrona.

Vplivi drugih zdravil na farmakokinetiko aprepitanta:
Potrebna je previdnost pri sočasni uporabi EMEND-a in zdravil, ki zavirajo aktivnost CYP3A4 (npr. ritonavir, ketokonazol, klaritromicin, telitromicin), ker se zaradi kombinacije zvišajo plazemske koncentracije aprepitanta.

Sočasnemu dajanju EMEND-a in zdravil, ki močno inducirajo aktivnost CYP3A4 (npr. rifampicin, fenitoin, karbamazepin, fenobarbital), se je treba izogibati, saj se pri kombiniranju zmanjšajo plazemske koncentracije aprepitanta, zaradi česar se lahko zmanjša učinkovitost EMEND-a. Sočasno uporabo EMEND-a in šentjanževke odsvetujemo.
Ketokonazol: Pri enkratnem odmerku 125 mg EMEND-a in 500 mg 10-dnevnega zdravljenja s ketokonazolom (ki je močan zaviralec CYP3A4) 400 mg na dan, se je AUC aprepitanta

povečeval za približno 5-krat, povprečni terminalni razpolovni čas aprepitanta pa se je povečal približno za 3-krat.

Rifampicin: Pri enkratnem odmerku 375 mg EMEND-a 9. dan 14-dnevnega zdravljenja z rifampicinom (ki je močan induktor CYP3A4) 600 mg na dan, se je AUC aprepitanta zmanjšal za 91%, povprečni terminalni razpolovni čas aprepitanta pa se je za 68% zmanjšal.

Neželeni učinki:

Velosti aprepitanta so ocenjevali pri približno 3800 preiskovanih.

O kliničnih neželenih učinki, ki so jih raziskovalci opredelili kot zgodbo, povezane z zdravilom, so poročali pri približno 17% bolnikov, zdravljenih z aprepitantom, ter pri 13% bolnikov, zdravljenih z običajno terapijo (pri bolnikih, ki se zaradi raka zdravijo z zelo emetogeno kemoterapijo). Zaradi neželenih učinkov so zdravljenje prekinitli pri 0,6% bolnikov, zdravljenih z aprepitantom, ter pri 0,4% bolnikov, zdravljenih s standardno terapijo. V klinični raziskavi bolniki, ki so dobivali zmerno emetogeno kemoterapijo, so o kliničnih neželenih učinkih poročali pri približno 21% bolnikov, zdravljenih z aprepitantom, ter pri približno 20% bolnikov, zdravljenih s standardno terapijo. Zdravljenje z aprepitantom so zaradi neželenih učinkov prekinitli pri 1,1% bolnikov, zdravljenih z aprepitantom, ter pri 0,5% bolnikov, zdravljenih s standardno terapijo.

Najpogostejši neželeni učinki, o katerih so pri zdravljenju z aprepitantom pri bolnikih, ki so dobivali zelo emetogeno kemoterapijo, poročali pogosteje kot pri običajni terapiji, so bili: kolcanje (4,6%), oslablost/utrujenost (2,9%), zvišanje alaninaminotransferaze (ALT) (2,8%), zaprtje (2,2%), glavobol (2,2%) ter anoreksija (2,0%). Najpogostejši neželeni učinek, o katerem so pri bolnikih, ki so dobivali zmerno emetogeno kemoterapijo, poročali pogosteje kot pri bolnikih, ki so bili zdravljeni s standardno terapijo, je bila utrujenost (2,5%). Pri bolnikih, zdravljenih z aprepitantom, so opazili naslednje neželene učinke, ki so se pojavljali pogosteje kot pri običajni terapiji:

Pogoste (>1/100, <1/10): anoreksija, glavobol, omotica, kolcanje, zaprtje, driska, dispneja, erukcija, oslablost/utrujenost, zvišanje ALT, zvišanje aspartataminotransferaze (AST).

Občasne (>1/1000, <1/100): kandidiaza, okužbe s stafilokoki, anemija, febrilna neutropenija, pikozičnost telesne teže, polidipsija, dezorientacija, evforija, anabioznost, nenormalne sline, moljne mišljenja, konjunktivitis, tinitus, bradikardija, navali vročine, faringitis, kihanje, kašelj, zalezanje izcedka iz nosu v zrela, draženje žrela, navzeja*, bruhanje*, refleks kisline, motnje okusa, neugodje v epigastriju, zaprtje, gastroezofagalna refleksna bolezen, predrtje razjede dvanajstnika, bolečine v trebuhu, suha usta, enterokolitis, vetrovi, stomatitis, izpuščaji, akne, fotosenzitivnost, prekomerno potenje, mastna koža, srbenje, lezije kože, mišični krči, bolečine v mišicah, polipija, oluzija, polakuzna, bolečine v trebuhu, otekanje, zardevanje, nelagodje v prsnem košu, letargija, žej, zvišanje alkalne fosfataze, hiperglikemija, mikrohematurija, hiponatremija, znižanje telesne teže.
*Navzeja in bruhanje sta bila parametra učinkovitosti prvih 5 dni po kemoterapiji; o njih so kot o neželenih učinkih poročali šele po tem času.

Profil neželenih učinkov je bil v podatkih raziskave z več ciklusi zdravljenja (do 5 dodatnih ciklov kemoterapije) na splošno podoben listemu po prvem ciklusu. Pri enem bolniku, ki je dobival aprepitant ob kemoterapiji zaradi raka, so poročali o Stevens-Johnsonovem sindromu kot o resnem neželenem učinku. Pri enem bolniku, ki je prejel aprepitant, vendar ne v raziskavi CIN (Cisplatin-induced Nausea and Vomiting), so poročali o anგიედemu in kopricivni kot o resnem neželenem učinku.

Aprepitanta ni mogoče odstraniti s hemodializo.
Vrsta ovjovline in vsebine: Na voljo so različna pakiranja, ki vsebujejo različne jakosti zdravila. Aluminjasti prekriti omet, ki vsebuje eno 125 mg kapsulo in dve 80 mg kapsuli. Na tgu ni vsehnavednih pakiranj.

Imetnik dovoljenja za promet:
Merck Sharp & Dohme Ltd.
Herford Road, Hoddeston
Herfordshire EN11 9SU
Velika Britanija

Način in režim izdaje zdravila: Izdaja zdravila je na recept!
Datum zadnje revizije besedila: november 2005.

EMD-ABI-003

† Zaščitená blagovna znamka MERCK & CO., INC., Whitehouse Station, N.J., ZDA.



Merck Sharp & Dohme, inovativna zdravila d.o.o.
Šmarlarska cesta 140, 1000 Ljubljana, Slovenija
Tel.: 01/52 04 201, faks: 01/52 04 349, 52 04 350

Tiskano v Sloveniji, marec 2006.
03-07-EMD-06-SLO-009-Z



PRAVI TRENUTEK ZA NOV ZAČETEK

AROMASIN®
eksemestan

BISTVENE INFORMACIJE IZ POVZETKA GLAVNIH ZNACILNOSTI ZDRAVILA AROMASIN®

Sestava in oblika zdravila: obložena tableta vsebuje 25 mg eksemestana. **Indikacije:** zdravljenje napredovalnega raka dojke pri ženskah z naravno ali umetno povzročeno menopavzo, pri katerih je boljšen napredovala po antiestrogenski terapiji. Učinkovitost se ni bila dokazana pri bolnicah, pri katerih tumorske celice nimajo estrogenskih receptorjev. **Odmevanje in način uporabe:** 25 mg enkrat na dan, najbolje po jedi. Zdravljenje naj traja, dokler je opazna rast tumorja. **Oljarna jeter in ledvice:** odmerka ni potrebno prilagoditi. **Otroci:** zdravilo se ne uporablja. **Kontraindikacije:** znana preobutljivost za zdravilno učinkovino ali za katero od pomožnih snovi, pri ženskah pred menopavzo, nosečnicah in doječih materah. **Posebna opozorila in previdnostni ukrepi:** ne sme se predpisovati ženskam s predmenopavznim endokrinim statusom, zato je treba v vseh klinično ustreznih primerih potrditi pomenopavzni endokrin status ženske. Pri bolnicah z jetrno ali ledvično okvaro je treba Aromasin uporabljati previdno. **Medsebojno delovanje z drugimi zdravili:** *in vitro* izsledki kažejo, da se zdravilo presnovi s pomočjo citokroma P450 (CYP) 3A4 in aldoketoreduktaz in da ne zavira nobenega od pomembnejših izoenzimov CYP. Uporabljati ga je treba previdno z zdravili, ki se presnavljajo s pomočjo CYP 3A4 in ki imajo ozek terapevtski interval. Kliničnih izkušenj s hkratno uporabo zdravila Aromasin in drugih zdravil proti raku ni. Aromasin se ne sme jemati sočasno z zdravili, ki vsebujejo estrogen, saj bi ta izničila njegovo farmakološko delovanje. **Uporaba med nosečnostjo in dojenjem:** je kontraindicirana. **Vpliv na sposobnost vožnje in upravljanja s stroji:** zaradi zaspanosti, somnolence, astenije in omotice, ki se lahko pojavijo po uporabi zdravila, je sposobnost za upravljanje s stroji ali vožnjo avtomobila zmanjšana. **Neželeni učinki:** v kliničnih raziskavah so bili neželeni učinki običajno blagi do zmerni. **Pogostejši od 10 %:** navali vročine in slabost. **Pogosti:** utrujenost, močnejše znojenje in omotica. **Majh pogosti (2 % ali več):** glavobol, neapetnost, bolečine, kožni izpuščaji, trebušne bolečine, anoreksija, bruhanje, depresija, alopecija, periferni ali nožni edemi, zaprtje in dispepsija. **Občasno:** zmanjšanje števila limfocitov, trombopenija, levkopenija in zvišanje vrednosti jetrnih encimov in alkalne fosfataze. **Preveliko odmevanje:** specifičnega antidota za preveliko odmevanje ni. **Način in režim izdajanja:** zdravilo se izdaja le na recept, uporablja pa se po navodilu in pod posebnim nadzorom zdravnika specialista ali od njega pooblaščenega zdravnika. **Imetnik dovoljenja za promet:** Pfizer Luxembourg S.A.R.L., 283, route d'Arion, L-8011 Strassen, Luksemburg. **Datum zadnje revizije besedila:** 5.10.2001.

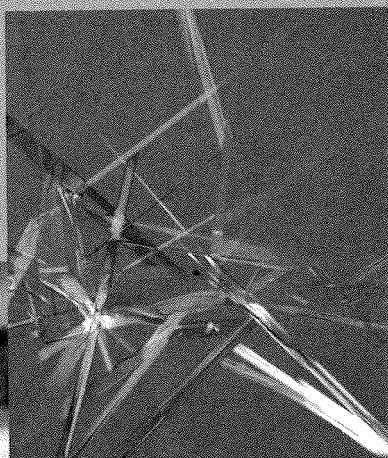
Pred predpisovanjem se seznanite s celotnim povzetkom glavnih značilnosti zdravila.

Podrobnejše informacije o zdravilu so na voljo pri:
Pfizer, podružnica za svetovanje s področja farmacevtske dejavnosti, Ljubljana, Letaška cesta 3c, 1000
Ljubljana

Pfizer



vodilni v onkologiji



Švicarska farmacevtska družba Hoffmann-La Roche Ltd z raziskavami na področju onkologije razvija številna nova zdravila, ki pomenijo napredek v zdravljenju raka.

www.roche.si

NAVODILA AVTORJEM

Vabljeni predavanja

Vabljeni predavatelji so dolžni pripraviti pregled predavane snovi, ki ga bomo izdali v zborniku Onkološkega vikenda. Rokopise (original in 2 kopiji) je potrebno poslati ga. Nives Turk, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana. Poleg tiskane verzije je potrebno poslati tudi verzijo na 3.5" 1.44 Mb disketi z oznako programa v katerem je tekst napisan (najraje Word za Windowse), ali po elektronski pošti (nturk@onko-i.si). Organizacijski odbor si pridržuje pravico, da kadar je to potrebno avtorjem predlaga vsebinske, slovnične in stilistične spremembe.

- Sestavek naj bo napisan z dvojnimi razmakom, dolg največ 5 (A4) tipkanih strani (vključujoč literaturo).
- Sestavek naj bo napisan kot pregledni članek, ter razdeljen z informativnimi podnaslovi.
- Vsak sestavek mora vsebovati **Povzetek** (do 250 besed, na posebni strani) in na koncu **Zaključek**.
- Naslov prispevka naj bo čim krajši in čim bolj informativen.
- Polno ime(na) avtorja(jev) naj bo pod naslovom skupaj z naslovom inštitucije, kjer je avtor zaposlen:

Janez Janko¹, Lojze Rome²

¹*Onkološki inštitut, Oddelek za tumorsko biologijo, Zaloška 2, 1105 Ljubljana,*

²*Pediatrična klinika, Oddelek za interno medicino, Vrazov trg 4, 1000 Ljubljana*

- Vse kratice je potrebno obrazložiti, ko se prvič pojavijo v tekstu.
- Ilustracije in tabele morajo biti jasno označene s pripadajočimi naslovi (pri tabelah naslovi in pri ilustracijah podnaslovi).
- Citirane literature ni potrebno navajati v tekstu ampak kot **Viri in literatura** na koncu sestavka.
- Navedena literatura v poglavju **Viri in literatura** naj bo citirana po vankuverskemu načinu:

članki

Novaković S, Marolt F, Serša G. The use of MCA and CEA in prostatic cancer follow-up. *Radiol Jugosl* 1990; 24: 417-21.

poglavje v knjigi

Squire J, Phillips RA. Genetic basis of cancer. In: Tannock IF, Hill RP, eds. *The basic science of oncology*. New York: Mc Graw-Hill, 1992: 41-60.

knjiga

Rubin P, ed. *Clinical oncology: A multidisciplinary approach for physicians and students*, 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993: 791.

- Naslove revij krajšamo tako, kot določa Index Medicus.
Navajamo imena vseh avtorjev razen če jih več kot 6, kjer navajamo samo imena prvih treh in zaključujemo z "et al.". Če je citirani prispevek v slovenščini zaključujemo z "in ostali".

Objavljeni povzetki

Vsi aktivni udeleženci strokovnega srečanja naj pripravijo Povzetke svojih prispevkov. Povzetki naj bodo dolgi do 300 besed in naj vključujejo:

- naslov prispevka (čim krajši in čim bolj informativen),
- polno ime(na) avtorja(jev) pod naslovom skupaj z naslovom inštitucije, kjer je avtor zaposlen (primer prikazan zgoraj),
- tekst povzetka, ki lahko vključuje tudi največ eno tabelo in eno sliko.

19. ONKOLOŠKI VIKEND
(Zbornik)

Uredniki:

J. Žgajnar, S. Novaković, N. Bešić, S. Frković-Grazio, B. Šeruga, B. Zakotnik

Izdali:

Kancerološko združenje Slovenskega zdravniškega društva,
Onkološki inštitut Ljubljana in Zveza slovenskih društev za boj proti raku

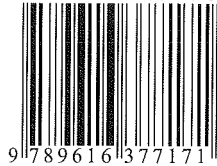
Naklada:

300 izvodov

Natisnil:

Nejc d.o.o., Ljubljana, maj 2006

ISBN 961-6377-17-5



9 789616 377171



TAXOTERE[®]
(docetaksel)

Eloxatin[™]

OXALIPLATIN 5 mg/ml



sanofi aventis

Ker je zdravje neprecenljivo

Pred predpisovanjem, prosimo, preberite "Povzetek glavnih značilnosti zdravila".
Podrobnejše informacije so na voljo na sedežu podjetja: Dunajska cesta 119,
Ljubljana, tel.: 01/560 48 00, fax: 01/560 48 46