

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

ELIŠKA KETNEROVÁ

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení BRCA – rodinná analýza

Bakalářská práce

2020

Eliška Ketnerová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Eliška Ketnerová**
Osobní číslo: **C17173**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Stanovení BRCA – rodinná analýza**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Provedení literární rešerše na dané téma.
2. Využití informací z rodinných anamnéz při analýzách BRCA.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.

Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce:

20. prosince 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2020

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Eliška Ketnerová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této práce.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá genetickou mutací genu BRCA 1 a 2. V práci je zahrnuta obecná charakteristika těchto genů, incidence a testování BRCA genů s následným zaměřením na genetické poradenství, rodinnou historii a anamnézu v souvislosti s rodokmeny a jejich významem v problematice genetické dědičnosti a mutace. V závěru se práce věnuje laboratorním metodám, které jsou užívané pro stanovení mutací BRCA 1/2 genu, léčbě a prevence BRCA nosiček.

KLÍČOVÁ SLOVA

mutace genu BRCA 1, mutace genu BRCA 2, rodokmeny, dědičnost, BRCA – nosiči, léčba, prevence

TITLE

Determination of BRCA – family analysis

ANNOTATION

The bachelor's thesis deals with the genetic mutation of the BRCA 1 and 2 genes. The thesis includes general characteristics of these genes, incidence and testing of BRCA genes with subsequent focus on genetic counseling, family history and anamnesis in connection with pedigrees and their importance in genetic inheritance and mutation. Finally, the work deals with laboratory methods that are used to determine mutations in the BRCA 1/2 gene, treatment and prevention of BRCA carriers.

KEYWORDS

BRCA 1 gene mutation, BRCA 2 gene mutation, pedigrees, heredity, BRCA – carriers, treatment, prevention

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
TERMINOLOGIE	14
ÚVOD.....	18
1 Historie.....	19
1.1 Gen BRCA 1	19
1.2 Gen BRCA 2	19
1.3 Sekvenční varianty	20
1.4 Mutace.....	20
1.5 Tumorigeneze a BRCA	20
1.6 Patogenní mutace a populace	22
2 Popis současného stavu.....	23
2.1 Incidence	23
2.2 Testování BRCA genů	24
2.3 Doporučení k testování BRCA genů.....	24
2.4 Indikace k testování BRCA genů.....	25
2.4.1 HBOC	25
2.5 Genetické testy	26
2.5.1 Genetická informace	27
2.5.2 Penetrance	27
2.6 Genetické poradenství	28
2.6.1 Význam genetické poradenství.....	29

2.7	Rodinná historie	30
3	Laboratorní vyšetření	31
3.1	HA – Heteroduplexní analýza	31
3.2	PPT – Protein Truncation Test	31
3.3	HRM – High Resolution Melting	31
3.3.1	Princip analýzy	32
3.4	Přímé sekvenování	33
3.4.1	Sekvenátor Genetic Analyser	33
3.5	MLPA metoda – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	33
3.5.1	Princip MLPA metody	34
3.6	PCR	34
3.6.1	Multiplexní PCR	34
3.6.2	Speciální PCR – Multiplex Bisulfite PCR-LDR-qPCR test	35
3.7	Obohacovací metody	35
3.7.1	MIP – molekulární inverze sondy	36
3.8	Hybridizace	36
3.8.1	Hybridizační obohacovací metody	37
3.9	Sekvenování nové generace	38
3.9.1	Výhody NGS	39
3.9.2	Nevýhody NGS	39
3.9.3	Platformy NGS	40
3.9.4	Illumina	41
3.9.5	Ion Torrent	41
3.9.6	Cílené sekvenování genomu	43

4	Léčba.....	44
4.1	Inhibitory PARP.....	44
4.1.1	Léčba pomocí inhibitorů PARP	45
4.1.2	Duální terapeutický potenciál pro inhibici PARP v onkologii	45
4.2	Chirurgická operace	45
4.3	Chemoterapie	45
4.3.1	Taxany	46
4.3.2	Platinová činidla	46
5	Prevence BRCA-pozitivních nosiček	47
5.1	Rodinná anamnéza	48
5.1.1	Význam rodinné anamnézy	49
5.1.2	Nepřesnosti rodinné anamnézy	50
5.1.3	Benefity anamnézy	50
5.2	Rodokmen	50
5.2.1	Třígenerační rodokmen.....	51
5.2.2	Standarty nomenklatury	51
5.2.3	Dědičné znaky patogenních variant BRCA 1 a BRCA 2	53
5.2.4	Rodokmen s negativní mutací BRCA.....	58
5.3	Bilaterální profylaktická mastektomie	58
5.4	Mamografie	59
5.5	MRI=Magnetická rezonance	60
6	Závěr	61

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Schématické zobrazení segmentů genů BRCA 1 a BRCA 2 na molekule DNA [13.].....	20
Obrázek 2 - A) popis funkcí BRCA1 a BRCA 2, B) ztráta druhé alely BRCA u nosiče mutace BRCA [13.].....	21
Obrázek 3 - Hybridizační metoda [9.]	38
Obrázek 4 - a) Illumina sekvenování pomocí můstkové PCR a opakovaného fluorescenčního zobrazování polymerázových kolonií, b) Ion Torrent sekvenování pomocí pH pro detekci začlenění nukleotidů [40.].....	42
Obrázek 5 - Standardní nomenklatura rodokmenu. Společné symboly se používají k nakreslení rodokmenu. Rodokmen ukazuje vztahy mezi členy rodiny a vzorce dědičnosti pro určité rysy a nemoci. [25.].....	52
Obrázek 6 - Rodokmen BRCA 1 mutace [25.].....	53
Obrázek 7 - Rodokmen BRCA 2 mutace [25.].....	54
Obrázek 8 - Rodokmen pacientky studie se známou familiární mutací BRCA 1 [31.].....	55
Obrázek 9 - Rodokmen dvou rodin splňujících kritéria pro dědičnou rakovinu prsu a vaječníků [39.]	56
Obrázek 10 – Rodinný rodokmen BRCA 1 a BRCA 2 mutace [46.].....	57
Obrázek 11 – rodokmen rodiny s anamnézou rakoviny prsu [43.].....	58
Tabulka 1-Přehled základní prevence zdravých nosiček mutace genů BRCA 1 a BRCA 2, i pacientek s jednostranným karcinomem prsu po léčbě od 18 let [16.].....	48
Tabulka 2- Přehled pro sledování ostatních karcinomů v souvislosti s mutací genu BRCA 1 a BRCA 2 jako je karcinom pankreatu od 50 let či o 10 let dříve, maligní melanom či CRC od 45 let [16.].....	48

Tabulka 3- Přehled základní prevence u mužů s mutací genu BRCA 1 a BRCA 2, zahrnuje vyšetření prsou od 35 let a prostaty od 40 let [16.].....48

Graf 1- Závislost frekvence alel na relativním riziku rakoviny [28.]28

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATM – Ataxia-telangiectasia (A-T) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutacemi v genu ATM (A-T mutated)

BC – rakovina prsu

BARD1 – BRCA1 přidružená doména RING 1

BRCA – BReast CAncer

BRIP1 – protein kódující BRCA 1 gen

CDH1 – E-cadherin

CMOS – komplementární polovodiče oxidů kovů

CNV – variabilní počet kopií

cfDNA – volná cirkulující DNA

CpG – část DNA se dvěma bezprostředně následujícími bázemi, tedy 2 nukleosidy vázané fosfátem, zde cytosin(C)-fosfát(p)-guanosin(G)

CRC – kolorektální karcinom

dATP – deoxyadenosintrifosfát

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleosid trifosfáty

ER – estrogenový receptor

FFPE – vzorky tkání fixovaných formalínem a zalitých v parafínu

HBOC – hereditary breast and ovarian cancer

HER2 – humánní epidermální receptor 2

HHC – rakovina jater

CHEK2 – gen CHEK2 kódující CHK2 proteinkinázu způsobuje středně zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu

ISFET – iontově citlivý tranzistor s efektem pole

LC – rakovina plic

LGR – velké genomické přeskupení

MOÚ – Masarykův onkologický ústav

NBN – gen, který obsahuje instrukce pro výrobu proteinu zvaného nibrin

NGS – technologie nové generace

NLS – jaderný lokalizační signál

NSGC – Národní společnosti genetických poradců

OC – rakovina vaječníků

PALB2 – kóduje DNA reparační protein, který byl objeven jako součást endogenního multiproteinového komplexu BRCA2

PCR – Polymerázová řetězová reakce

PR – progesteronový receptor

PSTF – pracovní skupina pro standardizaci rodokmenů

PTEN – protein, který u lidí, je kódován PTEN genu

PTT – Protein Truncation Test

RAD51 – eukaryotický gen

RA – rodinná anamnéza

STK11 – gen, který obsahuje instrukce pro výrobu enzymu serin či threonin kinázy 11

TNBC – Triple negativní karcinom prsu

TP53 – (Tumor protein p53), tumor supresorový gen

TERMINOLOGIE

Adukty: zprostředkovávají toxické účinky řady karcinogenů a cytotoxických látek; v případě DNA vedou její modifikace (tvorba aduktů, zlomů a ztráta bází) ke vzniku tzv. premutagenních lézí vedoucích ke vzniku mutací

Amplikon: částí DNA nebo RNA, která je zdrojem a / nebo produktem amplifikačních nebo replikačních událostí

Bioinformatické: zabývající se shromažďováním biologických dat, zejména dat molekulárně-biologických

Diferenciální diagnóza: diagnóza, která zahrnuje více možných onemocnění s odpovídajícím souborem příznaků. K jejich rozlišení se indikují další vyšetření

Deleční analýza: tato metoda se zabývá delecí, což je proces kdy během replikace DNA ztratí část chromozomu nebo sekvence DNA

Duplicitní analýza: tato metoda se zabývá duplicitou, což je proces kdy se na projevu znaku se podílí dominantní alely genu a intenzita projevu znaku závisí na vzájemných vztazích těchto genů

Vertikální elektroforéza: separační metoda izolující molekuly o rozdílné hmotnosti, popř. odlišném elektrickém náboji, využívající jejich odlišnou pohyblivost v elektrickém poli, kdy vzorek se nanáší ve svislém směru

Empirická rakovina: založená na zkušenosti, ověřitelná experimentálně či pozorováním

Exom: část genomu tvořená exony neboli sekvencemi které vytvářejí mRNA po vystřížení intronů

Familiární: rodinná anamnéza rakovina prsu

Fenoskopie: znak nalezený v organismu, který se vyvíjí v důsledku faktorů prostředí a který se blíží identickým nebo podobným znakům v jiném organismu, ve kterém je tento znak přítomen v důsledku genetických faktorů

Fluorofor: molekula, která po osvětlení světlem určité vlnové délky absorbuje energii tohoto záření a prakticky okamžitě ji ztratí emisí záření o delší vlnové délce

Genomická DNA: DNA tvořící (jaderný) genom příslušného organismu

Homopolymerní sekvence: sekvence tvořená polymerem, jehož makromolekula se skládá se z jednoho druhu monomeru, tím se liší od kopolymeru

Horizontální elektroforéza: separační metoda izolující molekuly o rozdílné hmotnosti, popř. odlišném elektrickém náboji, využívající jejich odlišnou pohyblivost v elektrickém poli, kdy vzorek se nanáší vodorovně

Hot-spots: jedná se o náhodný proces, ale zároveň bylo prokázáno, že v některých oblastech genomu k mutacím dochází častěji

Hysterektomie: odstranění dělohy

Chemoprevence: použití farmakologických nebo přirozených látek k inhibici kancerogenního procesu

Incidence: počet nově vzniklých případů dané nemoci ve vybrané populaci za určité časové období

Inkorporace: včlenění

Ipsilaterální: stejnostranný

Kolorektum: tlusté střevo společně s konečníkem

Kumulativní: úhrnný, rostoucí

Ligace: spojování dvou fragmentů DNA kovalentní vazbou

Melting: proces tání

Metachronní: časově následný

Neoadjuvance: neboli neoadjuvantní se podává se před plánovanou chirurgickou léčbou (a někdy i před radioterapií)

Neovaskularita: novotvorba cév

nonsense mutace: jedná se o jednobodovou substituční mutaci, vzniká zde z jiného kodonu kodon terminační

Onkomarkery: nádorové markery jsou skupina látek, které mohou být produkovány nádorovými buňkami a které nejsou přítomny (nebo jen v omezeném množství) v normálních buňkách

Peritumorální: v bezprostřední blízkosti primárního nádoru

Prediktivní: předvídající na základě pozorování

Preinvazivní: lokalizovaná léze neoplastického charakteru, která však nemá znaky infiltračního růstu a zůstává ohraničena bazální membránou

Probandka: jedinec, který je předmětem zkoumání

Proliferativní: množící se

Polymerázová kolonie: malé kolonie DNA

Primer: řetězec nukleové kyseliny DNA, RNA nebo proteinu dlouhý několik bází, respektive aminokyselin, který slouží jako počáteční místo replikace DNA či RNA

Pseudogen: sekvence DNA, která je podobná genu, ale nedochází k jejímu přepisování v RNA (transkripci)

Pyrosekvenování: metoda využívající syntézu komplementárního vlákna pomocí DNA polymerázy (za použití primerů) a zároveň analýzu její aktivity pomocí dalších enzymů a chemikálií

Salpingooforektomie: operační vynětí vejcovodu a vaječníku

Sekvenování: souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA

Sonda: přístroj nebo zařízení k prozkoumání nebo měření něčeho obtížně přístupného

Spikulace: neboli desmoplastické reakce, což je typ proliferace vaziva indukovaný invazivním růstem nádoru.

Syntetická letalita: typ genové interakce, při níž je mutace v jednom z interagujících genů slučitelná s životaschopností buňky, ale vyřazení obou genů z funkce vede k buněčné smrti

Taxan: cytostatika přírodního původu, extrahovaná z různých druhů tisů (rod *Taxus*)

Templát: též matrice je v molekulární biologii označení pro jednořetězcovou DNA (někdy i jednořetězcovou RNA), který je využíván jako zdroj informací při tvorbě kopií těchto nukleových kyselin

Terciární péče: zdravotní péče, poskytovaná ve vysoce specializovaných zdravotnických zařízeních vysoce specializovanými zdravotnickými pracovníky

Terminátor: končí nebo dokončuje určité rozmezí

Tumorigeneze: vznik, vývoj a růst nádor

ÚVOD

Studium faktorů ovlivňujících vznik rakoviny je velmi důležité, protože včasné zachycení dokáže zachraňovat nejen lidské zdraví, ale i životy. V případě rakoviny prsu je velká pozornost kladena na geny BRCA, které jsou prokázány onkomarkery.

V této práci jsou představeny výsledky rešerše stanování BRCA genů ve vztahu k rodinné anamnéze, kde BRCA (breast cancer) jsou geny zapojené do opravných mechanismů poškozené DNA, jejich mutace zvyšují riziko vzniku rakoviny prsu, případně vaječníků.

Práce popisuje tuto problematiku počínaje historickým úvodem, přes popis současného stavu poznání, včetně detailnějších popisů jednotlivých diagnostických metod, léčby a prevence.

1 Historie

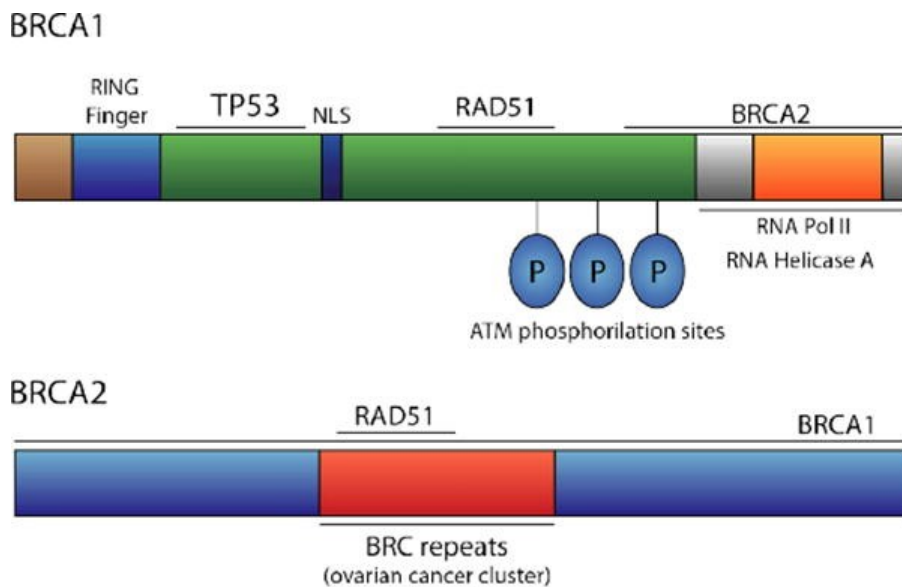
V roce 1994 a 1995 byly objeveny hlavní predispoziční geny BRCA 1 a BRCA 2. Gen BRCA 1 je lokalizován na chromozomu 17q21, má 24 exonů a gen BRCA 2 na chromozom 13q12-13, má 27 exonů. Geny BRCA 1 a 2 několikanásobně zvyšují riziko onemocnění nádorem prsu či vaječníku a to celoživotně. [1.] Podstatná úloha těchto genů spočívá v regulaci buněčného cyklu, reparaci DNA a udržování stability genomu. [2.]

1.1 Gen BRCA 1

Gen BRCA 1 (BRCA1) je tumor supresorový gen, který je odpovědný za genomovou stabilitu. [1.] Za 45-50 % hereditárních karcinomů prsů u mladých žen, je zodpovědný gen BRCA 1. Tento gen je také zodpovědný za predispozici ke vzniku karcinomu ovaria, prostaty a kolorekta. Produktem genu BRCA 1 je nukleární fosfoprotein. Jeho význam je pro buněčnou diferenciaci epitelu mléčné žlázy. [3.] Jedná se o gen kódující protein o velikosti 1863 aminokyselin. S řadou proteinů, které se účastní reparace poškozené tkáně vstupuje do interakce. Nosičky mutace genu BRCA 1 mají většinou karcinomy prsu histopatologicky nezralé tzv. high grade a vysoce proliferativní tzv. triple negativní. Řadí se sem biomarkery TNBC, ER, PR a HER2. V případě pozitivit žen na mutaci BRCA 1 genu se v 10 % jedná o medulární karcinom prsu. Tento medulární karcinom prsu často bývá triple negativní. [4.]

1.2 Gen BRCA 2

Gen BRCA 2 má podobnou funkci a kóduje protein o velikosti 3418 aminokyselin. [2.] Zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu u mladých žen způsobují defekty BRCA 2. V poslední době se udává i zvýšené riziko karcinomu pankreatu. [3.] Karcinomy prsu u BRCA 2 pozitivních žen jsou sporadicky nezralé. Mají většinou exprese estrogenových a progesteronových receptorů. Tyto exprese jsou fenotypově podobné karcinomům, které nemají průkaz mutace v genech BRCA 1 nebo BRCA 2. [4.]



Obrázek 1 - Schématické zobrazení segmentů genů BRCA 1 a BRCA 2 na molekule DNA [13.]

1.3 Sekvenční varianty

Sekvenční varianty v BRCA 1 a BRCA 2 lze rozdělit do tří širokých tříd. První třída obsahuje jednonukleotidové změny. Druhá třída zahrnuje malé inserce nebo deleční události (indely). Do třetí poslední třídy patří velké genomické přeskupení (LGR). Patogenní mutace jednoho nukleotidu BRCA a malých indexů se vyskytují široce rozložené v celé číselné sekvenci a uchovávají intronické sekvence obou genů. [8.]

1.4 Mutace

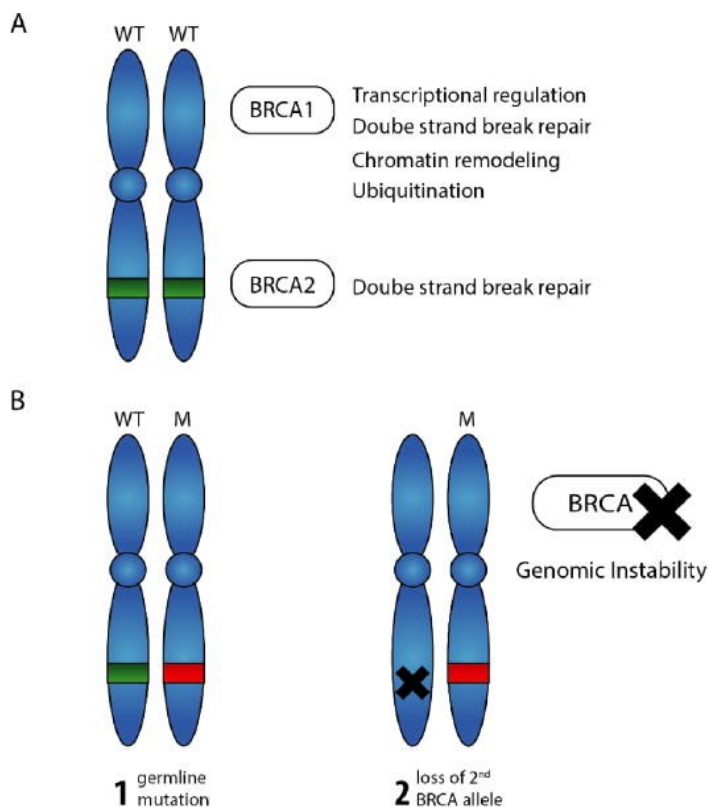
K nastartování procesu nádorové transformace buňky je právě klíčovým mechanismem defektní reparace. Přenos zárodečné mutace, která inaktivuje jednu z alel (kopií) odpovědného genu je příčinou predispozice k malignímu nádorovému onemocnění. Genetická změna (ztráta druhé intaktní alely) v cílové tkáni pak následně vede k inaktivaci genu. Tato inaktivace iniciuje tumorigenezi např. genomová nestabilita spojená se vznikem jiných mutací. [2.]

1.5 Tumorigeneze a BRCA

Jelikož BRCA1 a BRCA2 jsou tumorsupresorové geny, jsou funkčně recesivní, a proto musí být obě kopie alely v buňce mutovány, aby se rakovina prsu mohla vyvinout. BRCA 1 je pleiotropní protein odpovědi na poškození DNA, který působí jak při aktivaci kontrolního

bodů, tak při opravě DNA. BRCA 2 je mediátorem homologní rekombinace. Role BRCA 1 v tumorigenezi souvisí s několika buněčnými procesy, konkrétně s transkripční regulací genů spojených s opravou DNA, tvorbou heterochromatinu na chromozomu X, opravou dvouřetězcových zlomů a ubikvitinací. BRCA1 se váže na BRCA 2, TP53 a RAD51 (oprava zlomení dvou řetězců DNA), mezi jinými proteiny asociovanými s buněčnými cykly a reakcemi na poškození DNA. Buňky postrádající funkční BRCA 1 protein nejsou schopny podstoupit zastavení ve fázi G2 buněčného cyklu po poškození DNA a jsou deficientní v opravě spojené s transkripcí. Absence účinného opravného mechanismu umožňuje poškození DNA na mnoha místech, včetně genů požadovaných pro expresi kontrolního bodu buněčného cyklu.

Například genetické mutace v genu TP53, které by zabránily expresi p21, umožňují BRCA-deficientním buňkám uniknout apoptóze a přetrvávat. U pacientů s mutacemi BRCA 1 nebo BRCA 2 se často vyskytují mutace TP53 a předpokládá se, že několik onkogenů podléhá mutacím v důsledku nedostatečnosti BRCA [13.]



Obrázek 2 - A) popis funkcí BRCA1 a BRCA 2, B) ztráta druhé alely BRCA u nosiče mutace BRCA [13.]

1.6 Patogenní mutace a populace

Typicky je v populacích přítomno velmi široké rozšíření patogenních mutací. V některých populacích jsou však zakladatelské patogenní mutace přítomny s vysokou frekvencí. Například v Ashkenazi židovské populaci tři zakladatelské patogenní mutace odpovídají za drtivou většinu klinicky relevantních patogenních mutací a jsou pozorovány při relativně vysoké frekvenci. V polských rodinách u rakoviny prsu a vaječníků existují tři patogenní mutace v BRCA1 a bylo zjištěno, že odpovídají za většinu patogenních mutací BRCA. Další tři patogenní zakladatelské BRCA 1 mutace byly pozorovány ve studii 1164 polských žen s rakovinou prsu. [8.] Přestože je zděděno pouze 5 až 10 % případů rakoviny prsu, současné odhady naznačují, že u 55 až 65 % nosičů mutace BRCA 1 a přibližně 45 % nosičů mutace BRCA 2 se rakovina prsu objeví ve věku 70 let. Dále bylo hlášeno 10leté riziko vzniku rakoviny vaječníků 12,7 % a 6,8 % u žen nesoucích mutace BRCA 1 a BRCA 2. Studie, která se věnovala 21 401 rodin podezřelých z škodlivé mutace BRCA ukázala, že 24 % rodin neslo patogenní mutaci BRCA 1 nebo BRCA 2. [13.]

2 Popis současného stavu

Po nemocech kardiovaskulárního druhu jsou nádorová onemocnění nejčastější příčinou úmrtí v naší populaci. Každý třetí jedinec jimi onemocní v průběhu svého života. Nejčastějším zhoubným nádorem u žen je karcinom prsu. V ČR je celoživotní riziko onemocnění karcinomem prsu u žen do 75 let věku kolem 8 %. O sporadické karcinomy prsu jde v 70-75 % případů. Příčina hereditárního karcinomu v rámci některého ze syndromů dědičné nádorové predispozice je u 5-10 % žen. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovaria je nejčastějším syndromem hereditární nádorové predispozice. Vzniká v důsledku mutace genů BRCA 1 nebo BRCA 2. [4.]

2.1 Incidence

Dvacet procent rakoviny prsu je familiární. Přibližně 5 % až 10 % rakoviny prsu je dědičný. Jde o zděděnou genovou mutaci, která staví pacienta na zvýšené riziko rakoviny. Dvě třetiny z těchto dědičných rakovin se vyskytuje u jedinců s BRCA 1 nebo mutace BRCA 2, což jsou zárodečné mutace. Zbývajících 10 až 15 % je způsobeno jiným faktorem, který se týká rodiny. Může se jednat o faktor životního prostředí, nebo neobjevenou genovou mutaci. [5.]

Pro nosičky mutací obou BRCA genů je celoživotní riziko od 40 do 85 %. Karcinomem prsu onemocní 19 % nosiček mutace BRCA 1, které se pohybují do věku 40 let. Pro BRCA 2 jde o 12 % nosiček. Nosičky, které mají mutaci genu BRCA 1 je zároveň riziko karcinomu ovaria 39-65 % a u nosiček BRCA 2 11-37 %. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu je 40-87 % pro nosičky mutací genu BRCA 1, pro nosičky mutací BRCA 2 18-88 %. U ovariálního karcinomu je celoživotní riziko pro nosičky mutací BRCA 1 22-65 % a 10-35 % u nosiček mutací BRCA 2. U mužů, jež jsou nosiči mutace genu BRCA 1 je celoživotní riziko karcinomu prsu cca 1,2 %. Muži s mutací genu BRCA 2 mají riziko cca 8 %. [4.] Celoživotní rizika onemocnění jsou uváděna pro nosičky různě dle studií a populací.

Ve studiích Velké Británie se uvádí, že celoživotní riziko nádorů prsu u nosiček mutace genu BRCA 1 je do 79,5 % do 80 let. U nosiček mutace genu BRCA 2 je do 88 %. Co se týče rizika ovariálního karcinomu v tomto věku, je uváděno pro BRCA 1 nosičky 65 % a pro nosičky BRCA 2 37 %. Pro oba geny je obecné riziko onemocnění nádorem prsu do 75 let 85 %, riziko druhostranného karcinomu prsu pak 40-60 %. V případě nádorů vaječníků je

kumulativní riziko pro nosičky BRCA 1 mutace 39-65 % a pro nosičky BRCA 2 11-37 %.
[1.]

2.2 Testování BRCA genů

Testování na vadné geny BRCA 1 a BRCA 2 zahrnuje krevní test, který je obvykle k dispozici na regionálních genetických centrech a některých centrech rakoviny. Na test se vztahuje většina krajských zdravotních plánů, pokud existuje podstatné riziko. Například v Ontariu odrážejí kritéria způsobilosti testování 10 % nebo vyšší riziko mutace. Nejprve se testují postižení jedinci v rodině, u nichž je riziko nejvyšší. Genetické testování se obecně nenabízí nedotčeným jedincům, pokud nebyla v rodině identifikována mutace. [5.] Pokud má příbuzný nosiče mutace genu BRCA krevní test, který je negativní pro známou familiární mutaci genu BRCA, má se za to, že má normální (divoký typ) zárodečné geny BRCA 1 a BRCA 2 a je často označován jako „nosič bez BRCA“. Obecně se nedoporučuje podstoupit profylaktickou operaci nebo zvýšený dohled nad rakovinou. U některých nosičů BRCA se však vyvine rakovina prsu nebo vaječníků. Tito jedinci jsou označováni jako „fenotypy BRCA“, což znamená, že mají stejný fenotyp (postižený rakovinou související s HBOC) jako jejich příbuzní, ale nemají stejný genotyp (známá mutace genu BRCA, jak je ukázáno krevním testováním). [30.]

2.3 Doporučení k testování BRCA genů

Doporučení pro genetické poradenství a testování, aby se zjistilo, zda má jedinec genovou mutaci BRCA, která je predisponuje k rozvoji rakoviny prsu a vaječníků, se stále zvyšuje. Ve vhodně vybraných případech je poradenství a testování nyní považováno za standard péče. Zásadní pro určení, komu by mělo být toto testování nabídnuto, je kvantifikace pravděpodobnosti, že jedinec má detekovatelnou mutaci BRCA. [27.] Ke genetické konzultaci s doporučením na genetické vyšetření, kde může lékařský genetik podle dat osobní anamnézy a minimálně třígeneračního rodokmenu indikovat kompletní testování genů BRCA 1 a BRCA 2 je třeba odeslat všechny ženy s rizikovou osobní nebo rodinnou anamnézou s nádorem prsu nebo ovaria. Na genetickou konzultaci může být žena odeslána do jakéhokoliv centra lékařské genetiky, jak státní, tak soukromé. Klinicko-genetická zpráva je ženě předána s konzultací jak pozitivních, tak negativních výsledků a s návrhem další preventivní péče. Pojišťovna hradí poradenství i kompletní testy indikované lékařským genetikem. Je možné

požadovat zrychlené testování v případě, že je testování nutné z důvodu léčby pacientky. Jedná se převážně o podání určité chemoterapie, nebo rozsahu chirurgické léčby po neoadjuvantní léčbě. Výsledky jsou při zrychleném testování nejpozději do 3 měsíců. Konzultace s lékařem probíhá okamžitě. Test, který si hradí pacientka sama tzv. BRCA screen, kde se zachytí maximálně 7 mutací, není rovnocenný jako kompletní test genů BRCA 1/2. Jelikož 60 % nosiček mutací v genech BRCA 1/2 tímto testem není zachyceno. Test zachytí přibližně pouze 40 % nosiček mutací. Podle dat MOÚ z roku 2015 nebylo zachyceno tímto testem více jak 5800 testovaných rizikových žen. [6.]

2.4 Indikace k testování BRCA genů

Sporadické indikace zahrnují epitelové karcinomy ovarií, vejcovodů a primární peritoneální karcinom bez ohledu na věk diagnostikovaného. Samostatné dva primární karcinomy prsu, které jsou bilaterální nebo ipsilaterální, synchronní nebo metachronní a to do 50 let v případě prvního karcinomu či do 60 let v případě obou. Dále je zde zahrnut karcinom prsu unilaterální do 45 věku života a popřípadě do 50 věku života, pokud není známa rodinná anamnéza. Bez ohledu na věk probandky, pokud má karcinom prsu a pankreatu. Muži s karcinomem prsu v jakémkoliv věku. Indikace se týká TNBC do 60 let. Konkrétně chybění receptorů ER, PR a HER2. Indikace u familiární výskytu v případě RA s karcinomy ovarií, vejcovodů či peritonea je vždy indikace k testování. Týká se to situací, kdy jsou alespoň 3 příbuzní s karcinomem prsu v jakémkoliv věku, 2 příbuzní s karcinomem prsu, a to jeden pod 50 let či oba do 60 let. Dále se jedná o probandku s karcinomem prsu do 50 let s přímým příbuzným, který je spojený s HBOC. Především se věnuje pozornost orgánům jako je slinivka a prostata. Testování je indikováno lékařským genetikem po genetickém poradenství a podepsání informovaného souhlasu. Při známe rodinné mutace se prediktivní vyšetření u příbuzných provede až po dosažení plnoletosti potencionálního vyšetřovaného. [6.]

2.4.1 HBOC

HBOC se dědí v autozomálně dominantním vzorci, což znamená, že postižení jedinci jsou heterozygotní pro mutaci genu BRCA. Pacientům podezřelým z nosičství mutace genu BRCA na základě osobní a rodinné historie se doporučuje podstoupit test zahrnující izolaci DNA z jejich bílých krvinek (nebo slin) a sekvenování jejich genů BRCA 1 a BRCA 2 s analýzami delece / duplikace. [30.]

2.5 Genetické testy

Obecně platí, že genetický test identifikuje dědičné mutace specifických genů, zatímco termín genomová zkouška se obvykle vztahuje k analýze sekvence, exprese skupiny genů, velké fragmenty genomu, nebo dokonce celého genomu. Značný počet genetických testů bude identifikovat vzácné varianty, kde klinický význam nelze odvodit pouze ze sekvenčních informací. Podíl variant s nejistým klinickým významem (VUS) pravděpodobně poroste s nižšími prahy pro testování a laboratorní poskytovatele s menšími zkušenostmi s BRCA. Většina VUS není spojena s vysokým rizikem rakoviny. Nesprávně interpretovaný VUS má potenciál vést ke špatnému řízení pacienta i jejich příbuzných. [30.]

Rozdíl mezi sekvencí zárodečné linie a somatické mutace je, že zárodečná mutace je přítomna od okamžiku početí, a proto se provádí ve všech buňkách těla a může být přenesena na další generaci. Příkladem zárodečné mutace je zděděné mutace v genu BRCA 1 nebo BRCA 2. Somatické mutace jsou získávány v průběhu celého života jedince prostřednictvím vystavení faktorům prostředí a jsou obvykle přítomny pouze v nádoru. Somatické testy rakoviny obvykle vyžaduje analýzu nádorové tkáně, zatímco zárodečné genetické testy obvykle analyzovat vzorek krve nebo bukalní stěr.

Několik z těchto genetických testů, které detekují přítomnost těchto mutací rakovinou predisponující, jsou komerčně dostupné. Tento typ testu zahrnuje vzorek krve (nebo vzorek tkáně člověka, jako je například slin nebo bukalní stěr) s analýzou DNA známých mutací. Až do nedávné doby, jednotlivé geny byly testovány odděleně a postupně tradičními Sangerovými sekvenčními metodami. Tyto metody jsou považovány za „zlatý standard“ sekvenování DNA. Jde o technologicky spolehlivý, široce dostupný a relativně jednoduchý pracovní postup. Sangerovo sekvenování nemůže detekovat LGR, které vyžadují pro analýzu alternativní techniky polymerázové řetězové reakce. [8.] Vzhledem snižujícím se nákladům a zlepšené účinnosti ve vysoce výkonné technologii sekvenování (sekvenování příští generace) se celé genové sekvenování a vícegenové panely staly nákladově efektivnější.

Od konce 90. let do roku 2013 bylo testování BRCA nabízeno výhradně společností Myriad Genetics, společností, která patentovala geny BRCA 1 a BRCA 2. V červnu 2013 Nejvyšší soud USA zrušil Myriadovy patenty a krátce nato začalo testování BRCA nabízet několik akademických a komerčních referenčních laboratoří. Mezi příklady akademických laboratoří,

kteřé nabízejí testování BRCA, patří: Baylor College of Medicine, City of Hope, Emory University, Washington University School of Medicine, Memorial Sloan Kettering a University of Washington Medical Center. Příklady komerčních laboratořích, kteřé nabízejí testování BRCA, jsou: Ambry Genetics, GeneDx, Invitae Corporation, Laboratory Corporation of America, Myriad Genetics, Quest Diagnostics a Pathway Genomics. Tyto laboratoře rozlišují své služby spojováním genových testů predispozice k rakovině. Jsou také nabízeny testy na mutace v jiných genech, o nichž je známo, že jednotlivce predisponují k rakovině prsu.

Geny u rakoviny prsu, konkrétně poukazují na klinický význam TP53, PTEN, ATM a geny PALB 2 kromě BRCA 1 a BRCA 2. Testy detekují známé bodové mutace, malé delece a velké chromozomální přestavby. Pro pacienty s identifikovanými členy rodiny nesoucími specifickou mutaci mohou být nabídnuty přizpůsobené analýzy detekující stejnou mutaci.

První společností, kteřá poskytovatelům umožnila zakázkové analýzy specifických genů, byla společnost Invitae Corporation (San Francisco, CA). Jak se laboratorní náklady snižují a technologie se rozšiřuje na sekvenování další generace, zvýší se množství informací dostupných z jediné zkušební objednávky. Multigenové panely mohou vyhodnotit přítomnost několika mutací souvisejících s rakovinou prsu najednou. Genetické testování je však nákladné. BRCA 1 a BRCA 2 jsou nejvíce zavedené geny související s rakovinou prsu. [7.]

2.5.1 Genetická informace

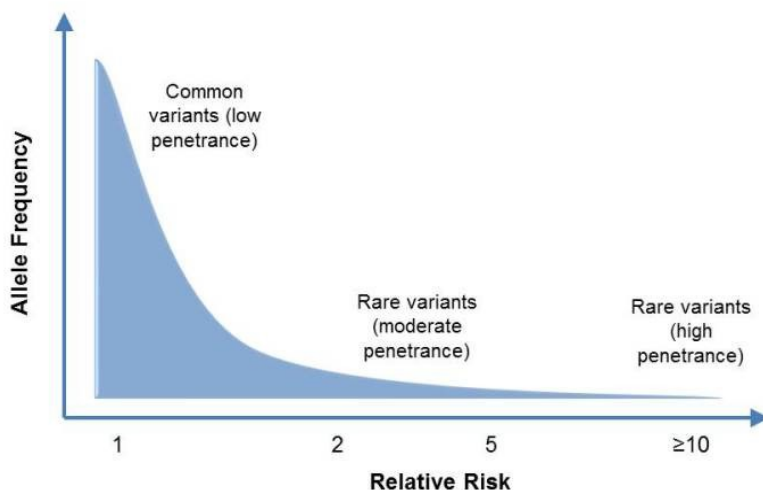
Genetické informace, poskytují prostředek k identifikaci lidí, kteří mají zvýšené riziko rakoviny. Zdroje genetické informace zahrnují biologické vzorky DNA, informace odvozené z rodinné historie člověka: choroby, nálezy z fyzikálních vyšetření a lékařské záznamy. Informace založené na DNA mohou být shromažďovány, ukládány a analyzovány kdykoli během života jednotlivce, od jeho početí až po smrt. [28.]

2.5.2 Penetrace

Podíl jednotlivců nesoucích patogenní variantu, u kterých se projeví nemoc, se označuje penetrace. Obecně mají běžné genetické varianty, kteřé jsou spojeny s náchylností k rakovině, nižší průnik než vzácné genetické varianty. To je znázorněno na grafu 1. U nemocí, kteřé začínají u dospělých jedinců je penetrace obvykle popsána věkem a pohlavím

jednotlivého nosiče. Například penetrace karcinomu prsu u ženských nosičů patogenních variant BRCA 1 / BRCA 2 je často uváděna podle věku 50 let a podle věku 70 let.

Genetic Architecture of Cancer Risk



Graf 1- Závislost frekvence alel na relativním riziku rakoviny [28.]

Graf, který je na obrázku výše znázorňuje obecné zjištění nízkého relativního rizika spojeného s běžnými genetickými variantami s nízkou penetrací, jako jsou polymorfismy s jedním nukleotidem identifikované ve asociačních studiích s genomem, a vyššího relativního rizika spojeného se vzácnými genetickými variantami s vysokou penetrací, jako jsou patogenní varianty genů BRCA 1 / BRCA 2 asociovaných s dědičným karcinomem prsu a vaječníků a geny pro opravu chybných párů spojené s Lynchovým syndromem. [28.]

2.6 Genetické poradenství

Genetické poradenství je proces komunikace mezi odborníky v oblasti genetiky a pacienty s cílem poskytnout jednotlivcům a rodinám informace o relevantních aspektech jejich genetického zdraví, dostupných možnostech testování a řízení a podporu při přechodu k porozumění a začlenění těchto informací do jejich každodenního života. Genetické poradenství obecně zahrnuje následujících šest kroků:

1. Posouzení rodinné a lékařské anamnézy

2. Analýza genetických informací
3. Komunikace genetických informací
4. Vzdělávání o dědičnosti, genetickém testování, managementu, snižování rizika, zdrojích a možnostech výzkumu
5. Podpurné poradenství pro usnadnění informovaných rozhodnutí a přizpůsobení riziku nebo stavu
6. Sledování [27.]

Pokyny pro genetické poradenství a testování byly publikovány American College of Medical Genetics a US Preventive Services Task Force. Provádění komplexního hodnocení rodinné historie a získání informovaného souhlasu se správným souborem genetických testů vyžaduje odborné znalosti a čas. Průběžná rodinná anamnéza může pomoci určit, kteří pacienti by měli být před definitivním genetickým testováním podrobeni genetické konzultaci. Genetické poradenství je životně důležitou součástí procesu genetického testování z několika důvodů: získat komplexní rodinnou anamnézu, vybrat nejvhodnější test, získat informovaný souhlas, vysvětlit výsledky pacientovi a rodině a pomáhat pacientovi vypořádat se s emocionálními a lékařskými důsledky učení se jejich genetickým výsledkům. [7.]

Genetické poradenství v oblasti rakoviny často zahrnuje multidisciplinární tým zdravotnických pracovníků, mezi něž může patřit genetický poradce, genetická sestra pokročilé praxe nebo lékařský genetik; odborník na duševní zdraví; a různé lékařské odborníky, jako je onkolog, chirurg nebo internista. Proces poradenství může vyžadovat řadu návštěv za účelem řešení lékařských, genetických testů a psychosociálních problémů. I když je poradenství v oblasti rizika rakoviny iniciováno jednotlivcem, dědičné riziko rakoviny má důsledky pro celou rodinu. Protože genetické riziko ovlivňuje neznámý počet biologických příbuzných, kontakt s těmito příbuznými je často nezbytný pro sběr přesné rodinné a lékařské historie. Genetické poradenství v oblasti rakoviny může zahrnovat několik členů rodiny. [27.]

2.6.1 Význam genetické poradenství

Dopad hodnocení rizik a predispozičního genetického testování je zlepšení zdravotních výsledků. Informace odvozené z posouzení rizik a / nebo genetického testování umožňují poskytovateli zdravotní péče přizpůsobit individuální přístup k podpoře zdraví

a optimalizovat dlouhodobé zdravotní výsledky prostřednictvím identifikace ohrožených jedinců před vznikem rakoviny. Poskytovatel zdravotní péče tak může zasáhnout dříve, aby snížil riziko nebo diagnostikoval rakovinu v dřívější fázi, kdy jsou šance na účinnou léčbu největší. Tyto informace mohou být použity k úpravě přístupu řízení k počáteční rakovině, k objasnění rizik jiných rakovin nebo k predikci reakce stávající rakoviny na specifické formy léčby, což může změnit doporučení léčby a dlouhodobé sledování. [27.] Jednotlivci, kteří jsou nositeli mutací BRCA 1 a 2 v rodině po cílené analýze mutací, mohou být podrobeni věkovému dohledu, aby se snížila morbidita, úmrtnost a emoční a finanční zátěž. [26.]

2.7 Rodinná historie

Rodinná historie může být získána prostřednictvím rozhovoru nebo písemné zprávy. Podrobnosti o rodinné zdravotní historii lze nejlépe shrnout do podoby rodokmenu. [24.] Sběr osobní a rodinné historie zahrnuje otevřené a cílené otázky týkající se osobního zdraví a každého člena rodiny s ohledem na postižené a neovlivněné jedince otcovské a mateřské linie po tři generace. Informace by měly zahrnovat typ rakoviny, přibližný věk při diagnóze, aktuální věk osoby nebo věk a rok smrti. Je užitečné získat informace o typu léčby, všech zárodečných genetických testech a expozicích v životním prostředí, které mohly rakovinu způsobit. Odborný klinický úsudek je často nezbytný pro posouzení platnosti rodinné anamnézy, kterou pacient sám nebo jiný člen rodiny sám ohlásil. [7.]

Rodinná historie, která byla hlášena samostatně, může obsahovat chyby a ve vzácných případech může být fiktivní. Nejspolehlivější dokumentací histologie rakoviny je zpráva o patologii. Ověření rakoviny lze provést také prostřednictvím jiných lékařských záznamů, nádorových registrů nebo úmrtních listů. [24.] Zpráva o patologii slouží také na potvrzení rodinné anamnézy před objednáním testů. Kromě shromažďování komplexní rodinné historie zahrnuje konzultace také posouzení genetického rizika a stanovení vhodných genetických testů. Diskuse o informovaném souhlasu zahrnují důsledky pro rakovinu v jiných orgánech a dopad na členy rozšířené rodiny bez ohledu na výsledek. Pokud tým primární péče není s touto mírou detailů spokojen nebo nemá zkušenosti, umožní doporučení genetického poradenství komplexní péči o pacienta. [7.] Rodinná historie se vyvíjí, proto je důležité aktualizovat rodinné historie od obou rodičů v průběhu času. [24.]

3 Laboratorní vyšetření

Pro výzkum genomiky a nemoci bylo vyvinuto mnoho technologií pro detekci a kvantifikaci sekvenčních variací. Tyto technologie lze obecně rozdělit do tří přístupů a jejich kombinací: polymerázová řetězová reakce (PCR), hybridizace a sekvenování nové generace (NGS). [40.]

Tyto geny se vyšetřují screeningovým vyšetřením, při nichž se používá vertikální i horizontální elektroforetická metoda, která vychází z PCR reakce. Použití metody se odvíjí od velikosti exonů. Heteroduplexní analýzy se používají pro exony o velikosti 200-500 bp. Exony, které mají větší počet bp je použita metoda PTT. Příkladem těchto větších exonů může být BRCA 1 exon 11 či BRCA 2 exon. [8.] Kvantitativní PCR je životaschopnou technikou pro detekci LGR. Je to však náročné na analýzu všech BRCA 1 a BRCA 2 exonů. Místo toho je nejběžněji používanou metodou pro analýzu LGR multiplexní ligace závislá amplifikace sondy MLPA. [8.]

3.1 HA – Heteroduplexní analýza

Jedná se o metodu, která detekuje hybridní dvoušroubovicovou molekulu DNA. Jde o takovou molekulu DNA, jejíž řetězce mají původ z různých rodičovských alel a vyznačují se neúplnou komplementaritou. Pro drobné delece a duplikace je citlivost této metody 100 % a pro substituce činí citlivost metody 70-80 %. Analýza je časově náročná a je zde požadována velká zkušenost hodnotícího pracovníka, jelikož se hodnotí vizuálně, tzn. za pomoci zraku. [8.]

3.2 PPT – Protein Truncation Test

Při této metodě se využívá transkripce a translace in vitro, mutace zde způsobuje předčasné zastavení translace. Můžeme detekovat pouze delece, duplikace a nonsense mutace. Detekce probíhá na úrovni proteinů. Opět se jedná o časově náročnou metodu a jsou zde i vysoké nároky na zkušenosti hodnotícího pracovníka, protože se hodnotí vizuálně stejně jako v předchozí metodě. [8.]

3.3 HRM – High Resolution Melting

Jelikož obě výše uvedené metody jsou časově náročné a mají omezenou senzitivitu byly v roce 2007 nahrazeny vysokorozlišovací analýzou křivek tání (HRM) s využitím přístroje LightScanner (Idaho Tech.). [8.]

Jde o jednoduchou metodu, která je založená na PCR. V přítomnosti nasycených koncentrací barviv vázajících se na DNA specifická sekvence ampliconu určuje chování při tavení se zvyšující se teplotou roztoku. Intenzita fluorescence klesá, jakmile se dvouvláknová DNA stane jednovláknovou a barvivo se uvolní. Teplota taveniny (T_m), ve které je 50% DNA ve dvouřetězcovém stavu, lze aproximovat pomocí derivátu křivky tání. Charakteristickou křivku tání lze použít k detekci změn v sekvenci DNA v ampliconu bez potřeby jakéhokoli zpracování po PCR. [42.]

Metoda, je rychlá a vysoce citlivá. Zachycuje různé mutace v krátkých fragmentech DNA v heterozygotním stavu. Vychází z principu heteroduplexní analýzy. [8.] HRM je také nedestruktivní metoda. Následná analýza vzorku jinými technikami, jako je gelová elektroforéza nebo sekvenování DNA, může být tedy stále provedena po analýze HRM. Díky těmto funkcím je HRM ideální pro použití v rutinních diagnostických nastaveních. Metodika MS-HRM byla díky svým četným výhodám široce používána v diagnostických laboratořích pro screening mutací spojených s nemocemi. [42.]

3.3.1 Princip analýzy

Základem metody je PCR amplifikace DNA (možnost provedení i v režimu real-time), na níž navazuje samotná HRM analýza, která zkoumá tzv. teplotu tání dvouvláknové DNA.

HRM analýza vychází z vlastnosti fluorescenční barvy (např. SybrGreen), která se během PCR reakce začleňuje do dvouřetězcové DNA, kde vykazuje vyšší fluorescenci než volná barvička. Následuje postupné zahřívání a během kterého dochází k denaturaci DNA (rozvolnění dvouřetězcové DNA na jednotlivé řetězce) a tím uvolnění fluorescenční barvy, tento jev se projeví poklesem fluorescence.

V analyzovaném fragmentu DNA výrazně mění profil křivky tání (meltingu) přítomnost heteroduplexu. Metoda poskytuje ve většině případů přesné rozlišení různých variant a mutací, které se nachází v analyzovaném fragmentu. Může zachytit i homozygotní varianty polymorfních oblastí. Heterozygotní stav se zachytí v případě PCR fragmentu, které jsou dlouhé v rozmezí cca 100-500 bp téměř ze 100 %. Křivku tání můžeme prohlížet díky analytickému programu a také můžeme identifikovat rozdílné profily a následně je správně vyhodnotit. [8.]

Pro správnou interpretaci je samozřejmostí použitích vhodných standardů. Jelikož se využívají především komerčně dostupné testy, není toto problém.

3.4 Přímé sekvenování

Přímé sekvenování slouží pro stanovení sekvence analyzovaného fragmentu. Stanovení sekvence se rozumí pořadí jednotlivých bází. Slouží k určení pozice a typu mutací u daného genetického onemocnění. Sekvenovány jsou všechny fragmenty, které mají aberantní mobilitu a jsou zachycené metodami HA, PTT a HRM. K sekvenování sloužil od roku 2000 automatický gelový sekvenátor ALF express II. Jelikož metoda byla časově velmi náročná, v jednu cyklu bylo analyzováno pouze 10 vzorků DNA a také příprava vzorků byla náročná byl nahrazen od roku 2007 automatickým sekvenátorem Genetic Analyser 3130, který používá soustavu čtyř kapilár. [8.]

3.4.1 Sekvenátor Genetic Analyser

Za 24 hodin je možno analyzovat až 96 vzorků, z toho vyplývá že sekvenování je méně pracné. Jde o začleňování fluorescenční značky pomocí značených terminátorů do PCR produktů. Fluorescence je detekována analyzátozem ze 4 různých fluorescenčních barev. Tyto barvy se používají k určení bází A, C, G a T. [8.]

3.5 MLPA metoda – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MLPA analýza je metoda založená na PCR pro analýzu relativního počtu kopií různých cílových sekvencí DNA. [35.] Tato metoda byla zavedena pro zvýšení senzitivity a spektra detekovaných mutací, která mají velká intragenová přeskupení. Provádí se od roku 2005. [8.] Jedná se o techniku, ve které se dvojice oligonukleotidových sond je schopna navzájem ligovat, vázat se na sousední polohy v genomické oblasti zájmu a amplifikovat, ale pouze tehdy, pokud obě sondy jsou vázány a ligovány semikvantitativním způsobem. [8.]

Test je rychlý, jednoduchý a nákladově efektivní, vhodný pro klinické aplikace k rozlišení mezi BRCA1-podobných a BRCA1-nepodobných TNBC. Omezením tohoto testu může být požadavek vysoké kvality DNA a vysokého obsahu nádoru. Po validaci testu založeného na MLPA bude nyní možné provést prospektivní studie, které jsou vysoce oprávněné k vyhodnocení testu v širším prostředí pro předvídání léčebného přínosu platinových léků nebo inhibitorů PARP.[35.]

3.5.1 Princip MLPA metody

Princip spočívá v hybridizaci speciálně navržených sond, které jsou specifické pro jednotlivé exony daného genu s genomovou DNA, jejich ligaci a následnou multiplex PCR reakci. Firma M.R.C. Holland poskytuje komerčně dostupných kitů pro analýzu. [8.]

3.6 PCR

Polymerázová řetězová reakce je způsob, kterým je molekula templátové DNA amplifikována pomocí syntetických primerů DNA, DNA polymerázy a dNTP. Směs se cykluje mezi alespoň 2 teplotami: vysoká teplota pro denuraci dvouvláknové DNA na jednovláknové molekuly (např. 95 °C) a nízká teplota pro primer k hybridizaci s templátem a pro polymerázu k prodloužení primeru (např. 60 °C). Každý teplotní cyklus v zásadě zdvojnásobuje množství cílové sekvence, takže i několik kopií cílové molekuly DNA může být rychle amplifikováno na nano-molární koncentrace, které mohou být následně detekovány fluorescencí nebo jinými prostředky. PCR je v současné době nejrozšířenější metodou pro detekci sekvencí DNA.

Ve srovnání s metodou hybridizace a NGS jsou hlavní předností PCR přesná kvantifikace, vysoká molekulární senzitivita a snadné použití. Kvantitativní PCR se například používá jako zlatý standard pro kvantifikaci DNA a RNA, která je obecně považována za přesnější než mikročipy nebo NGS. Hlavní slabinou PCR je její neschopnost provádět vysoce multiplexované testy, kvůli tvorbě dimerů primerů, které vedou k falešně pozitivním nebo falešně negativním. [40.]

3.6.1 Multiplexní PCR

Je nejčastěji používáno v rutinním molekulárním testování, které je převážně zaměřeno na identifikaci známých mutací hot spotů v onkogenech. [39.] Rozsah variant s multiplexováním je simultánní analýza variant více cílových sekvencí. V multiplexované PCR existují tři hlavní potíže: vyčerpání dNTPs amplikony s nejvyšší koncentrací, ortogonální odečet různých amplikonů a tvorba dimerů primerů během amplifikace. [40.]

Studie, která se zabývá zachycováním pomocí NGS oproti multiplexní PCR dokazuje, že upravený cílený obohacovací protokol založený na zachycení je lepší než běžně aplikované multiplexní protokoly založené na PCR pro spolehlivou detekci variant BRCA1/2, včetně detekce CNV, s využitím vzorků nádoru FFPE. [39.]

Při multiplexním zesilování PCR několika cílů může přítomnost jednoho cíle s vysokou koncentrací účinně potlačit zesilování jiných cílů. [40.]

3.6.2 Speciální PCR – Multiplex Bisulfite PCR-LDR-qPCR test

Test je určen pro markery CpG specifické pro rakovinu prsu identifikované pomocí integrovaných analýz veřejně dostupných metylačních datových souborů pro celý genom pro 31 typů primárních nádorů (včetně BRCA), jakož i odpovídající normální tkáň a periferní krev.

Studie, který se zabývá tímto novým testem zahrnuje kroky, které vedou ke zlepšení krevních testů pro včasnou detekci pro detekci BrCa, včetně bioinformatické identifikace a charakterizace biomarkerů a zlepšení biochemie testu. Pochopitelně byly testy testovány pouze na simulovaných vzorcích cfDNA. V budoucích studiích však vyhodnotíme neinvazivní diagnostickou schopnost BrCa našeho multiplexního testu PCR-LDR-qPCR pomocí analýzy cfDNA odvozených od pacienta. [41.]

3.7 Obohacovací metody

Cílené obohacování usnadňuje aplikaci sekvenování nové generace do klinického prostředí tím, že zaměřuje sekvenční úsilí na podmnožinu důležitých genů nebo exomových oblastí, snižuje náklady a zjednodušuje následnou analýzu. [38.]

Metody obohacení jsou nejčastěji založené na PCR nebo hybridizačních přístupech. PCR je dobře zavedená technika předběžného sekvenování obohacení, zejména pro použití se Sangerovým sekvenováním. [9.]

Multiplexní PCR, hybridizační zachycovací a selektivní cirkulační sondy jsou účinné metody obohacování cílů pro klinické sekvenování příští generace. Obohacování cíle pomocí PCR je rychlejší a vyžaduje menší množství vstupní DNA než metody zachycování hybridizace. [38.] V případě NGS byly při testování BRCA úspěšně použity laboratorně vyvinuté metody PCR s dlouhým dosahem. Nevýhodou však je nutnost přípravy velkého počtu ampliconů odděleně aby došlo k využití vysoké propustností NGS. Následně je nutno spojit a sekvenovat dohromady tyto amplicony. To vedlo k vývoji komerčně dostupných multiplexních PCR souprav, které obohacují specifický gen nebo panel genů v malém počtu PCR amplifikací. Například test CE-IVD BRCA MASTR (Multiplicom, Niel, Belgie) zesiluje kódující oblasti

BRCA 1 a BRCA 2 v 93 amplikonech v pěti multiplexních reakcích PCR. Další sady RUO pro BRCA 1 a BRCA 2 jsou například Ion Ampliseq Community Panel (Thermo Fisher) a GeneRead DNaseq Gene Panel (Qiagen, Hilden, Německo). [8.] Mezi hlavní překážky cíleného obohacování patří opakující se prvky v DNA, vysoký obsah GC nebo AT a pseudogeny. [38.]

3.7.1 MIP – molekulární inverze sondy

Metody obohacení založené na molekulární inverzní sondě mohou poskytovat větší specifitu než standardní přístupy založené na PCR. MIP se skládá z univerzální mezerníkové oblasti lemované sekvencemi specifickými pro každou stranu cílové oblasti. Jakmile MIP nasedne na cíl, mezera mezi sekvencemi je vyplněna DNA polymerázou a ligázou. Genomická DNA je štěpena a cílová DNA je PCR-amplifikována a sekvenována. Přestože je PCR jako metoda obohacení NGS vysoce citlivá, specifická a reprodukovatelná, je neúčinná pro NGS větších genomických cílů, kde by měly být zváženy jiné přístupy k obohacení cíle. [8.]

3.8 Hybridizace

Hybridizace je proces, kterým se syntetická sonda DNA nebo primer váže (pomocí Watson Crickova párování bází) na biologickou DNA cílovou sekvenci. Hybridizace tvoří základ všech moderních analytických a diagnostických technik DNA, ale v nepřítomnosti amplifikace DNA nebo amplifikace signálu neposkytuje hybridizace dostatečnou molekulární citlivost pro praktické použití.

Hybridizace se obvykle používá ve spojení s PCR nebo s fluorescenční mikroskopií. Nedávný pokrok v senzorových technologiích může umožnit, aby hybridizace v nepřítomnosti enzymatické amplifikace DNA byla životaschopnou alternativou k PCR a NGS.

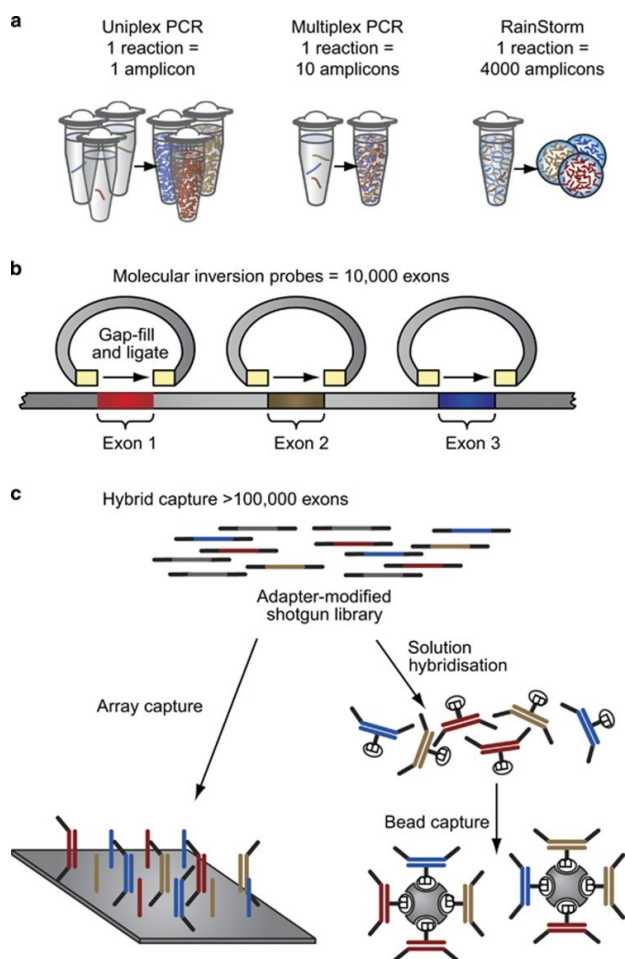
Její hlavní silnou stránkou je její jednoduchost, multiplexování a spolehlivost. Protože hybridizace je biofyzikální jev, probíhá na mnoha pufrovacích podmínkách, na rozdíl od testů na bázi enzymů s úzkými přijatelnými pufrovými kompozicemi. Hlavní slabinou hybridizace je, že nezajišťuje sekvenční zesílení a musí být spárována buď s technologií zesílení signálu, nebo s vysoce citlivým odečítacím přístrojem. [40.]

3.8.1 Hybridizační obohacovací metody

Tyto metody pracují na principu selekce pomocí sond komplementárních k DNA v genomické oblasti, která je zkoumána. Zachytávání v poli používá mikročipy s vysokou hustotou obsahující komplementární sondy, zatímco zachycení v roztoku používá komplementární sondy, které se pak čistí pomocí značených kuliček. Výhodou zachycení v roztoku je, že je vysoce škálovatelný a nevyžaduje další vybavení spojené se zpracováním mikročipů. [9.] Použitím mikročipů se využije prostorové uspořádání k vyřešení problému s multiplexním odečtem. [40.]

K dispozici jsou hybridizační soupravy, které cílí konkrétně na BRCA 1 a BRCA 2. Do těchto metod patří RUO HaloPlex a SureSelect (Agilent, Santa Clara, CA, USA), což jsou soupravy zachytané v roztoku. Dále jsou k dispozici hybridizační soupravy, které zahrnují BRCA 1 a BRCA 2 jako součást většího panelu genů spojených s rakovinou, jako je RUO TruSight Cancer Sequencing Panel (Illumina), který cílí na 94 genů, nebo NimbleGen Comprehensive Cancer Design (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA), který cílí na 578 genů.

Hybridizační metody, zejména metody zachycování na poli, mohou vyžadovat další náklady, čas a v případě rozsáhlého panelu genů náhodné nálezy k celkovému procesu NGS. [8.]



Obrázek 3 - Hybridizační metoda [9.]

3.9 Sekvenování nové generace

Jedná se o skupinu přístupů pro masivně multiplexovanou sekvenční analýzu DNA a RNA. Na rozdíl od tradičního Sangerova sekvenování, které vyžaduje jako vstup homogenní templát DNA, umožňuje NGS analýzu heterogenních vzorků a současně poskytuje sekvenční informace pro více než 10 milionů náhodně vybraných molekul nukleové kyseliny ve vzorku. Vzhledem k velkému počtu čtení je NGS jedinečně vhodný pro analýzu a diagnostiku nukleových kyselin vyžadujících multiplexovanou analýzu mnoha genů a jejich variant. [40.]

Zvýšená poptávka po testování BRCA vyvíjí tlak na diagnostické laboratoře, aby zvýšila jejich schopnost screeningu mutace a zvládat problémy spojené s klasifikací variant BRCA sekvencí pro klinický význam, například interpretaci patogenních mutací nebo variant neznámého významu, přesné stanovení velkých genomických přeskupení a detekce somatických mutací v DNA extrahované s formalínem fixovaných vzorků parafínu. Mnoho

diagnostických laboratoří zavádí technologii nové generace (NGS) pro zvýšení jejich screeningové kapacity a zkrácení doby zpracování a jednotkových nákladů.

Screening zárodečných variant BRCA 1 a BRCA 2 pomocí sekvenování Sanger DNA nebo NGS je v klinické praxi dobře zaveden a používá se primárně pro stanovení dědičného rizika rakoviny prsu a vaječníků. [36.] Přechod na NGS však přináší komplikace vyplývající z výběru složek BRCA testování pracovního postupu, jako je platforma NGS, metoda obohacování a proces analýzy bioinformatiky.

Pro diagnostické laboratoře je nezbytná efektivní a nákladově efektivní strategie detekce přesných mutací a standardizovaný systematický přístup k hlášení výsledků testů BRCA. Značný rozdíl mezi metodou sekvenování Sanger a NGS je, že DNA nemusí být dostatečně citlivé k detekci nízkých hladin somatických změn a tyto metody jsou nákladnější a obtížnější se rozlišují pro aplikace s vysokou propustností než testy NGS. [36.] Déle testování BRCA s technologií NGS nabízí oproti Sangerově sekvenaci mnoho výhod, včetně možnosti detekce LGR v jediném pracovním postupu, i když detekce LGS a NGS nebyla v diagnostickém nastavení plně zavedena. V klinickém prostředí se NGS obvykle používá pro sekvenování specifických genů, jako jsou BRCA 1 a BRCA 2, nebo panelů genů. [8.] Hlavní pokrok této metody je schopnost produkovat v některých případech více než miliardu krátkých čtení zatím co je přístroj v provozu, což je činí užitečnými pro mnoho biologických aplikací. [37.]

3.9.1 Výhody NGS

NGS jsou dostatečně citlivé k detekci mutací na nízké úrovni, multiplexovány pro snížení potřebného množství DNA. [36.] Mezi klíčové výhody také patří technologii vysoká propustnost, automatizované analýzy s nižšími náklady a paralelní průběh s jinými genetickými testy. [8.]

3.9.2 Nevýhody NGS

Mezi značné nevýhody se řadí vyšší náklady na spuštění, komplexní pracovní postup, je potřeba také ukládání a analýza vyhrazených dat, dochází ke snížené citlivosti pro velké inserce či delece. Jedná se konkrétně o větší než 20 párů bází. [8.]

3.9.3 Platformy NGS

Díky rozmanitosti funkcí NGS je pravděpodobné, že na trhu bude současně více platform, přičemž některé z nich mají jasné výhody pro konkrétní aplikace oproti jiným. Přední platformy NGS používají klonálně amplifikované templáty, které nejsou ovlivněny libovolnými ztrátami genomických sekvencí, které jsou spjaty s metodami bakteriálního klonování.

Důležitou výhodou jedno-molekulových šablonových platform je, že PCR není vyžadována. PCR může vytvářet mutace, které se maskují jako sekvenční varianty a amplifikační zkreslení, které v cílových sekvencích nedostatečně reprezentuje oblasti bohaté na AT a GC. Existují čtyři primární metody chemie NGS: cyklické reverzibilní zakončení, sekvenování ligací, pyrosekvenování a sekvenování v reálném čase. [37.]

Volba platformy NGS je však pouze jedním z faktorů, které je třeba zvážit v celém pracovním postupu NGS, který je rovněž závislý na dalších složkách, včetně metod obohacování, sekvenčních chemií a analytických postupů. MiSeq (Illumina) a Ion Torrent PGM (Life Technologies) jsou příklady plošinových NGS platform. Oba fungují na principu sekvenční syntézy, při kterém se měří přidání nukleotid trifosfátů k připraveným klonovým DNA templátům. V případě MiSeq jsou to fluorescenčně značené reverzibilní deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP) a sekvence jsou opticky čteny fluorescenčním zobrazením. Ion Torrent naopak čte sekvence opticky pomocí technologie polovodičového sekvenování (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), kde se změny pH v důsledku přidání dNTP do rodičního se řetězce zaznamenávají jako změny napětí. [9.]

Žádná chemie není dokonalá a všechny platformy NGS trpí konečnou vnitřní chybovostí kvůli nejednoznačnosti signálu, nepřesnosti enzymu, nedokonalé deprotektce atd. Sekvenční chyby komplikují volání variant, zejména těch s nízkou frekvencí. Nedávné inovace v molekulárním čárovém kódování významně snížily chybovost NGS za cenu zvýšení hloubky sekvenování. [40.]

Díky rychlému tempu vývoje platformy NGS jsou veškeré podrobné revize zastaralé v době zveřejnění. Vzhledem k tomu jsou aktuální on-line recenze, jako je NGS Field Guide od The Molecular Ecologist, důležitými referencemi při výběru platformy NGS. [9.]

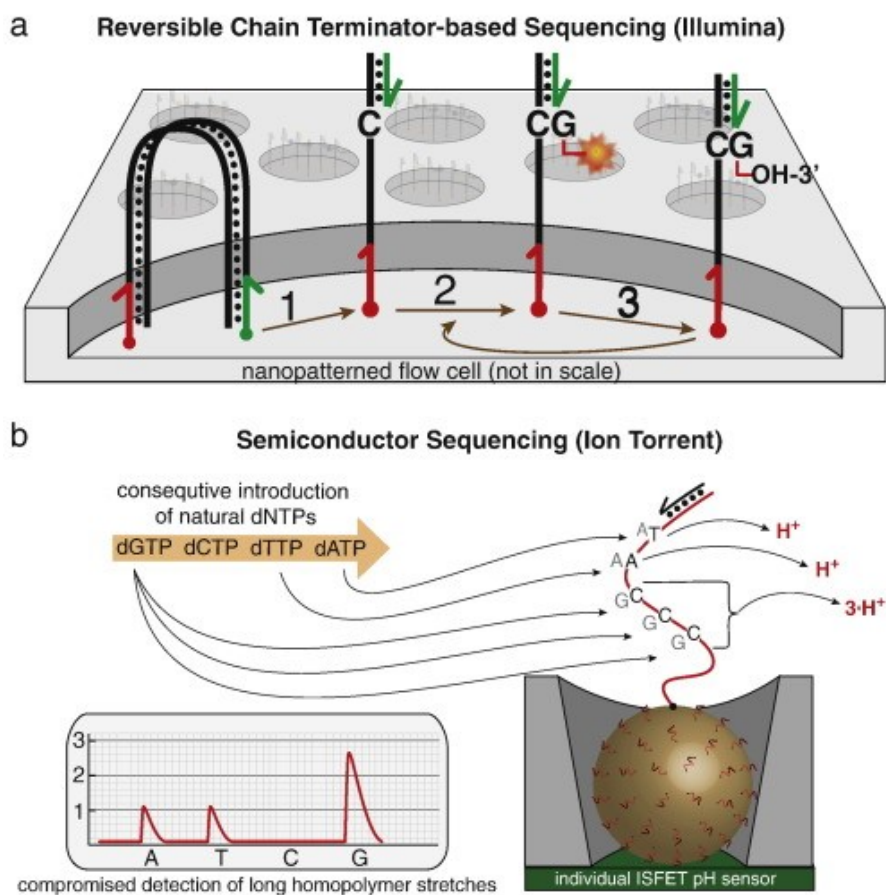
3.9.4 Illumina

System Illumina NGS je založen na myšlence sekvenčního přidání nukleotidové báze značené fluoroforem v kombinaci s fluorescenčním zobrazením (obrázek 4a). Tato platforma se spoléhá na „přemostění PCR“ na povrchu pomocí vázaných primerů k vytvoření lokálních polymerázových kolonií amplikonů. Všechny amplikony v každé polymerázové kolonii by měly mít stejnou sekvenci a generovat stejnou barevnou fluorescenci během každého cyklu začlenění nukleotidů (obrázku 4a). Barva fluorescence odpovídá identitě zabudovaného nukleotidu. Platforma Illumina také nejpomalejší ze zkoumaných platforem NGS, přičemž každý cyklus (začlenění nukleotidů a zobrazování) trvá zhruba 5 minut [40.]

3.9.5 Ion Torrent

Jedná se o platformu, která používá pro čtení nukleotidové identity spíše hodnotu pH než fluorescenci. Během extenze primeru se pro každou událost začlenění nukleotidů uvolní protonový ion (obrázek 4b). Uvolněné protony způsobují lokalizovanou a přechodnou změnu pH, která je detekována miniaturním senzorem pH (ISFET) na matici prvků CMOS. V každém kroku sekvenování je do reakční reakční buňky zaveden pouze jeden typ nukleotidů (např. dATP). Signál DNA pak budou vykazovat pouze fragmenty DNA s odpovídajícím nukleotidem jako další bázi.

Všechny čtyři nukleotidy se cyklují tímto způsobem, aby se provedlo sekvenování. Senzory pH navíc reagují téměř okamžitě. V důsledku toho je Ion Torrent sekvenování výrazně rychlejší než Illumina sekvenování. Další výhodou platformy Ion Torrent NGS je to, že samotné nástroje jsou výrazně levnější než odpovídající přístroje Illumina, vzhledem k relativně nižším nákladům na senzory pH ve srovnání s optickými odečítacími systémy. Hlavní nevýhody jsou jeho relativně vyšší vnitřní chybovost a vyšší náklady na čtení ve srovnání s Illuminou. [40.]



Obrázek 4 - a) Illumina sekvenování pomocí můstkové PCR a opakovaného fluorescenčního zobrazování polymerázových kolonií, b) Ion Torrent sekvenování pomocí pH pro detekci začlenění nukleotidů [40.]

Na obrázku 4a výše je graficky znázorněno, že cílová DNA je připojena s adaptéry na obou koncích 5' a 3' a tyto adaptéry umožňují, aby byl cíl zachycen a amplifikován na povrchu vzorované buňky, která je unášena kolonou. Během skutečného sekvenování se v každém cyklu přidávají současně všechny dNTP, každý s odlišnou značkou fluoroforu, a každá polymerázová kolonie obsahuje jeden nukleotid, aby se vytvořil jasný fluorescenční bod detekovaný zobrazováním. Chemické ošetření štěpí fluoroforovou a blokátorovou skupinu, což umožňuje zahájení nového cyklu inkorporace nukleotidů.

Obrázek 4b je zobrazena metoda Ion Torrent, kde můžeme vidět, že během prodlužování polymerázy a inkorporace nukleotidů se uvolňuje proton, který přechodně mění pH mikrojamky. Tokem v jednom typu nemodifikovaného dNTP (např. dATP) současně miniaturizované senzory pH ISFET hlásí, že mikrojamky včlenily zavedený nukleotid.

Homopolymerní sekvence (např. AAAAA) vedou k uvolnění většího počtu protonů, které může být obtížné přesně kvantifikovat. [40.]

3.9.6 Cílené sekvenování genomu

Obrovské paralelní sekvenční schopnosti technologií sekvenování příští generace z nich učinily nástroje volby pro charakterizaci genomických aberací pro výzkumné a diagnostické účely. Pro klinické aplikace je screening celého genomu nebo exomu náročný kvůli velké genomické oblasti, kterou je třeba sekvenovat, souvisejícím nákladům, složitosti dat a nedostatku známého klinického významu všech genů.

Rutinní screening proto zahrnuje omezené markery s prokázaným klinickým významem. Tento proces, označovaný jako cílené sekvenování genomu, vyžaduje selektivní obohacení genomických oblastí sestávajících z těchto markerů prostřednictvím jedné z několika strategií obohacování na bázi primerů nebo sond, následované sekvenováním obohacených genomických oblastí. [38.]

4 Léčba

Ženy, které zdědily mutace v genech BRCA 1 nebo BRCA 2, mají výrazně zvýšené riziko rakoviny prsu a vaječníků. Nosiče mutací mají různé možnosti, včetně rozsáhlého a pravidelného dohledu, chemoprevenci a chirurgie snižující riziko. Zejména se uplatňuje profylaktická chirurgie, ta může zahrnovat bilaterální mastektomii, bilaterální salpingooforektomii nebo kombinaci obou postupů. Profylaktická chirurgie se ukázala jako neúčinnější strategie snižování rizik. [14.] V retrospektivních i prospektivních observačních studiích snižuje bilaterální profylaktická mastektomie incidence rakoviny prsu o 90 % nebo více u pacientů s mutací BRCA. [14.] Profylaktická mastektomie jako výkon patří do tzv. riziko redukcujících operací. [16.]

4.1 Inhibitory PARP

Poly (ADP-ribóza) polymerázy (PARP) jsou rodina příbuzných enzymů, které sdílejí schopnost katalyzovat přenos ADP-ribózy na cílové proteiny. Role PARP proteinů při opravě DNA je zvláště zajímavá, s ohledem na zjištění, že určité nádory defektní v homologních rekombinačních mechanismech, mohou spoléhat na přežití zprostředkované PARP opravou DNA a jsou citlivé na její inhibici. Inhibitory PARP mohou také zvýšit senzitivitu nádoru k čínidlům poškozujícím DNA. Klinické studie inhibitorů PARP zkoumají užitečnost těchto přístupů u rakoviny. [17.]

PARP hraje zásadní roli při opravě jednovláknových zlomů DNA skrz základní cestu pro vyříznutí excize. Inhibitory PARP způsobují zvýšení DNA jednovláknových zlomů (SSB), které jsou přeměněny během replikace na nenapravitelné toxické dvojláknové zlomky DNA (DSB) v BRCA 1/2 defektních buňkách. [19.] Rozdělení dvou řetězců DNA by normálně bylo opraveno procesem opravy homologní rekombinace (HRR), což je složitý proces zahrnující mnoho proteinů, zejména BRCA 1 a BRCA 2. Nádory s nedostatkem HRR, jako jsou ty, které se vyskytují u rakovin mutovaných BRCA, nemohou přesně opravit poškození DNA, pokud je také narušena funkce PARP proteinu a jak základní excize, tak opravné cesty pro HRR DNA jsou nefunkční. [18.] Díky své úloze v opravě DNA vede inhibice PARP ke genomické nestabilitě a hromadění poškozených buněk při zastavení buněčného cyklu. [17.]

4.1.1 Léčba pomocí inhibitorů PARP

Klinické studie ukázaly, že inhibitory PARP jsou prospěšné při léčbě pacientů, kteří jsou nositeli zárodečných mutací BRCA. Kromě toho jsou inhibitory PARP pravděpodobně také užitečné pro nosiče mutací jiných než BRCA. Jedna ze studií ukázala, že Iniparib a jeho metabolity neinhibují PARP v intaktních buňkách, což naznačuje, že by se v klinických studiích měly inhibitory PARP zvážít. Současné klinické studie testují potenciál sedmnácti nových inhibitorů PARP u časného a pokročilého karcinomu prsu, jako je Olaparib, Veliparib, Talazoparib nebo Rucaparib aj. Olaparib získal schválení FDA v roce 2014 a Rucaparib byl schválen v prosinci 2016. [19.]

Další klinické údaje navíc naznačují, že inhibitory PARP mohou být přínosem také pro pacienty, jejichž nádory jsou citlivé na chemoterapii na bázi platiny a kteří mají nedostatek HRR způsobený jinými mutacemi, než jsou mutace v genech BRCA 1/2. [18.]

4.1.2 Duální terapeutický potenciál pro inhibici PARP v onkologii

Inhibice PARP má potenciál pro použití v léčbě rakoviny prostřednictvím alespoň dvou mechanismů, tj. zvýšením citlivosti nádoru na chemoterapeutická činidla, která poškozují DNA, a také indukci „syntetické letality“ v buňkách, které jsou vysoce závislé na PARP, kvůli nedostatku v HR, jako jsou proteiny BRCA 1. [17.]

4.2 Chirurgická operace

Ženy, které nesou mutace BRCA mají větší vývoj sekundární rakoviny, a to buď na stejném prsu (ipsilaterální) nebo na opačném prsu (kontralaterální). U těchto žen se doporučuje bilaterální mastektomie, protože studie naznačují, že ženy, které jsou nositeli mutací BRCA1/2 a dostávají bilaterální mastektomii, mají menší pravděpodobnost úmrtí na rakovinu prsu než ženy, které byly léčeny unilaterální mastektomií. [19.]

4.3 Chemoterapie

Rakoviny prsu spojené s mutací BRCA jsou charakterizovány deficientní homologní rekombinací DNA a 80 % karcinomů prsu spojených s BRCA 1 vykazuje bazální molekulární podtyp. Nosiče BRCA tradičně dostávají konvenční systémovou chemoterapii na základě svých výchozích charakteristik nádoru a obecně se uznává, že po vhodné léčbě je prognóza mutačního nosiče rovnocenná prognóze u pacienta se sporadickým karcinomem prsu. Avšak

s rostoucím pochopením funkcí proteinů BRCA 1/2 při homologní opravě DNA se uznává, že nádory rakoviny prsu spojené s BRCA mohou mít odlišné biochemické vlastnosti, a proto vyžadují léčebné strategie přizpůsobené na míru. Ukázalo se, že nádory vznikající u pacientů s mutacemi BRCA jsou zvláště citlivé na sloučeniny platiny nebo inhibitory PARP. Navíc se zdá, že nosiči mutace BRCA 1 využívají režimů obsahujících antracyklin-taxan, stejně jako u sporadických trojnásobně negativních karcinomů prsu. [20.]

4.3.1 Taxany

Taxany jsou chemoterapeutická činidla stabilizující mikrotubuly, která blokují proliferaci buněk, což vede k apoptóze. Nejběžnějšími taxany používanými k léčbě rakoviny prsu jsou docetaxel a paclitaxel. Nosiči mutace BRCA 1 v podskupině hormonálně negativních karcinomů vykazovaly menší citlivost na chemoterapii taxanem než pacienti bez hormonálně negativních nosičů mutací BRCA 1. Naopak v podskupině hormonálně pozitivních nádorů vykazují dědičné i sporadické případy podobné citlivosti jako terapie taxanem. [19.]

4.3.2 Platinová činidla

Platinová činidla se vážou přímo na DNA, čímž vytvářejí adukty DNA / platina, což vede k mezidruhovým křížovým vazbám DNA a následným přerušáním dvou řetězců. Studie ukázala, že neoadjuvantní chemoterapie podporuje zvýšenou odpověď na platinové látky a sníženou odpověď na taxany u dědičné rakoviny prsu asociované s BRCA 1. Práce zaměřující se na neoadjuvantní terapii cisplatinou ukázala, že snížená exprese BRCA 1 může pomoci identifikovat podmnožiny trojnásobně negativních rakovin, které jsou citlivé na cisplatinu. Další důkaz byl poskytnut v následné klinické studii s použitím cisplatinu, která ukázala, že nosiče mutace BRCA 1 jsou na tuto chemoterapeutickou látku vysoce citliví. Jedna studie však zaznamenala reverzní mutaci BRCA 1 u trojnásobně negativního pacienta s rakovinou prsu, který se vyvinul v průběhu 18 týdnů neoadjuvantní léčby na bázi platiny. To vedlo ke špatné reakci a časnému relapsu a smrti. [19.]

5 Prevence BRCA-pozitivních nosiček

Genetické testování lze provádět také u zdravých jedinců, nejen u těch, kteří již rakovinu vyvinuli. [22.] Program pro BRCA pozitivní ženy, které jsou zdravými nosičkami se zaměřuje zejména na brzkou detekci karcinomu prsu. Tato detekce je zahájena přibližně ve 25 letech. Spadá sem ultrazvukové vyšetření každého půl roku a zároveň i vyšetření pomocí zobrazovacích metod jako je např. magnetická rezonance, ultrazvuk či mamografie. Pokud má žena prokázanou některou mutaci genů BRCA musíme brát v úvahu i riziko nádoru vaječníků, vejcovodů a pobřišnice.

U BRCA-pozitivních pacientek se soustavná gynekologická péče zaměřuje zejména na gynekologická ultrazvuk a vyšetření biomarkeru CA 125 každých 4–6 měsíců. Sledování tohoto typu se zahajuje již kolem 20 let pacientky. Avšak aby se snížilo úmrtí BRCA-pozitivních žen na nádor vaječníků nestačí pouze tento screeningový program. Jako efektivní řešení je profylaktická operace. Tato operace se provádí optimálně ve věkovém rozmezí 35-40 let po ukončení reprodukce. Procedura se obvykle provádí pomocí mastektomie na ochranu kůže a současnou rekonstrukcí. Pokud již byla manifestace nádoru potvrzena jako invazivní nebo preinvazivní karcinom, zvolí se postupný přístup se zachováním kůže subkutánní mastektomií a současnou rekonstrukcí implantátu. Cílem je individuální snížení pravděpodobnosti onemocnění z 55-80 % na 1-2 %. [21.]

Bilaterální profylaktická mastektomie je běžně užívaná pro BRCA-pozitivní nosičky. Zatímco kontralaterální profylaktická mastektomie se provádí u nositelů BRCA, u kterých se již rakovina prsu vyvinula jako prostředek ke snížení rizika kontralaterálního karcinomu prsu.[22.]

Běžně se také zahrnuje provedení hysterektomie s bilaterální salpingooforektomií. Operace snižuje riziko nádoru děložních adnex a pobřišnice, ale také nádor prsu přibližně o polovinu. V rámci preventivního sledování prsou žen je doporučeno sledovat i jiné solidní nádory k časně detekci, a to u obou pohlaví. [16.]

Tabulka 1-Přehled základní prevence zdravých nosiček mutace genů BRCA 1 a BRCA 2, i pacientek s jednostranným karcinomem prsu po léčbě od 18 let [16.]

Zdravé nosičky mutace genů BRCA1, BRCA2	<ul style="list-style-type: none"> • Samovyšetření prsou od 18 let • Klinické vyšetření 1× za půl roku od 25 let věku nebo o 10 let dříve, než byl věk nejmladší příbuzné s Ca prsu • Ve 25 a 30 letech jedna mamografie (MG) k vyloučení mikrokalciifikací (jedna šikmá projekce na každý prs) • 25–29 let: MRI a UZ střídavě po 6 měsících, v případě velmi časného výskytu Ca prsu v rodině je sledování zahájeno o 10 let dříve, než byl věk nejmladší příbuzné v rodině léčené s Ca prsu • 30–65 let: MRI a MG střídavě po 6 měsících, UZ se využívá jako doplňující metoda po předchozí MRI či MG • MRI prsou se provádí mezi 7. a 17. dnem menstruačního cyklu, nelze použít v době laktace, neměla by být používána v I. trimestru gravidity • 65 let a starší: MG a UZ střídavě po 6 měsících (individuálně podle zdravotního stavu pacientky)
Pacientky s jednostranným karcinomem prsu po léčbě s mutací genů BRCA1, BRCA2	<ul style="list-style-type: none"> • Sledování stejně jako u zdravých nosiček (viz výše)

Tabulka 2- Přehled pro sledování ostatních karcinomů v souvislosti s mutací genu BRCA 1 a BRCA 2 jako je karcinom pankreatu od 50 let či o 10 let dříve, maligní melanom či CRC od

Screening karcinomu pankreatu	U nosičů mutace genu BRCA2 s pozitivní RA Ca pankreatu zvažení screeningu pomocí endosonografie pankreatu (EUS) 1× ročně od 50 let věku nebo o 10 let dříve, než onemocněl nejmladší člen rodiny karcinomem pankreatu
Screening maligního melanomu	Kožní a oční vyšetření 1× ročně, screening individuálně podle výskytu maligního melanomu v rodině
Screening CRC	Od 45 let test na okultní krvácení 1× ročně, kolonoskopie 1× za 3–5 let

45 let [16.]

Tabulka 3- Přehled základní prevence u mužů s mutací genu BRCA 1 a BRCA 2, zahrnuje vyšetření prsou od 35 let a prostaty od 40 let [16.]

Screening karcinomu prsu	Samovyšetření prsou 1× měsíčně od 35 let
Screening karcinomu prostaty	Urologické vyšetření včetně PSA 1× ročně od 40 let

5.1 Rodinná anamnéza

- Předchází genetické vyšetření

- Doporučení se odvíjí na základě SLG
- Proč se mají testovat i muži:
 - Muži nesoucí mutace v BRCA 1 a / nebo BRCA 2 mohou vyvinout melanomy nebo rakoviny prsu, slinivky břišní nebo prostaty. V Evropském onkologickém ústavu jsme testovali mutace v těchto genech mnohem méně mužů než žen (357 oproti 4 728 od roku 2001). Sedmdesát tři z těchto mužů byli probandy, první ve své rodině, který pozitivně testoval takové mutace; dalších 284 bylo zapojeno do kaskádového screeningu, což je testování krevních příbuzných lidí se specifickými genetickými mutacemi. Ve srovnání se ženami je celkový testovací poměr 1 ze 13 nebo 1 ze 53 pouze pro probandy. Většina mužských probandů (63 ze 73) měla rakovinu prsu; 8 mělo pouze nádory bez prsu (11 %). Zejména 40 % pacientů s rakovinou prostaty mělo mutaci BRCA. [45.]

5.1.1 Význam rodinné anamnézy

Rodinné anamnézy rozlišovaly relativně málo, pokud se probandce rozvinula rakovinu prsu, kdežto mimo jiné rodinné anamnézy nejlépe rozlišovaly nosiče od zdravých jedinců. Věk probandky je jasně silným prediktorem pravděpodobnosti nosiče, ale naše zkušenost je taková, že rodinná anamnéza je důležitým určujícím faktorem pravděpodobnosti mutace u nedotčených i postižených žen. [11.] Podle autozomálně dominantního vzorce dědičnosti jsou předávány dalším generacím s pravděpodobností 50 % a následně vedou k familiární agregaci nemoci. [12.]

Rodinná anamnéza může identifikovat lidi s mírným až středně zvýšeným rizikem rakoviny nebo může sloužit jako první krok k identifikaci dědičné predispozice k rakovině, která představuje velmi vysoké celoživotní riziko. [27.] Také je nezbytným nástrojem pro hodnocení rizika rakoviny. [24.] Rozsah tohoto rizika se však bude lišit v závislosti na povaze rodinné historie, konkrétně na tom, který příbuzný byl ovlivněn, na jejich věku při diagnostice, počtu postižených příbuzných a věku dotčené ženy. [29.] U rostoucího počtu nemocí lze testování na bázi DNA použít k identifikaci konkrétní patogenní varianty jako příčiny dědičného rizika a určení, zda členové rodiny zdědili variantu související s touto chorobou. [27.]

Přesnost rodinné anamnézy má přímý dopad na stanovení diferenciálních diagnóz, výběr vhodného testování, interpretaci výsledků genetických testů, zpřesnění jednotlivých odhadů rizika rakoviny a nastínění screeningu a doporučení ke snížení rizika. [24.] Při porovnávání samostatně hlášených informací s nezávisle ověřenými případy je citlivost anamnézy karcinomu prsu relativně vysoká, 83 % až 97 %, ale nižší u rakoviny vaječníků, 60 %. [24.] Protože rodinná anamnéza rakoviny je jedním z důležitých prediktorů rizika rakoviny, představuje analýza rodokmenu důležitý aspekt hodnocení rizika. [24.]

5.1.2 Nepřesnosti rodinné anamnézy

Přesnost a úplnost rodinné historie se musí brát v úvahu, pokud se používají k posouzení rizika. Hlášená rodinná anamnéza může být chybná nebo osoba nemusí vědět o příbuzných, kteří mají rakovinu. Kromě toho mohou malé rodiny a předčasné úmrtí omezit informace získané z rodinné historie. Rakovina prsu nebo ovarií na otcovské straně rodiny obvykle zahrnuje více vzdálených příbuzných než rakovina prsu nebo ovarií na mateřské straně, takže informace může být obtížnější získat. Další omezení spoléhání se na rodinné historie zahrnují adopci, rodiny s malým počtem žen, omezený přístup k informacím o rodinné historii a náhodné odstranění dělohy, vaječníků a / nebo vejcovodů pro indikace rakoviny. [24.]

5.1.3 Benefity anamnézy

Ukázalo se, že vzdělávání pacientů zlepšuje úplnost sběru rodinné anamnézy a může vést k přesnější stratifikaci rizika, doporučení pro genetické poradenství a ke změnám v doporučeních managementu. Potvrzení prvotního místa rakoviny v rodině, které ovlivní výpočet dědičných pravděpodobností predispozice a / nebo odhad rizik empirické rakoviny, může být důležité, zejména pokud rozhodnutí o léčbě, jako je chirurgie snižující riziko, budou vycházet z této rodinné historie. Přesnost se liší podle místa rakoviny a stupně příbuznosti. Hlášení o historii rakoviny může být nejpřesnější u rakoviny prsu a méně přesná u gynekologických malignit a rakoviny tlustého střeva. [24.]

5.2 Rodokmen

Rodokmen je charakterizován jako standardizované grafické znázornění rodinných vztahů. Primárně usnadňuje identifikaci modelů přenosu nemocí, rozpoznávání klinických charakteristik spojených se specifickými dědičnými syndromy rakoviny a stanovení nejlepších strategií a nástrojů pro hodnocení rizik. Pokud existují důkazy o zděděné

náchylnosti k rakovině, ale genetické testování nebylo provedeno, lze k odhadu rizika rakoviny použít analýzu rodokmenu. Tento typ výpočtu používá pravděpodobnost, že jedinec obsahuje genetickou variantu a údaje o specifické penetraci pro výpočet rizika rakoviny. [24.]

Identifikace jedinců rodokmenem a analýzou mutací BRCA 1/2 nám umožní nabídnout cílené testování mutací a vhodné poradenství. Konkrétní studie, kterou se zabývá nemocnice s terciární péčí ukázala, že ze 127 pacientů s rakovinou prsu léčených v letech 2014–2015, 24 z nich splnilo kritéria dědičného syndromu rakoviny prsu a vaječnicků po podrobné verbální pitevní a rodokmenové analýze. Byly odhaleny mutace ve 13 případech (54 %), mezi něž patřilo 9 mutací BRCA 1 (69 %) a 4 mutace BRCA 2 (31 %) pomocí BRCA 1 a 2 další generace sekvenování provedené po poradě před testem. Následným poradenstvím, které bylo provedeno po testování byla doporučena cílená mutační analýza pro 64 vysoce rizikových členů v těchto 13 rodinách s patogenními mutacemi. [26.] U případů rakoviny prsu mužů je riziko dědičnosti pro autozomálně dominantní genetické podmínky je 50 % pro ženy je toho riziko stejné. Rozdílná je zde penetrace genů, která může vést k tomu, že někteří jedinci v rodině nebudou ovlivněni. [25.] Tento postup pomůže při dohledu nad včasnou detekcí, vhodnou léčbou a prevencí nemoci snížením zátěže pro rodinu i národ. Výsledky této předběžné studie zdůrazňují význam genetického poradenství, analýzy rodokmenů a genetického testování. [26.]

5.2.1 Třígenerační rodokmen

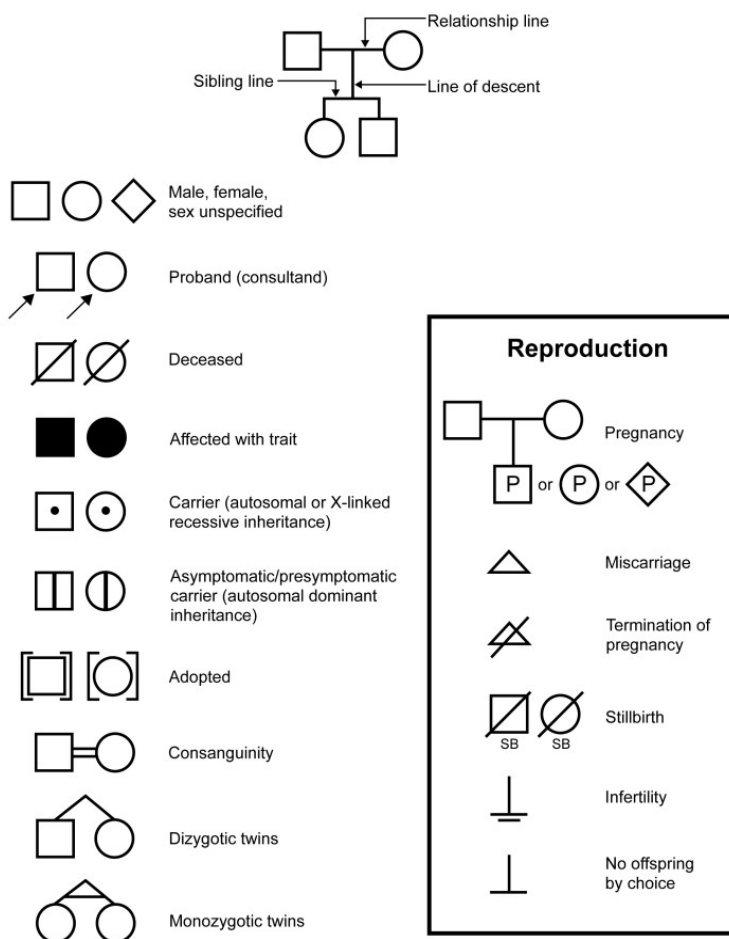
Ideální a standartní rodinná historie je komplexní třígenerační rodokmen používaný v lékařské genetice, genetickém poradenství a výzkumu. Rodinná historie pro třígenerační rodokmen je definována na příbuzné prvního a druhého stupně. Příbuzní prvního stupně jsou rodiče, děti a plní sourozenci. Příbuzní druhého stupně jsou prarodiče, tety / strýcové, neteři / synovci, vnoučata a nevlastní sourozenci. [33.]

5.2.2 Standarty nomenklatury

V roce 1995 navrhla pracovní skupina pro standardizaci rodokmenů (PSTF) Národní společnosti genetických poradců (NSGC) systém nomenklatury rodokmenů. [33.] Nomenklatura byla vybrána na základě aktuálního použití, konzistence mezi symboly, kompatibility s počítačem, a přizpůsobivost symbolů odrážející rychlý technický pokrok v lidské genetice. Použití standardizované nomenklatury rodokmenů sníží šance

na nesprávnou interpretaci lékařských a genetických informací o pacientovi a rodině. [32.]
 Obecné symboly rodokmenu jsou uvedeny na obrázku 5.

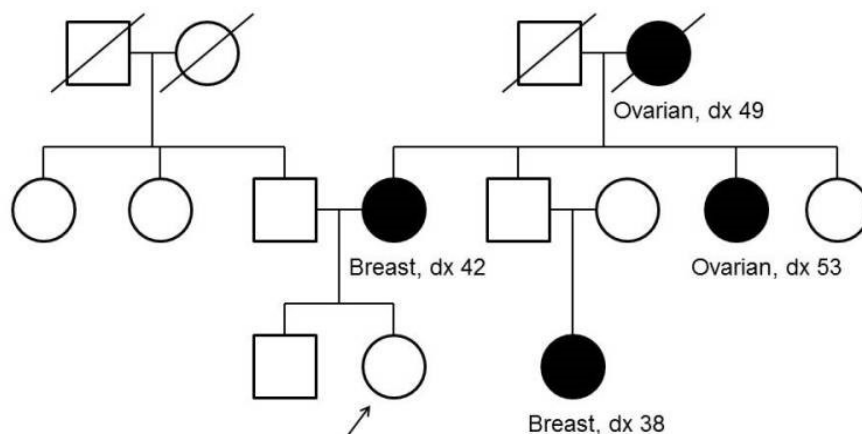
Standard Pedigree Nomenclature



Obrázek 5 - Standardní nomenklatura rodokmenu. Společné symboly se používají k nakreslení rodokmenu. Rodokmen ukazuje vztahy mezi členy rodiny a vzorce dědičnosti pro určité rysy a nemoci. [25.]

5.2.3 Dědičné znaky patogenních variant BRCA 1 a BRCA 2

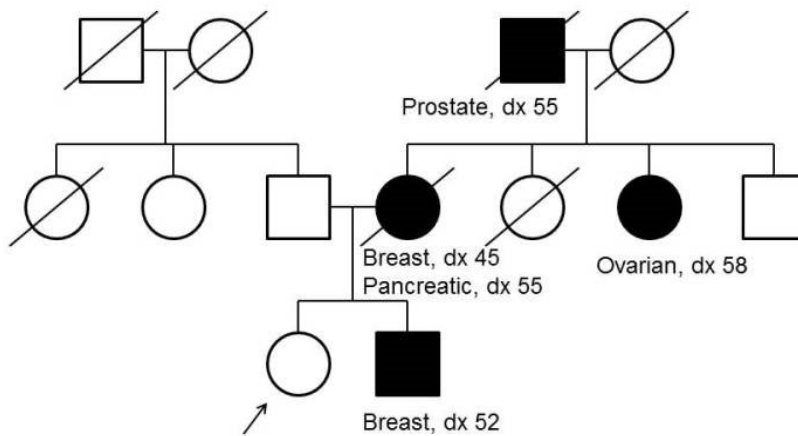
Classic *BRCA1* Pedigree



Obrázek 6 - Rodokmen BRCA 1 mutace [25.]

Rodokmen znázorněný na obrázku 6 ukazuje některé z klasických rysů rodiny s patogenní variantou BRCA 1 ve třech generacích, včetně postižených členů rodiny s rakovinou prsu nebo rakovinou vaječníků a mladým věkem na začátku. Skupiny BRCA 1 mohou vykazovat některé nebo všechny tyto vlastnosti. Jako autozomálně dominantní syndrom může být patogenní varianta BRCA 1 přenášena mateřskými nebo otcovskými liniemi, jak je znázorněno na obrázku. [24.]

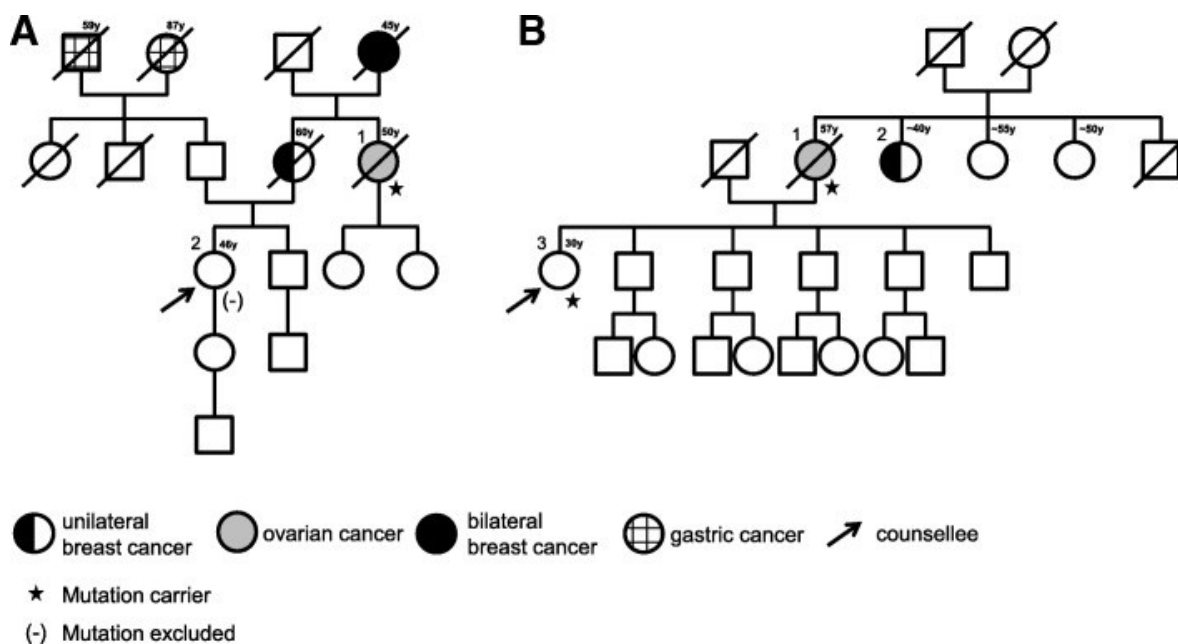
Classic *BRCA2* Pedigree



Obrázek 7 - Rodokmen *BRCA2* mutace [25.]

Rodokmen na obrázku výše ukazuje některé z klasických rysů rodiny s patogenní variantou *BRCA2* napříč třemi generacemi, včetně postižených členů rodiny s rakovinou prsu (včetně rakoviny prsu u mužů), rakoviny vaječníků, slinivky břišní nebo prostaty a relativně mladým věkem na začátku. Skupiny *BRCA2* mohou vykazovat některé nebo všechny tyto vlastnosti. Jako autozomálně dominantní syndrom může být patogenní varianta *BRCA2* přenášena mateřskými nebo otcovskými liniemi, jak je znázorněno na obrázku. [24.] Pacientka ve studii podstoupila genetické poradenství po sestře, u které bylo zjištěno, že má škodlivou mutaci *BRCA1* a bylo zjištěno, že není nosičem. Přes tato zjištění podstoupila profylaktickou bilaterální salpingooforektomií s hysterektomií a patologie byla negativní na okultní malignitu. 12 měsíců po profylaktické operaci jí byla diagnostikována primární peritoneální karcinom.

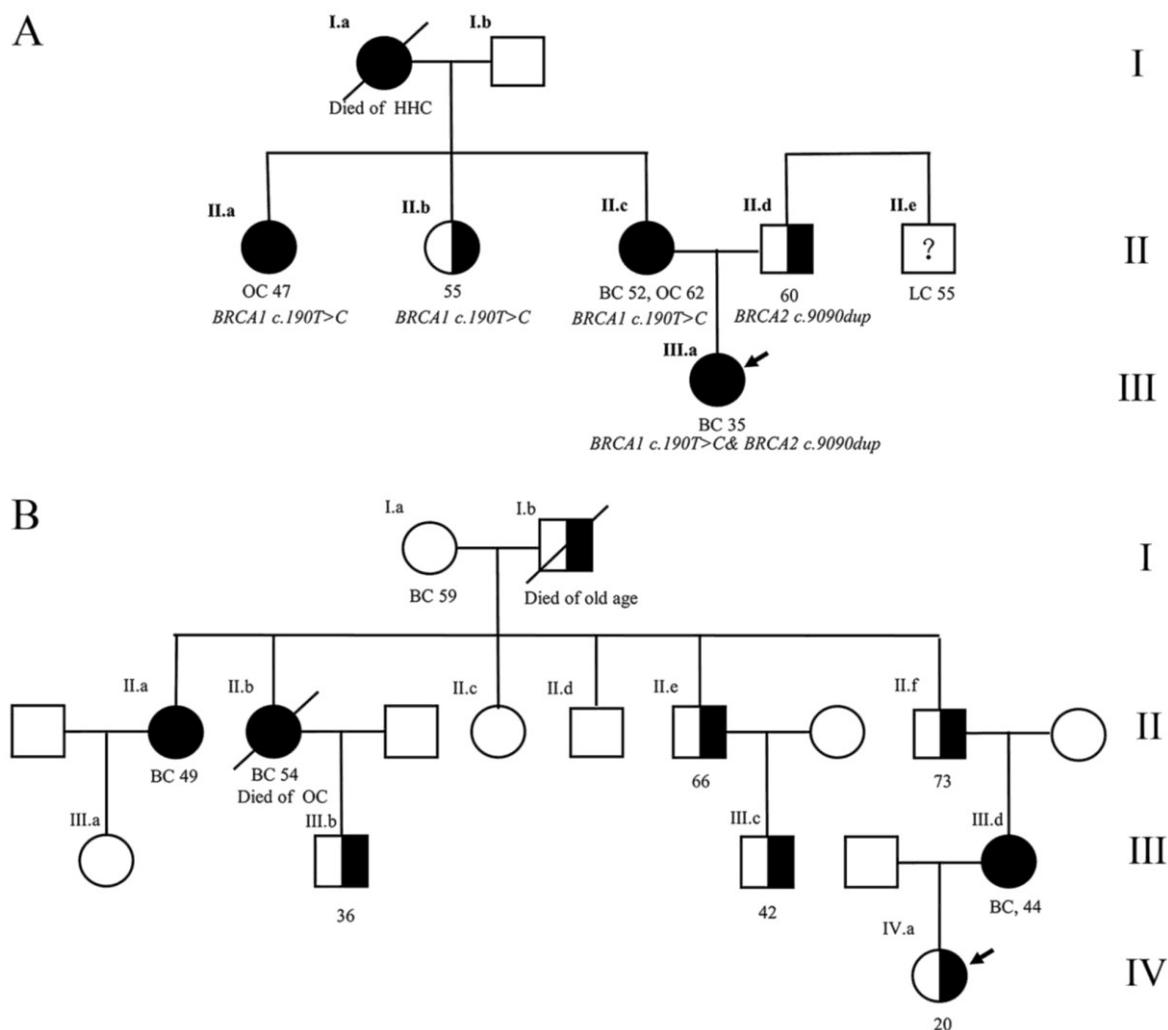
Na obrázku 7 je rodokmen tohoto pacienta. Rodiny pacientů 1 a 5 nesly mutaci *BRCA1* 187delAG. Hodnocení nádorové tkáně od dvou pacientů s fenoskopii pomocí PCR / kapilární elektroforézy neodhalilo žádný důkaz o mutaci. [30.]



Obrázek 9 - Rodokmen dvou rodin splňujících kritéria pro dědičnou rakovinu prsu a vaječnicků [39.]

Rodokmen na obrázku 9 popisuje dvě rodiny, kde byla prokázána rakovina prsu a vaječnicků. Rodokmen A znázorňuje rodinu, ve které zemřeli všichni pacienti, u kterých se vyvinula rakovina. Zjistili jsme, že se jedná o patogenní mutaci genu BRCA 2. Probandka nezdělala mutaci, a proto ji bylo možné zbavit obav, že zdělala genetickou predispozici od své matky.

Rodokmen B znázorňuje rodinu, ve které pacient 2 trpící rakovinou prsu odmítl genetické testování. Patogenní mutace genu BRCA 2 identifikována v nádorové tkáni dostupné od jednotlivce 1. Cílená analýza odhalila, že dcera (3) také nesla mutaci, což potvrdilo, že varianta identifikovaná v nádorové tkáni od matky byla skutečně zárodečnou variantou. Dcera byla proto zařazena do vysoce rizikového programu screeningu rakoviny prsu a vaječnicků. [39.]



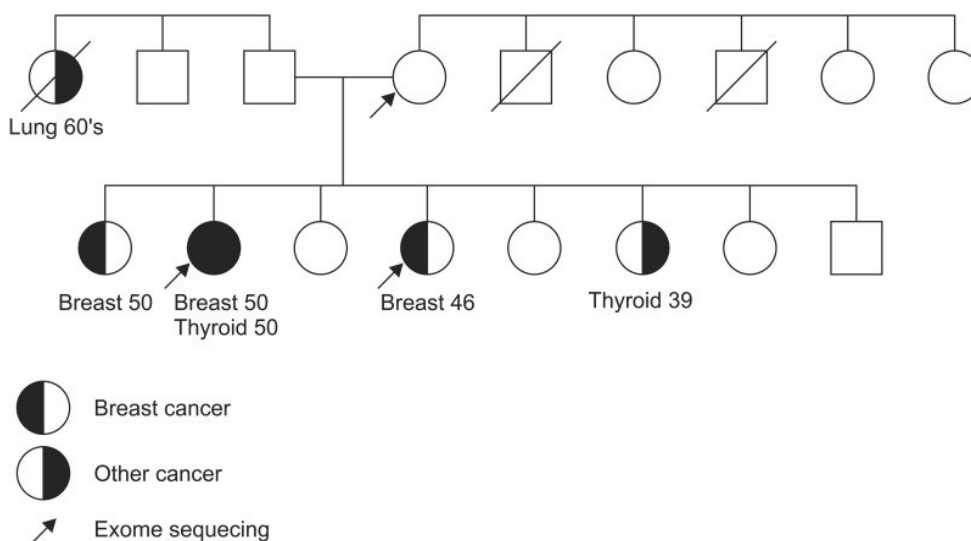
Obrázek 10 – Rodinný rodokmen BRCA 1 a BRCA 2 mutace [46.]

V rodokmenu jsou pacienti s rakovinou s mutacemi označeni pevnými symboly, zatímco zdraví nositelé jsou označeni polovičními pevnými symboly. Pozdní jednotlivci jsou označeni symboly zkříženého zkreslení. Probandy jsou označeny šipkami. Neznámý stav BRCA je označen otázníkem. Věk pod symboly označuje věk diagnostikovaný rakovinou pro pacienty a aktuální věk pro zdravé nosiče.

Rodokmen A znázorňuje rodinu s mutací genu BRCA 1 a BRCA 2. Pacient II.e má rakovinu plic a odmítl podstoupit testování BRCA.

Rodokmen B znázorňuje rodinu s mutací genu BRCA 1. Pacientka I.a má rakovinu prsu bez mutace genu BRCA 1. [46.]

5.2.4 Rodokmen s negativní mutací BRCA



Obrázek 11 – rodokmen rodiny s anamnézou rakoviny prsu [43.]

Rodokmen znázorňuje tři sestry, které měly v anamnéze rakovinu prsu, zatímco druhá sestra měla současně rakovinu štítné žlázy. Tato sestra byla geneticky testována na mutace BRCA a BRAF, ale negativní na mutaci BRCA. V předchozí generaci nebyli žádní členové rodiny s rakovinou prsu nebo štítné žlázy.

Pro analýzu byla vybrána korejská rodina, ve které tři sestry mají v anamnéze rakovinu prsu. Druhá sestra měla současně rakovinu prsu a štítné žlázy a další sestra bez rakoviny prsu měla anamnézu rakoviny štítné žlázy. V předchozí generaci nebyli žádní členové s rakovinou prsu nebo štítné žlázy. Druhá sestra podstoupila genetické testování mutací BRCA a BRAF a byla detekována mutace BRAF, somatická mutace. V genech BRCA 1 a BRCA 2 však nebyla detekována žádná mutace, a to ani metodou amplifikace sondy závislou na multiplexní ligaci. [43.]

5.3 Bilaterální profylaktická mastektomie

Bilaterální profylaktická mastektomie zahrnuje odstranění obou zdravých prsou, aby se v první řadě zabránilo rozvoji rakoviny prsu jako forma primární prevence. [22.] S bilaterální profylaktickou mastektomií souvisí pár malých problémů. Jedním z problémů je optimální načasování bilaterální profylaktické mastektomie. Pro bilaterální profylaktickou mastektomii není stanovena pevná lhůta; může být provedeno, jakmile je genetické testování dokončeno nebo může být odloženo na neurčito. Je však třeba vzít v úvahu, že rakovina prsu

u nosičů mutací BRCA 1 se vyvíjí ve výrazně mladším věku, asi o 10 let dříve než sporadická rakovina prsu. Proto je rozumné diskutovat o možnosti profylaktické operace v okamžiku zjištění stavu mutace BRCA. Dalším problémem je vliv bilaterální profylaktické mastektomie na kvalitu života. Cílem je odstranit dostatečné množství prsní tkáně pro optimální snížení rizika a poskytnout esteticky přijatelný výsledek pomocí rekonstrukční chirurgie.

Mastektomie šetrící kůži a bradavky jsou také považovány za bezpečné. Riziko malignity po zachování dvorce je 3,5–5,5 % za 5–7 let. Je pravděpodobné, že různé typy mastektomie mohou mít různé účinky na spokojenost pacienta. K rozeznání tohoto problému je zapotřebí dalších studií. [22.]

5.4 Mamografie

V posledních 50 letech je mamografie zlatým standardem pro screening rakoviny prsu u žen v běžné populaci a je jedinou zobrazovací modalitou prsu, u níž bylo prokázáno, že snižuje úmrtnost na karcinom prsu v randomizovaných kontrolovaných studiích. V souladu s tím se v polovině 90. let identifikovaly ženy, které nesly mutace BRCA 1 a BRCA 2, každoroční mamografie se pro tyto ženy stal doporučeným screeningovým režimem. Perspektivní studie však ukázaly, že s tímto přístupem byla detekována velká část rakovin v suboptimálním stadiu. Míra intervalu rakoviny se pohybovala od 35 % do 50 %.

Existuje pravděpodobně několik faktorů způsobujících nízkou citlivost mamografie. Mladé ženy mají obecně větší radiologickou hustotu prsu než starší ženy, což zakrývá detekci malignity. Avšak i u žen dané věkové skupiny se ukázalo, že zejména rakoviny související s BRCA 1 jsou mamograficky méně detekovatelné. Histologicky s rakovinou souvisejícími s BRCA 1 jsou obvykle buněčné a masité s kulatými tlačíci okraji, což má za následek benignější mamografický vzhled, spíše než cirkulační s nepravidelnými infiltračními okraji, jako je mnoho sporadických rakovin. Nižší citlivost mamografie na BRCA 2 související s rakovinou je poněkud obtížnější vysvětlit, protože histologicky jsou tyto rakoviny podobné sporadickým rakovinám. Rozumným vysvětlením je, že v průměru nádory související s BRCA 2 mají rychlejší zdvojnásobení doby než sporadické nádory, což zvyšuje pravděpodobnost, že se projeví jako hmatatelné intervalové nádory, místo aby byly zjištěny v dalším kole screeningu. [23.]

5.5 MRI=Magnetická rezonance

Na základě známé incidence rakoviny související s věkem u nosičů mutací BRCA se doporučuje, aby screening MRI začal ve věku 25 nebo 30.[23.] Na rozdíl od mamografie, která se spoléhá na anatomickou hustotu, zkreslení a kalcifikaci, aby se zjistila malignita, poskytuje kontrastní magnetická rezonance funkční hodnocení tkáně prsu. Jeho schopnost detekovat neovaskularitu nádoru a peritumorální zánět způsobuje, že jeho citlivost je relativně nezávislá na hustotě prsu a vyšší než u jakékoli jiné formy zobrazování prsu. Přibližně 50 % invazivních rakovin vykazuje klasický MRI vzorec časného zesílení kontrastu a předčasného vymytí, protože kontrastní látka se hromadí rychleji a vymývá se rychleji z cévního nádoru než z normálních nebo benigních tkání. Některé morfologické znaky jsou také typické pro malignitu, včetně spikulace nebo nepravidelného okraje léze a zvýšeného zlepšení periferie léze. Absence zesílení dobře koreluje s nepřítomností invazivního karcinomu prsu s negativní prediktivní hodnotou vyšší než 95 %. [23.]

6 Závěr

Mutace v genech BRCA 1 a 2 jsou prokázaným rizikovým faktorem celé řady onkologických zvrátů. Nejčastěji je s těmito geny spojována rakovina prsu, ale i rakovina vaječníku, která je mírně upozaděna. Tato onemocnění se samozřejmě týkají žen, ale i u mužů mohou mutace v BRCA způsobovat onkologické zvraty (nejčastěji spojené s rakovinou prostaty).

Prvním preventivním opatřením zařazujícím člověka do rizikové skupiny by měla být rodinná anamnéza mutace BRCA. Pokud existuje genetický profil ženských i mužských předků, dokáže tato rodinná retro-analýza ukázat, zdali člověk bude patřit do rizikové skupiny a případně ho včas odeslat na genetické vyšetření.

Samotné vyšetření je sice dnes již dostupné, ale stále se nejedná o jednoduchou analýzu, jelikož mutací v BRCA genech je již nyní popsáno několik set a stále se objevují další. Samozřejmě ne všechny mutace musí vést k onkogenním zvrátům. Na základě studií bylo vybráno několik dalších markerů, které jsou doporučovány k analýze spolu s BRCA geny (např. CHEK2, TP53, PTEN, CDH1, PALB2, BRIP1, ATM, RAD51C, RAD51D, STK11, BARD1, NBN). [44.]

Jelikož se tedy jedná o komplexní genetické vyšetření, kde nestačí pouhá analýza několika jednobodových mutací, ale je nutná analýza velkých oblastí DNA metodou, která si získává převahu je vysokokapacitní sekvenování nové generace, méně už vysokokapacitní hybridizační techniky nebo techniky amplifikační, které lze ale použít pro hrubý screening, díky rychlosti a ceně.

Dle provedené rešerše jsou již velmi propracovány nejen analytické metody a léčebné postupy, ale především preventivní programy, které umožňují včasné zachycení rizikových skupin (rodin) a jedinců.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1.] FORETOVÁ, Lenka, Eva MACHÁČKOVÁ, Markéta PALÁCOVÁ, Marie NAVRÁTILOVÁ, Marek SVOBODA a Katarína PETRÁKOVÁ. Recommended Extension of Indication Criteria for Genetic Testing of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Klinická onkologie* [online]. 2016, **29**(Suppl 1), S9-S13 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.14735/amko2016S9. ISSN 0862495X.
- [2.] ZIKÁN, Michal, Petr POHLREICH, Jan NOVOTNÝ, Zdeněk KLEIBL a Markéta JANATOVÁ. Analýza populačně specifických mutací genu BRCA1 – pilotní studie ve skupině neselektovaných pacientek s karcinomem prsu. *Linkos* [online]. 2005, **10**(P006) [cit. 2020-03-11].
- [3.] KLENER, Pavel. *Klinická onkologie*. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-7262-151-3.
- [4.] PUCHMAJEROVÁ, Alena, Jannis TORNIKIDIS, Lubor MARŇA, et al. Hereditární formy karcinomu prsu: genetická etiologie a současné možnosti prevence a chirurgické léčby. *Časopis lékařů českých* [online]. 2018, **157**(2), 90-95 [cit. 2020-03-11].
- [5.] CARROLL, June, Carol CREMIN, Judith ALLANSON, et al. Hereditary breast and ovarian cancers June C. *Canadian Family Physician*. 2008, **54**, 1691-1692.
- [6.] Doporučení SLG pro testování genů BRCA1/2. In: *Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. Praha, 2015, 21.10.2015 [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: https://www.linkos.cz/files/standardy/Doporuceni-SLG-pro-testovani_BRCA12_COS.pdf
- [7.] LYNCH, Julie A., Vickie VENNE a Brygida BERSE. Genetic Tests to Identify Risk for Breast Cancer. *Seminars in Oncology Nursing* [online]. 2015, **31**(2), 100-107 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1016/j.soncn.2015.02.007. ISSN 07492081.
- [8.] PAVLŮ, Hana, Zuzana JURÁŠKOVÁ, Jitka KUKLOVÁ, Marcela MACKŮ a Eva MACHÁČKOVÁ. Vývoj laboratorních vyšetřovacích metod v diagnostice genů

BRCA1 a BRCA2 v MOÚ.: Nádorová biologie/immunologie/genetika a buněčná terapie. *Linkos* [online]. 2011, (227p) [cit. 2020-03-12].

[9.] WALLACE, Andrew J. New challenges for BRCA testing: a view from the diagnostic laboratory. *European Journal of Human Genetics* [online]. 2016, **24**(S1), S10-S18 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1038/ejhg.2016.94. ISSN 1018-4813.

Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ejhg201694>

[10.] HODGSON, Darren R., Brian A. DOUGHERTY, Zhongwu LAI, et al. Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the BRCA genes. *British Journal of Cancer* [online]. 2018, **119**(11), 1401-1409 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1038/s41416-018-0274-8. ISSN 0007-0920.

[11.] FOULKES, William D., Jean-Sébastien BRUNET, Ellen WARNER, Pamela J. GOODWIN, Wendy MESCHINO, Steven A. NAROD, Paul E. GOSS a Gordon GLENDON. The Importance of a Family History of Breast Cancer in Predicting the Presence of a BRCA Mutation. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 1999, **65**(6), 1776-1778 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1086/302675. ISSN 00029297.

[12.] SINGER, Christian F., Yen Y. TAN, Daniela MUHR, et al. Association between family history, mutation locations, and prevalence of BRCA1 or 2 mutations in ovarian cancer patients. *Cancer Medicine* [online]. 2019, **8**(4), 1875-1881 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1002/cam4.2000. ISSN 2045-7634.

[13.] M. GILKES, Daniele a Inês GODET. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics* [online]. 2017, **4**(1), 1-7 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.15761/1000228. ISSN 2056-4546. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5505673/#R82>

[14.] SALHAB, Mohamed, Selina BISMOHUN a Kefah MOKBEL. Risk-reducing strategies for women carrying brca1/2 mutations with a focus on prophylactic surgery. *BMC Women's Health* [online]. 2010, **10**(1), 2-10 [cit. 2020-06-19]. DOI: 10.1186/1472-6874-10-28. ISSN 1472-6874.

[15.] FRANCESCHINI, Gianluca, Riccardo MASETTI, Martin Alessandro SANCHEZ, Alba Di LEONE a Daniela TERRIBILE. Bilateral Prophylactic Mastectomy in

- BRCA Mutation Carriers: What Surgeons Need to Know. *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2019, **90**, 1-2 [cit. 2020-06-19].
- [16.] *Časopis Lékařů Českých* [online]. ČR, 2018, **157**(2) [cit. 2020-05-05]. ISSN 1805–4420.
- [17.] MORALES, Julio, Longshan LI, Farjana J. FATTAH, Ying DONG, Erik A. BEY, Malina PATEL, Jinming GAO a David A. BOOTHMAN. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* [online]. 2014, **24**(1), 15-28 [cit. 2020-06-19]. DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013006875. ISSN 1045-4403.
- [18.] HODGSON, Darren R., Brian A. DOUGHERTY, Zhongwu LAI, et al. Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the BRCA genes. *British Journal of Cancer* [online]. 2018, **119**(11), 1401-1409 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1038/s41416-018-0274-8. ISSN 0007-0920.
- [19.] M. GILKES, Daniele a Inês GODET. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics* [online]. 2017, **4**(1), 1-7 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.15761/1000228. ISSN 2056-4546.
- [20.] BAYRAKTAR, Soley a Stefan GLÜCK. Systemic therapy options in BRCA mutation-associated breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* [online]. 2012, **135**(2), 355-366 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1007/s10549-012-2158-6. ISSN 0167-6806.
- [21.] TRUTSCHEL, E., J. HOFFMANN, U. FROSTER, W. HARTMANN, A. PEEK a M. MARX. Prophylaktische mammachirurgische Versorgung von BRCA-Mutationsträgerinnen. *Journal für Ästhetische Chirurgie* [online]. 2013, **6**(4), 244-249 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1007/s12631-013-0250-3. ISSN 1867-4305.
- [22.] SONG, Chin-Vern, Soo-Hwang TEO, Nur Aishah TAIB a Cheng-Har YIP. Surgery for BRCA, TP53 and PALB2: a literature review. *Ecancermedicalscience* [online]. 2018, **12**(863), 1-10 [cit. 2020-06-19]. DOI: 10.3332/ecancer.2018.863. ISSN 17546605.

- [23.] WARNER, Ellen. Screening BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers for Breast Cancer. *Cancers* [online]. 2018, **10**(12) [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.3390/cancers10120477. ISSN 2072-6694.
- [24.] Cancer Genetics Risk Assessment and Counseling: PDQ Cancer Information Summaries. *PDQ Cancer Genetics Editorial Board: Health Professional Version* [online]. US: Bethesda (MD): National Cancer Institute, 2002 [cit. 2020-06-30].
- [25.] Genetics of Breast and Gynecologic Cancers (PDQ®): PDQ Cancer Information Summaries. *PDQ Cancer Genetics Editorial Board: Health Professional Version* [online]. US: Bethesda (MD): National Cancer Institute, 2002 [cit. 2020-06-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65767/>
- [26.] DAROOEI, Mina, Subhadra POORNIMA, Bibi Umae SALMA, et al. Pedigree and BRCA gene analysis in breast cancer patients to identify hereditary breast and ovarian cancer syndrome to prevent morbidity and mortality of disease in Indian population. *Tumor Biology* [online]. 2017, **39**(2), 1-8 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1177/1010428317694303. ISSN 1010-4283.
- [27.] SAND, Sharon R., David S. DERAM, Deborah J. MACDONALD, Kathleen R. BLAZER a Jeffrey N. WEITZEL. Linkage of a Pedigree Drawing Program and Database to a Program for Determining BRCA Mutation Carrier Probability. *Familial Cancer* [online]. 2005, **4**(4), 313-316 [cit. 2020-06-30]. DOI: 10.1007/s10689-005-8849-y. ISSN 1389-9600.
- [28.] Cancer Genetics Overview (PDQ®): PDQ Cancer Information Summaries. *PDQ Cancer Genetics Editorial Board: Health Professional Version* [online]. US: Bethesda (MD): National Cancer Institute, 2002 [cit. 2020-06-29].
- [29.] MACKAY, James, John STRATTON a Paul PHAROAH. Screening for breast and ovarian cancer: the relevance of family history. *British Medical Bulletin* [online]. UK, 1998, **54**(4), 823-838 [cit. 2020-06-30]
- [30.] ECCLES, D.M., G. MITCHELL, A.N.A. MONTEIRO, et al. BRCA1 and BRCA2 genetic testing—pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain

- clinical significance. *Annals of Oncology* [online]. 2015, **26**(10), 2057-2065 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1093/annonc/mdv278. ISSN 09237534.
- [31.] MITCHELL, Rachel, Lela BUCKINGHAM, Melody COBLEIGH, Jacob ROTMENSCH, Kelly BURGESS, Lydia USHA a Alvaro GALLI. Can chimerism explain breast/ovarian cancers in BRCA non-carriers from BRCA-positive families? *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(4) [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1371/journal.pone.0195497. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0195497>
- [32.] VINCENT, Victoria, Dorene S. MARKEL, Debra LOCHNER-DOYLE, et al. Recommendations for Standardized Human Pedigree Nomenclature. *Am. J. Hum. Genet.* [online]. 1995, **56**(3), 745-752 [cit. 2020-07-02].
- [33.] BENNETT, Robin L., Kathryn Steinhaus FRENCH, Robert G. RESTA a Debra Lochner DOYLE. Standardized Human Pedigree Nomenclature: Update and Assessment of the Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling* [online]. 2008, **17**(5), 424-433 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1007/s10897-008-9169-9. ISSN 1059-7700.
- [34.] LU, Karen H., Marie E. WOOD, Molly DANIELS, et al. American Society of Clinical Oncology Expert Statement: Collection and Use of a Cancer Family History for Oncology Providers. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2014, **32**(8), 833-840 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1200/JCO.2013.50.9257. ISSN 0732-183X.
- [35.] GROSS, Eva, Harm VAN TINTEREN, Zhou LI, et al. Identification of BRCA1-like triple-negative breast cancers by quantitative multiplex-ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis of BRCA1-associated chromosomal regions: a validation study. *BMC Cancer* [online]. 2016, **16**(1) [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1186/s12885-016-2848-2. ISSN 1471-2407.
- [36.] ELLISON, Gillian, Shuwen HUANG, Hedley CARR, Andrew WALLACE, Miika AHDESMAKI, Sanjeev BHASKAR a John MILLS. A reliable method for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations in fixed tumour tissue utilising multiplex

- PCR-based targeted next generation sequencing. *BMC Clinical Pathology* [online]. 2015, **15**(1) [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1186/s12907-015-0004-6. ISSN 1472-6890.
- [37.] METZKER, Michael L. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2010, **11**(1), 31-46 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1038/nrg2626. ISSN 1471-0056.
- [38.] BALLESTER, Leomar Y., Rajyalakshmi LUTHRA, Rashmi KANAGAL-SHAMANNA a Rajesh R. SINGH. Advances in clinical next-generation sequencing: target enrichment and sequencing technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 2016, **16**(3), 357-372 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1586/14737159.2016.1133298. ISSN 1473-7159.
- [39.] ZAKRZEWSKI, Falk, Laura GIELDON, Andreas RUMP, et al. Targeted capture-based NGS is superior to multiplex PCR-based NGS for hereditary BRCA1 and BRCA2 gene analysis in FFPE tumor samples. *BMC Cancer* [online]. 2019, **19**(1) [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1186/s12885-019-5584-6. ISSN 1471-2407. Dostupné z: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5584-6>
- [40.] KHODAKOV, Dmitriy, Chunyan WANG a David Yu ZHANG. Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2016, **105**, 3-19 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.005. ISSN 0169409X.
- [41.] BACOLOD, Manny D., Jianmin HUANG, Sarah F. GIARDINA, Philip B. FEINBERG, Aashiq H. MIRZA, Alexander SWISTEL, Steven A. SOPER a Francis BARANY. Prediction of blood-based biomarkers and subsequent design of bisulfite PCR-LDR-qPCR assay for breast cancer detection. *BMC Cancer* [online]. 2020, **20**(1) [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1186/s12885-020-6574-4. ISSN 1471-2407.
- [42.] RIBEIRO FERREIRA, Igor, Wilton DARLEANS DOS SANTOS CUNHA, Leonardo HENRIQUE FERREIRA GOMES, et al. A rapid and accurate methylation-sensitive high-resolution melting analysis assay for the diagnosis of Prader Willi and Angelman patients. *Mol Genet Genomic Med* [online]. 2019, **7**(6) [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.1002/mgg3.637. ISSN 2324-9269.

- [43.] NOH, Jae Myoung, Jihun KIM, Dae Yeon CHO, Doo Ho CHOI, Won PARK a Seung Jae HUH. Exome sequencing in a breast cancer family without BRCA mutation. *Radiation Oncology Journal* [online]. 2015, **33**(2) [cit. 2020-07-05]. DOI: 10.3857/roj.2015.33.2.149. ISSN 2234-1900. Dostupné z: <http://e-roj.org/journal/view.php?doi=10.3857/roj.2015.33.2.149>
- [44.] Nabídka testování dědičné dispozice k nádorům prsu a vaječníků - geny BRCA1, BRCA2 a další rizikové geny. *MOÚ - Masarykův onkologický ústav* [online]. ČR [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/nabidka-testovani-dedicne-dispozice-k-nadorum-prsu-a-vajecniku-geny-brca1-brca2-a-dalsi-rizikove-geny/t4183>
- [45.] MARABELLI, Monica, Mariarosaria CALVELLO a Bernardo BONANNI. Cancer: more genetic BRCA testing for men. *Nature* [online]. 2019, **573**(7774), 346-346 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1038/d41586-019-02775-2. ISSN 0028-0836.
- [46.] WEI, Hongyi, Minghao WANG, Jianghua OU, et al. Multicenter cross-sectional screening of the BRCA gene for Chinese high hereditary risk breast cancer populations. *Oncology Letters* [online]. 2018, **15**(6) [cit. 2020-07-06]. DOI: 10.3892/ol.2018.8538. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8538>