

GENETYKA KLINICZNA
NOWOTWORÓW 2017

Monografia pod redakcją Jana Lubińskiego



Międzynarodowa Konferencja „Genetyka Kliniczna Nowotworów 2017”-
zadanie finansowane w ramach umowy 811/P-DUN/2017 ze środków Ministra Nauki
i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na działalność upowszechniająca naukę.

Druk:
libroplint.pl Łukasz Moleski
ul. Duńska 6
71-795 Szczecin

SPIS TREŚCI

Autorzy	6
Zasady dziedziczenia predyspozycji do nowotworów	9
Principles of genetic predisposition to malignancies Tadeusz Dębniak, Jan Lubiński	
Analizy molekularne DNA w wykrywaniu i leczeniu chorób nowotworowych.....	19
DNA analyses in cancer detection and treatment Grzegorz Kurzawski, Dagmara Dymerska, Pablo Serrano- Fernandez, Joanna Trubicka, Bartłomiej Masojć, Anna Jakubowska i Rodney J. Scott	
Testy DNA wysokiego ryzyka raka piersi w Polsce.....	45
DNA testing of high breast cancer risk in Poland Anna Jakubowska, Bohdan Górski, Jan Lubiński	
Testy DNA wysokiego ryzyka raka jelita grubego w Polsce.....	59
DNA testing of high colorectal cancer risk in Poland Grzegorz Kurzawski, Dagmara Dymerska, Katarzyna Gołębiwska, Jan Lubiński	
Testy DNA wysokiego ryzyka raka prostaty w Polsce.....	67
DNA testing of high prostate cancer risk in Poland Wojciech Kluźniak, Dominika Wokołorczyk, Aniruddh Kashyap, Jan Lubiński, Cezary Cybulski	
Testy DNA umiarkowanie zwiększonego ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe	73
DNA tests for variants conferring low or moderate increase in risk of cancer Grzegorz Kurzawski, Janina Suchy, Cezary Cybulski, Tadeusz Dębniak, Bohdan Górski, Marcin Lener, Tomasz Huzarski, Joanna Trubicka, Anna Janicka, Jolanta Szymańska- Pasternak, Jan Lubiński	
Genetyka kliniczna raka piersi i jajnika	85
Hereditary breast and ovarian cancer Jacek Gronwald, Jan Lubiński	
Zespół Lyncha (HNPCC)	111
Lynch syndrome Tadeusz Debniak, Józef Kładny, Grzegorz Kurzawski, Janina Suchy, Katarzyna Gołębiwska, Jan Lubiński	
Zespół MSH6.....	127
MSH6 syndrome Janina Suchy, Grzegorz Kurzawski, Jan Lubiński	

Rodzinna polipowatość gruczołakowata jelita grubego	135
Familial adenomatous polyposis of colon Andrzej Pławski, Paweł Boruń, Piotr Krokowicz, Michał Drews, Jacek Paszkowski, Jan Lubiński, Tomasz Banasiewicz	
Polipowatości hamartomatyczne.....	157
Hamartomatous polyposis Paweł Boruń, Kacper Sałanowski, Kinga Borowczyk, Wojciech Cichy, Andrzej Pławski	
Genetyka kliniczna raka prostaty	177
Hereditary prostate cancer Cezary Cybulski, Bartosz Gliniewicz, Andrzej Sikorski, Jan Lubiński	
Genetyka kliniczna raka rdzeniastego tarczycy	191
Clinical genetic of medullary thyroid carcinoma Barbara Jarzab, Małgorzata Oczko-Wojciechowska, Jolanta Krajewska, Jan Włoch, Zbigniew Wygoda	
Zespoły mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego.....	215
Multiple endocrine neoplasia syndromes Barbara Jarzab	
Zespół mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego typu 1.....	219
Multiple endocrine neoplasia type 1, MEN 1 <u>Janusz Krassowski</u> , Sylwia Szpak-Ulczok, Barbara Jarzab	
Predyspozycja dziedziczna do guzów chromochłonnych i przyzwojaków.....	237
Kornelia Hasse-Lazar, Małgorzata Oczko-Wojciechowska, Barbara Jarzab	
Choroba von Hippel-Lindau	253
Von Hippel-Lindau disease Cezary Cybulski, Karol Krzystolik, Jan Lubiński	
Genetyka kliniczna czerniaka	265
Clinical genetics of malignant melanoma Tadeusz Dębniak, Jan Lubiński	
Siatkówczak	275
Retinoblastoma Stanisław Zajączek	
Nerwiakowłóknikowatość typu 1 (NF1, choroba von Recklinghausena)	289
Neurofibromatosis I (NF1, von Recklinghausen Disease) Stanisław Zajączek, Thierry van de Wetering	
Nerwiakowłóknikowatość typu 2 (NF2)	301

Neurofibromatosis II (NF2) Stanisław Zajączek	
Genetyka kliniczna nowotworów nerek Clinical genetics of kidney cancer Aleksandra Tołoczko-Grabarek, Joanna Trubicka, Dorota Jurkiewicz, Jan Lubiński	311
Genetyka kliniczna raka żołądka Clinical genetics of stomach cancer Anna Jakubowska, Beata Wojnarska, Urszula Teodorczyk, Tomasz Huzarski, Jan Lubiński	327
Genetyka kliniczna raka płuc. Clinical genetics of lung cancer Marcin Lener, Tomasz Grodzki, Jan Lubiński	341
Genetyka kliniczna raka trzustki Clinical genetics of pancreas cancer Marcin Lener, Sandra Pietrzak, Tomasz Huzarski, Jan Lubiński	353
Rzadkie predyspozycje genetyczne zwiększające ryzyko występowania nowotworów Rare genetic predisposition increasing the risk of cancers. Marta Kaczmarek-Ryś, Katarzyna Ziemnicka, Szymon Hryhorowicz, Paweł Boruń, Bartłomiej Budny, Andrzej Pławski	373
Zespół ataksji-telangiektazji Ataxia–telangiectasia syndrome Andrzej Pławski, Paweł Boruń, Marta Kaczmarek-Ryś, Barbara Pietrucha	387
Selen w nowotworach Selenium (Se) in cancers Marcin Lener, Katarzyna Jaworska-Bieniek, Anna Jakubowska, Grzegorz Sukiennicki, Wojciech Marciniak, Magdalena Muszyńska, Katarzyna Durda, Katarzyna Kaczmarek, Jan Lubiński	399
INDEKS AUTORÓW INDEX OF AUTHORS	411
SKOROWIDZ INDEX	413

AUTORZY

Tomasz Byrski, Cezary Cybulski, Tadeusz Dębniak, Katarzyna Durda, Dagmara Dymerska, Bohdan Górski, Katarzyna Gołębiowska, Jacek Gronwald, Satish Gupta, Tomasz Huzarski, Anna Jakubowska, Anna Janicka, Katarzyna Jaworska-Bieniek, Wojciech Kluźniak, Karol Krzystolik, Grzegorz Kurzawski, Marcin Lener, Jan Lubiński, Bartłomiej Masojć, Magdalena Muszyńska, Katarzyna Nej-Wołosiak, Oleg Oszurek, Pablo Serrano-Fernandez, Janina Suchy, Grzegorz Sukiennicki, Jolanta Szymańska-Pasternak, Aleksandra Tołoczko-Grabarek, Thierry van de Wetering, Beata Wojnarska, Dominika Wokołorczyk, Stanisław Zajączek, Elżbieta Złowocka-Perłowska, Sandra Pietrzak,

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Międzynarodowe Centrum Nowotworów Dziedzicznych, Polska

Wojciech Cichy, Kinga Ilnicka-Borowczyk

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych, Polska

Bartosz Gliniewicz, Andrzej Sikorski

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Klinika Urologii, Polska

Barbara Jarzab, Zbigniew Wygoda, Małgorzata Oczko-Wojciechowska, Jolanta Krajewska, Sylwia Szpak-Ulczoł, Kornelia Hasse-Lazar,

Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie oddział w Gliwicach, Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Polska

Józef Kładny

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Klinika Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej, Polska

Piotr Krokowicz, Michał Drews,

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej, Polska

Janusz Menkiszak, Izabella Rzepka-Górska

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Katedra i Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologii Ginekologicznej Dorosłych i Dziewcząt, Polska

Jacek Paszkowski, Tomasz Banasiewicz

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Klinika Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej, Polska

Andrzej Pławski, Paweł Boruń, Anna Bartkowiak, Ryszard Słomski, Marta Kaczmarek- Ryś, Szymon Hryhorowicz

Polska Akademia Nauk, Instytut Genetyki Człowieka, Poznań, Polska

Jan Włoch

Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach,
Klinika Chirurgii Onkologicznej, Polska

Anna Wiechowska-Kozłowska

Pracownia Endoskopii, Zakład Opieki Zdrowotnej Ministerstwa Spraw Wewnętrznych
i Administracji, Szczecin, Polska

Tomasz Grodzki

Szpital Specjalistyczny Chorób Płuc, Szczecin-Zdunowo, Polska

Ewa Jaworowska, Jakub Lubiński

Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Pomorski Uniwersytet
Medyczny w Szczecinie, Polska

Barbara Górecka-Szyld, Grażyna Wilk

Katedra i Zakład Radiologii Ogólnej i Stomatologicznej, Pomorski Uniwersytet
Medyczny w Szczecinie, Polska

Mieczysław Sulikowski

Klinika Chirurgii Szcękowo-Twarzowej, Pomorski Uniwersytet Medyczny
w Szczecinie, Polska

Antoni Morawski

Instytut Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin, Polska

Rodney J. Scott

Faculty of Health School of Biomedical Sciences and Pharmacy, The University
of Newcastle, Australia

Joanna Trubicka, Dorota Jurkiewicz

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa,
Polska

Kacper Sałanowski

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Polska

Janusz Krassowski

Klinika Endokrynologii CMKP, Szpital Bielański w Warszawie, Polska

Barbara Pietrucha

Oddział Immunologii, Instytut „Pomnik -Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa, Polska

Katarzyna Ziemnicka, Bartłomiej Budny

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany
Materii i Chorób Wewnętrznych, Polska

Tadeusz Dębniak, Jan Lubiński



Zasady dziedziczenia predyspozycji do nowotworów

Principles of genetic predisposition to malignancies

Streszczenie

Nowotwory złośliwe powstają w wyniku genetycznie uwarunkowanej predyspozycji oraz, w różnym stopniu, wpływu czynników środowiskowych. Czynniki genetyczne są odpowiedzialne za predyspozycję jednogenową oraz wielogenową „wysoką” oraz „umiarkowaną”. Szacuje się, że około 30% wszystkich nowotworów powstaje w wyniku wysokiej, genetycznie uwarunkowanej predyspozycji. W zależności od rodzaju uszkodzeń i miejsca uszkodzenia DNA różny jest typ dziedziczenia oraz charakterystyka rodowodowo-kliniczna. Rodowodowo dziedziczenie jednogenowe autosomalne dominujące na ogół charakteryzuje występowanie zachorowań w każdym kolejnym pokoleniu (pionowa transmisja), zarówno u mężczyzn jak i u kobiet; u blisko 50% krewnych. W tym typie chorób genetycznych mutacje konstytucyjne (tj. obecne we wszystkich komórkach organizmu) w pojedynczym genie są główną przyczyną zachorowania. Oceniając rodowód rodziny obciążonej nowotworami należy również pamiętać o tzw. fenokopiiach - pojawianiu się przypadkowych, niezwiązanych z nosicielstwem danej mutacji zachorowań na nowotwory w rodzinie. W przypadku wielogenowej predyspozycji na nowotwory zachorowuje zwykle tylko pojedyncza osoba w rodzinie. Wielogenowa predyspozycja do nowotworów może być związana z wysokim lub umiarkowanie zwiększonym ryzykiem zachorowania. Wydaje się, że uszkodzenia DNA umiarkowanie zmieniające ryzyko zachorowania odpowiadają głównie za mało nasilone rodzinne agregacje zachorowań. Taki patomechanizm może mieć ważne znaczenie kliniczne, bowiem słaba rodzinna agregacja nowotworów jest częsta. Współdziałanie „słabych” mutacji i polimorfizmów w wielu genach oraz dodatkowo wpływ czynników środowiskowych może znacząco zwiększać ryzyko nowotworów złośliwych różnych narządów.

Słowa kluczowe: dziedziczenia jednogenowe, dziedziczenia wielogenowe

Summary

Human malignancies are caused by genetic factors and gene-environment interactions. Genetic susceptibility can be divided into monogenic and polygenic predisposition; the risk of cancer development can be defined as “high” or “moderate”. It is estimated that around 30% of all malignancies are caused by “high-risk” genetic predisposition. Depending on the position and type of DNA changes the pattern of inheritance as well as clinical and pedigree characteristics may be different. Pedigrees of monogenic diseases with autosomal dominant inheritance are characterised by occurrence of disorder in all generations (vertical transmission), among men and women, among 50% of the relatives. Such diseases are caused by constitutional mutations of single genes, present in all cells of the body. Evaluation of the pedigree and clinical data of families with aggregations of cancers should exclude phenocopies (accidental malignancy not related to mutation responsible for the aggregation of malignant tumors). In polygenic type of inheritance single individuals can be affected. DNA alterations associated with “moderate” risk are responsible for moderate cancer familial aggregations. Such pathomechanism may have significant clinical impact, since moderate cancer familial aggregations are frequent. Associations of “weak” mutations and polymorphisms of many genes and additional influence of environmental factors can significantly increase the risk of cancer development.

Key words: monogenic predisposition, polygenic predisposition

Szacuje się, że około 30% wszystkich nowotworów powstaje w wyniku wysokiej, genetycznie uwarunkowanej predyspozycji (1). Świadczą o tym przede wszystkim analizy zgodności zachorowań wśród bliźniaków jednojajowych, a więc identycznych genetycznie. Jeśli jeden z nich zachoruje np. na raka prostaty czy piersi, to prawdopodobieństwo, że drugi bliźniak będzie dotknięty nowotworem tego samego narządu wynosi odpowiednio ok. 40 i 30% (2). Ponadto, jeśli uwzględnimy również przypadki zachorowań na nowotwory, ale o innej lokalizacji, np. raka piersi u jednej osoby, a raka żołądka u drugiej, to zgodność wśród bliźniaków jednojajowych jest jeszcze wyższa.

Przyjmuje się, że nowotwory powstają najczęściej w wyniku genetycznej predyspozycji jednogenowej lub wielogenowej.

JEDNOGENOWA PREDYSPOZYCJA DO NOWOTWORÓW

W tym typie chorób genetycznych mutacje konstytucyjne (tj. obecne we wszystkich komórkach organizmu) w pojedynczym genie są główną przyczyną zachorowania. We wszystkich nowotworach występują mutacje genów. Są to jednak w zdecydowanej większości tak zwane mutacje somatyczne, które od konstytucyjnych różnią się tym, że występują jedynie w tkance nowotworowej. Na obecnym etapie rozwoju nauki, wśród dziedzicznych przyczyn nowotworów diagnozowanych w celach praktycznego usprawnienia opieki medycznej niemal wyłącznie rozpoznawana jest predyspozycja jednogenowa z rodowodowymi cechami dziedziczenia autosomalnie dominującego. Według modelu dziedziczenia Mendla każdy osobnik ma dwie kopie (allele) genu odpowiedzialnego za daną cechę lub chorobę, zajmujące identyczną pozycję (lokus) na homologicznych chromosomach. Każde dziecko otrzymuje jedną kopię genu od ojca, drugą zaś od matki. Zgodnie z zasadami dziedziczenia jednogenowego dominującego, posiadanie zaburzenia wrodzonej mutacji już tylko w jednej kopii genu powoduje predyspozycję do zachorowania (3). Reguła ta jest zachowana wówczas, gdy gen związany z rozwojem nowotworów dziedzicznych jest protoonkogenem, jak np. RET, którego mutacje konstytucyjne predysponują do zespołu MEN2. W większości nowotwory powstają u nosicieli mutacji w tzw. genach supresorowych (antyonkogenach) jak np. p53, czy w genach naprawy uszkodzeń DNA jak np. *MSH2*, które molekularnie mają charakter recesywny. U nosicieli mutacji takich genów dochodzi do rozwoju nowotworów, dlatego, że z bardzo wysoką częstością u tych osób występuje w ciągu życia inaktywacja drugiego allele (najczęściej poprzez delecję) (4).

RODOWODOWO DZIEDZICZENIE JEDNOGENOWE AUTOSOMALNIE
DOMINUJĄCE CHARAKTERYZUJE WYSTĘPOWANIE ZACHOROWAŃ:

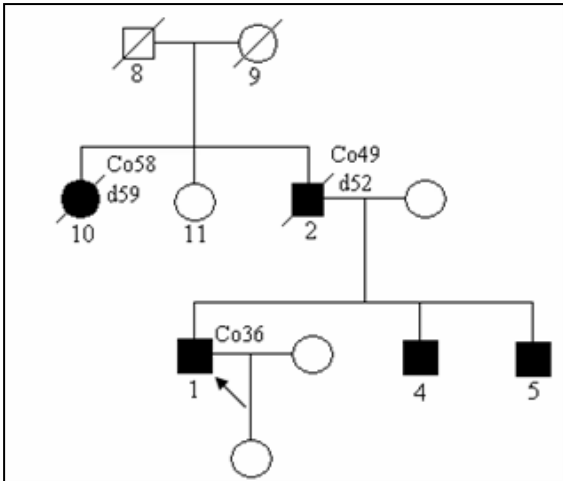
- a) w każdym kolejnym pokoleniu (pionowa transmisja);
- b) zarówno u mężczyzn jak i u kobiet;
- c) u blisko 50% krewnych (5).

Przykładowy rodowód przedstawiono na rycinie 1. W rodzinie tej obserwuje się też coraz młodszy wiek pojawiania się nowotworów w każdym kolejnym pokoleniu (tak zwana antycypacja).

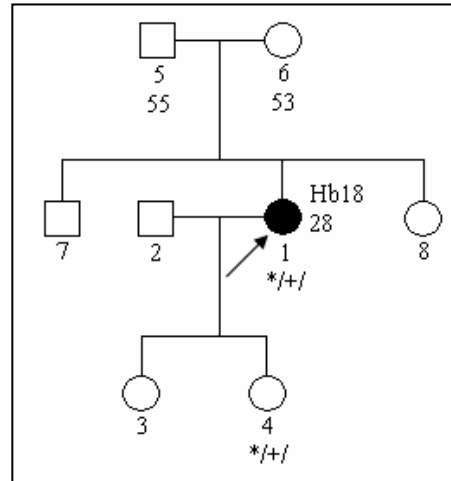
Cech charakterystycznych dla dziedziczenia jednogenowego dominującego nie stwierdza się w sytuacjach:

- a) mutacji germinalnych (tj. w plemnikach lub komórkach jajowych) *de novo* – w takich przypadkach nie występują zachorowania w pokoleniach przodków probanta (osoby zasięgającej porady genetycznej); mutacja jest przekazywana na następne pokolenia - rycina 2;
- b) mutacji mozaikowych, tj. obecnych tylko w niektórych tkankach; mutacje takie powstają zwykle *de novo* w okresie zarodkowym; w takich przypadkach obserwuje się zachorowania u pojedynczej osoby w rodzinie, a mutacja jest przekazywana na następne pokolenia tylko wówczas, gdy występuje w komórkach germinalnych;
- c) mutacji o niskiej penetracji; penetrację definiujemy, jako stosunek liczby osób chorych do liczby nosicieli mutacji; w zespołach predyspozycji do nowotworów sięga ona nawet 0,8-0,9; w przypadkach mutacji o niskiej penetracji jest on dużo niższy i wówczas w rodzinie chorują tylko pojedyncze osoby (6); przykładowy rodowód pokazano na rycinie 3;
- d) mutacji skutkujących zachorowaniem tylko u jednej płci; na przykład nosicielami mutacji *BRCA1* są zarówno mężczyźni jak i kobiety, na raka jajnika chorują jednak tylko kobiety z tą zmianą;
- e) w „małych” rodzinach z niewielką liczbą osób.

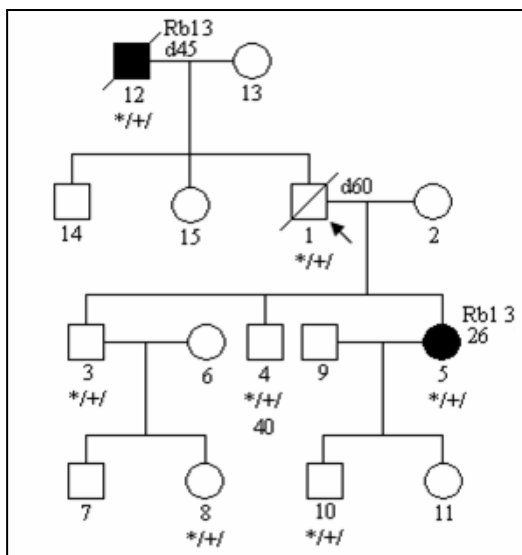
Oceniając rodowód rodziny obciążonej nowotworami należy również pamiętać o tzw. fenokopiach - pojawianiu się przypadkowych, niezwiązanych z nosicielstwem danej mutacji zachorowań na nowotwory w rodzinie (7). Na poniższej rycinie przedstawiono przykładowy rodowód - z 4 rakami piersi wywołanymi dziedziczną mutacją genu *BRCA1* oraz 1 rakiem piersi u osoby niebędącej nosicielem tej mutacji. U potomstwa tej pacjentki nie stwierdza się wysokiego ryzyka związanego z mutacją *BRCA1*.



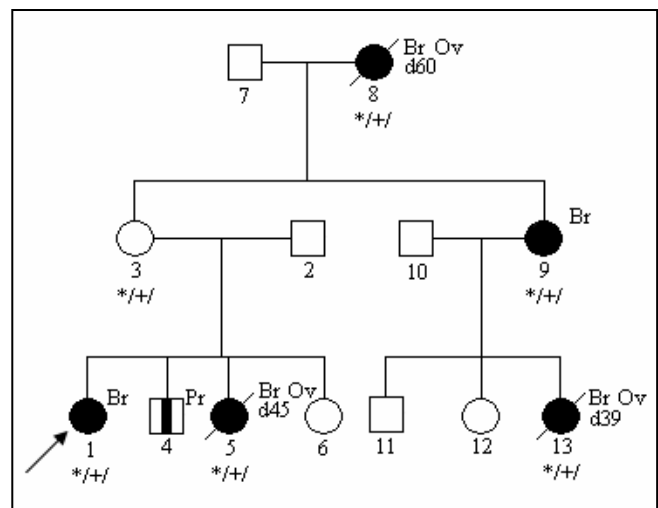
Ryc. 1. Rodzina z zespołem Lyncha - z rodowodowymi cechami choroby jednogennej autosomalnie dominującej.



Ryc. 2. Rodzów rodziny z chorobą wywołaną mutacją germlinalną *de novo* w obrębie genu VHL.



Ryc. 3. Rodzów rodziny z niską penetracją mutacji genu Rb1.



Ryc. 4. Fenokopia - rak piersi niezwiązany z mutacją konstytucyjną w rodzinie z mutacją *BRCA1*.

WIELOGENOWA PREDYSPOZYCJA DO NOWOTWORÓW

W przypadku tego typu predyspozycji na nowotwory zachorowuje zwykle tylko pojedyncza osoba w rodzinie. Wielogenowa predyspozycja do nowotworów może być związana z wysokim lub umiarkowanie zwiększonym ryzykiem zachorowania. W wyniku prowadzonych w naszym Ośrodku badań jak dotąd poznano geny/mutacje i polimorfizmy zwiększające (na ogół umiarkowanie) ryzyko nowotworów w ponad 90% nieselekcjonowanych raków piersi (96% raków piersi rozpoznanych po 50. roku życia, 99% raków zrazikowych - tabela 1, 2, 3), 89% raków jelita grubego, 72% czerniaków złośliwych, 36% raków jajnika oraz 27,5%

raków prostaty. Wydaje się, że uszkodzenia DNA umiarkowanie zmieniające ryzyko zachorowania odpowiadają głównie za mało nasilone rodzinne agregacje zachorowań. Taki patomechanizm może mieć ważne znaczenie kliniczne, bowiem słaba rodzinna agregacja nowotworów jest częsta.

Tab. 1. Częstość markerów zidentyfikowanego panelu w nieselekcjonowanych kolejnych rakach piersi i kontrolach (9)

Gen/Marker	Raki (%)	Kontrole (%)
<i>BRCA1</i>	2.7% (26/977)	0% (0/977)
CHEK 2	11.9% (113/951)	6% (59/977)
p53	10.1% (85/838)	5.7% (52/918)
TNR	55.6% (419/753)	45.8% (397/866)
FGFR - GG	18.3% (61/334)	13.9% (65/469)
CDKN2A	7% (19/273)	5.4% (22/404)
XPD - GG	41% (104/254)	36.4% (139/382)
XPD - CC/AA	17.3% (26/150)	14% (34/243)
BRCA2	7.3% (9/124)	4.8% (10/209)
XPD - AA	20% (23/115)	18.6% (37/199)
Którykolwiek marker	90.6% (885/977)	83.4% (815/977)
Statystyka	$P = 3 \cdot 10^{-6}$	

Współdziałanie „słabych” mutacji i polimorfizmów w wielu genach oraz dodatkowo wpływ czynników środowiskowych może znacząco zwiększać ryzyko nowotworów złośliwych różnych narządów. Współdziałanie linearne (akumulacja zmian) występuje, jeśli całkowite ryzyko zachorowania na nowotwór składa się z sumy ryzyk związanych z poszczególnymi „słabymi” mutacjami w wielu genach, na przykład w przypadku dwukrotnego wzrostu ryzyka zachorowania u nosiciela mutacji w genie A oraz mutacji w genie B (jeśli obie te mutacje są związane z 50% wzrostem ryzykiem zachorowania).

Tab. 2. Częstość markerów zidentyfikowanego panelu w rakach zrazikowych i kontrolach (9)

Gen/Marker	Raki (%)	Kontrole (%)
<i>BRCA1</i>	0.7% (1/140)	0% (0/140)
CHEK 2	19.4% (27/139)	4.3% (6/140)
p53	10.7% (12/112)	6% (8/134)
BRCA2	9% (9/100)	4.8% (9/126)
FGFR - nAA	75.8% (69/91)	60% (72/120)
TNR	72.7% (16/22)	39.6% (19/48)
NOD 2	16.7% (1/6)	0% (0/29)
M3K - nAA	80% (4/5)	41.4% (12/29)
Którykolwiek marker	99.30%(139/140)	87.90%(123/140)
Statystyka	P= 0.00073	

Tab. 3. Częstość markerów zidentyfikowanego panelu w rakach rozpoznanych w wieku powyżej 50 r.ż. i kontrolach (9)

Gen/Marker	Raki (%)	Kontrole (%)
<i>BRCA1</i>	2.1% (14/667)	0% (0/667)
CHEK 2	11% (72/653)	4.8% (32/667)
p53	11% (64/581)	5.4% (34/635)
TNR	55.9% (289/517)	45.3% (272/601)
FGFR - nAA	68.9% (157/228)	60.8% (200/329)
BRCA 2	5.6% (4/71)	2.3% (3/129)
XPD - CC/AA	13.4% (9/67)	6.3% (8/126)
NOD 2	13.8% (8/58)	6.8% (8/118)
XPD - GG	48% (24/50)	35.5% (39/110)
Którykolwiek marker	96.1% (641/667)	89.4% (596/667)
Statystyka	P= 2.4 · 10⁻⁶	

W innych przypadkach występuje współdziałanie nieliniowe (interakcja zmian) - na przykład przy pięciokrotnym wzroście ryzyka u nosiciela wyżej wymienionych mutacji (8).

Przykładem wielogenowego, “wysokiego” ryzyka jest interakcja wariantów genów CHEK2 i BRCA2 prowadząca do znacznego wzrostu ryzyka zachorowania na raka piersi (OR = 5.7; P = 0.006) (10).

PIŚMIENNICTWO

1. Lynch HT, et al.: Hereditary cancer in adults. *Cancer Detect Prev* 1995, 19: 219-33.
2. Lichtenstein P, et al.: The Swedish Twin Registry: a unique resource for clinical, epidemiological and genetic studies. *J Intern Med* 2002, 252: 184-205.
3. Knudson A: Mutation and cancer: a statistical study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971, 68: 820-3.
4. Friedman JM: Genetics and epidemiology, congenital anomalies and cancer. *Am J Hum Genet* 1997, 60: 469-73.
5. Marra G, et al.: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer the syndrome, the genes, historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87: 1114-24.
6. Lubiński J: Hereditary tumors . prophylactics, early diagnosis, treatment. *Biotechnologia* 1996, 35: 202-7.
7. Friedman JM, et al.: Genetyka, wydanie I polskie pod redakcją J. Limona. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2000.
8. Cybulski C, et al.: Epistatic relationship between the cancer susceptibility genes CHEK2 and p27. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007, 16: 572-6.
9. Lubinski J, et al.: Genetic contribution to all cancers: the first demonstration using the model of breast cancers from Poland stratified by age at diagnosis and tumour pathology, *Breast Cancer Res Treat* 2008.
10. Serrano-Fernández P, et al.: Synergistic interaction of variants in CHEK2 and BRCA2 on breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2009, 117 (1): 161-5.

Legenda do rodowodów przedstawionych na rycinach 1-4:

Co36 – rak jelita grubego rozpoznany w 36 roku życia

d52 – zgon w 52 roku życia

Rb1 3 – siatkówczak rozpoznany w 3 roku życia

Hb – „hemangioblastoma” siatkówki

Ov – rak jajnika

Pr – rak prostaty

*+/+ – nosiciel mutacji konstytucyjnej

*-/- – osobnik niebędący nosicielem mutacji konstytucyjnej

*Grzegorz Kurzawski, Dagmara Dymerska, Pablo Serrano- Ferrnandez, Joanna Trubicka,
Bartłomiej Masojć, Anna Jakubowska i Rodney J. Scott*



Analizy molekularne DNA w wykrywa- niu i leczeniu chorób nowotworowych

DNA analyses in cancer detection and treatment

Streszczenie

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój metod molekularnych służących do analiz DNA. Aktualnie prym wiodą metody oparte na PCR w czasie rzeczywistym oraz metody umożliwiające multipleksację kilku reakcji. Nowe metody skriningowe pozwalają na bardzo szybkie badanie dużych grup pacjentów stosunkowo niskim kosztem. W niniejszym opracowaniu przedstawiono nowoczesne techniki stosowane w wykrywaniu mutacji konstytucyjnych u osób z genetyczną predyspozycją do nowotworów, jak również mutacji somatycznych pozwalających na wybór optymalnego sposobu leczenia chorób nowotworowych.

Słowa kluczowe: zmiany konstytucyjne, mutacje somatyczne, genetyczna predyspozycja, techniki, diagnostyka

Summary

During the past decade many new molecular methods for DNA and RNA analysis have emerged. Real-time amplification techniques and particularly those with the capacity of multiplexing have become commonly used in laboratory practice. Novel screening methods enable the very rapid examination of large patients series. The aim of this study is the introduction of a few modern techniques, most commonly used in detection of genetic predisposition to cancer as well somatic mutations allow the selection of optimal treatment of cancer

Keywords: constitutional changes, somatic mutation, hereditary cancer, techniques, diagnoses

W ostatnich latach zidentyfikowano szereg genów, których mutacje odpowiedzialne są za wysoką dziedziczną predyspozycję do nowotworów (Lubiński i wsp. 2002). U nosicieli tych mutacji ryzyko zachorowania na chorobę nowotworową może wynosić nawet 90%. Wybrane geny związane z wysoką genetyczną predyspozycją do nowotworów zestawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Geny, których mutacje predysponują do zespołów nowotworów dziedzicznych. Zestawienie obejmuje geny najczęściej badane w naszym laboratorium.

Gen / lokalizacja	Predyspozycja do nowotworów	Penetracja*
<i>Rb1</i> (Schubert i wsp.1994) 13q14	siatkówczak	do 90%
<i>BRCA1</i> (Gronwald i wsp.1998) 17q21	rak sutka rak jajnika	do 80%
<i>BRCA2</i> (Gronwald i wsp.1998) 13q13	rak prostaty rak jelita grubego	
<i>VHL</i> (Neumann i wsp.1997) 3p25	naczyniaki mózdzku, siatkówki, rak nerki guzy nadnerczy	do 80%
<i>MSH2</i> (Lynch i wsp. 1996) 2p21	rak jelita grubego i cienkiego rak trzonu macicy	do 90% dla mężczyzn
<i>MLH1</i> (Lynch i wsp. 1996) 3p22	rak nerki i pęcherza moczowego rak przewodów żółciowych	do 70% dla kobiet (Dunlop
<i>MSH6</i> (Lynch i wsp.,1996) 2p16	rak jajnika rak żołądka	i wsp. 1997)

*prawdopodobieństwo zachorowania w ciągu życia na nowotwór u nosiciela mutacji

Zidentyfikowano również wiele ważnych ze względu na wybór leczenia i rokowanie mutacji somatycznych w DNA komórek nowotworowych. Mutacje te dotyczą m.in. takich genów jak: *KIT*, *PDGF α* , *EGFR*, *HER2*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT1*, *SMAD4*, *PTEN*, *TGFBR2*, *ALK*, *MET*, *Era*, *MGMT*, *IDH1*, *IDH2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ROS1*.. Są to geny kodujące białka pełniące funkcje receptorów wykazujących aktywność kinaz, bądź składniki wewnątrzkomórkowe najważniejszych szlaków przekazywania sygnałów regulujących podziały komórkowe.

Według wytycznych ESMO, ustalenie statusu rodziny genów *RAS* jest obecnie wymagane w praktyce onkologicznej, a leczenie przeciwciałami monoklonalnymi anty-EGFR jest przewidziane tylko dla pacjentów bez mutacji (Van Cutsem i wsp. 2016)

Izolacja DNA

Materiałem do badań jest DNA, które izoluje się na ogół z komórek łatwo dostępnych takich jak leukocyty z krwi obwodowej lub rzadziej biopsjaty innych tkanek. W trakcie analiz wykrywana jest mutacja konstytucyjna, a więc obecna we wszystkich komórkach pacjenta bądź somatyczna obecna tylko niektórych komórkach ciała (np. w komórkach nowotworowych). Materiał do badania najlepiej pobrać do 48 godzin przed izolacją. Dla krwi dobre wyniki uzyskuje się również po kilkudniowym przechowywaniu jej w temperaturze pokojowej lub nawet przez kilka lat w temperaturze poniżej zera. Jeżeli nie dysponujemy tkankami świeżymi to izolację DNA można wykonać z tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w bloczkach parafinowych, chociaż uzyskanie jednoznacznych wyników z takiego materiału jest czasami trudne, niekiedy wręcz niemożliwe. Izolowanie DNA polega na usunięciu białek z lizatu komórkowego. W metodzie fenolowo-chloroformowej uzyskuje się to poprzez trawienie proteinazą K i ekstrakcję w mieszaninie fenolu i chloroformu. Z odbiałczonych w ten sposób próbek kwasy nukleinowe wytrąca się alkoholami: etylowym lub izopropylowym. Mało kto dzisiaj w codziennej pracy używa tej czasochłonnej i toksycznej, choć dającej czyste i nie zdegradowane DNA, metody. Jest ona nadal stosowana jedynie do izolacji DNA z „bloczków parafinowych” z utrwalonym materiałem z guza. Do izolacji ze świeżych tkanek używa się mniej pracochłonnych metod, które łatwiej poddają się procesowi automatyzacji, a są oparte na wybiórczym wiązaniu DNA z nośnikiem (złóże chromatograficzne, filtr bądź kuleczki magnetyczne) następnie odmyciu zanieczyszczeń i uwolnieniu DNA do roztworu.

Amplifikacja fragmentów genów

Pierwszym etapem każdej analizy jest amplifikacja (namnożenie) materiału DNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi: matryca DNA (zwykle genomowe DNA), polimeraza DNA, para specyficznych dla analizowanego rejonu genu starterów (*primers*), trójfosforany deoksyrybonukleotydów oraz bufor reakcyjny. Mieszanina ta poddawana jest zmianom temperatury w specjalnym termostacie cyklicznym – termocyklerze, co prowadzi do wytwarzania przez polimerazę nowych komplementarnych nici na jednoniciowej matrycy. Każdy cykl składa się z trzech etapów: denaturacji, przyłączania starterów i syntezy. Po 22 cyklach, przy 100% wydajności, liczba kopii powielanego fragmentu zwiększa się milion razy.

Wykrywanie zmian konstytucyjnych i somatycznych

Od czasu wynalezienia reakcji PCR przez K.B. Mullis'a obserwuje się dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej, w tym metod wykrywania mutacji konstytucyjnych i somatycznych.

Umownie możemy podzielić je na metody wykrywania:

- mutacji nieznanymi
- mutacji znanych

WYKRYWANIE NIEZNANYCH MUTACJI

Zastosowanie metod wykrywania nieznanymi mutacji jest w praktyce lekarskiej uzasadnione mimo tego, że w przypadku „dużych” (wieloksonowych) genów są one nadal praktyczne.

Analizy DNA

Zasadnicze rodzaje analiz:

- NGS (*next-generation sequencing* - sekwencjonowanie nowej generacji)
- sekwencjonowanie metodą Sanger
- pirosekwencjonowanie
- MLPA (*multiplex ligation dependent probe amplification* - zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond)
- HRM (*high resolution melting analysis* - analiza krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości)
- DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography* – denaturacyjna wysoka-sprawną chromatografia cieczą)

NGS

W ostatnich latach na rynku sekwencjonowania pojawiły się aparaty nowej generacji zapowiadające znacznie obniżenie kosztów sekwencjonowania DNA: Roche 454 i GS Junior system (www.454.com), analizatory HiSeq i MiSeq (www.illumina.com) oraz Proton i Ion Torrent (www.iontorrent.com) przeznaczone do sekwencjonowania całych genomów, ukierunkowanego re-sekwencjonowania i wykrywania mutacji (Glenn 2011), sekwencjonowania wybranej grupy genów (Walsh i wsp. 2010, 2011, Pritchard i wsp. 2012). Możliwe jest na przykład, zbadanie wszystkich genów związanych z rakiem jelita w jednej reakcji

(<http://tests.labmed.washington.edu/COLOSEQ>), lub charakterystyka mutacji somatycznych dla 236 genów ważnych ze względu na rokowanie i leczenie (<http://foundationone.com/>).

Aktualnie prym wiodą analizatory HiSeq i MiSeq firmy Illumina oparte na metodzie Solexa (Illumina). W tej metodzie do pofragmentowanego DNA dołącza się krótkie dwuniciowe fragmenty (adaptery). Po denaturacji jednoniciowe fragmenty zostają unieruchomione na specjalnej płycie (flow-cell), po czym fragmenty amplifikowane są poprzez tzw. bridge amplification – unieruchomiony fragment odszukuje w najbliższym sąsiedztwie komplementarny nukleotyd (dzięki wcześniejszemu przyłączeniu adapterów) również związany z podłożem, a polimeraza dobudowuje nic. Po kolejnej denaturacji cykl się powtarza. To umożliwia tworzenie się tzw. „clusters” czyli sektorów takich samych, powielonych fragmentów. Sekwencjonowanie następuje jednocześnie w każdym sektorze, a po włączeniu każdego nukleotydu, kończącego syntezę w każdym kolejnym cyklu, reakcja jest powtarzana. Każdy z 4 nukleotydów zakończony jest innym barwnikiem (fluoroforem) co umożliwia odczyt sekwencji nukleotydów. W zależności od typu instrumentu możliwe są różne poziomy multipleksacji (www.illumina.com). Sekwencjonowanie nowej generacji umożliwia wykrywanie małych, punktowych mutacji jak i rearanżacji genów (Walsh i wsp. 2010).

Rozwój aplikacji dotyczących sekwencjonowania genów związanych z nowotworami dziedzicznymi (Thompson i wsp. 2012, Roberts i wsp. 2012, Kurian i wsp. 2014, Easton i wsp. 2015, Lynce i wsp. 2016, Vysotskaia, Hogan i wsp. 2016) i znaczne obniżenie kosztów (www.veritasgenetics.com/mygenome, Loman i wsp. 2012, www.genome.gov/sequencingcosts), sprawiły, że technologie sekwencjonowania nowej generacji znalazły powszechne zastosowanie i są standardem w testowaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworów i określaniu statusu mutacyjnego (profilu mutacji somatycznych) zmienionych nowotworowo tkanek.

Jeszcze większy potencjał i zapowiedź całkowitej rewolucji w diagnostyce molekularnej niosą nowe techniki służące do odczytu sekwencji natywnego DNA bez konieczności wstępnej amplifikacji takie jak True Single Molecule Sequencing (www.helicosbio.com) i SMRT TECHNOLOGY (<http://www.pacificbiosciences.com>) lub system GridION oparty na technologii NanoPore opracowywany przez Oxford NanoPore Technologies (www.nanoporetech.com).

Sekwencjonowanie Sangera

Nadal za najbardziej czułą i niezawodną uważa się sekwencjonowanie metoda Sanger. Sekwencjonowanie ta metoda umożliwia wykrywanie „małych” zmian (dotyczących kilku – kilkuset nukleotydów) oraz ich pełną charakterystykę i jest uznane jako „Gold Standard” w

wykrywaniu mutacji. W latach pięćdziesiątych XX wieku znaczny postęp w technologii sekwencjonowania osiągnięto poprzez wprowadzenie automatycznych aparatów do sekwencjonowania, których funkcjonowanie oparte jest o fluorescencję wzbudzaną laserem. Każdy z nukleotydów (A, C, G, T) jest wyznakowany innym fluorochromem, co w

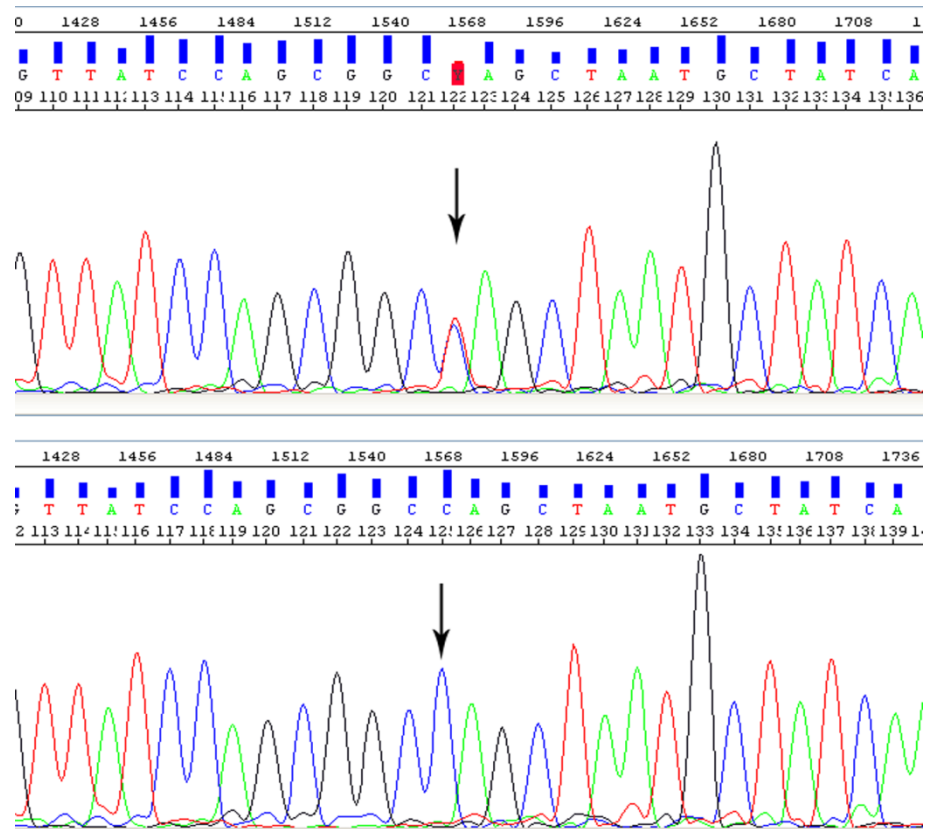
konsekwencji pozwala na ich identyfikację poprzez rejestrację fluorescencji. Popularną techniką jest **sekwencjonowanie metodą cykliczną** (Rosenthal i wsp. 1992) oparte o klasyczną metodę Sangera. W

trakcie badania oceniane są sekwencje produktów PCR obu nici DNA. Rzeczywista zmiana w odróżnieniu od artefaktów wykrywana jest w obu niciach. Procedura sekwencjonowania składa się z kilku etapów:

- preparatywnego PCR - polegającego na namnożeniu wybranego fragmentu genu przy użyciu pary specyficznych starterów
- asymetrycznego PCR - dla każdej próbki amplifikacja osobno z każdym ze starterów z zastosowaniem dideoksynukleotydów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi

- elektroforezy na denaturującym żelu poliakrylamidowym z równoczesną detekcją i rejestracją przepływających produktów
- analizy otrzymanych wyników przy użyciu pakietu programów komputerowych.

Podczas asymetrycznego PCR powstają wszystkie możliwe, różniące się długością oligonukleotydy komplementarne do matrycy i zawierające na 3'-końcu fluorochrom („zaznaczone kolorem”). Zostają one rozdzielone podczas elektroforezy od najkrótszego po najdłuższy, a kolejność kolorowych nukleotydów (różniących się kolorem światła emitowanego) odczytywana jest jako sekwencja komplementarna do matrycy. Odczytana sekwencja DNA jest później porównywana z sekwencją prawidłową z dostępnych baz danych takich jak Gen-

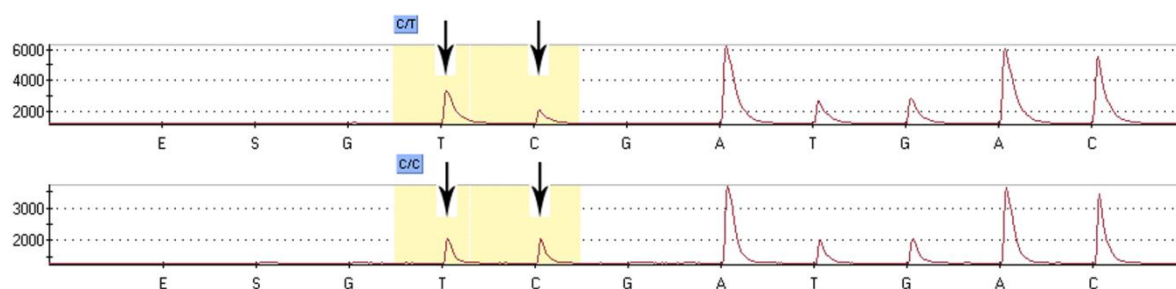


Ryc. 2. Chromatogram charakterystyczny dla mutacji c.83C>T w genie *MLH1* (chromatogram górny) w porównaniu do sekwencji niezmienionej (chromatogram dolny).

Bank, SNPper czy EMBL. Przez porównanie z sekwencją prawidłową określany jest dokładnie charakter zmiany (rysunek 2).

Obecnie czołowe firmy oferują sekwenatory umożliwiające jednoczesne sekwencjonowanie 96 próbek w oparciu o elektroforezę kapilarną produktów otrzymanych metodą cykliczną z użyciem dideoksynukleotydów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Postęp w tej dziedzinie polegał w ostatnich latach nie tylko na zwiększeniu liczby jednocześnie analizowanych próbek, ale na opracowaniu nowych żeli (umożliwiających wielokrotny rozdział na tym samym wypełnieniu kapilary) i „chemii” (mieszanki złożonej z buforów, substratów, polimerazy i tak zwanych ulepszczy) umożliwiających analizę sekwencji jednego fragmentu długości prawie 1000 zasad.

Pirosekwencjonowanie (Ronaghi i wsp. 1996, Agah i wsp. 2004) jako matrycę wykorzystuje jednoniciowy fragment DNA, na którym przeprowadzana jest synteza nici komplementarnej poprzez dodawanie kolejno czterech różnych trifosforanów deoksynukleotydów (dNTP). Przyłączeniu każdej zasady towarzyszy uwalnianie pirofosforanu, który zostaje przekształcony w ATP (adenozyno-5'-trifosforan) przy udziale sulfurylasy i obecnego w mieszaninie APS (adenozyno-5'-fosfosiarczan). Powstały ATP wykorzystywany jest przez lucyferazę do przekształcenia lucyferyny w oksylucyferynę. W reakcji tej powstaje światło w ilości odpowiadającej wyprodukowanemu we wcześniejszym etapie pirofosforanowi. Emitowane światło jest rejestrowane przez kamerę CCD i przekształcane do postaci piku na wykresie (rysunek 3). Ten sam schemat reakcji przeprowadzany jest również dla kolejno dodawanych różnych dNTPów. Jeżeli dodawany nukleotyd nie jest komplementarny do matrycy nie następuje włączenie go do nowo syntetyzowanej nici i nie powstaje pirofosforan. Tylko obecność sygnału świetlnego stanowi podstawę do zapisu w sekwencji kolejnego dodawanego nukleotydu. Fakt, iż sekwencjonowany fragment jest niewielki (do kilku nukleotydów) przekłada się na niskie koszty metody.



Ryc. 3. Pirogram charakterystyczny dla mutacji c.2932C>T w genie *APC* (pirogram górny) w porównaniu do sekwencji niezmienionej (pirogram dolny)

Nie wszyscy wiedzą, że słabością opisaną techniką jest niemożność sekwencjonowania rejonów homopolimerycznych dłuższych niż 5 nukleotydów. Jest to spowodowane brakiem proporcjonalności sygnału świetlnego do ilości uwolnionego pirofosforanu. Problem ten rozwiązano poprzez zastosowanie NRTs (*nucleotide reversible terminators* – odwracalnie kończące nukleotydy) nukleotydów zmodyfikowanych poprzez przyłączenie grupy allilowej (3' O allyl) lub nitrobenzylowej (3' O (2 nitrobenzyl)). Taka modyfikacja blokuje grupę 3' hydroksylową i uniemożliwia przyłączenie kolejnego nukleotydu podczas komplementarnego wydłużania nowosyntetyzowanej nici. Gdy zmodyfikowany nukleotyd zostanie wbudowany, po rejestracji sygnału świetlnego, „zabezpieczenie” zostaje usunięte poprzez dealilację, co pozwala na przyłączenie kolejnego komplementarnego nukleotydu. W ten sposób każdy pik na pirogramie odpowiada jednemu włączonemu nukleotydowi i rejon homopolimeryczny mogą być precyzyjnie zsekwencjonowane (Wu i wsp. 2007). Pirosekwencjonowanie jest powszechnie stosowane również do sprawdzania statusu metylacji wysp CpG guza (Colla i wsp. 2003).

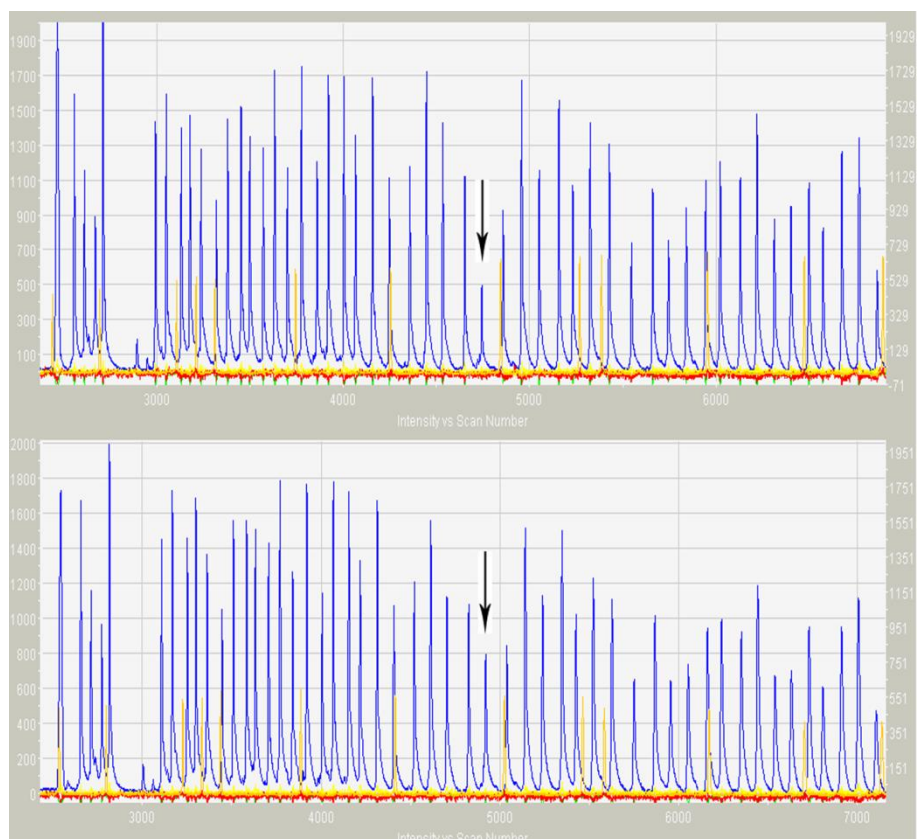
MLPA

Jedną z technik, kiedyś powszechnie używaną do wykrywania dużych przemieszczeń, opartą o hybrydyzację była metoda Southern (Southern blotting), opisana po raz pierwszy przez E.M. Southern w 1975 r. Współcześnie metodą godną polecenia, która niemal całkowicie zastąpiła metodę Southerna w wykrywaniu rearanżacji w genach jest MLPA (Schouten i wsp. 2002). Technika ta w oparciu o reakcję ligacji specyficznych sond i reakcję amplifikacji pozwala na ocenę liczby kopii eksonów wybranych genów predysponujących do nowotworów. Na jej podstawie można wnioskować o delecjach bądź duplikacjach (amplifikacjach) fragmentów lub całych genów (geny odniesienia jako kontrola). W technice tej stosuje się wiele par sond. Sondy zawierają oprócz sekwencji komplementarnych do sekwencji eksonowych - docelowych, (sekwencje ulegające hybrydyzacji), sekwencje starterowe, a jedna z każdej pary dodatkowo unikatową sekwencję wstawki. Sekwencje hybrydujące każdej pary

sond wiążą się komplementarnie do sąsiadujących ze sobą fragmentów DNA i tylko przy w pełni komplementarnej hybrydyzacji może zajść ligacja. Po przyłączeniu sond do matrycy następuje ich ligacja, a następnie denaturacja. Oddysocjowana, zligowana sonda zawierająca sekwencje starterowe zostaje poddana amplifikacji w reakcji PCR. Obecność różnej długości wstawek pozwala na rozróżnienie produktów skierowanych na różne fragmenty DNA (sekwencje docelowe), a ilość produktu jest proporcjonalna do ilości sekwencji matrycowej. Każdy pik odpowiada produktowi amplifikacji zligowanej specyficznej pary sond (rysunek 4). Różnice względne w wysokości bądź powierzchni pików wskazują na zmiany ilościowe (bądź czasami jakościowe) docelowej sekwencji badanego DNA. Wynik wskazujący na brak pojedynczego eksonu genu może być spowodowany obecnością polimorfizmu w obrębie sekwencji docelowej, a nie rzeczywistą delecją. Dlatego aby uniknąć błędów w interpretacji wyników, we wszystkich przypadkach wskazujących na delecje pojedynczego eksonu należy sekwencjonować sekwencje docelowe, aby upewnić się, że miejsca wiązania sond na DNA są w pełni komplementarne do używanych sond. Technika umożliwia też wykrywanie mutacji punktowych i metylacji wybranych rejonów DNA.

Zaletą tej techniki jest niewielka ilość DNA wymagana do przeprowadzenia analizy i możliwość zastosowania nawet częściowo zdegradowanego materiału genetycznego. Najważniejszymi zaletami metody są prostota wykonania, niska cena i małe wymagania co do ilości (20ng genomowego DNA) i jakości DNA. Oferowane gotowe zestawy sond dotyczą najważniejszych znanych genów silnie predysponujących do nowotworów takich jak:

ATM, APC, BMPRIA, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDKN2A, CDKN2B, CHEK1, CHEK2, EPCAM, EXT1, EXT2, FANCA, FANCB, FANCD2, MEN1,



Ryc. 4. Wynik elektroforezy wskazujący na delecję eksonu 9 w genie *MSH2* (rysunek górny) w porównaniu do sekwencji niezmienionej (rysunek dolny)

MLH1, MSH2, MSH6, NF1, NF2, PMS2, PTCH, PTEN, RB1, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCB1, STK11, TP53, VHL, WT1. Metoda jest też wykorzystywana do charakterystyki raków i białaczek pod względem występowania mutacji somatycznych punktowych i utrat bądź amplifikacji całych genów.

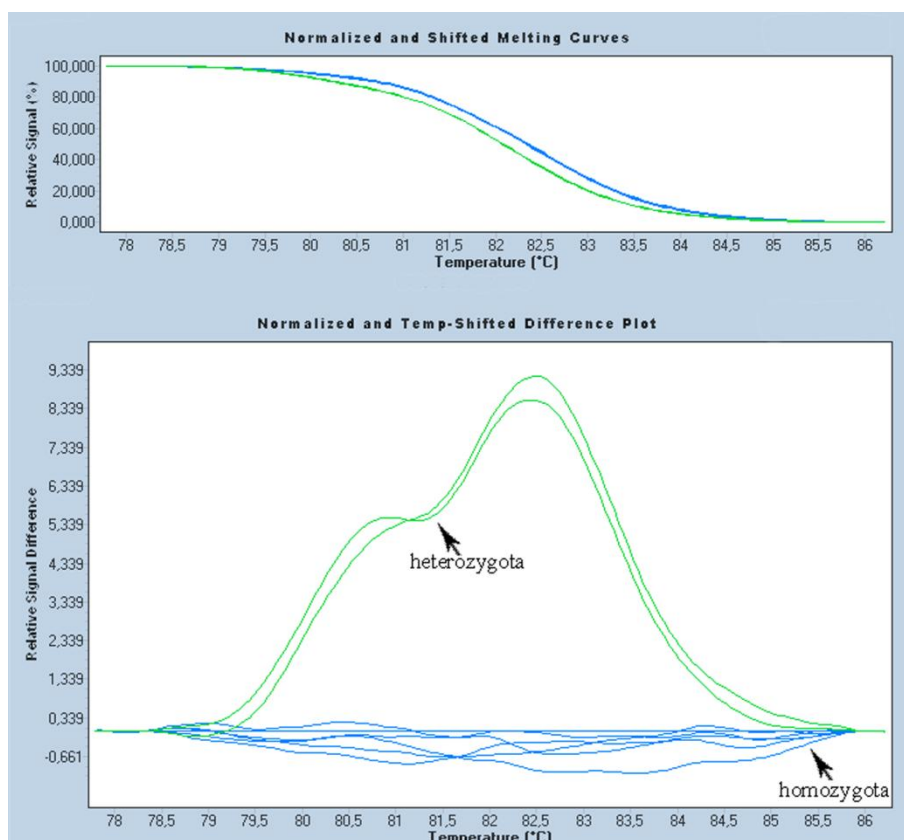
HRMA

Technika HRMA umożliwia detekcję zarówno „małych” mutacji (punktowych i kilku - kilkunastu nukleotydowych) jak i rearanżacji genów. Wszystkie mutacje (małe i duże) mogą być wykrywane jednocześnie (Boruń i wsp. 2014), co redukuje czas badania. Podstawą wykrywania zmian jest analiza ilości powstałego produktu i analiza krzywej topnienia. Pierwszym etapem jest PCR w czasie rzeczywistym z użyciem barwników fluorescencyjnych, najczęściej SYBR Green, LCGreen lub Syto 9 (Wittwer 2009). Detekcja natężenia fluorescencji umożliwia monitorowanie przyrostu produktu reakcji w każdym cyklu. Analiza ilościowa umożliwia wykrywanie rearanżacji genów (głównie delecji). W kolejnym etapie uzyskany produkt poddaje się denaturacji.

Na podstawie zmian poziomu fluorescencji barwnika wykreślona zostaje krzywa topnienia produktu. Jej przebieg pozwala na genotypowanie próbek (rysunek 5). Wadą metody są trudności w rozróżnieniu homozygot między sobą (Erali i wsp. 2008), jednak dzięki wysokiej czułości, specyficzności, niskim kosztom i niewielkiej ilości materiału potrzebnego do

wykonania analizy, HRMA uznano za wartościową metodę screeningu (Wittwer

2009, Rouleau i wsp. 2009), która może konkurować z DHPLC (Aguirre-Lamban i wsp. 2010).



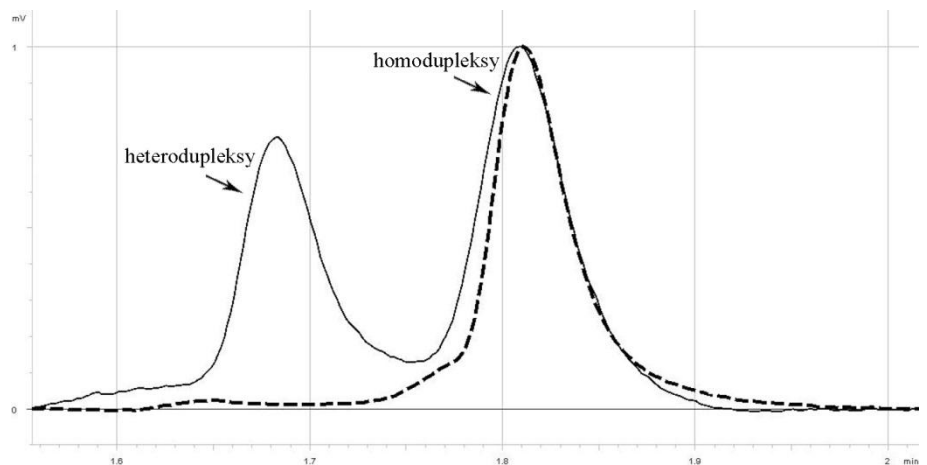
Ryc. 5. Genotypowanie próbek przy pomocy HRMA. Krzywa topnienia dla heterozygotycznej mutacji c.67delG w genie *MLH1* (kolor zielony) w porównaniu do sekwencji niezmienionej – homozygoty normalnej (kolor niebieski)

DHPLC

Dobłą i ciągle używaną techniką wstępnego wykrywania zmian jest DHPLC (O'Donovan i wsp. 1998, Liu i wsp. 1998, Jones i wsp. 1999, Arnold i wsp. 1999, Gross i wsp. 1999). Jest to odmiana HET wykorzystująca wysoką rozdzielczość nowoczesnych wypełnień kolumn chromatograficznych. Rozdział analizowanych fragmentów DNA przeprowadzany jest w gradiencie czynnika denaturującego. W warunkach subdenaturacyjnych heterodupleksy wykazują mniejsze powinowactwo niż homodupleksy do złoża kolumny i łatwiej ulegają wymyciu. Kluczem jest różnica powinowactwa stałej fazy względem jedno i dwuniciowego DNA – heterodupleksy są „jednoniciowe” w miejscu niesparowania (w warunkach subdenaturacyjnych od tego miejsca zaczyna się topnienie).

Rozdział monitorowany jest przez pomiar absorbancji mierzonej przy 260 nm. Profil elucji (rysunek 1) jest charakterystyczny i powtarzalny dla danej

zmiany i pozwala na odróżnienie nowych zmian od wcześniej wykrytych mutacji bądź polimorfizmów.



Ryc. 1. Profil elucji DHPLC charakterystyczny dla mutacji c.1786_1788delAAT w genie *MSH2* (linia ciągła) w porównaniu do sekwencji niezmięnionej (linia przerywana)

Z danych literaturowych (Xiao i wsp. 2001) i badań własnych (Kurzawski i wsp. 2002) wynika, że DHPLC łączy zalety dotychczas stosowanych metod. Czułość metody sięga 100% (O'Donovan i wsp. 1998, Arnold i wsp. 1999, Gross i wsp. 1999) przy stosunkowo niskich kosztach (koszt materiałów zużywalnych ~ 2 € na jeden fragment), ponadto jest szybka, a przy zastosowaniu „autosamplera” pozwala wykonać analizę 3 x 96 próbek na dobę.

WYKRYWANIE ZNANYCH MUTACJI

Coraz więcej wiadomo o rodzaju i częstości mutacji predysponujących do nowotworów charakterystycznych dla różnych populacji, w tym o mutacjach powtarzalnych, czyli występujących w wielu rodzinach danej grupy etnicznej. Testy DNA dotyczące wykrywania znanych mutacji nabierają coraz większego znaczenia ze względu na ich niezwykle wysoką efektywność ekonomiczną. Dzięki intensywnym badaniom takich genów jak *BRCA1*, *MLH1*, *MSH2* i *VHL* wiadomo jakich mutacji szukać przy pomocy testów znanych mutacji zanim po-

dejmie się pełne badania całych genów (Kurzawski i wsp. 2002, Cybulski i wsp. 2002, Górski i wsp. 2000).

Również testy wykrywające mutacje somatyczne w tkance nowotworowej są w większości oparte o techniki wykrywające znane mutacje. Charakterystyka mutacyjna nowotworów pozwoliła na lepsze zrozumienie biologii nowotworów i wprowadzenie nowych leków o charakterze przeciwciał blokujących receptory, czy inhibitorów kinaz oraz lepsze zrozumienie niepowodzeń leczenia. Powstają profesjonalne interaktywne narzędzia gromadzące dane i popularyzujące nowoczesne podejście do onkologii. Dobrym przykładem może być baza internetowa „My Cancer Genome” (<http://www.mycancergenome.org/>) stworzona przez Mia Levy’ego i Wiliama Pao w 2011 roku, gdzie można znaleźć aktualne informacje dotyczące znaczenia mutacji w leczeniu nowotworów oparte na rzetelnych próbach klinicznych.

Najczęściej stosowane testy DNA wykrywające znane mutacje wykorzystują następujące techniki:

- Wykrywanie mutacji za pomocą enzymów restrykcyjnych w produktach PCR
- Allelo-specyficzna amplifikacja
- PCR w czasie rzeczywistym
- MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization time of flight* - spektrometria mas z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu)
- Genotypowanie SNaPshot
- Testy paskowe

RFLP/PCR (*restriction fragment-length polymorphism/PCR* - wykrywanie mutacji za pomocą enzymów restrykcyjnych w produktach PCR)

Enzymy restrykcyjne, zwane endonukleazami restrykcyjnymi lub krótko, restryktazami rozpoznają specyficzne sekwencje zasad w dwuniciowym DNA i rozcinają obie nici dokładnie w określonym miejscu. Dlatego są wykorzystywane do wykrywania mutacji punktowych, małych delecji lub insercji, które prowadzą do utraty lub pojawienia się nowych miejsc restrykcyjnych. Namnożony produkt PCR zawierający zmianę poddaje się trawieniu odpowiednią restryktazą, a następnie rozdziela przy pomocy elektroforezy na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Układ prążków pozwala na wykrycie określonej znanej mutacji. Metoda RFLP choć jest niezwykle prosta i tania, została niemal całkowicie wyparta przez techniki, które nie korzystają z elektroforezy do analizy produktów PCR.

ASA (*allele specific amplification* – allelo-specyficzna amplifikacja)

W popularnie używanej wersji tej techniki z użyciem elektroforezy agarozowej oprócz starterów flankujących, stosuje się jeden starter w pełni komplementarny do allela z mutacją lub dwa startery, z których jeden jest w pełni komplementarny do allela z mutacją, a drugi do allela niezmienionego. Przy tym, startery są tak zlokalizowane, że w wyniku PCR powstają różniące się długością produkty w zależności od genotypu użytej próbki DNA. Nowoczesna wersja tej metody wykorzystująca krótkie sondy fluorescencyjne allelo-specyficzne i aparaty do PCR w czasie rzeczywistym (Heied i wsp. 1996, Matsubara i wsp. 1999) pozwala na bardzo szybkie badanie wielu próbek DNA. Technologię matryc (macierzy) z unieruchomionymi na stałej fazie oligonukleotydami można też traktować jako współczesną wersję ASA. Niewątpliwą zaletą tej technologii jest daleko idąca automatyzacja i możliwość równoczesnego badania nawet kilku tysięcy znanych mutacji.

PCR w czasie rzeczywistym (*real time PCR*)

Jedną z najnowszych najczęściej stosowanych technik w biologii molekularnej jest PCR w czasie rzeczywistym pozwalający na monitorowanie ilości produktu PCR w każdym jej cyklu. Modyfikacja tej techniki, polegająca na zastosowaniu fluorescencyjnie znakowanych sond komplementarnych do sekwencji badanego fragmentu DNA, znalazła swoje zastosowanie również w identyfikacji znanych zmian genetycznych. Istnieje szereg systemów opartych na tej technice różniących się typem sondy zastosowanej w celu detekcji badanej zmiany. Wśród nich wyróżnia się systemy wykorzystujące między innymi sondy typu: *TaqMan* i *SimpleProbes*, czy *iFRET-HRM*.

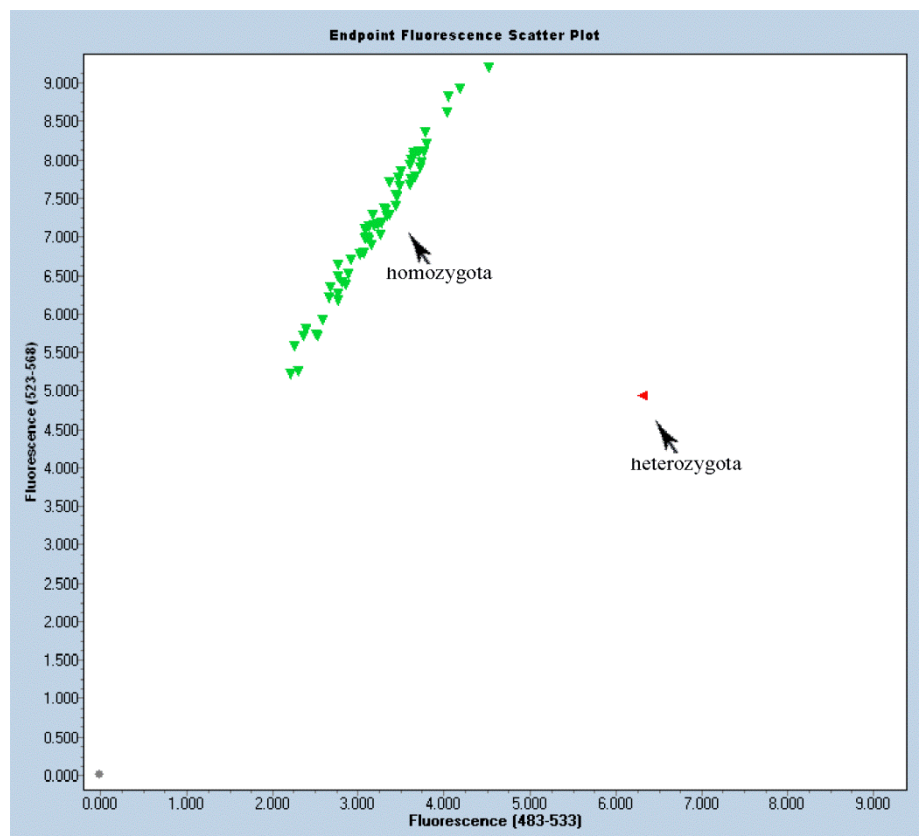
Systemy oparte na zastosowaniu komplementarnych wyznakowanych fluorescencyjnie sond posiadają liczne zalety. Są nimi: wysoka czułość, krótki czas i pełne zautomatyzowanie analizy oraz zniwelowanie ryzyka kontaminacji poprzez przeprowadzenie wszystkich etapów w zamkniętych dołkach płytki.

Sondy *TaqMan*

Stosowane w tym systemie pary sond specyficzne dla amplifikowanych fragmentów DNA (normalnego i zmienionego) są znakowane na 5' końcu jednym z barwników reporterowych: FAM (6-karboksyfluoresceina), HEX (heksachloro-6-karboksyfluoresceina), TET (tetrachloro-6-karboksyfluoresceina) lub JOE (2,7-dimetylo-4,5-dichloro-6-6-karboksyfluoresceina) a na końcu 3' barwnikiem tłumiącym: TAMRA (6-karboksytertrametylorodamina) lub DABCYL (kwas 4-(4-dimetyloaminofenylazo)-benzoesowy). Bliiskość barwnika reporterowego w stosunku do barwnika tłumiącego w obrębie tej samej sondy

powoduje, iż fluorescencja jest wygaszana. Podczas reakcji PCR na etapie przyłączania starterów wyznakowana sonda wiąże się specyficznym z matrycą pomiędzy miejscami hybrydyzacji starterów. Jej 3' koniec jest zablokowany, co powoduje, iż w następnym etapie, jakim jest wydłużanie starterów nie może być ona wydłużana tak jak startery. Zastosowana w tym systemie polimeraza o aktywności 5'-3' exonukleazy do budowania nici DNA degradowuje sondę, co skutkuje uwolnieniem barwnika reporterowego od barwnika tłumiącego i wzrostem fluorescencji. Proces ten zachodzi podczas każdego cyklu powodując narastanie sygnału fluorescencyjnego z poszczególnych cykli, co umożliwia detekcję sygnału w każdym momencie trwania reakcji. Na podstawie końcowego pomiaru natężenia fluorescencji barwników reporterowych wykonuje się analizę końcowych produktów amplifikacji (*endpoint analysis*) i wnioskuje o genotypach badanych próbek (rysunek 6).

Sondy stosowane w tym systemie mają długość od 20 do 40 nukleotydów, liczba par G+C w ich sekwencji zawiera się w przedziale od 40-60%. Sondy nie powinny zawierać powtórzeń pojedynczych nukleotydów, szczególnie guaniny. Sekwencja sondy nie powinna być też komplementarna do sekwencji starterów jak i do sekwencji matrycy w miejscu przyłączenia starterów. Ważne jest, aby sonda nie posiadała na 5'-końcu guaniny, ponieważ jej obecność wygasza fluorescencję barwnika reporterowego nawet po odseparowaniu go od barwnika tłumiącego (Haugland 2002).



Ryc. 6. Genotypowanie próbek przy pomocy sondy *TaqMan*. Analiza końcowych produktów amplifikacji (*endpoint analysis*) dla heterozygotycznej mutacji c.677G>T w genie *MLH1* (czerwony trójkąt) i próbki niezmienionej – homozygoty normalnej (zielony trójkąt). Kontrola zerowa – punkt szary okrąg

Modyfikacją tego systemu jest zastosowanie sondy *TaqMan* typu MGB (*minor groove binder*), w której do końca 3' przyłączona jest również grupa MGB. Jej funkcja polega

na stabilizacji przyłączenia sondy poprzez wpasowanie się do kompleksu powstałego z sondy i matrycowego DNA. Interakcja grupy MGB z kompleksem sonda-matryca podnosi temperaturę topnienia sondy o 15-30°C, co pozwala na zastosowanie sond o znacznie krótszej sekwencji (od 14 do 18 nukleotydów). Jest to korzystne podczas analizy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, ponieważ krótkie sondy łatwiej ulegają destabilizacji pod wpływem zmian nukleotydów występujących w badanej sekwencji (Kutyavin i wsp. 2000).

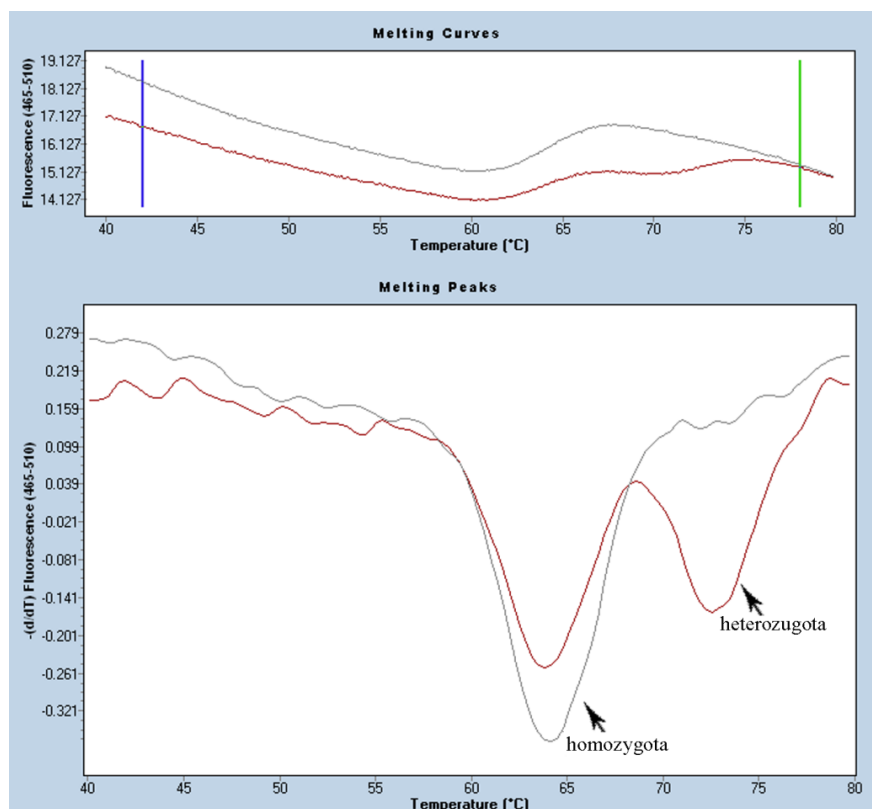
Inną modyfikacją jest tak zwany *castPCR* (*competitive allele-specific TaqMan PCR*) przeznaczony do wykrywania punktowych mutacji somatycznych w DNA guza pozyskiwanego z blozków parafinowych, zawierającego znaczne ilości DNA z komórek normalnych. Modyfikacja polega na użyciu allelo-specyficznych starterów oraz dodatkowo allelo-specyficznych blokerów z grupą MGB. Metoda oparta o pomiar fluorescencji przy amplifikacji wybranych alleli i genu odniesienia pozwala na wykrycie mutacji przy proporcji 1 kopia z mutacją do 1000 kopii bez mutacji (Didelot i wsp. 2012).

Sondy *SimpleProbes* (*guanine quenching probes*)

Guanina wykazuje cechy cząsteczki tłumiącej fluorescencję takich barwników jak FAM czy JOE. W technice tej wykorzystuje się krótki fragment jednoniciowego DNA o długości ok. 20-30 nukleotydów (sonda molekularna) o sekwencji komplementarnej do badanego DNA zawierającego zmianę, wyznakowany na 5'- lub 3'-końcu barwnikiem fluorescencyjnym (FAM lub JOE).

Technika ta umożliwia zidentyfikowanie heterozy-

gotycznych oraz homozygotycznych wariantów zmiany poprzez pomiar wzrostu fluorescencji wykonywany w gradiencie temperatury (rysunek 7). Sonda, która hybryduje z sekwencją badaną, ma zwykle wyższą temperaturę topnienia, jeżeli hybryduje z nicią w pełni kom-



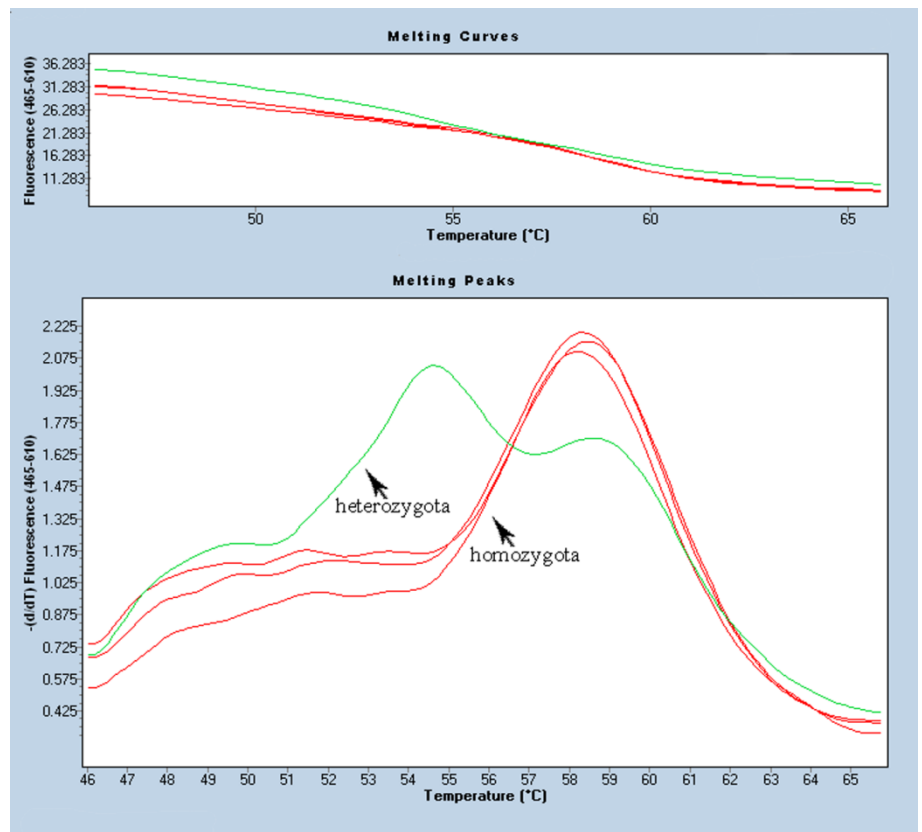
Ryc. 7. Genotypowanie próbek przy pomocy sond *SimpleProbes*. Krzywa topnienia dla heterozygotycznej mutacji c.178G>T w genie *MC1R* (kolor szary) w porównaniu do sekwencji niezmięnionej - homozygoty normalnej (kolor bordowy)

plementarną, natomiast niższą temperaturę topnienia, gdy pod sondą znajduje się pojedynczy niesparowany nukleotyd. Odczyt poziomu fluorescencji podczas podnoszenia temperatury w zakresie 40°-80°C pozwala na zidentyfikowanie konkretnego wariantu badanej zmiany w DNA. Wadą techniki jest konieczność projektowania sond dla poszczególnych sekwencji, jak i zbyt mała uniwersalność warunków doświadczalnych (Haugland 2002).

Sondy iFRET-HRMA

Technika jest modyfikacją opisaną w 2002 metody DASH (*dynamic allele-specific hybridisation on membrane arrays*) (Howell i wsp. 2002, Jobs i wsp. 2003). Łączy ze sobą metodologię reakcji HRMA i PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem sond. Reakcję przeprowadza się podobnie do standardowej reakcji HRMA, jednak wykonuje się asymetryczny PCR w obecności starterów flankujących interesujący nas region oraz wyznakowanej fluorescencyjnie barwnikiem 6-ROX

(6-karboksy-X-rodamina) na 3' końcu sondy, komplementarnej do jednego z badanych wariantów (jeżeli stosuje się sondę F to startera F dodaje się 10-krotnie mniej niż startera R). Barwnik fluorescencyjny SYTO 9 jest FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) donorem a barwnik 6-ROX, którym wyznakowana jest sonda, FRET akceptorem. Ze względu na zastosowanie polimerazy, która nie posiada aktywności 5'-3' nie dochodzi do degradacji przyłączonej sondy podczas etapu elongacji (Masoje i wsp. 2013). Podobnie jak w przypadku metody HRMA na podstawie zmian poziomu fluorescencji barwnika fluorescencyjnego (w tym przypadku 6-ROX, który jest akceptorem) wykreślona zostaje krzywa topnienia produk-



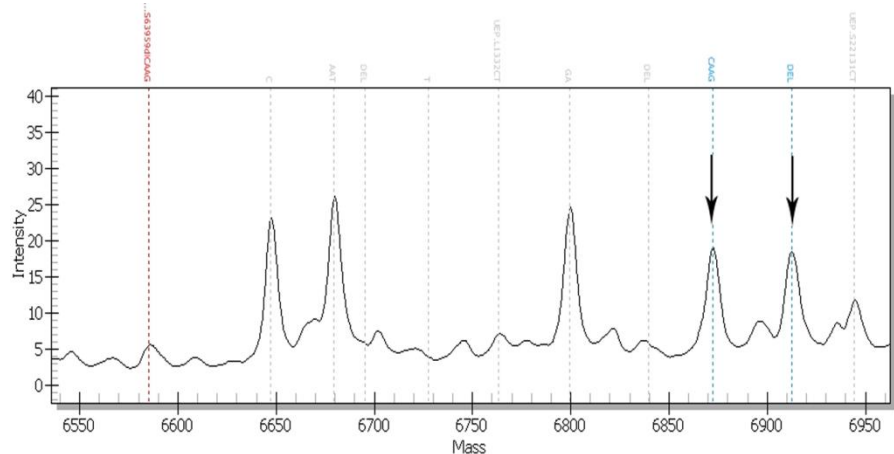
Ryc. 8. Genotypowanie próbek przy pomocy sond iFRET-HRMA. Krzywa topnienia dla heterozygotycznej mutacji c.942+3A>T w genie *MSH2* (kolor zielony) w porównaniu do sekwencji niezmięnionej - homozygoty normalnej (kolor czerwony)

tu. Jej przebieg pozwala na genotypowanie próbek. Metoda zapewnia tańsze w porównaniu z innymi metodami z wykorzystaniem sond genotypowanie i z powodzeniem może być stosowana w przypadku „trudnych” sekwencji m.in. zawierających wielokrotne powtórzenia zasad. Może być stosowana zarówno do wykrywania mutacji germinalnych jak i somatycznych.

MALDI -TOF

MALDI-TOF jest jedną z technik spektrofotometrii masowej, która wykorzystywana jest również w detekcji zmian w obrębie badanego fragmentu DNA. Najczęściej stosuje się ją do analizy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP). Analizę poprzedzają etapy oparte o reakcje PCR. Pierwszy PCR, prowadzi do namnożenia wybranego bądź wybranych fragmentów (w wersji multipleksowej) zawierających badane SNP-y. W drugim, asymetrycznym PCR gdzie przyłączany jest primer komplementarny do sekwencji poprzedzającej polimorficzne miejsce, stosuje się dideoksynukleotydy. Na etapie elongacji w zależności od wariantu matrycy do startera dołączany jest terminujący dideoksynukleotyd (przyłączane dideoksynukleotydy różnią się masą). Później po oczyszczeniu za pomocą żywicy jonowymiennej próbki nanoszone są na płytki (*spectroCHIP*), a następnie poddawane impulsowi laserowemu wzbudzającemu jony. Cała analiza przeprowadzana jest w warunkach próżniowych, przez co ruch jonów nie jest zakłócany przez zderzenia z cząsteczkami gazów. Prędkość przemieszczania się wzbudzonych jonów

pochodzących od badanych próbek analizowana jest przez detektor czasu przelotu jonów. Jony pochodzące od większej masy docierają do detektora wolniej niż jony pochodzące od mniejszej masy. Jak wcześniej wspomniano, różnice nukleotydowe występujące w badanych próbkach wpływają na masę powstałych produktów, co pozwala na ich rozróżnienie (rysunek 9). Rozdział analizowanych cząsteczek dokonywany jest na podstawie stosunku masy jonów do ich ładunku (Wise i wsp. 2003, Gabriel i wsp. 2009). Technika ta charakteryzuje się wysoką czułością i pozwala na szybkie przeprowadzenie analizy. System *Sequenome MassARRAY* (www.sequenom.com) oparty o MALDI-TOF pozwala na genoty-



Ryc. 9. Widmo masowe próbki z mutacją c.3959_3962delCAAG w genie *MSH6*. Strzałkami zaznaczono dwa alleliczne warianty.

powanie 76 tysięcy punktów w ciągu dnia. Koszty wykonania analizy (koszty materiałów zużywalnych) w wersji multipleksowej są bardzo niskie i wynoszą zaledwie ~ 1,5 € / dołek (w jednym dołku do 40 zmian) dla jednego pacjenta (Dymerska i wsp. 2010). Wadą metody jest wysoki koszt aparatu i osiąganie wysokiej rentowności przy analizowaniu dużych serii próbek, co czyni ją przydatną jedynie dla dużych laboratoriów. Ostatnio z powodzeniem używana do wykrywania mutacji somatycznych

(Agena Bioscience <http://agenabio.com/products/massarray-dx/>)

SNaPshot

Reakcja SNaPshot pozwalająca na równoczesne badanie wielu zmian w jednej próbce, znalazła zastosowanie w wykrywaniu mutacji w genach m.in. *BRCA1* i *BRCA2* (Fournier i wsp. 2004, Filippini i wsp. 2007, Révillion i wsp. 2004), *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* (Buchard i wsp. 2007).

Analiza poprzedzona jest dwoma etapami opartymi na reakcjach multipleks PCR. W pierwszej reakcji namnaża się matrycę DNA. Podczas drugiego PCR do fragmentu DNA przyłączany jest starter komplementarny do sekwencji poprzedzającej zmianę (*extension primer*). Na etapie elongacji w zależności od występującego w DNA wariantu do każdego startera dołączany jest terminujący, wyznakowany innym fluorochromem dideoksynukleotydu. Uzyskane produkty (różniące się długością i rodzajem barwnika) rozdzielane są elektroforetycznie przy użyciu sekwensera kapilarnego (www.appliedbiosystems.com).

Test paskowy

Obiecującym narzędziem wykrywania „małych” mutacji jest tzw. test paskowy (*strip assay*). Ponieważ nie wymaga specjalistycznego sprzętu może być atrakcyjną metodą, szczególnie dla niewielkich laboratoriów.

Pierwszym etapem jest namnożenie fragmentu genu zawierającego badaną zmianę. Następnie wykonuje się równolegle dwie reakcje, w obecności jednego allelo-specyficznego startera (*extension primer*) z poli(dT) na końcu 5', wiążącego się do sekwencji DNA z konkretnym wariantem, trzech nukleotydów dATP, dCTP, dGTP oraz dUTP-biotyny lub dUTP-digoksygeniny. W efekcie, w zależności od występującego w DNA wariantu („z mutacją” bądź „normalnego”) otrzymuje się dwa typy produktów: wyznakowane biotyną lub digoksygeniną. Produkty obu reakcji nanosi się na nitrocelulozowy pasek, wzdłuż którego migrują wskutek sił kapilarnych. W obrębie paska można wyróżnić trzy strefy: strefę z immobilizowaną streptawidyną, z którą zwiążą się produkty zawierające jeden wariant DNA, strefę z immobilizowanymi przeciwciałami anty-digoksygeniny, z którą zwiążą się produkty zawie-

rające drugi wariant DNA oraz strefę kontrolną z immobilizowanymi poli(dT). Wizualizację związanych kompleksów przeprowadza się przy użyciu nanocząsteczek złota ze związanymi poli(dA). Wybarwienie jednego paska i paska w strefie kontrolnej wskazuje na homozygotę, dwóch i paska strefy kontrolnej na heterozygotę (Konstantou i wsp. 2009)). W literaturze można znaleźć bardziej złożone wersje tej metody pozwalające na wykrywanie wielu różnych mutacji na jednym pasku (Litos i wsp. 2009). W ocenie autorów, test paskowy jest czuły, szybki i tani (Konstantou i wsp 2009, Litos i wsp. 2009, Gialeraki i wsp. 2010).

COLD-PCR

„COLD-PCR” jest nową modyfikacją techniki PCR, w której wybiórczo (preferencyjnie) namnażany jest allel z mutacją występujący w mniejszości, znajdujący się w mieszaninie zawierającej allele bez mutacji oraz z mutacją, niezależnie od rodzaju oraz umiejscowienia mutacji w analizowanej sekwencji (Li i wsp. 2008). Metoda ta opiera się na spostrzeżeniu, że dla każdej sekwencji DNA można określić tzw. krytyczną temperaturę denaturacji (T_c), która jest nieco niższa od właściwej temperatury denaturacji (T_m). Wydajność amplifikacji PCR określonej sekwencji DNA gwałtownie spada, gdy temperatura denaturacji jest poniżej T_c .

Dotychczas opracowano dwa rodzaje techniki „COLD-PCR”: „full COLD-PCR” (pełny) oraz „fast COLD-PCR” (szybki).

„Full COLD-PCR” składa się z 5 etapów powtarzanych cyklicznie:

1. Denaturacja – denaturacja próbki DNA
2. Anealing pośredni – tworzenie heterodupleksów
3. Melting – topnienie heterodupleksów w T_c
4. Anealing starterów PCR – przyłączenie starterów reakcji PCR do jednoniciowych fragmentów powstałych w wyniku denaturacji heterodupleksów (przy czym homodupleksy w T_c nie uległy denaturacji i dlatego startery nie mogą się do nich przyłączyć)
5. Elongacja – synteza drugiej nici DNA przez polimerazę DNA

W technice „Fast COLD-PCR” etap 1 i 2 są pominięte.

„COLD-PCR” jest czułą techniką, umożliwiającą wykrycie mutacji dotyczącej małego odsetka komórek i może być wykorzystana w celu zwiększenia czułości i wiarygodności konwencjonalnych technik, takich jak RFLP, sekwencjonowanie, MALDI-TOF, PCR w czasie rzeczywistym. Zastąpienie tradycyjnej techniki PCR przez „COLD-PCR” może w znaczący sposób pomóc w identyfikacji mutacji, szczególnie w przypadku gdy mutacja jest obecna

w niewielkim odsetku komórek, np. gdy bada się guzy nowotworowe lub poszukuje specyficznych zmian w płynach ustrojowych.

Podsumowanie

W ciągu ostatnich lat rozwój i upowszechnianie nowych metod molekularnych przebiega bardzo szybko. Zastosowanie wielofunkcyjnych robotów laboratoryjnych umożliwiło wykorzystanie ich nie tylko do izolacji DNA i RNA, ale też do normalizacji stężeń (doprowadzenie dożądanego i jednakowego stężenia serii próbek), przygotowania reakcji PCR i itp. Równoczesny rozwój oprogramowania i komputeryzacja sprawiły, że dzisiaj istnieje możliwość całkowitej automatyzacji procesu bankowania próbek i ich testowania, łącznie z transferem danych i wyników. W laboratoriach coraz rzadziej używa się probówek. Na trwałe do użytku weszły płytki o 96 czy nawet 384 dołkach, bo większość analiz wykonuje się w dużych seriach stosując coraz mniejsze objętości odczynników (miniaturyzacja), używając automatycznych dozowników, co przekłada się na coraz mniejsze koszty analizy jednej próbki. Do historii odeszły jeszcze tak nie dawno bardzo popularne metody wykrywania nieznanymi mutacji takie jak SSCP, czy metoda DGGE.

Co raz częściej też DHPLC jest zastępowana prostszą i tańszą HRMA, która stała się standardem we wstępnym wykrywaniu mutacji. Wypieranie mniej czułych czy bardziej złożonych albo toksycznych metod jest spowodowane znacznym postępem i zwiększeniem dostępności tradycyjnego sekwencjonowania i NGS. W przypadku analizy długich fragmentów (około 1000 zasad) bezpośrednie sekwencjonowanie jest dziś najtańszą, najszybszą i najpewniejszą metodą wykrywania nieznanymi mutacji. Obecnie czołowe firmy oferują sekwenatory umożliwiające jednoczesne sekwencjonowanie 96 próbek w oparciu o elektroforezę kapilarną produktów otrzymanych metodą cykliczną z użyciem dideoksynukleotydów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. A nowe systemy NGS umożliwiają bardzo szybką i stosunkowo taną analizę całego genomu bądź rejonów odpowiedzialnych za zwiększone predyspozycje do chorób, w tym również nowotworowych. Próbie czasu nie oparła się ASA w wersji z użyciem elektroforezy agarozowej i RFLP/PCR ze względu na upowszechnienie mniej pracochłonnych i tańszych metod PCR w czasie rzeczywistym zwłaszcza z użyciem sond *TaqMan*, które pozwalają na znacznie szybsze analizowanie znanych SNP-ów i mutacji w wielu próbkach równocześnie (płytki na 384 próbek). Dodatkową zaletą tej techniki jest wyeliminowanie możliwości kontaminacji laboratorium produktami reakcji PCR, co jest niezwykle ważne zwłaszcza w laboratoriach diagnostycznych. Niemal całkowicie z użycia wyszła żmudna i pracochłonna metoda Southerna. W wykrywaniu rearanzacji w genach odpowiedzialnych za

dziedziczne predyspozycje do nowotworów i innych chorób zastąpiły ją MLPA i niektóre odmiany HRMA pozwalające też na wykrywanie mutacji punktowych.

PIŚMIENNICTWO

- Agah A, Aghajan M, Mashayekhi F, Amini S, Davis RW, Plummer JD, Ronaghi M, Griffin PB: A multi-enzyme model for pyrosequencing. *Nucleic Acids Res*, 32:e166, 2004
- Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Garcia-Hoyos M, Cantalapiedra D, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Trujillo-Tiebas MJ, Ramos C, Ayuso C: Comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning in the *ABCA4* gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51:2615-2619, 2010
- Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Kiechle M: A highly sensitive, fast and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat*, 14:333-339, 1999
- Borun P, Kubaszewski L, Banasiewicz T, Walkowiak J, Skrzypczak-Zielinska M, Kaczmarek-Rys, M, Plawski A: Comparative-high resolution melting: a novel method of simultaneous screening for small mutations and copy number variations. *Human Genetics*, 133(5), 535–545. 2014
- Buchard A, Sanchez JJ, Dalhoff K, Morling N: Multiplex PCR detection of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* gene variants: simultaneously detecting *GSTM1* and *GSTT1* gene copy number and the allelic status of the *GSTP1* Ile105Val genetic variant. *J Mol Diagn*, 9:612-617, 2007
- Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R: Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques*, 35:146-50, 2003
- Cotton RG, Rodrigues NR, Campbell RD: Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *PNAS*, 85:4397-4401, 1988
- Cybulski C, Krzystolik K, Murgia A, Górski B, Dębniak T, Jakubowska A, Martella M, Kurzawski G, Prost M, Kojder I, Limon J, Nowacki P, Sagan L, Białas B, Kałuża J, Zdunek M, Omulecka A, Jaskólski D, Kostyk E, Koraszewska-Matuszewska B, Haus O, Janiszewska H, Pecold K, Starzycka M, Słomski R, Cwirko M, Sikorski A, Gliniewicz B, Cyryłowski L, Fiszer-Maliszewska L, Gronwald J, Tołoczko-Grabarek A, Zajączek S, Lubiński J: Germline mutations in the von Hippel-Lindau (*VHL*) gene in patients from Poland: disease presentation in patients with deletions of the entire *VHL* gene. *J Med Genet*, 39:E38, 2002
- Didelot, Audrey, et al. "Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples." *Experimental and molecular pathology*, 92.3:275-280, 2012
- Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, Liu B, Kinzler KW, Vogelstein B: Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet*, 6:105-110, 1997
- Dymerska D, Serrano-Fernández P, Suchy J, Pławski A, Słomski R, Kąklewski K, Scott RJ, Gronwald J, Kładny J, Byrski T, Huzarski T, Lubiński J, Kurzawski G: Combined iPLEX and TaqMan Assays to Screen for 45 Common Mutations in Lynch Syndrome and FAP Patients. *J Mol Diagn*, 12:82-90, 2010
- Erali M, Voelkerding KV, Wittwe CT: High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol*, 85:50-58, 2008
- Easton DF, Pharoah PD, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, Devilee P, Meindl A, Couch FJ, Southey M, Goldgar DE, Evans DG, Chenevix-Trench G, Rahman N, Robson M, Domchek SM, Foulkes WD: Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *New England Journal of Medicine* 372 (23):2243–57, 2015
- Filippini S, Blanco A, Fernández-Marmiesse A, Alvarez-Iglesias V, Ruíz-Ponte C, Carracedo A, Vega A: Multiplex SNaPshot for detection of *BRCA1/2* common mutations in Spanish and Spanish related breast/ovarian cancer families. *BMC Med Genet*, 8:40, 2007
- Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D: SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 2: Unit 2.12, 2009
- Gialeraki A, Markatos C, Grouzi E, Merkouri E, Travlou A, Politom M: Evaluation of a reverse-hybridization StripAssay for the detection of genetic polymorphisms leading to acenocoumarol sensitivity. *Mol Biol Rep*, 37:1693-1697, 2010
- Glenn TC: Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11: 759–769, 2011
- Górski B, Byrski T, Huzarski T, Jakubowska A, Menkiszak J, Gronwald J, Płużańska A, Bębenek M, Fischer-Maliszewska L, Grzybowska E, Narod SA, Lubiński J: Founder mutations in the *BRCA1* gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet*, 66:1963-1968, 2000
- Gronwald J, Menkiszak J, Tołoczko A, Zajączek S, Kładny J, Kurzawski G, Krzystolik K, Podolski J, Lubiński J: Hereditary breast cancer. *Pol J Pathol*, 49:59-66, 1998
- Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M: A comparison of *BRCA1* mutations analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet*, 105:72-78,1999

Haugland RP. The handbook of Fluorescent Probes and Research products. Ninth Edition. Molecular Probes. 2002 (<http://www.probes.com>)

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6:986-994,1996

Howell WM, Jobs M, Brookes AJ: iFRET: an improved fluorescence system for DNA-melting analysis. *Genome Res* 12:1401–1407, 2002

Jobs M, Howell WM, Stromqvist L, Mayr T, Brookes AJ: DASH-2: flexible, low-cost, and high-throughput SNP genotyping by dynamic allele-specific hybridization on membrane arrays. *Genome Res* 13:916–924, 2003

Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC: Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem*, 45: 1133-1140, 1999

Konstantou JK, Ioannou PC, Christopoulos TK: Dual-allele dipstick assay for genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension reaction. *Eur J Hum Genet*, 17:105-111, 2009

Kurian AW, Hare EE, Mills MA, Kingham KE, McPherson L, Whittemore AS, McGuire V, Ladabaum U, Kobayashi Y, Lincoln SE, Cargill M, Ford JM: Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. *Journal of Clinical Oncology* 32: 2001–2009, 2014

Kurzawski G, Safranow K, Suchy J, Chlubek D, Scott RJ, Lubiński J: Mutation analysis of *MLH1* and *MSH2* genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods*, 51:89-100, 2002

Kurzawski G, Suchy J, Kładny J, Safranow K, Jakubowska A, Elsakov P, Kucinkas V, Gardovski J, Irmejs A, Sibul H, Huzarski T, Byrski T, Dębniak T, Cybulski C, Gronwald J, Oszurek O, Clark J, Góźdz S, Niepsuj S, Słomski R, Pławski A, Łącka-Wojciechowska A, Rozmiarek A, Fiszer-Maliszewska Ł, Bębenek M, Sorokin D, Stawicka M, Godlewski D, Richter P, Brożek I, Wysocka B, Jawień A, Banaszkiwicz Z, Kowalczyk J, Czudowska D, Goretzki PE, Moeslein G, Lubiński J: Germline *MSH2* and *MLH1* mutational spectrum in HNPCC families from Poland and the Baltic States. *J Med Genet*, 39:E65, 2002

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J: 3'-minor groove-binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 28:655-661, 2000

Li J, Wang L, Mamon H, et al. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med* 2008;14:579–584.

Litos IK, Ioannou PC, Christopoulos TK, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E: Multianalyte, dipstick-type, nanoparticle-based DNA biosensor for visual genotyping of single-nucleotide polymorphisms. *Biosens Bioelectron*, 24:3135-3139, 2009

Liu W, Smith DI, Rechtzigel KJ, Thibodeau SN, James CD: Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations. *Nucleic Acids Res*, 26:1396-1400, 1998

Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Chrystala Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen J. Performance comparison of bechop High-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*, 30(6):562, 2012

Lubiński J, Górski B, Kurzawski G, Jakubowska A, Cybulski C, Suchy J, Dębniak T, Grabowska E, Lener M, Nej K: Molecular basis of inherited predispositions for tumors. *Acta Biochim Pol*, 49:571-581, 2002

Lynch HT, Smyrk T: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Cancer*, 78:1149-1167, 1996

Lynce F, Isaacs C: How Far Do We Go With Genetic Evaluation? Gene, Panel, and Tumor Testing. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 35:e72-8, 2016

Masojć B1, Górski B, van de Wetering T, Dębniak T, Cybulski C, Jakubowska A, Mędrak K, Rudnicka H, Dwight ZL, Lubiński J: Genotyping by induced Förster Resonance Energy Transfer (iFRET) mechanism and simultaneous mutation scanning. *Hum Mut*, 34:636-643. 2013

Matsubara Y, Fujii K, Rinaldo P, Narisawa K. A fluorogenic allelespecific amplification method for DNA-based screening for inherited metabolic disorders. *Acta Paediatr Suppl*, 88:65-68, 1999

Myers RM, Maniatis T, Lerman LS: Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*, 155:501-527, 1987

Nagamine CM, Chan K, Lau YFCA: A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet*, 45:337-339, 1989

Neumann HP, Zbar B: Renal cysts, renal cancer and von Hippel-Lindau disease. *Kidney Int*, 51:16-26, 1997

O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P: Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics*, 52:44-49, 1998

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *PNAS*, 86:2766-2770, 1989

Pritchard CC, Smith C, Salipante SJ, Lee MK, Thornton AM, Nord AS, Gulden C, Kupfer SS, Swisher EM, Bennett RL, Novetsky AP, Jarvik GP, Olopade OI, Goodfellow PJ, King MC, Tait JF, Walsh T: ColoSeq Provides Comprehensive Lynch and Polyposis Syndrome Mutational Analysis Using Massively Parallel Sequencing. *J Mol Diagn*, 14:357-366, 2012

Révillion F, Verdière A, Fournier J, Hornez L, Peyrat JP: Multiplex single-nucleotide primer extension analysis to simultaneously detect eleven *BRCA1* mutations in breast cancer families. *Clin Chem*, 50:203-206, 2004

Roberts NJ, Jiao Y, Yu J, Kopelovich L, Petersen GM, Bondy ML, Gallinger S, Schwartz AG, Syngal S, Cote ML, Axilbund J, Schlick R, Ali SZ, Eshleman JR, Velculescu VE, Goggins M, Vogelstein B, Papadopoulos N, Hruban RH, Kinzler KW, Klein AP. ATM Mutations in Patients with Hereditary Pancreatic Cancer Discov, 2(1): 41-46, 2012

Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P: Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*, 242:84-90, 1996

Rosenthal A, Charnock-Jones DS: New protocols for sequencing with dye terminators. *DNA Seq*, 3:61-64, 1992

Rouleau E, Lefol C, Bourdon V, Coulet F, Noguchi T, Soubrier F, Bièche I, Olschwang S, Sobol H, Lidereau R: Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to *MLH1* germline mutations in Lynch syndrome. *Hum Mut*, 30:867-875, 2009

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30:e57, 2002

Schubert EL, Hansen MF, Strong LC: The retinoblastoma gene and its significance. *Ann Med* 1994, 26:177-184, 1994

Thompson JF, Reifenger JG, Giladi E, Kerouac K, Gill J, Hansen E, Kahvejian A, Kapranov P, Knope T, Lipson D, Steinmann KE, Milos PM. Single-step capture and sequencing of natural DNA for detection of *BRCA1* mutations. *Genome Res*, 22(2):340-5, 2012

Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, Nord AS, Mandell JB, Swisher EM, King MC: Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *PNAS*, 107:12629-12633, 2010

Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, Roeb W, Agnew KJ, Stray SM, Wickramanayake A, Norquist B, Pennington KP, Garcia RL, King MC, Swisher EM: Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *PNAS*, 108:18032-18037, 2011

Wise CA, Paris M, Morar B, Wang W, Kalaydjieva L, Bittles AH. A standard protocol for single nucleotide primer extension in the human genome using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 17:1195-1202, 2003

Wittwer CT: High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mut*, 30:857-859, 2009

Wu J, Zhang S, Meng Q, Cao H, Li Z, Li X, Shi S, Kim DH, Bi L, Turro NJ, Ju J: 3'-O-modified nucleotides as reversible terminators for pyrosequencing. *Proc Natl Acad Sci*, 104:16462-16467, 2007

Van Cutsem, E.; Cervantes, A.; Adam, R.; Sobrero, A.; van Krieken, J.H.; Aderka, D.; Aranda Aguilar, E.; Bardelli, A.; Benson, A.; Bodoky, G.; et al. Esmo consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 1386–1422.

Vysotskaia VS, Hogan GJ, Gould GM, Wang X, Robertson AD, Haas KR, Theilmann MR, Spurka L, Grauman PV, Lai HH, Jeon D, Haliburton G, Leggett M, Clement S, Chu CS, Iori K, Maguire JR, Kaylene Ready, Evans EA, Kang HP, Haque IS: Development and validation of a 36-gene sequencing assay for hereditary cancer risk assessment. doi: <https://doi.org/10.1101/088252>, 2016

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mut*, 17:439-474, 2001

Anna Jakubowska, Bohdan Górski, Jan Lubiński



**Testy DNA wysokiego ryzyka raka
piersi w Polsce**

DNA testing of high breast cancer risk in Poland

Streszczenie

Do najczęstszych przyczyn występowania wysokiej, genetycznie uwarunkowanej predyspozycji do rozwoju raka piersi i/lub jajnika w Polsce należą mutacje w genach *BRCA1* i *CHEK2*. Mutacje innych genów, tj. *BRCA2* i *PALB2* są również związane z wysokim ryzykiem raka piersi jednak występują znacznie rzadziej. Charakterystyczną cechą dla populacji polskiej jest jej stosunkowo wysoka homogenność, dzięki czemu możliwe było wykrycie mutacji założycielskich badanych genów. Odkrycie to umożliwiło opracowanie szybkich i stosunkowo niedrogich molekularnych testów diagnostycznych, umożliwiających wykrywanie mutacji z dużą czułością. Wyniki badań sekwencjonowania nowej generacji pokazują, że u pacjentek z rodzin z silną agregacją raków piersi/jajnika i/lub rakami piersi zdiagnozowanymi <50 rokiem życia, u których nie wykryto mutacji przy pomocy szybkiego testu diagnostycznego należy rozważyć badanie pełnej sekwencji genów *BRCA1* i *BRCA2*, oraz innych genów, których mutacje mogą mieć związek z wysokim ryzykiem zachorowania na raka piersi/jajnika.

Słowa kluczowe: mutacje założycielskie, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, test DNA

Summary

The most common causes of high genetic predisposition to the breast and/or ovarian cancers in Poland are mutations in *BRCA1* and *CHEK2* genes. The mutations in other genes, ie. *BRCA2* and *PALB2*, are also associated with a high risk of breast cancer, however are less common. Relatively high homogeneity of Polish population made possible identification of founder mutations in several tested genes. Based on this phenomenon we have elaborated rapid, relatively non-expensive and sensitive molecular diagnostic tests used for detection of mutations in high risk genes. Results of analyses using next-generation sequencing have shown that in patients from families with strong aggregation of breast/ovarian cancers and breast cancers diagnosed <50 years of age the examination of full sequence of the *BRCA1* and *BRCA2*, and also other genes related to high risk of breast/ovarian cancers should be considered.

Key words: founder mutation, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, DNA tests

Znane są geny, których mutacje wiążą się z wysokim ryzykiem raka piersi. Wśród nich najczęściej wymieniane są *BRCA1* i *BRCA2*, odpowiedzialne za ok. 20% przypadków występowania raka piersi w rodzinie. Wysokie ryzyko raka piersi stwierdza się również u nosicielek mutacji *CHEK2* skracających białko z rodzin z rakami piersi u krewnych (1). Do genów wysokiego ryzyka należą ponadto *PALB2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11* i *CDH1*, jednak ich mutacje są rzadsze i występują u mniej niż 1% rodzin z rakiem piersi. Istnieją także geny, takie jak *ATM*, *NBN*, *MRE11A*, *RAD50*, *BRIP1*, których mutacje są związane ze zwiększeniem ryzyka raka piersi, jednak charakteryzują się nieco niższą, 20-40%, penetracją (Tabela 1) (2, 3).

Tab. 1. Geny związane ze zwiększonym ryzykiem raka piersi.

Gen	Zespół	Raki u nosicieli heterozygotycznych	Ryzyko raka piersi
<i>BRCA1</i>	Dziedziczny rak piersi/jajnika	Piersi, jajnika	50-85%
<i>BRCA2</i>	Dziedziczny rak piersi/jajnika	Piersi, jajnika, trzustki, żołądka, prostaty	40-85%
<i>PALB2</i>	Dziedziczny rak piersi	Piersi, trzustki	40%
<i>PTEN</i>	Cowden	Piersi, tarczycy, trzony macicy, nerki, jelita, skóry	25-85%
<i>TP53</i>	Li-Fraumeni	Mózgu, piersi, kory nadnerczy, skóry, mięsaki, białaczka	50-90%
<i>RECQL</i>	Dziedziczny rak piersi	Piersi	35-80%
<i>CHEK2</i>	Dziedziczny rak piersi	Piersi, prostaty, jelita, nerki	20-40% *
<i>STK11</i>	Peutz-Jeghers	Piersi, jelita, żołądka, trzustki, płuc, jajnika, jąder	45-50%
<i>CDH1</i>	Dziedziczny rozlany rak żołądka	Żołądka, piersi (lobularny)	40-50%
<i>ATM</i>	Dziedziczny rak piersi	Piersi	20%
<i>NBN</i>	Dziedziczny rak piersi	Piersi	20-30%
<i>MRE11A</i>	Dziedziczny rak piersi	Piersi	?
<i>RAD50</i>	Dziedziczny rak piersi	Piersi	?
<i>BRIP1</i>	Dziedziczny rak piersi	Piersi	20%

*mutacje skracające białko oraz raki piersi wśród krewnych

Badania wykazały, że wysokie ryzyko raka piersi w Polsce jest związane najczęściej z mutacjami w genach *BRCA*, *BRCA2*, *CHEK2* oraz *PALB2*, a także niedawno zidentyfikowanym *RECQL*. Charakterystyczną cechą dla populacji polskiej jest jej stosunkowo wysoka homogenność, dzięki czemu możliwe było wykrycie częstych mutacji założycielski badanych genów, co umożliwiło opracowanie szybkich i stosunkowo niedrogich molekularnych testów diagnostycznych, umożliwiających wykrywanie mutacji z dużą czułością.

Testy DNA oparte o ocenę mutacji powtarzalnych w populacji polskiej związanych z wysokim ryzykiem raka piersi.

Geny *BRCA1* i *BRCA2*

Gen *BRCA1* został sklonowany w roku 1994, jest zlokalizowany na chromosomie 17q21 i obejmuje 81 154 kbp genomowego DNA, jego mRNA posiada 7,8 kbp długości, 24 eksony, a białko składa się z 1836 aminokwasów (4-6). Gen *BRCA2* został sklonowany w 1995 roku, położony jest na chromosomie 13q13.1 i obejmuje 84 192 pb, mRNA o długości 11386 pb składa się z 27 eksonów i koduje białko zbudowane z 3418 aminokwasów (7, 8). Oba geny mają podobną budowę strukturalną: zawierają bardzo długi ekson 11 a miejsce startu translacji jest zlokalizowane w eksonie 2.

Spektrum mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* jest bardzo duże i mogą one występować wzdłuż całego genu. Geny te bardzo rzadko podlegają mutacjom *de novo* i to jest najprawdopodobniej jedną z głównych przyczyn „efektu założyciela” powodującego, że w populacjach o dużym poziomie homogenności etnicznej zaledwie kilka mutacji stanowi większość obserwowanych uszkodzeń genów *BRCA1* i *BRCA2*. W Polsce zjawisko to po raz pierwszy zaobserwowano w naszym Ośrodku (9), a niezależnie, jednak nieco później i na mniejszym materiale, w Gliwicach (10). Mutacje genów *BRCA1* i *BRCA2* w polskich rodzinach opisano również w innych pracach, jednak z doniesień tych nie wynikało, że zaledwie kilka zmian stanowi zdecydowaną większość zaburzeń konstytucyjnych występujących w Polsce (11, 12). W przeprowadzonych w Szczecinie w latach 1996-1999 badaniach 66 rodzin z silną agregacją raków piersi/jajnika wykryto 35 mutacji konstytucyjnych *BRCA1*, z których 5382insC, C61G i 4153delA stwierdzono odpowiednio w 18, 7 i 4 przypadkach (9). Dalsze badania przeprowadzone na reprezentatywnej dla wszystkich regionów w Polsce serii 200 rodzin, z co najmniej 3 rakami piersi/jajnika wykazały, że mutacje konstytucyjne genu *BRCA1* (badane sekwencjonowaniem oraz technikami „Long PCR” i „Southern-RFLP”) są przyczyną 61% (122/200) tych agregacji, a około 90% z nich stanowi jedna z trzech mutacji 5382insC, C61G

i 4153delA występujące w stosunku około 6:2:1; mutacje genu *BRCA2* stwierdzono u zaledwie 3,5% pacjentów z badanej grupy (7/200) i żadna z nich nie była powtarzalna (13).

Mutacje założycielskie w genie *BRCA1*

Dzięki odkryciu „efektu założyciela” w polskiej populacji możliwe było opracowanie szybkiego i efektywnego testu wykrywający mutacje w genie *BRCA1* u pacjentów polskiego pochodzenia (5382insC, C61G i 4153delA) z bardzo wysoką czułością. Opracowany w naszym Ośrodku test oparty o „multiplex PCR” pozwala wykrywać w prosty, szybki i tani sposób 80-90% mutacji *BRCA1* związanych z wysokim ryzykiem raka piersi/jajnika (patent nr P-335917). Specyficzność testu jest praktycznie 100% (brak wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych) jeżeli wynik testu oparty jest o analizę z dwóch niezależnych pobrań krwi. W przeprowadzonych w naszym Ośrodku testach u około 3 500 kolejnych pacjentek z rodzin z rakiem piersi zdiagnozowanym przed 50 rokiem życia 3 mutacje założycielskie w *BRCA1* wykryto w 5,7% przypadków (14). W podobnych badaniach u około 500 kolejnych pacjentek z rakiem jajnika niezależnie od wieku zdiagnozowania tego nowotworu, mutację *BRCA1* stwierdzono w 13% przypadków (15, 16). W koordynowanej przez nasz Ośrodek akcji Stowarzyszenia „Różowa Wstążka” promowanej przez czasopismo dla kobiet „Twój Styl” testy *BRCA1* wykonano u 5000 kobiet wykrywając mutacje u 4% pacjentek zdrowych, u których wśród krewnych I^o lub II^o stwierdzono raka piersi rozpoznanego przed 50 r.ż. lub raka jajnika niezależnie od wieku zdiagnozowania. Akcję przeprowadzono na terenie całego kraju, tak więc można przyjąć, że mimo istniejących regionalnych różnic, dla wszystkich Polek wskazaniem do testu *BRCA1* powinno być stwierdzenie wśród krewnych I^o lub II^o zarówno:

- a) cech rodowodowo-klinicznych dziedzicznego raka piersi/jajnika (wg kryteriów podanych w rozdziale o tych zespołach), jak i:
- b) stwierdzenie nawet jednego zachorowania na raka piersi przed 50 r.ż. lub raka jajnika w dowolnym wieku:
- c) ponadto test *BRCA1* należy wykonywać u każdej chorej z rakiem piersi i/lub jajnika.

Inne zasady, które koniecznie należy przestrzegać przy wykonywaniu testów *BRCA1*:

- a) pełnoletniość osoby testowanej;
- b) wykonywanie analiz DNA z dwóch niezależnych pobrań krwi przez akredytowaną pracownię;
- c) przeprowadzenie specjalistycznej konsultacji przez genetyka-onkologa zarówno przed jak i po analizie DNA.

Test Wysokiego Ryzyka (TWR) obejmujący analizę mutacji powtarzalnych dla populacji polskiej w genach *BRCA1* i *BRCA2*

Wyniki licznych badań przeprowadzonych w kolejnych latach w wielu ośrodkach w Polsce wykazały, że oprócz 3 mutacji założycielskich 5382insC, C61G i 4153delA w genie *BRCA1* inne zmiany również mogą występować powtarzalnie. Dokładna analiza danych literaturowych ujawniła kilkadziesiąt różnych mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* (9-13, 16-31). Wśród powyższych zmian, poza 3 mutacjami założycielskimi, ze zwiększoną częstością występowały 5 mutacji *BRCA1* (185delAG, 794delT, 3819del5, 3875del4 i 5370C/T) oraz 4 mutacji *BRCA2* (886delGT, 4075delGT, 6174delT, 8138del5). Zmiany te zostały włączone do tzw. testu wysokiego ryzyka raka piersi/jajnika, wykonywanego u pacjentek spełniających kryteria dziedzicznego raka piersi, a u których nie wykryto mutacji założycielskich 5382insC, C61G, 4153delA. Analizy molekularne wykonywane są techniką Real-time PCR, z zastosowaniem sond Taqman.

Sekwencjonowanie genów *BRCA1* i *BRCA2*

Możliwości związane z wykorzystaniem techniki sekwencjonowanie nowej generacji (*Next Generation Sequencing*, NGS) pozwalają w uzasadnionych przypadkach na zbadania pełnej sekwencji genów *BRCA1* i *BRCA2*. Ze względów na dłuższy czas wykonania oraz wyższe koszty badanie NGS, najlepiej aby było wykonywane u pacjentów, u których wcześniej przeprowadzono test TWR i nie wykazano obecności żadnej z powtarzalnych mutacji *BRCA1/2*.

Mutacje genu *CHEK2*

Gen *CHEK2* będący ludzkim homologiem genu *Rad53* *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Cds1* *Schizosaccharomyces pombe* pełni istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego i naprawy DNA (62, 63). *CHEK2* znajduje się na chromosomie 22q12.1, obejmuje 54 091 pz i składa się z 17 eksonów; mRNA o długości 2547 nukleotydów koduje białko składające się z 543 aminokwasów (64).

Wyniki analiz pokazały, że u pacjentek z rakiem piersi występują ze zwiększoną częstością 4 mutacje genu *CHEK2*: 3 zmiany o charakterze skracającym białko (1100delC, IVS2+1G/A, del5395pz) oraz jedna mutacja zmiany sensu (I157T). Zmiany te występują z częstością ok. 6% w populacji polskiej. Zmiany skracające białko są związane z ponad 3-krotnym a zmiana I157T z 1,5-krotnym zwiększeniem ryzyka zachorowania na raka piersi (1). Bardzo istotne jest to, że w rodzinach z rakiem piersi u krewnych I/II^o mutacje skracające białko wiążą się z

aż 5-7 krotnym wzrostem ryzyka tego raka (1). Wysokie ryzyko raka piersi występuje również u homozygotycznych nosicieli mutacji genu *CHEK2* (65).

Podobnie jak w przypadku mutacji założycielskich genu *BRCA1*, również dla *CHEK2* opracowano szybki test diagnostyczny polegający na wykrywaniu 4 mutacji powtarzalnych w genie *CHEK2*: 1100delC, IVS2+1G/A, del5395pz i I157T. Analizy molekularne wykonywane są techniką Real-time PCR, z zastosowaniem sond Taqman, a także ASA-PCR i RFLP.

Mutacje genu *PALB2*.

Gen *PALB2* został sklonowany w 2006 roku (66), zlokalizowany jest na chromosomie 16p12.2, obejmuje 38 196 pz i składa się z 13 eksonów; mRNA o długości 3911 nukleotydów koduje białko składające się z 1186 aminokwasów (67). *PALB2* stabilizuje białko *BRCA2* i wraz z nim pełni istotną rolę w procesie naprawy DNA (66).

Wyniki badania opartego na analizie genomowej „exome sequencing” ujawniły w populacji polskiej obecność 2 mutacji założycielskich w genie *PALB2*: 509_510delGA oraz 172_175delTTGT (68). Analiza powyższych mutacji w dużej grupie kobiet, 12 529 z rakiem piersi oraz 4702 zdrowych, pokazała, że ich obecność wiąże się z 4,4 krotnym zwiększeniem ryzyka raka piersi, przy czym ryzyko to może być znacznie wyższe u pacjentek z rodzin z agregacją raka piersi (OR 6,34-22,7) (69). Ponadto, u nosicielek mutacji *PALB2* zaobserwowano częstsze występowanie większych guzów oraz gorsze rokowanie (68). Powyższy wynik pokazuje, że do pełnej analizy genetycznej wysokiego ryzyka raka piersi w Polsce należy oceniać oprócz mutacji założycielskich w genach *BRCA1*, *BRCA2* i *CHEK2*, również mutacje w genie *PALB2*.

Mutacje genu *RECQL*.

Związek mutacji w genie *RECQL* z wysokim ryzykiem raka piersi został niedawno zidentyfikowany przez naukowców z Polski i Kanady oraz działające niezależnie grupę uczonych z Chin (70, 71). Gen ten jest zlokalizowany na chromosomie 12p12, obejmuje 32 760pz i składa się z 16 eksonów; mRNA o długości 2341 nukleotydów koduje białko składające się z 649 aminokwasów (72, 73). Białko *RECQL* należy do rodziny RecQ helikaz DNA biorących udział m. in w procesach naprawy DNA, replikacji rekombinacji i transkrypcji

Wyniki analizy genu *RECQL* w dużej grupie pacjentek z rakiem piersi (13 136 z Polski oraz 538 z Kanady) wykazały, że nowo zidentyfikowane mutacje tego genu (c.1667_1667+3del AG w populacji polskiej oraz c.634C>T w Kanadzie) wiążą się z 5,5-11,5 krotnym w Polsce oraz 16-krotnym w Kanadzie zwiększeniem ryzyka raka piersi (70). Wyniki badania z Chin

opartego na analizie przypadków rodzinnych pokazały nawet ponad 30-krotne zwiększenie ryzyka raka piersi dla nosicielek mutacji genu *RECQL* - mutacje wykryto u 9 z 448 pacjentek z rodzin z agregacją raków piersi oraz 1 spośród 1588 osób zdrowych (70). Wyniki te pokazują jednoznacznie, że mutacje genu *RECQL* wiążą się z wysokim ryzykiem raka piersi i powinny zostać włączone do analizy molekularnej wysokiego ryzyka tego nowotworu w Polsce i na świecie.

Sekwencjonowanie nowej generacji – nowe zmiany genów związanych z ryzykiem raka piersi.

Wyniki najnowszych badań, w których wykorzystano sekwencjonowanie nowej generacji ujawniły, że oprócz mutacji założycielskich/powtarzalnych w genach *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* i *RECQL*, u pacjentek z rakiem piersi tzw. potrójnie ujemnym (ER, PR i HER ujemnym) oraz z rodzin z silną agregacją raków piersi można wykryć mutacje również w innych genach związanych z ryzykiem raka piersi, np. *ATM*, *BRIP1*, *BARD1*, *XRCC2* (68). Obecnie na rynku dostępne są oferty obejmujące sekwencjonowanie techniką NGS panelu nawet kilkudziesięciu innych genów. Niektóre z testów NGS oprócz analizy zmian typu substytucje, małe delecje/insercje umożliwiają równoczesowe wykrycie dużych rearanżacji w obrębie badanych genów, jak duże delecje/insercje.

Niezależnie od wykorzystywanej techniki analizy molekularnej czy też badanego genu/ów, zawsze należy uwzględnić przeprowadzenie powtórnej analizy molekularnej - badanie z drugiego niezależnego pobrania próbki do izolacji DNA, w celu wykluczenia wyników fałszywie dodatnich, a także fałszywie ujemnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Cybulski C, et al.: Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 2011, 29: 3747-52.
2. Armstrong AC, Evans GD. Management of women at high risk of breast cancer. *BMJ*. 2014.
3. Rainville IR, et al.: *Curr Oncol Rep* 2014, 16: 371.
4. Chamberlain JS, et al.: *BRCA1* maps proximal to D178579 on chromosome 17q21 by genetic analysis. *Am J Hum Genet* 1993, 52: 792-8.
5. Miki Y, et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 1994, 266: 66-71.
6. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BRCA1ID163ch17q21.html>
7. Wooster R, et al.: Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 1995, 378: 789-792.
8. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BRCA2ID164ch13q13.html>

9. Górski B, et al.: Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000, 66: 1963-8.
10. Grzybowska E, et al.: High frequency of recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Polish families with breast and ovarian cancer. *Hum Mut* 2000, 16: 482-90.
11. Sobczak K, et al.: Novel NRCA1 mutations and more frequent intron-20 alteration found among 236 women from Western Poland. *Oncogene* 1997, 15: 1773-9.
12. van der Looij M, et al.: Founder BRCA1 mutation and two novel germline BRCA2 mutations in breast and/or ovarian cancer families from North-Eastern Poland. *Hum Mutat* 2000, 15: 480-1.
13. Górski B, et al.: A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int J Cancer*. 2004, 110: 683-6.
14. Lubiński J, et al.: BRCA1-positive breast cancers in young women from Poland. *Breast Cancer Res Treat*. 2006, 99: 71-6.
15. Menkiszak J, et al.: Hereditary ovarian cancer in Poland. *Int J Cancer*. 2003, 106: 942-5.
16. Ratajska M, et al.: BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland. *Oncol Rep*. 2008, 19: 263-8.
17. Gaj P, et al.: High frequency of BRCA1 founder mutations in Polish women with nonfamilial breast cancer. *Fam Cancer* 2012, 11: 623-8.
18. Skasko E, et al.: Age at onset of bilateral breast cancer, the presence of hereditary BRCA1, BRCA2, CHEK2 gene mutations and positive family history of cancer. *Onkologie* 2009, 32: 182-8.
19. Jakubowska A, et al.: A high frequency of BRCA2 gene mutations in Polish families with ovarian and stomach cancer. *Eur J Hum Genet* 2003, 11: 955-8.
20. Jakubowska A, et al.: BRCA2 gene mutations In families with aggregations of breast and stomach cancers. *Br J Cancer* 2002, 87: 888-91.
21. Majdak EJ, et al.: Prognostic impact of BRCA1 pathogenic and BRCA1/BRCA2 unclassified variant mutations in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2005, 104: 1004-12.
22. Brozek I, et al.: Limited significance of family history for presence of BRCA1 gene mutation in Polish breast and ovarian cancer cases. *Fam Cancer* 2012, 11:351-4.
23. Perkowska M, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in breast-ovarian cancer families from north-eastern Poland. *Hum Mutat* 2003, 21: 553–554.
24. Brozek I, et al. High frequency of BRCA1/2 germline mutations in consecutive ovarian cancer patients in Poland. *Gynecol Oncol* 2008, 108: 433–437.
25. Skasko E et al.: The presence of hereditary BRCA1 gene mutations in women with familial breast or ovarian cancer and the frequency of occurrence of these tumours in their relatives. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004, 25: 470-4.
26. Kwiatkowska E, et al.: Novel BRCA2 mutation in a Polish family with hamartoma and two male breast cancers. *J Med Genet* 2002, 39: E35.
27. Kwiatkowska E, et al.: BRCA2 germline mutations in Male breast cancer patients in the Polish population. *Hum Mutat* 2001, 17: 73.
28. Jakubowska A, et al.: Detection of germline mutations in the BRCA1 gene by RNA-based sequencing. *Hum Mutat* 2001, 18: 149-56.
29. Jasinska A, Krzyzosiak WJ. Prevalence of BRCA1 founder mutations in western Poland. *Hum Mutat* 2001, 17: 75.
30. Grzybowska E, et al.: Germline mutations in the BRCA1 gene predisposing to breast and ovarian cancers in Upper Silesia population. *Acta Biochim Pol* 2002, 49 :351-6.
31. Magdalena Ratajska “Częstość występowania i kosegregacja wybranych mutacji genów BRCA1 i 2 w rodzinach z agregacją raka piersi”, rozprawa doktorska, Gdańsk 2010.
32. Bergthorsson JT, et al.: BRCA1 and BRCA2 mutation status and cancer family history of Danish women affected with multifocal or bilateral breast cancer at a young age. *J Med Genet* 2001, 38: 361-8.
33. Thomassen M, et al.: A BRCA2 mutation incorrectly mapped in the original BRCA2 reference sequence, is a common West Danish founder mutation disrupting mRNA splicing. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 128: 179-85.
34. Thomassen M, et al.: BRCA1 and BRCA2 mutations in Danish families with hereditary breast and/or ovarian cancer. *Acta Oncol* 2008, 47: 772-7.
35. Soegaard M, et al.: BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence and clinical characteristics of a population-based series of ovarian cancer cases from Denmark. *Clin Cancer Res* 2008, 14: 3761-7.
36. Thomassen M, et al.: BRCA1 and BRCA2 mutations in Danish families with hereditary breast and/or ovarian cancer. *Acta Oncol* 2008, 47: 772-7.
37. Hansen TV, et al.: Identification of a novel BRCA1 nucleotide 4803delCC/c.4684delCC mutation and a nucleotide 249T>A/c.130T>A (p.Cys44Ser) mutation in two Greenlandic Inuit families: implications for

- genetic screening of Greenlandic Inuit families with high risk for breast and/or ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010, 124: 259-64.
38. Hansen TV, et al.: Screening of 1331 Danish breast and/or ovarian cancer families identified 40 novel BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer* 2011, 10: 207-12.
 39. Tamboom K, et al.: BRCA1 mutations in women with familial or early-onset breast cancer and BRCA2 mutations in familial cancer in Estonia. *Hered Cancer Clin Pract* 2010, 8: 4.
 40. Eerola H, et al.: Survival of breast cancer patients in BRCA1, BRCA2, and non-BRCA1/2 breast cancer families: a relative survival analysis from Finland. *Int J Cancer* 2001, 93: 368-72.
 41. Hartikainen JM, et al.: Screening for BRCA1 and BRCA2 mutations in Eastern Finnish breast/ovarian cancer families. *Clin Genet* 2007, 72: 311-20.
 42. Gronwald J, et al.: High incidence of 4153delA BRCA1 gene mutations in Lithuanian breast- and breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 2005, 94: 111-3.
 43. Elsakov P, et al.: The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast and ovarian cancer in Lithuania. *Clin Genet* 201, 78: 373-6.
 44. Csokay B, et al.: Strong founder effects in BRCA1 mutation carrier breast cancer patients from Latvia. Mutation in brief no. 258. Online. *Hum Mutat* 1999, 14: 92.
 45. Gardovskis A, et al.: Clinical, molecular and geographical features of hereditary breast/ovarian cancer in Latvia. *Hered Cancer Clin Pract* 2005, 3: 71-6.
 46. Vanags A, et al.: Population screening for hereditary and familial cancer syndromes in Valka district of Latvia. *Hered Cancer Clin Pract* 2010, 8: 8.
 47. Meindl A et al.: German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. *Int J Cancer* 2002, 97: 472-80.
 48. Tereschenko IV, et al.: BRCA1 and BRCA2 mutations in Russian familial breast cancer. *Hum Mutat* 2002, 19: 184.
 49. Sokolenko AP, et al.: Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia. *Fam Cancer* 2007, 6: 281-6.
 50. Suspitsin EN, et al.: High frequency of BRCA1, but not CHEK2 or NBS1 (NBN), founder mutations in Russian ovarian cancer patients. *Hered Cancer Clin Pract* 2009, 7: 5.
 51. Iyevleva AG, et al.: Non-founder BRCA1 mutations in Russian breast cancer patients. *Cancer Lett* 2010, 298: 258-63.
 52. Håkansson S, et al.: Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 1997, 60: 1068-78.
 53. Zelada-Hedman M, et al.: A screening for BRCA1 mutations in breast and breast-ovarian cancer families from the Stockholm region. *Cancer Res* 1997, 57: 2474-7.
 54. Chen J, et al.: BRCA2 germline mutations in Swedish breast cancer families. *Eur J Hum Genet* 1998, 6: 134-9.
 55. Arver B, et al.: BRCA1 screening in patients with a family history of breast or ovarian cancer. *Genet Test* 1999, 3: 223-6.
 56. Arver B, et al.: First BRCA1 and BRCA2 gene testing implemented in the health care system of Stockholm. *Genet Test* 2001, 5: 1-8.
 57. Einbeigi Z, et al.: A founder mutation of the BRCA1 gene in Western Sweden associated with a high incidence of breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2001, 37: 1904-9.
 58. Malander S, et al.: One in 10 ovarian cancer patients carry germ line BRCA1 or BRCA2 mutations: results of a prospective study in Southern Sweden. *Eur J Cancer* 2004, 40: 422-8.
 59. Bergman A, et al.: A high frequency of germline BRCA1/2 mutations in western Sweden detected with complementary screening techniques. *Fam Cancer* 2005, 4: 89-96.
 60. Einbeigi Z, et al.: BRCA1 gene mutations may explain more than 80% of excess number of ovarian cancer cases after breast cancer - a population based study from the Western Sweden Health Care region. *Acta Oncol* 2010, 49: 361-7.
 61. Margolin S, et al.: BRCA1 mutations in a population-based study of breast cancer in Stockholm County. *Genet Test* 2004, 8: 127-3.
 62. Matsuoka S, et al.: Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 1998, 282: 1893-1897.
 63. Chaturvedi P, et al.: Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* 1999, 18: 4047-4054.
 64. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CHEK2ID312.html>
 65. Cybulski C, et al.: Effect of CHEK2 missense variant I157T on the risk of breast cancer in carriers of other CHEK2 or BRCA1 mutations. *J Med Genet* 2009, 46: 132-5.

66. Xia B, et al.: Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molec Cell* 2006, 22: 719-729.
67. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_PALB2.html
68. Cybulski C, Lubiński J, Wokołorczyk D, Kuźniak W, Kashyap A, Sopik V, Huzarski T, Gronwald J, Byrski T, Szwiec M, Jakubowska A, Górski B, Dębniak T, Narod SA, Akbari MR. Mutations predisposing to breast cancer in 12 candidate genes in breast cancer patients from Poland. *Clin Genet*. 2015; 88(4): 366-70.
69. Cybulski C, Kluźniak W, Huzarski T, Wokołorczyk D, Kashyap A, Jakubowska A, Szwiec M, Byrski T, Dębniak T, Górski B, Sopik V, Akbari MR, Sun P, Gronwald J, Narod SA, Lubiński J; Polish Hereditary Breast Cancer Consortium. Clinical outcomes in women with breast cancer and a PALB2 mutation: a prospective cohort analysis. *Lancet Oncol*. 2015; 16(6): 638-44
70. Cybulski C, Carrot-Zhang J, Kluźniak W, Rivera B, Kashyap A, Wokołorczyk D, Giroux S, Nadaf J, Hamel N, Zhang S, Huzarski T, Gronwald J, Byrski T, Szwiec M, Jakubowska A, Rudnicka H, Lener M, Masojć B, Tonin PN, Rousseau F, Górski B, Dębniak T, Majewski J, Lubiński J, Foulkes WD, Narod SA, Akbari MR. Germline RECQL mutations are associated with breast cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2015; 47(6): 643-6.
71. Sun J, Wang Y, Xia Y, Xu Y, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Lou H, Xie Y. Mutations in RECQL Gene Are Associated with Predisposition to Breast Cancer. *PLoS Genet*. 2015; 11(5): e1005228.
72. Seki M, Miyazawa H, Tada S, Yanagisawa J, Yamaoka T, Hoshino S, Ozawa K, Eki T, Nogami M, Okumura K, Taguchi H, Hanaoka F, Enomoto T. Molecular cloning of cDNA encoding human DNA helicase Q1 which has homology to Escherichia coli Rec Q helicase and localization of the gene at chromosome 12p12. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22(22): 4566-73.
73. Puranam KL, Blackshear PJ. Cloning and characterization of RECQL, a potential human homologue of the Escherichia coli DNA helicase RecQ. *J Biol Chem*. 1994; 269(47): 29838-45.
74. Sharma S, Doherty KM, Brosh RM Jr. Mechanisms of RecQ helicases in pathways of DNA metabolism and maintenance of genomic stability. *Biochem J*. 2006; 398(3): 319-37



**Testy DNA wysokiego ryzyka raka jelita
grubego w Polsce**

DNA testing of high colorectal cancer risk in Poland

Streszczenie

W diagnozowaniu predyspozycji do dziedzicznego raka jelita grubego (RJG), będącego wynikiem dziedziczenia pojedynczych mutacji związanych z wysokim ryzykiem RJG stosuje się techniki w kolejności odpowiedniej by wykrywać mutacje jak najskuteczniej jak najmniejszym kosztem. Podstawowym kryterium kwalifikacji do wykonania testów DNA są dane rodowodowo-kliniczne. W pierwszej kolejności wykrywa się mutacje z wykorzystaniem testów opartych o wykrywanie najczęstszych zmian powtarzalnych. W drugiej kolejności wykonuje się analizę rearanzacji, a następnie pełną analizę genów za pomocą DHPLC i/lub sekwencjonowania DNA. Wysokie ryzyko nowotworów jelita grubego można wykryć również na podstawie oceny akumulacji zmian DNA, które pojedynczo, ryzyko guzów jelita zwiększają w niewielkim stopniu.

Słowa kluczowe: Rak jelita grubego, testy DNA

Summary

In diagnosis of predisposition to hereditary colorectal cancer (CRC) resulting from inheritance of single mutations associated with high risk of CRC it is appropriate to apply techniques in order allowing the highest cost-effectiveness of carrier detection. The basic criteria for the implementation of DNA testing are pedigree and clinical data. Testing based on analysis of recurrent mutations should be performed as the first. Then, it is appropriate to analyse occurrence of large rearrangements and finally DHPLC and/or sequencing. High risk of colorectal neoplasias can be detected as well by analysis of cumulation in one person of a few low-risk genetic markers.

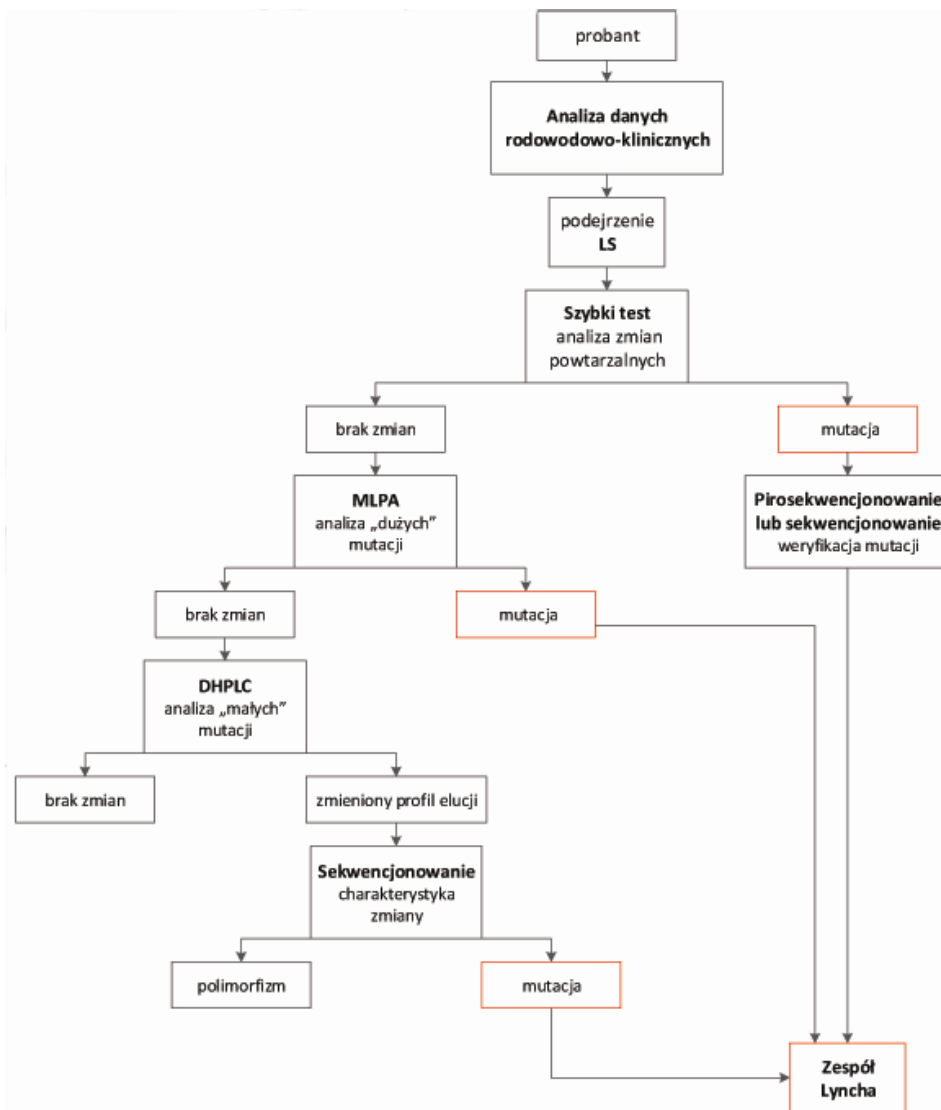
Key words: Hereditary colorectal cancer, DNA test

Podstawowym kryterium kwalifikacji do wykonania testów DNA w kierunku dziedzicznego raka jelita grubego (RJG) są dane rodowodowo-kliniczne. W przypadku dostępności tkanki z guza wskazane jest wykonanie jako pierwszej immunohistochemicznej oceny ekspresji genów *MLH1*, *MSH2* i *MSH6*, co w przypadku braku ekspresji jednego z białek mogłoby kierować postępowaniem diagnostycznym.

W pierwszej kolejności stosuje się techniki pozwalające na najtańsze diagnozowanie nosicieli mutacji – test wykrywania mutacji powtarzalnych i MLPA umożliwiającą wykrycie rearanżacji genów. W przypadku niewykrycia mutacji wspomnianymi metodami wykonuje się analizę 56 fragmentów genów *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* za pomocą DHPLC lub i sekwencjonowania DNA.

Testy oparte o ocenę mutacji powtarzalnych w genach MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*)

Coraz więcej wiadomo o rodzaju i częstości mutacji predysponujących do nowotworów. W Polsce takie geny jak *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, których mutacje stanowią największy odsetek znanych przyczyn zachorowań na dziedzicznego RJG, doczekały się opracowań populacyjnych, na podstawie których wiadomo, jakich mutacji można się spodziewać i w jakich miejscach genów. Według zebranych danych, 90% mutacji w polskich rodzinach z zespołem Lyncha (LS) stanowią „małe mutacje” (mutacje dotyczące kilku-kilkunastu nukleotydów) (Kurzawski i wsp. 2006), które w 70% mają charakter powtarzalny (Dymerska i wsp. 2014). (Mutacje powtarzalne to takie mutacje, które pojawiły się w minimum dwóch polskich rodzinach, lub tylko jednej, jednak są powtarzalne na świecie). Rozwój metod wykrywania znanych mutacji otwiera perspektywę nowego podejścia w diagnozowaniu dziedzicznego RJG głównie ze względu na niezwykle wysoką efektywność ekonomiczną. Według naszych danych wykrywanie 20 najczęstszych mutacji odpowiedzialnych za LS (w genie *MLH1*: c.67delG; c.83C>T; c.184C>T; c.199G>A; c.332C>T; c.545+3A>G; c.546-2A>G; c.677G>A; c.677G>T; c.1252_1253delGA; c.1489_1490insC; c.1731G>A; c.2041G>A; c.2059C>T; w genie *MSH2*: c.942+3A>T; c.1204C>T; c.1215C>A; c.1216C>T; c.2210+1G>C; w genie *MSH6*: c.3959_3962delCAAG) pozwala wykrywać około 50% wszystkich nosicieli mutacji. Analizę DNA wykonuje się zgodnie z algorytmem przedstawionym na rycinie 1.



Ryc 1. Algorytm diagnostyczny badania zmian w genach *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, związanych z zespołem Lyncha

Testy oparte o ocenę mutacji powtarzalnych w genie *APC*

Przy podejrzeniu rodzinnej polipowatości jelita grubego (FAP) pełną analizę genu *APC* poprzedza się badaniem mutacji powtarzalnych. Według danych uzyskanych przez badaczy Pławski i wsp. w 80% polskich rodzin z FAP wykrywa się „małe mutacje”, w tym w 44% z nich to mutacje powtarzalne (Pławski i wsp. 2007), czyli takie, które wystąpiły w przynajmniej dwóch polskich rodzinach. Analiza siedmiu mutacji pozwala wykrywać około 40% wszystkich nosicieli mutacji.

MLPA genów MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) oraz genu *EPCAM*

Technika MLPA (*multiplex ligation dependent probe amplification*) jest obecnie jedną z podstawowych technik wykrywania rearanżacji w różnych genach, w tym także w genach MMR, a także badania amplifikacji fragmentów genomu (Schouten i wsp. 2002) w naszym laboratorium. Mutacje w genach MMR wykrywane testem MLPA stanowią około 10% wszystkich mutacji w rodzinach z LS (Kurzawski i wsp. 2006). W przypadku wyniku negatywnego celowe wydaje się wykonanie testu na obecność mutacji w genie *EpCAM*. Mutacja ostatnich eksonów genu *EpCAM* może prowadzić do inaktywacji genu za nim leżącego - *MSH2* (Dymerska i wsp. 2017).

DHPLC i/lub sekwencjonowanie DNA

W przypadku niewykrycia mutacji wspomnianymi metodami wykonuje się pełną analizę 56 fragmentów kodujących w genach *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* metodą DHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*), co zapewnia efektywny screening przy zachowaniu stosunkowo niewielkich kosztów analizy (Kurzawski i wsp. 2002). Wykryte zmiany profilu elucji charakteryzuje się przy pomocy sekwencjonowania DNA. Każdą wykrytą mutację weryfikuje się z dwóch niezależnych pobrań krwi.

Kumulacja markerów genetycznych niskiego ryzyka

W naszym ośrodku zgenotypowano 3059 zdrowych osób w wieku 54-65 z negatywną historią rodzinną pod względem RJG. Spośród markerów nieznacznie zwiększonego ryzyka zidentyfikowano pięć (rs2066847 - *NOD2* c.3020insC, rs6983267, rs4779584, rs3802842, rs4939827), z których każdy pojedynczo związany był ze wzrostem 17-59% ryzyka tzw. zaawansowanego nowotworu jelita grubego (*advanced colorectal neoplasias*, ACN) - rak, gruczolak kosmkowy, dysplazja wysokiego stopnia lub gruczolak cewkowy o średnicy co najmniej 10mm. Stwierdzono, że wystąpienie u pacjenta trzech lub więcej zmian związanych ze zwiększonym ryzykiem powoduje wzrost ryzyka ACN o 3,6-krotne. Czulość omawianego testu w wykrywaniu ACN wynosi około 15% (Kurlapska i wsp. 2014).

PIŚMIENNICTWO

Dymerska D, Kurzawski G, Suchy J, Roomere H, Toome K, Metspalu A, Janavičius R, Elsakov P, Irmejs A, Berzina D, Miklaševičs E, Gardovskis J, Rebane E, Kelve M, Kładny J, Huzarski T, Gronwald J, Dębniak T, Byrski T, Stembalska A, Surdyka D, Siołek M, Szwiec M, Banaszkiwicz Z, Wiśniowski R, Kilar E, Scott RJ, Lubiński J: Lynch syndrome mutations shared by the Baltic States and Poland. *Clin Genet* 2014;6(2):190-193
Dymerska D, Gołębowska K, Kuświk M, Rudnicka H, Scott RJ, Billings R, Pławski A, Boruń P, Siołek M, Kozak-Klonowska B, Szwiec M, Kilar E, Huzarski T, Byrski T, Lubiński J, Kurzawski G: New *EPCAM* founder deletion in Polish population. *Clin Genet*, 92:649-653, 2017

Kurzawski G, Suchy J, Lener M, Kłujso-Grabowska E, Kładny J, Safranow K, Jakubowska K, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Dębniak T, Cybulski C, Gronwald J, Oszurek O, Oszutowska D, Kowalska E, Goźdz S, Niepsuj S, Słomski R, Pławski A, Łącka-Wojciechowska A, Rozmiarek A, Fiszer-Maliszewska Ł, Bębenek M, Sorokin D, Szaśiadek M, Stembalska A, Grzebieniak Z, Kilar E, Stawicka M, Godlewski D, Richter P, Brożek I, Wysocka B, Limon J, Jawień A, Banaszkiwicz Z, Janiszewska H, Kowalczyk J, Czudowska D, Scott RJ, Lubiński J: Germline *MSH2* and *MLH1* mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study). *Clin Genet* 2006; 69:40-47

Kurlapska A, Serrano-Fernández P, Baszuk P, Gupta S, Starzyńska T, Małęcka-Panas E, Dąbrowski A, Dębniak T, Kurzawski G, Suchy J, Rogoza-Mateja W, Scott RJ, Lubiński J: Cumulative effects of genetic markers and the detection of advanced colorectal neoplasias by population screening. *Clin Genet* 2014;doi:10.1111/cge.12481.

Kurzawski G, Safranow K, Suchy J, Chlubek D, Scott RJ, Lubiński J: Mutation analysis of *MLH1* and *MSH2* genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2002;51(1):89-100

Pławski A, Podralska M, Słomski R: Recurrent mutations in Polish FAP families. *Heredit Cancer Clin Pract* 2007, 5:195-198

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G.: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 15;30:e57

*Wojciech Kluźniak , Dominika Wokołorczyk , Aniruddh Kashyap, Jan Lubiński,
Cezary Cybulski*



Testy DNA wysokiego ryzyka raka prostaty w Polsce

DNA testing of high prostate cancer risk in Poland

Streszczenie

W ostatnich 10 latach w polskiej populacji zidentyfikowaliśmy szereg mutacji, związanych z wysokim ryzykiem raka stercza i opracowaliśmy test wysokiego ryzyka raka prostaty (TWR-PR). Oparty jest o wykrywanie 7 mutacji w genach NBS1(657del5), CHK2(IVS2+1G>A, del5395, 1100delC, I157T), HOXB13(G84E) i regionie 8q24(rs188140481). Ryzyko raka prostaty u nosicieli jednej z powyższych siedmiu zmian DNA jest wysokie, gdy w ich rodzinie występowało co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty u krewnych I i/lub II stopnia. Ryzyko zachorowania jest zwiększone 3 - 8 krotnie, co odpowiada wysokiemu prawdopodobieństwu (od 24% do 64%) zachorowania na raka prostaty do 85 roku życia. Łącznie częstość populacyjna tych zmian DNA w polskiej populacji wynosi 7%, a w przypadkach rodzinnych agregacji tego nowotworu wynosi około 20%. Test TWR-PR określa nową grupę wysokiego ryzyka - mężczyzn z co najmniej jednym zachorowaniem na raka prostaty w rodzinie, u których wykrywa się specyficzne zmiany genetyczne. Opracowanie testu stwarza możliwość szybkiej diagnostyki genetycznej wysokiego ryzyka raka stercza w polskiej populacji.

Słowa kluczowe: TWR-PR, NBS1, CHK2, HOXB13, 8q24, rak prostaty, diagnostyka

Summary

In the last 10 years we identified a number of mutations in the Polish population associated with high-risk prostate cancer (PC) and developed a high-risk PC test (TWR-PR). It is based on the detection of 7 mutations in NBS1 (657del5), CHEK2 (IVS2 + 1G>A, del5395, 1100delC, I157T), HOXB13 (G84E) and 8q24 region (rs188140481). Risk of PC in carriers of one of these seven DNA variants is high, when they report a positive family of prostate cancer in at least one or more I or II degree relatives. The risk of prostate cancer is increased by 3 - 8 fold, which corresponds to a high lifetime risk (from 24% to 64%) of prostate cancer to age of 85 years. These seven founder alleles have a combined prevalence of 7.0% in the Polish population. One of these seven alleles is present in 20% of men with familial prostate cancer. TWR-PR test defines a new high risk group - men with at least one relative of prostate cancer in the family, who test positive for one of the seven founder prostate cancer risk variants. Development of this test offers the opportunity for rapid diagnosis of high risk of prostate cancer in the Polish population.

Key words: TWR-PR, NBS1, CHEK2, HOXB13, 8q24, prostate cancer, diagnostics

W ostatnich 10 latach w polskiej populacji zidentyfikowaliśmy szereg mutacji, związanych z wysokim ryzykiem raka stercza i opracowaliśmy test wysokiego ryzyka raka prostaty (TWR-PR) oparty o wykrywanie 7 mutacji: (1) mutacji 657del5 genu NBS1, 2) mutacji IVS2+1G>A genu CHEK2, 3) mutacji del5395 genu CHEK2, 4) mutacji 1100delC genu CHEK2, 5) mutacji I157T genu CHEK2, 6) mutacji G84E genu HOXB13, 7) allele A polimorfizmu pojedynczego nukleotydu rs188140481 w regionie 8q24.

Mutacja 657del5 genu NBS1 występuje z częstością około 0,6% w naszej populacji, a więc w Polsce żyje około 250 000 nosicieli tej mutacji. U mężczyzny, u którego w rodzinie występowało co najmniej jedno zachorowanie na raka stercza u krewnych I lub II stopnia nosicielstwo mutacji 657del5 genu NBS1 wiąże się z 4,5-krotnie zwiększonym ryzykiem raka stercza, co odpowiada około 36% ryzyku zachorowania na raka prostaty do 85 roku życia w naszej populacji [1].

W polskiej populacji występują cztery częste powtarzalne mutacje w obrębie genu CHEK2 (IVS2+1G>A, del5395, 1100delC, I157T). Mutacje te łącznie występują z wysoką częstością 6% w naszej populacji, a więc w Polsce żyje około 2,5 mln nosicieli mutacji genu CHEK2.

U mężczyzny, u którego w rodzinie występowało co najmniej jedno zachorowanie na raka stercza u krewnych I lub II stopnia nosicielstwo jednej z czterech mutacji genu CHEK2 (del5395 lub 1100delC lub IVS2+1G>A lub I157T) wiąże się z około 3-krotnie zwiększonym ryzykiem raka stercza, co odpowiada około 24% ryzyku zachorowania na raka prostaty [2]. Wyniki najnowszych badań na grupie 2907 mężczyzn z populacji polskiej, u których wykonano badania przesiewowe raka prostaty wykazały, że szczególnie efektywne jest wykrywanie wczesnego raka prostaty za pomocą PSA u nosicieli mutacji CHEK2 I157T. Zwiększone ryzyko dotyczyło zwłaszcza nosicieli tej mutacji w wieku 40-60 lat (OR=5,5, p =0.001) i mężczyzn z rakiem prostaty wśród krewnych (OR = 3,2, p = 0.0004) [2].

Mutacja G84E genu HOXB13 występuje w Polsce z częstością około 0.12%, a więc w Polsce żyje około 24 000 nosicieli tej zmiany DNA. U mężczyzny, u którego w rodzinie występowało co najmniej jedno zachorowanie na raka stercza u krewnych I lub II stopnia nosicielstwo mutacji G84E genu HOXB13 wiąże się 8-krotnie zwiększonym ryzykiem raka prostaty, co odpowiada około 64% ryzyku zachorowania na raka prostaty [3].

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu rs188140481 (allele A) w populacji polskiej występuje z częstością 0.4%, a więc w Polsce żyje około 80 000 nosicieli tego allele. U mężczyzny, u którego w rodzinie występowało co najmniej jedno zachorowanie na raka stercza u krewnych I lub II stopnia nosicielstwo allele A wiąże się z około 5,4 - krotnie zwiększonym

ryzykiem raka prostaty, co odpowiada około 43% ryzyku zachorowania na raka stercza w ciągu życia [4].

W podsumowaniu, ryzyko raka prostaty u nosicieli jednej z powyższych siedmiu zmian DNA jest wysokie, gdy w ich rodzinie występowało co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty u krewnych I i/lub II stopnia. Wówczas ryzyko zachorowania jest zwiększone 3 - 8 krotnie, co odpowiada wysokiemu prawdopodobieństwu, od 24% do 64%, zachorowania na raka prostaty do 85 roku życia. Łącznie częstość populacyjna tych zmian DNA (składowych panelu wysokiego ryzyka) w polskiej populacji wynosi 7%, a w przypadkach rodzinnych agregacji tego nowotworu wynosi około 20%.


Test TWR-PR identyfikuje wysokie genetycznie uwarunkowane ryzyko raka gruczołu krokowego mężczyzny, u którego w rodzinie stwierdzono jedno lub więcej zachorowań na ten nowotwór. Ogromną zaletą testu jest to, iż określa on nową grupę wysokiego ryzyka - mężczyzn z co najmniej jednym zachorowaniem na raka prostaty w rodzinie, u których wykrywa się specyficzne zmiany genetyczne (mutacje DNA z panelu TWR-PR). Szacujemy, że za pomocą testu u około 20% zdrowych mężczyzn z dodatnim wywiadem rodzinnym zostanie wykryte wysokie genetycznie uwarunkowane ryzyko raka prostaty. W Polsce żyje około 200 tysięcy mężczyzn z tak zdefiniowanym wysokim ryzykiem raka stercza.

Opracowanie testu stwarza możliwość szybkiej diagnostyki genetycznej opartej o identyfikację zmian DNA. Koszt testu opartego o wykrywanie wybranych mutacji charakterystycznych dla polskiej populacji jest wielokrotnie mniejszy niż koszt pełnej analizy sekwencji genów.

PIŚMIENNICTWO

1. Cybulski C, Wokołorczyk D, Kluźniak W, et al. An inherited NBN mutation is associated with poor prognosis prostate cancer. *Br J Cancer*. 2013, 108:461–468.
2. Cybulski C, Wokołorczyk D, Kluźniak W, Kashyap A, et al. A personalised approach to prostate cancer screening based on genotyping of risk founder alleles. *Br J Cancer*. 2013, 108:2601–2609.
3. Kluźniak W, Wokołorczyk D, Kashyap A, et al. The G84E mutation in the HOXB13 gene is associated with an increased risk of prostate cancer in Poland. *Prostate*. 2013, 73:542–548.
4. Antczak A, Wokołorczyk D, Kluźniak W, Kashyap A, et al. The variant allele of the rs188140481 polymorphism confers a moderate increase in the risk of prostate cancer in Polish men. *Eur J Cancer Prev*. 2014 Sep 2

*Grzegorz Kurzawski, Janina Suchy, Cezary Cybulski, Tadeusz Dębniak, Bohdan Górski,
Marcin Lener, Tomasz Huzarski, Joanna Trubicka, Anna Janicka, Jolanta Szymańska-
Pasternak, Jan Lubiński*



Testy DNA umiarkowanie zwiększonego ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe

**DNA tests for variants conferring low or moderate
increase in the risk of cancer**

Streszczenie

U większości nosicieli zmian DNA umiarkowanie podwyższających ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe nie stwierdza się agregacji nowotworów w rodzinie. W tych sytuacjach zastosowanie testów DNA jest trudną do zastąpienia metodą wykrywania zwiększonej genetycznej predyspozycji do nowotworów. Jak dotąd nie ustalono efektywności medycznej i ekonomicznej dla testów wykrywających zmiany DNA umiarkowanie podwyższające ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe. Niemniej jednak wykonywanie tych testów jako opcji postępowania diagnostycznego należy rozważyć u wszystkich dorosłych niezależnie od nowotworowego wywiadu rodzinnego.

Słowa kluczowe: test DNA, zmiany umiarkowanie zwiększonego ryzyka

Summary

Most carriers of DNA variants conferring a low or moderate increase in the risk of cancer development report a negative family history of cancer. DNA testing seems to be irreplaceable way of identification of an increased genetic susceptibility to tumor development in these patients. The medical and economic effectiveness of DNA testing for variants conferring low or moderate increase in the risk of cancer is not established. However, such testing should be considered as an option for all adults independently on family history of cancer.

Key words: DNA tests, moderate risk changes

TEST OPARTY O WYKRYWANIE MUTACJI 3020INSC GENU *NOD2*

Zmiana 3020insC w obrębie genu *NOD2* zwiększa ryzyko zachorowania na:

- raka piersi DCIS w wieku poniżej 50 r.ż. ok. 5-krotnie
- mutacja ta występuje w ok. 8% wszystkich raków piersi;
- raka jelita grubego ponad 2-krotnie w wieku powyżej 60 r.ż. - mutacja ta występuje w ok. 15% wszystkich raków jelita grubego;
- raka płuc ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 12% wszystkich raków płuc;
- raka jajnika ok. 1,5-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 11% wszystkich raków jajnika (1).

Zalecenia dla nosicieli zmiany 3020insC w obrębie genu *NOD2* proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi;
- badania lekarskie piersi od 20 r.ż. 1 x 6 miesięcy;
- USG piersi od 20 r.ż. 1 x rok;
- mammografia od 35 r.ż. 1 x rok naprzemiennie z USG piersi;
- USG dopochwowe narządu rodno od 45 r.ż. 1 x rok;
- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż., co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych;
- bezwzględny zakaz palenia papierosów, dieta bogata w warzywa i owoce.

Zalecenia dla mężczyzn:

- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż., co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych;
- bezwzględny zakaz palenia papierosów, dieta bogata w warzywa i owoce.

TEST OPARTY O WYKRYWANIE MUTACJI 1100DELC, IVS2+1G>A, DEL5395, I157T GENU *CHEK2*

Zmiany skracające białko *CHEK2* (1100delC i IVS2+1G>A, del5395) zwiększają ryzyko zachorowania na:

- raka piersi (częściej rak zrazikowy) ok. 2,4-krotnie - mutacje te występują w ok. 2,5% wszystkich raków piersi; ok. 5-krotnie gdy w rodowodzie wystąpił rak piersi wśród krewnych I° lub II°.

- raka prostaty ok. 2,3-krotnie - mutacje te występują w ok. 2,5% wszystkich raków prostaty oraz ok. 5% rodzinnych raków prostaty; ryzyko raka prostaty jest zwiększone około 5-krotnie, jeśli w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I°;
- raka brodawkowego tarczycy - ok. 5-krotnie – mutacje te występują w ok. 4% wszystkich raków brodawkowatych tarczycy (2, 3, 4).

Zmiana typu „missense” I157T w obrębie genu *CHEK2* zwiększa ryzyko zachorowania na:

- raka piersi ok. 1,5-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 7% raków piersi;
- raka prostaty ok. 1,6-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 8% wszystkich raków prostaty oraz ok. 12% rodzinnych raków prostaty; ryzyko raka prostaty jest zwiększone około 3-krotnie gdy w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I°;
- raka brodawkowatego tarczycy ok. 2-krotnie – mutacja ta występuje w ok. 9% raków tarczycy;
- raka nerki ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 10% raków nerki;
- raka jelita grubego ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 10% raków jelita grubego (2, 3, 4);
- raka jajnika o niskim stopniu morfologicznej złośliwości ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 10% raków jajnika G1; oraz nowotworów jajnika o granicznej złośliwości ok. 2,5-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 11,5% nowotworów jajnika o granicznej złośliwości (5).

Zalecenia dla nosicieli zmian skracających białko CHEK2 (1100delC i IVS2+1G>A, del5395) proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi;
- badania lekarskie piersi od 25 r.ż., 1 x 6 miesięcy;
- USG piersi od 25 r.ż., 1 x rok;
- mammografia od 35 r.ż., 1 x rok, naprzemiennie z USG piersi;
- gastroskopia od 40 r.ż., 1 x rok.
- USG tarczycy od 20 r.ż., 1 x rok.

Zalecenia dla mężczyzn:

- badanie palpacyjne prostaty, PSA od 50 r.ż. 1 x rok;
- do rozważenia biopsja saturacyjna po 60 r.ż. – jeśli w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I°.
- gastroskopia od 40 r.ż., 1 x rok.

Zalecenia dla nosicieli zmiany I157T w obrębie genu *CHEK2* proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi;
- badania lekarskie piersi od 40 r.ż., 1 x 6 miesięcy;
- USG piersi od 40 r.ż., 1 x rok;
- rezonans magnetyczny piersi ewentualnie mammografia od 40 r.ż., 1 x rok naprzemiennie z USG piersi;
- USG dopochwowe narządu rodowego od 25 r.ż., 1 x rok;
- USG jamy brzusznej od 40 r.ż., 1 x rok ze szczególnym zwróceniem uwagi na nerki;
- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż., co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych;
- USG tarczycy od 20 r.ż., 1 x rok.

Zalecenia dla mężczyzn:

- USG jamy brzusznej, od 40 r.ż., 1 x rok ze szczególnym zwróceniem uwagi na nerki;
- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż., co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych;
- badanie palpacyjne prostaty, PSA od 50 r.ż., 1 x rok;
- do rozważenia biopsja saturacyjna prostaty po 60 r.ż. - tylko, jeśli w rodowodzie jest rak prostaty wśród krewnych I°.

TEST OPARTY O WYKRYWANIE MUTACJI 657DEL5 GENU *NBS1*

Zmiana 657del5 w obrębie genu *NBS1* zwiększa ryzyko zachorowania na:

- raka piersi ok. 2-krotnie; mutacja ta występuje w ok. 1% wszystkich raków piersi;
- raka prostaty ok. 4-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 3% wszystkich raków prostaty i ok. 9% rodzinnych raków prostaty; ryzyko raka prostaty jest zwiększone około 15-krotnie, jeśli w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I° (6),
- raka trzustki ok. 4-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 2% wszystkich raków trzustki (13).

Zalecenia dla nosicieli zmiany 657del5 w obrębie genu *NBS1* proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi;

- badania lekarskie piersi od 30 r.ż. 1 x 6 miesięcy;
- USG piersi od 30 r.ż., 1 x rok;
- mammografia od 35 r.ż., 1 x rok naprzemiennie z USG piersi.

Zalecenia dla mężczyzn:

- badanie palpacyjne prostaty, PSA od 50 r.ż. 1 x rok;
- do rozważenia biopsja saturacyjna po 60 r.ż. – jeśli w rodowodzie jest rak prostaty wśród krewnych I^o.
- USG jamy brzusznej od 45 r.ż., 1 x rok
- TK jamy brzusznej od 45 r.ż., 1x 3 lata

TEST OPARTY O WYKRYWANIE ZMIANY A148T GENU *CDKN2A* (P16)

Zmiana A148T w obrębie genu *CDKN2A* (p16) zwiększa ryzyko zachorowania na:

- czerniaka złośliwego ok. 2-krotnie - mutacja występuje w około 7% wszystkich czerniaków złośliwych;
- raka piersi (częściej DCIS) poniżej 50. roku życia ok. 1,5-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 5% raków piersi poniżej 50. roku życia;
- raka płuc ok. 2-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 7% wszystkich raków płuc;
- raka jelita grubego ok. 1,5-krotnie - mutacja ta występuje w ok. 5% wszystkich raków jelita grubego (7, 8, 9).

Zalecenia dla nosicieli zmiany A148T w obrębie genu *CDKN2A* proponowane jako opcja postępowania medycznego:

Zalecenia dla kobiet:

- systematyczna samokontrola piersi;
- badania lekarskie piersi od 20 r.ż., 1 x 6 miesięcy;
- USG piersi od 20 r.ż., 1 x rok;
- mammografia od 35 r.ż., 1 x rok naprzemiennie z USG piersi;
- USG jamy brzusznej od 50 r.ż., 1 x rok;
- TK jamy brzusznej od 50 r.ż., 1 x 3 lata
- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż., co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych;
- bezwzględny zakaz palenia papierosów, dieta bogata w warzywa i owoce;
- unikanie nadmiernej ekspozycji na słońce/inne źródła promieniowania UV; stosowanie filtrów przeciwsłonecznych o wysokim (30 i więcej) współczynniku fotoprotekcji;

- w przypadku stwierdzenia znamion wykazujących następujące zaburzenia: powiększenie się, zmiana zabarwienia, świąd, obwódka zapalna, sączenie, krwawienie - natychmiastowa konsultacja u dermatologa.

Zalecenia dla mężczyzn:

- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy jelita grubego od 60 r.ż., co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych;
- bezwzględny zakaz palenia papierosów, dieta bogata w warzywa i owoce;
- unikanie nadmiernej ekspozycji na słońce/inne źródła promieniowania UV; stosowanie filtrów przeciwsłonecznych o wysokim (30 i więcej) współczynniku fotoprotekcji;
- w przypadku stwierdzenia znamion wykazujących następujące zaburzenia: powiększenie się, zmiana zabarwienia, świąd, obwódka zapalna, sączenie, krwawienie - natychmiastowa konsultacja u dermatologa.

TEST OPARTY O WYKRYWANIE ZMIAN C142G, G355T, G4326C GENU *CYP1B1*

Homozygotyczne nosicielstwo zmian C142G, G355T, G4326C (homozygoty GTC) w obrębie genu *CYP1B1* zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi ok. 2-krotnie i występuje w ok. 12% wszystkich raków (10).

Zalecenia dla nosicielek homozygotycznego genotypu GTC w obrębie genu *CYP1B1* proponowane jako opcja postępowania medycznego:

- systematyczna samokontrola piersi;
- badanie lekarskie piersi od 25 r.ż., 1 x 6 miesięcy;
- USG piersi od 25 r.ż., 1 x rok;
- rezonans magnetyczny piersi ewentualnie mammografia od 25-30 r.ż., 1 x rok naprzemiennie z USG piersi.
- USG jamy brzusznej od 35 r.ż., 1x rok ze szczególnym zwróceniem uwagi na trzustkę i nerki;
- TK jamy brzusznej od 35-40 r.ż., 1 x 3 lata

Nosicielstwo układu zmian CC, non GG, non CC w obrębie genu *CYP1B1* zwiększa ryzyko zachorowania na raka jelita grubego ok. 3-krotnie i występuje w ok. 6% wszystkich raków.

Zalecenia dla nosicieli (kobiety i mężczyźni) układu CC, non GG, non CC w obrębie genu CYP1B1 proponowane jako opcje postępowania medycznego:

- kolonoskopia lub ewentualny wlew kontrastowy od 50 r.ż. co 5 lat lub częściej w przypadku występowania jakichkolwiek zaburzeń jelitowych.

TEST OPARTY O WYKRYWANIE ZMIANY C5972T GENU BRCA2

Zmiana C5972T zwiększa ryzyko zachorowania na raka piersi DCIS poniżej 50. roku życia ok. 3-krotnie; homozygotyczne nosicielstwo tej zmiany (homozygoty TT) zwiększa ryzyko raka piersi poniżej 50. roku życia ok. 5-krotnie; zmiana ta występuje w ok. 6% raków piersi poniżej 50. roku życia (11).

Zalecenia dla nosicielek zmiany C5972T genu BRCA2 proponowane jako opcja postępowania medycznego:

- systematyczna samokontrola piersi;
- badania lekarskie piersi od 25 r.ż., 1 x 6 miesięcy;
- USG piersi od 25 r.ż., 1 x rok;
- mammografia od 35 r.ż., 1 x rok naprzemiennie z USG piersi.

TEST OPARTY O BADANIE NOSICIELSTWA MUTACJI C61G ORAZ 4153DELA GENU BRCA1 U MĘŻCZYŹN

Zmiany C61G oraz 4153delA genu BRCA1 u mężczyzn zwiększają ryzyko zachorowania na raka prostaty ok. 3,6-krotnie - mutacje te występują w ok. 0,4% wszystkich raków prostaty; ryzyko raka prostaty u nosicieli tych zmian jest zwiększone około 12-krotnie, gdy w rodowodzie wystąpił rak prostaty wśród krewnych I° (12).

Zalecenia dla nosicieli mutacji C61G oraz 4153delA genu BRCA1 proponowane jako opcja postępowania medycznego:

- badanie urologiczne, PSA od 50 r.ż., 1 x 1 rok;
- do rozważenia biopsja saturacyjna prostaty po 60 r.ż. - jeśli w rodowodzie stwierdzono raka prostaty wśród krewnych I°.

PIŚMIENNICTWO

1. Kurzawski G, et al.: The *NOD2* 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 2004, 64: 1604-6.
2. Cybulski C, et al.: *CHEK2* is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 1131-5.
3. Cybulski C, et al.: A large germline deletion in the *CHEK2* kinase gene is associated with an increased risk of prostate cancer. *J Med Genet* 2006, 43: 863-6.

4. Cybulski C, et al.: A deletion in *CHEK2* of 5,395 bp predisposes to breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2007, 102: 119-22.
5. Szymańska-Pasternak J, et al.: *CHEK2* Variants Predispose to Benign, Borderline and Low-Grade Invasive Ovarian Tumors. *Gin Oncol* 2006, 102: 429-31.
6. Cybulski C, et al.: *NBS1* is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 2004, 64: 1215-9.
7. Dębniak T, et al.: *CDKN2A* common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res* 2005, 65: 835-9.
8. Dębniak T, et al.: A Common Variant of *CDKN2A* (p16) Predisposes to Breast Cancer. *J Med Genet* 2005, 42: 763-5.
9. Dębniak T, et al.: *CDKN2A* common variant and multi-organ cancer risk-a population-based study. *Int J Cancer* 2006, 118: 3180-2.
10. Matyjasik J, et al.: *CYP1B1* and predisposition to breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2007, 106: 383-8.
11. Górski B, Narod SA, Lubiński J. A common missense variant in *BRCA2* predisposes to early onset breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005, 7: 1023-7.
12. Cybulski C, et al.: *BRCA1* mutations and prostate cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 2008, 17: 62-6.
13. Lener M, et al.: Do founder mutations characteristic of some cancer sites also predispose to pancreatic cancer? *Int J Cancer* 2016, 139: 601-6.

Jacek Gronwald, Jan Lubiński



Genetyka kliniczna raka piersi i jajnika

Hereditary breast and ovarian cancer

Streszczenie

W ostatnich latach udało się wykazać u niemal wszystkich pacjentek z rakami piersi lub jajnika charakterystyczne podłoże konstytucyjne sprzyjające rozwojowi tych nowotworów. Stwierdzono, że nosicielstwo mutacji w genach *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, *RECQL*, *RAD51*, *RAD51C*, *TP53*, *MSH6*, *MRE11A*, *CDH1*, *NBS1*, *NOD2*, *CDKN2A*, *CYP1B1* jak i rzadziej występujących zmian w genach takich jak *ATM*, *PTEN*, *STK11* wiąże się z podwyższonym ryzykiem raka piersi. Zaburzenia w genach *BRCA1*, *BRCA2*, *NOD2*, *CHEK2*, *DHCR7* predysponują do rozwoju raka jajnika. W niektórych przypadkach zmiany genetyczne wiążą się z bardzo wysokim ryzykiem nowotworowym, w innych przypadkach wykrywane zaburzenia predysponują do rozwoju raka w mniejszym stopniu. Zdiagnozowanie podwyższonego ryzyka raka umożliwia wdrożenie programu profilaktycznego umożliwiającego zapobieżenie nowotworowi, a tam gdzie to się nie udaje pozwala na wykrycie raka we wczesnym stadium. Dodatkowo zdiagnozowanie nosicielstwa odpowiednich mutacji pozwala na dobór najefektywniejszego, zindywidualizowanego sposobu leczenia związanego z uwarunkowaniami konstytucjonalnymi pacjenta. Dużym problemem diagnostycznym są pacjentki, u których zmian molekularnych nie udało się znaleźć, ale dane rodowodowo-kliniczne wskazują na silne podłoże genetyczne nowotworu. W niniejszym opracowaniu przedstawiono podłoże genetyczne rozwoju raka piersi i jajnika uwzględniając wpływ genów wysokiego oraz umiarkowanego zwiększonego ryzyka jak i zasady interpretacji danych rodowodowych. Omówiono obecnie obowiązujące zasady diagnozowania grup ryzyka, profilaktyki oraz leczenia raka u pacjentek z zespołem *BRCA1*, *BRCA2*, innych zespołów wysokiego ryzyka raka piersi i/lub jajnika oraz ze zmianami w genach umiarkowanie zwiększonego ryzyka.

Słowa kluczowe: rak piersi, *BRCA1*, genetyka

Summary

Recently, it is possible to show a constitutional genetic background in almost all patients with breast or ovarian cancer. It has been recognized that increased risk of breast cancers occurs in carriers of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RECQL*, *RAD51*, *RAD51C*, *TP53*, *MSH6*, *MRE11A*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBS1*, *NOD2*, *CDKN2A*, *CYP1B1* and less frequently of genes such as *ATM*, *PTEN*, *STK11*. Abnormalities in *BRCA1*, *BRCA2*, *NOD2*, *CHEK2*, *DHCR7* genes are predisposing factors also for development of ovarian cancer. In some cases, characteristic gene mutations are related to a very high risk of cancer, in other cases detected genetic changes predispose to cancer at lower degree. Diagnosis of increased risk of cancer allows introduction of prophylactic programs which make possible to avoid cancer, or diagnose it in early stages. Additionally, the most effective method of treatment can be chosen for carriers of some mutations. Significant diagnostic problem constitute patients in whom molecular abnormality was not detected but pedigree-clinical data indicate strong genetic background of cancer. In the review we show the genetic background of breast and ovarian cancer taking into consideration contribution of high and moderate penetrance genes as well as importance of pedigree data. We discuss rules of diagnosis, prophylactics, the most sensitive methods of early detection and treatment in patients with *BRCA1*, *BRCA2* and other high risk syndromes as well as in patients with abnormalities in moderate penetrance genes.

Key words: breast cancer, *BRCA1*, genetics

Najstarsze doniesienie o rodzinnym raku piersi datuje się na około 100 rok naszej ery i pochodzi z literatury medycznej Starożytnego Rzymu (1). Pierwsza dokumentacja rodzinnej agregacji raka piersi pochodząca z czasów nowożytnych została opublikowana przez Broca w 1866 roku, który opisał 10 przypadków raka piersi w 4 pokoleniach rodziny swojej żony (2). W połowie lat dziewięćdziesiątych udowodniono również na poziomie molekularnym, że znacząca część raków piersi i jajnika ma dziedziczną etiologię jednogenową (3, 4). Badania oceniające częstość występowania cech rodowodowo-klinicznych charakterystycznych dla silnych agregacji raków piersi/jajnika wśród kolejnych raków tych narządów jak i analizy zgodności zachorowań wśród bliźniaków jednojajowych wskazują, że w około 30% raków piersi i jajnika zachorowania te powstają wskutek silnej genetycznej predyspozycji (5). Do niedawna w pozostałych tzw. sporadycznych rakach piersi/jajnika znaczenie czynników genetycznych było pomijane. W ostatnich latach udało się jednak wykazać, że u pacjentów z rakami sporadycznymi również jest wykrywalne charakterystyczne podłoże konstytucyjne sprzyjające rozwojowi tych nowotworów. Dlatego obecnie uważa się, że u niemal wszystkich pacjentów z nowotworami powinno występować odpowiednie podłoże genetyczne w różnym stopniu wpływające na ryzyko rozwoju nowotworu. Zmiany genetyczne silnie związane z występowaniem nowotworu określa się jako zmiany (geny) wysokiego ryzyka, natomiast zmiany powiązane z rozwojem danego nowotworu w mniejszym stopniu nazywa się zmianami (genami) umiarkowanie zwiększonego ryzyka. Klinicznie silna genetyczna predyspozycja do raka piersi/jajnika jest w Polsce na ogół powiązana z mutacjami w genach *BRCA1*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRCA2* czy *RECQL* i ujawnia się najczęściej jako zespoły tzw. dziedzicznego raka piersi specyficznego narządowo (hereditary breast cancer - site specific; HBC-ss), dziedzicznego raka piersi-jajnika (hereditary breast-ovarian cancer; HBOC) i dziedzicznego raka jajnika specyficznego narządowo (hereditary ovarian cancer; HOC). W zespole HBC-ss u członków rodzin występują raki piersi a nie stwierdza się raków jajnika, w zespole HBOC wśród krewnych rozpoznawane są zarówno raki piersi jak i jajnika, w zespole HOC w rodzinach występują raki jajnika natomiast nie stwierdza się raków piersi. Na podstawie cech rodowodowo-klinicznych charakterystycznych dla raków piersi/jajnika związanych z mutacjami o wysokiej penetracji określono kryteria umożliwiające rozpoznawanie definitywne lub z wysokim prawdopodobieństwem rodzin z zespołami HBC-ss, HBOC, HOC. Kryteria te zestawiono w tabeli 1. W zdecydowanej większości przypadków nowotworów związanych z genami umiarkowanie zwiększonego ryzyka wywiad rodzinny jest nieobciążony.

Zespoły HBC-ss, HBOC, HOC są heterogenne klinicznie i molekularnie. Do najczęstszych przyczyn ich powstawania należą mutacje konstytucyjne w genach *BRCA1* i *BRCA2*.

Ostatnio wykazano, że kilka procent tych zespołów powstaje na bazie mutacji skracających białko genu *CHEK2*, *PALB2* czy *RECQL* (6, 7, 8, 9).

Tab. 1. Kryteria rodowodowo-kliniczne rozpoznawania zespołów HBC-ss, HBOC i HOC.

Liczba przypadków raka piersi lub jajnika w rodzinie:
A - trzy (diagnoza definitywna)
1. Przynajmniej 3 krewnych dotkniętych rakiem piersi/jajnika rozpoznany w dowolnym wieku;
B - dwa (diagnoza z dużym prawdopodobieństwem)
1. 2 raki piersi lub jajnika wśród krewnych I ^o (lub II ^o przez mężczyznę);
2. 1 rak piersi i 1 rak jajnika rozpoznane w dowolnym wieku wśród krewnych I ^o (lub II ^o przez mężczyznę);
C - jeden (diagnoza z dużym prawdopodobieństwem)
1. Wystąpienie raka piersi poniżej 40 roku życia;
2. Wystąpienie raka piersi obustronnego;
3. Wystąpienie raka piersi rdzeniastego lub atypowego rdzeniastego;
4. Wystąpienie raka piersi i jajnika u tej samej osoby;
5. Wystąpienie raka piersi u mężczyzny;

ZESPÓŁ *BRCA1*

W zespole tym stwierdza się u pacjentki konstytucyjną mutację genu *BRCA1*. U nosicielek mutacji tego genu obserwuje się około 50-80% ryzyko rozwoju raka piersi i około 40% ryzyko rozwoju raka jajnika (10). Wg danych uzyskanych w naszym Ośrodku dla populacji polskiej na podstawie badania kolejnych raków piersi/jajnika ryzyka do 75 roku życia wynoszą odpowiednio około 66% dla raka sutka i 44% dla raka jajnika (tab. 2). Zaobserwowano, że ryzyko jest uzależnione od rodzaju mutacji i lokalizacji w genie (11, 12, 13). Wg naszych obserwacji np. ryzyko zachorowania na raka piersi jest około 2-krotnie wyższe u nosicielek 5382insC, w porównaniu z ryzykiem u nosicielek 4153delA (11). Dodatkowym czynnikiem wpływającym na poziom ryzyka jest stopień obciążenia wywiadu rodzinnego. Stwierdzono, że ryzyko raka piersi rośnie o kolejne 20% wraz z wystąpieniem u każdej krewniej I^o raka piersi przed 50 rokiem życia. Natomiast wystąpienie raka jajnika u każdej krewniej I^o lub II^o wiąże się ze wzrostem ryzyka raka jajnika o kolejne 60% (14). Również miejsce zamieszkania wpływa na poziom ryzyka. W przeprowadzonym ostatnio prospektywnym badaniu ryzyka raka stwierdzono różnice penetracji w zależności od miejsca zamieszkania. I tak, prawdopodobieństwo rozwoju raka piersi do 70 roku życia dla nosicielek mutacji genu

BRCA1 z Ameryki Północnej określono na 72%, a dla nosicielek z Polski na 49%, wskazując na znaczenie czynników środowiskowych (15).

Tab. 2. Ryzyko raka piersi i jajnika u nosicielek mutacji *BRCA1* w Polsce (10).

A: Skumulowane ryzyko raka piersi:						
Wiek:	<30	40	50	60	70	75
Ryzyko skumulowane (%):	1,6	6,5	30	40,5	50,5	66
B: Skumulowane ryzyko raka jajnika:						
Wiek:	<30	40	50	60	70	75
Ryzyko skumulowane (%):	1	3,5	12	30	41	44

Niepełna penetracja *BRCA1* sugeruje, że inne genetyczne i pozagenetyczne czynniki mają znaczenie w karcinogenezie u nosicielek mutacji.

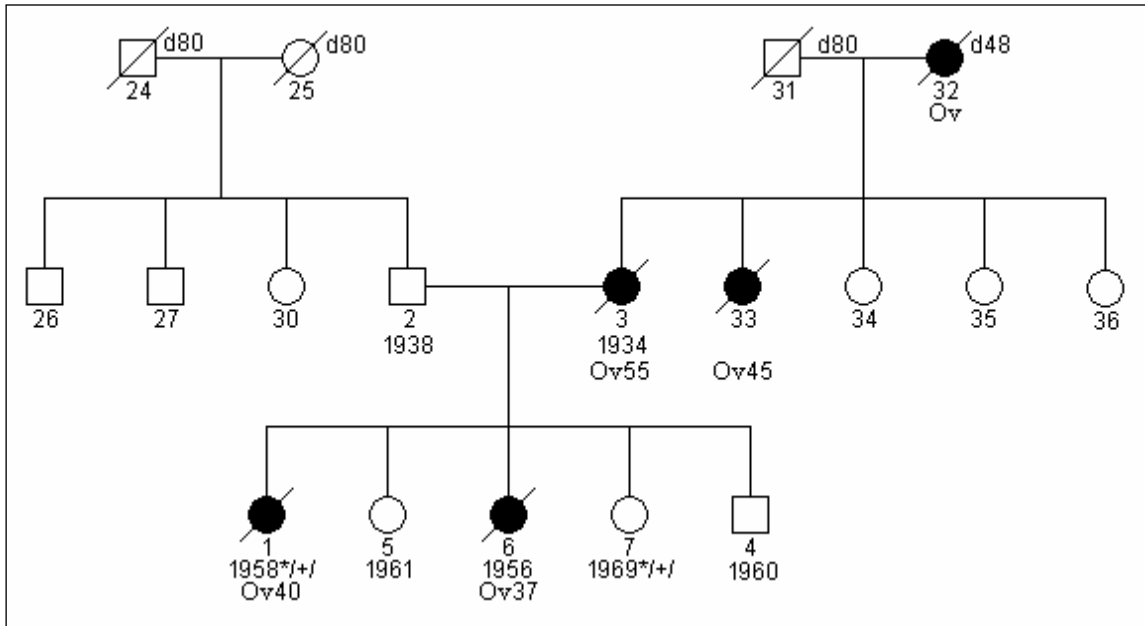
Jak dotąd zidentyfikowano szereg zmian mających potencjalne znaczenie jako modyfikatory ryzyka. Wieloośrodkowe badania w ramach konsorcjum CIMBA sugerują, że zmiany te pojedynczo mają słaby efekt oddziaływania i prawdopodobnie jest on zmienny populacyjnie (16-31).

Charakterystyczne dla raków jajnika u nosicielek mutacji *BRCA1* jest również zwiększone ryzyko raków jajowodu i otrzewnej szacowane na około 10%. Przedstawione powyżej dane o częstości zachorowań na raka jajnika dotyczą najprawdopodobniej częstości raków jajnika, jajowodu i otrzewnej łącznie, ponieważ te ostatnie guzy były w przeszłości najczęściej rozpoznawane jako raki jajnika ze względu na podobieństwo obrazu histologicznego i towarzyszący im wzrost poziomu markera CA 125.

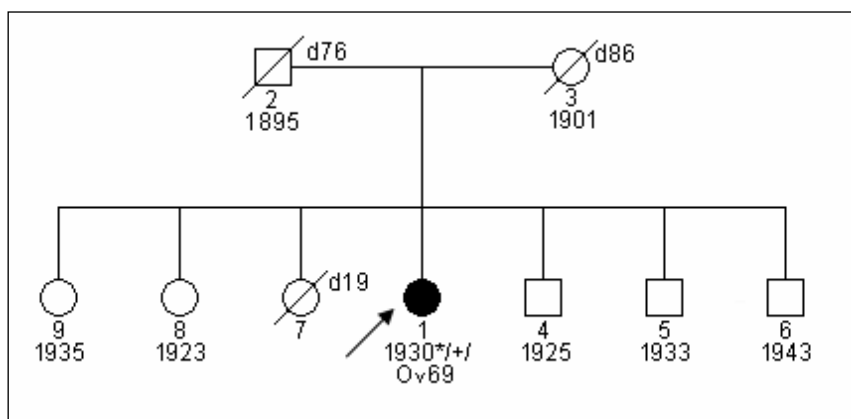
Najprawdopodobniej ryzyko raków innych narządów w niektórych rodzajach mutacji *BRCA1* jest również zwiększone, jednak ten efekt nosicielstwa zaburzeń *BRCA1* nie został dotąd dowiedziony ostatecznie.

Raki piersi i jajnika zależne od *BRCA1* wykazują szereg charakterystycznych cech klinicznych. Średni wiek diagnozowania raków piersi tego typu wynosi około 42-45 lat (32-33) a raków jajnika około 54 lata (34-35). Obustronność stwierdza się w około 18-32% raków piersi *BRCA1* zależnych (36-37). Bardzo charakterystyczną cechą jest szybkie tempo rozrastania się tych guzów - w ponad 90% przypadków raki *BRCA1* zależne wykazują G3 - trzeci stopień morfologicznej złośliwości już w chwili rozpoznania. Niemal wszystkie raki jajnika u nosicielek mutacji genu *BRCA1* diagnozowane są też w III^o/IV^o zaawansowania klinicznego wg FIGO. Raki piersi często są rdzeniaste, atypowe rdzeniaste lub przewodowe bez wykry-

walnej obecności receptorów estrogenowych (ER). Raki piersi zależne od *BRCA1* stanowią około 25-30% wszystkich raków potrójnie ujemnych (ER-, PGR-, HER2-) (36-38). Wywiad rodzinny często jest obciążony (ryc. 1), jednak ze względu na dziedziczenie w linii ojcowskiej i niepełną penetrację tj. przypadki z negatywnym wywiadem rodzinnym stwierdza się w ok. 45% (ryc. 2) (37).



Ryc. 1. Rodzina z zespołem HOC oraz stwierdzoną mutacją konstytucyjną genu *BRCA1* 4153delA.



Ryc. 2. Osoba z rakiem jajnika i ze stwierdzoną mutacją konstytucyjną genu *BRCA1* - 5382insC z rodziny bez innych uchwytanych cech rodowodowo-klinicznych charakterystycznych dla rodzin z zespołem HBOC/HOC.

ZESPÓŁ *BRCA2*

W zespole tym stwierdza się u pacjentki konstytucyjną mutację genu *BRCA2* (5). Na podstawie danych z piśmiennictwa w rodzinach z definitywnym HBC-ss i HBOC u nosicielki mutacji *BRCA2* ryzyko raka piersi sięga 31-56% a raka jajnika 11-27% (12, 41-45). Ostatnio zaobserwowano, że duży wpływ na poziom ryzyka rozwoju raka piersi ma wiek zachorowania na ten nowotwór krewnej I^o. Roczne ryzyko wynosi 4.5% dla nosicielek mutacji genu *BRCA2* jeśli krewna I^o zachorowała przed 30 rokiem życia, a 0.7% jeśli zachorowanie wystąpiło w wieku powyżej 60 lat. Takiego związku nie obserwowano wśród nosicielek mutacji genu *BRCA1* (46). Jak wykazały badania 200 polskich rodzin z silną agregacją raków piersi/jajnika, mutacje konstytucyjne genu *BRCA2* występują w tej grupie rzadko – z częstością około 4%. Nie jest jak dotąd znane ryzyko skumulowane rozwoju raka u polskich nosicieli mutacji genu *BRCA2*. Większość mutacji *BRCA2* występujących w naszej populacji najprawdopodobniej na ogół nieznacznie zwiększa ryzyko raka piersi, chociaż badania wykonane w naszym Ośrodku wykazały, że w rodzinach z agregacją raka piersi zdiagnozowanego przed 50 r.ż. oraz żołądka zdiagnozowanego u mężczyzn przed 55 r.ż. częstość mutacji genu *BRCA2* występuje na poziomie 10-20% (47). Mutacje genu *BRCA2* wiążą się natomiast ze znacznym, chociaż dokładniej nieokreślonym, ryzykiem raka jajnika, raka prostaty oraz raków przewodu pokarmowego - żołądka, jelita grubego, trzustki i to zarówno u kobiet jak i u mężczyzn. Przemawiają za tym badania przeprowadzone w naszym Ośrodku, w których mutacje wykrywano z częstością około 30% w rodzinach bez raka piersi, ale z agregacją raka jajnika oraz raka żołądka, jelita grubego lub trzustki wśród krewnych I^o lub II^o niezależnie od płci (48). Z badań wykonanych w Poznaniu wynika, że częstość mutacji genu *BRCA2* jest też zwiększona w rodzinach z rakiem piersi u mężczyzn i wynosi ona w naszym kraju około 15% (49).

Raki piersi i jajnika w rodzinach z mutacjami genu *BRCA2* wykazują szereg cech charakterystycznych. Według danych z piśmiennictwa średni wiek zachorowania na raki zależne od *BRCA2* wynosi dla raków piersi 52 lata u kobiet i 53 lata u mężczyzn oraz dla raków jajnika 62 lata (49-50).

INNE ZESPOŁY WYSOKIEGO RYZYKA RAKA PIERSI

W Polsce w około 30% rodzin z rozpoznanymi definitywnie zespołami HBC-ss i HBOC oraz w około 40% rodzin z zespołem HOC nie są wykrywane mutacje *BRCA1* lub *BRCA2*. Udowodniono, że części przypadków występowanie tych nowotworów w populacji polskiej spowodowane jest nosicielstwem mutacji genów *CHEK2* (1100delC, IVS2+1G>A, del5395), *PALB2* czy *RECQL* (7, 8, 9).

Nosicielstwo mutacji *CHEK2* skracających białko (1100delC, IVS2+1G>A, del5395) wiąże się z około 3-krotnym wzrostem ryzyka zachorowania na raka piersi a, co niezwykle ważne aż z 5-7-krotnym wzrostem w rodzinach z rakami piersi wśród krewnych (6, 51, 52). Cybulski i wsp. określili, że ryzyko raka piersi u nosicielek mutacji *CHEK2* skracających białko wynosi 28% jeśli rak piersi wystąpił u krewnej II^o, 34% jeśli rak piersi wystąpił u krewnej I^o i 44% jeśli rak piersi wystąpił u krewnej I^o i II^o (53). W związku z powyższym nosicielki mutacji *CHEK2* spełniające te kryteria należy traktować jak pacjentki wysokiego ryzyka. Ryzyko to dotyczy zarówno pacjentek młodych jak starszych. Stąd badania kontrolne piersi w tej grupie rozpoczyna się od 25 roku życia. Stwierdzono, że u pacjentek z tą mutacją znacząco częściej występuje typ lobularny raka piersi (53). Nowotwór ten jest trudny do wykrycia wyłącznie za pomocą mammografii. Ostatnio wykazano, że kombinacja usg piersi i mammografii charakteryzuje się w tej grupie pacjentek czułością zbliżoną do badania rezonansu magnetycznego (Huzarski i wsp. wysłano do druku). W tym kontekście uwzględniając koszty badań, usg piersi z mammografią wydają się być rozsądną alternatywą do badania rezonansu magnetycznego piersi.

Zaobserwowano, że nosicielstwo mutacji genu *PALB2* wiąże się z około 5-krotnym zwiększeniem ryzyka raka piersi, a w przypadkach gdy krewna I^o nosicielki mutacji genu *PALB2* chorowała na raka piersi ryzyko wzrasta 8,5-krotnie (7-8). Należy podkreślić, że *PALB2*-zależne raki piersi charakteryzują się znacznie gorszym rokowaniem szczególnie w przypadkach zdiagnozowania guza o średnicy większej niż 2 cm (8). Dlatego w prowadzeniu pacjentek z tą mutacją należy szczególnie duży nacisk położyć na zastosowanie metod umożliwiających wczesne wykrycie guza (np. MRI piersi) oraz różnych form profilaktyki pierwotnej.

Ostatnio Cybulski i wsp. zidentyfikował nowy gen związany z wysokim ryzykiem raka piersi. Nosicielstwo mutacji genu *RECQL* charakteryzuje około 40% ryzykiem rozwoju raka piersi, a w przypadkach obciążonego wywiadu rodzinnego ryzyko rośnie do około 70% (9).

W pojedynczych przypadkach rodzin, w których występują ze zwiększoną częstością raki piersi/jajnika, można rozpoznać jeden z rzadkich zespołów nowotworowych. Zespoły zestawiono w tabeli 3, W wielu ośrodkach na świecie nadal trwają prace nad identyfikacją genów, których mutacje wiążą się z wysokim ryzykiem raka piersi.

Tab. 3. Wybrane rzadkie zespoły genetyczne ze zwiększonym ryzykiem występowania raka piersi i/lub jajnika.

Schorzenie	Obraz kliniczny	Mutacje genu / Dziedziczenie	Piśmiennictwo
Mutacja genu CHEK2 u pacjentów z wywiadami rodzinnym obciążonym rakiem piersi	wysokie ryzyko rozwoju raka piersi, oraz umiarkowanie zwiększone ryzyko rak jelita grubego, nerki, tarczycy, prostaty	CHEK2 penetracja około 30-40%	51-52
Współwystępowanie mutacji genu CHEK2 i polimorfizmu B2P1	wysokie ryzyko rozwoju raka piersi, oraz umiarkowanie zwiększone ryzyko rak jelita grubego, nerki, tarczycy, prostaty	CHEK2/B2P1 penetracja około 30-40%	54
Homozygotyczna mutacja genu CHEK2	wysokie ryzyko rozwoju raka piersi, oraz umiarkowanie zwiększone ryzyko rak jelita grubego, nerki, tarczycy, prostaty	CHEK2 penetracja około 30-40%	52
Mutacja genu PALB2	wysokie ryzyko rozwoju raka piersi	PALB2 penetracja około 35%	7, 8
Mutacja genu RECQL	wysokie ryzyko rozwoju raka piersi	RECQL penetracja około 40%	9
Mutacje genu RAD51 C i D	wysokie ryzyko rozwoju raka jajnika	RAD51C i RAD51D wysoka penetracja	55
Zespół Li-Fraumeni	raki piersi (około 15% w wieku <30 r. ż.), mięsaki, guzy mózgu, białaczka, raki nadnercza	p53, wysoka penetracja; AD	50, 56

Mutacje genu CDH1	Rozlany rak żołądka, rak piersi zrazikowy	CDH1 wysoka penetracja; AD	55
Choroba Cowdena	wieloogniskowe zaburzenia śluzowoskórne, łagodne choroby proliferacyjne różnych organów, raki tarczycy, raki piersi/jajnika	PTEN AD	57-58
HNPCC	raki jelita grubego, trzonu macicy i innych organów włączając raka piersi/jajnika	<i>MSH2, MLH1</i> ; AD	59
Zespół Peutz-Jeghers	śluzowoskórna pigmentacja melaninowa, polipy jelitowe, raki kolorektalne i jelita cienkiego, guzy gonadalne, rak piersi	STK11; AD	60
Zespół Ruvalcaba-Myhre-Smith (Z.Bannayan-Riley-Ruvalcaba)	makrocefalia, polipy jelitowe, plamy „café-au-lait” na twarzy, tłuszczaki, raki tarczycy i piersi	PTEN AD	61
Heterozygotyczne nosicielstwo mutacji genu dla „ataxia telangiectasia”	ataksja mózdkowa, telangiectazje oczne i skórne, nadwrażliwość na promieniowanie radiacyjne, różne nowotwory włączając raka piersi/jajnika	ATM penetracja 20-40%; AD	62-63
Zespół Klinefeltera	gynecomastia, cryptorchidism, guzy z ekstragonadalnych komórek germinalnych (germ cell tumors), rak piersi u mężczyzn	47, XXY; niska penetracja < 10%	64
Mutacja genu receptora androgenowego	rodzinne raki piersi u mężczyzn	receptor androgenowy	65
Chłopcy1 fRodowodowe dziedziczenie:			

AD - autosomalne dominujące

AR - autosomalne recesywne

ZALECENIA POSTĘPOWANIA W RODZINACH Z WYSOKIM RYZYKIEM RAKA PIERSI/JAJNIKA

Specjalne zasady postępowania (66) należy zastosować u:

- nosicieli mutacji genów związanych z wysokim ryzykiem raka piersi/jajnika, jeśli takie mutacje zostały wykryte w rodzinie; w takich przypadkach zwykle tylko około 50% członków rodziny musi być włączonych do programu
- wszystkich członków rodzin z rozpoznaniem definitywnym lub podejrzeniem zespołu dziedzicznego raka piersi/jajnika według kryteriów rodowodowo-klinicznych zestawionych w tabeli 1, jeśli konstytucyjne mutacje predysponujące do rozwoju raków nie zostały wykryte.

Specjalne postępowanie dotyczy:

- a) profilaktyki;
- b) schematu badań kontrolnych;
- c) leczenia.

PROFILAKTYKA

Doustna hormonalna antykoncepcja

Dobrze udokumentowano przeciw wskazania do stosowania doustnych środków antykoncepcyjnych przez nosicielki mutacji *BRCA1* w wieku do 25 lat.

Wykazano, że środki te stosowane w młodszym wieku przez 5 lat zwiększają ryzyko raka piersi o około 40%, a raka piersi występującego do 40 rż. nawet o około 74% (67-68). Ponieważ w około 30% przypadków u nosicielek mutacji *BRCA1* nie stwierdza się jakichkolwiek cech HBC-ss, HBOC lub HOC, wydaje się konieczne wykonywanie testu *BRCA1* u każdej młodej kobiety, która decyduje się na doustną antykoncepcję. Środki antykoncepcyjne stosowane przez nosicielki mutacji *BRCA1* po 30 roku życia wydają się nie wpływać na wzrost ryzyka raka piersi (67-70) natomiast zmniejszają o około 50% ryzyko raka jajnika (67). Tak więc ich stosowanie w późniejszym wieku wydaje się uzasadnione. Jak dotąd brak dobrze zweryfikowanych danych na temat efektów stosowania doustnej antykoncepcji w rodzinach z rakami piersi/jajnika niezwiązanymi z *BRCA1*. W związku z tym jednak, że istnieją

prace o kilkakrotnym zwiększeniu ryzyka raka piersi spowodowanym pigułkami antykoncepcyjnymi u kobiet z rodzin z agregacją zachorowań na raka piersi (71), rozsądnym wydaje się unikanie doustnej antykoncepcji w rodzinach z cechami HBC-ss i HBOC. Nie zaobserwowano negatywnego wpływu na ryzyko raka jajnika środków hormonalnych stosowanych w trakcie leczenia bezpłodności (72).

Hormonalna terapia zastępcza

Profilaktyczne usunięcie narządu rodno w wieku 35-40 lat jest postępowaniem z wyboru u nosicielek mutacji *BRCA1/2* i wiąże się z redukcją ryzyka rozwoju zarówno raka jajnika. Wykazano, że częstość raka piersi wśród nosicielek mutacji genu *BRCA1/2*, które poddały się adnexektomii jest podobna do w grupie pacjentek stosujących hormonalną terapię zastępczą jak i w grupie nosicielek, które takiej terapii nie stosowały (73-76). Wpływ hormonalnej terapii zastępczej u nosicielek mutacji *BRCA1/2*, które nie poddały się operacji profilaktycznej narządu rodno nie jest wystarczająco udokumentowany. Stwierdzono 3-krotny wzrost ryzyka rozwoju raka piersi u osób stosujących hormonalną terapię zastępczą i obciążonych rodzinnym wywiadem odnośnie raka piersi (77). W związku z powyższym decyzja o stosowaniu hormonalnej terapii zastępczej u takich nosicielek mutacji *BRCA1/2*, powinna być rozważana ze szczególną ostrożnością.

Karmienie piersią

Długotrwałe karmienie piersią zalecamy wszystkim pacjentkom z rodzin z HBC-ss, HBOC i HOC. Wykazano, że u nosicielek mutacji *BRCA1* karmienie przez okres, łącznie po wszystkich ciążach, długości 18 miesięcy redukuje ryzyko raka piersi o około 50% tj. z 50-80% do 25-40% (77-78).

Wczesne urodzenie dziecka

Generalnie kobiety, które urodziły pierwsze dziecko przed 20 r.ż. mają o około połowę niższe od nieródek ryzyko zachorowania na raka piersi. Ta obserwacja prawdziwa w odniesieniu do nieselekcjonowanej grupy kobiet, nie została potwierdzona w grupie kobiet - nosicielek mutacji *BRCA1* czy *BRCA2* (79). Biorąc jednak pod uwagę fakt, że nosicielki mutacji powinny poddać się operacji profilaktycznej narządu rodno w wieku 35-40 lat, pacjentki nie powinny zwlekać z macierzyństwem.

Chemoprewencja

Tamoxifen

Dane z piśmiennictwa jednoznacznie wskazują, że tamoxifen zmniejsza o około 50% ryzyko raka piersi ER+. Działanie to zaobserwowano zarówno u zdrowych kobiet jak i u kobiet leczonych z powodu raka jednej piersi, kiedy to tamoxifen zmniejszał ryzyko raka obustronnego. Tamoxifen działa też profilaktycznie u nosicielek mutacji *BRCA1* obniżając ryzyko raka piersi o około 50% mimo tego, że zdecydowana większość tych guzów jest ER-. Dobroczynne działanie tamoxifenu wykazano zarówno u nosicielek mutacji w wieku przedmenopauzalnym, jak i pomenopauzalnym (80-81). Uzasadnione jest proponowanie pacjentkom z rodzin z definitywnym HBC-ss, HBOC oraz nosicielkom mutacji *BRCA1* chemoprewencji tamoxifenem po wykluczeniu wszelkich przeciwwskazań zwłaszcza związanych ze zwiększonym ryzykiem choroby zakrzepowej i przy zapewnieniu odpowiedniej kontroli, co do powstawania tych zaburzeń oraz zmian przerostowych śluzówki trzonu macicy. Aktualne wyniki wskazują, że roczne stosowanie tamoxifenu wykazuje podobny efekt prewencyjny jak 5-letnia terapia (82).

Mikroelementy

W grudniu 2008 roku odkodowano dane prowadzonej przez nasz Ośrodek podwójnie zaślepionej próby klinicznej nad wpływem selenu na ryzyko raków u nosicielek mutacji *BRCA1*. W próbie wzięło udział ponad 1300 kobiet, u których stwierdzono nieoczekiwanie, że w podgrupie suplementowanej seleninem sodu po blisko 3 latach trwania próby wystąpiła nieco większa liczba raków piersi i jajnika. Badania asocjacyjne wskazują, że o optymalnym dla nosicielki *BRCA1* poziomie selenu decydują genotypy genów metabolizujących selen. Możliwość obniżenia ryzyka raka u nosicielek *BRCA1* poprzez suplementację selenem czy dietę ubogoselenową wymaga dalszych badań, jednak już obecnie można wykorzystać oznaczenie poziomu selenu w osoczu, jako marker ryzyka raków piersi/jajnika u nosicielek mutacji *BRCA1*. Ostatnio wykazano również, że pacjentki, u których ze zdiagnozowanym rakiem piersi i równocześnie występującym niskim poziomem selenu charakteryzowały się znacząco niższym wskaźnikiem 5-letniego przeżycia (83). Pojawiają się doniesienia wskazujące na znaczenie jonów żelaza i antymonu na ryzyko raka piersi u nosicielek mutacji genu *BRCA1* (84).

Adnexektomia

Zarówno retrospektywne jak i prospektywne obserwacje pacjentek z konstytucyjnymi mutacjami *BRCA1* lub *BRCA2* wykazują, że profilaktyczna adnexektomia zmniejsza ryzyko raka jajnika/otrzewnej do około 5% i raka piersi do około 30-40%. Efekt zmniejszający ryzyko raka piersi obserwuje się również, kiedy adnexektomia zostanie wykonana po menopauzie (85). Do niedawna uważano, że efekt ten dotyczy zarówno nosicielek mutacji genu *BRCA1* jak i *BRCA2*, jednak ostatnio Kotsopoulos i wsp. zaobserwowali, że profilaktyczna adneksektomia nie ma znaczącego wpływu na redukcję ryzyka raka piersi wśród nosicielek mutacji genu *BRCA1* (86). Profilaktyczna adnexectomia wiąże się z 80% redukcją zachorowalności na raka jajnika, jajowodu i otrzewnej oraz 77% redukcją umieralności wynikającej z jakiegokolwiek przyczyny (87). Wobec powyższych faktów w naszym Ośrodku profilaktyczna adnexektomia zalecana jest u wszystkich nosicielek mutacji *BRCA1/BRCA2*, które przekroczyły 35 r.ż. Zabieg ten proponujemy kobietom z rodzin z HBC-ss, HBOC i HOC i bez mutacji *BRCA1/BRCA2* tylko wówczas, gdy w trakcie badań kontrolnych wykrywane są zmiany patologiczne narządu płciowego. Wśród naszych pacjentek około 85% akceptuje tę formę profilaktyki (88).

Mastektomia

Celem profilaktycznej mastektomii jest ograniczenie prawdopodobieństwa rozwoju raka piersi poprzez usunięcie newralgicznej tkanki. Opisano pojedyncze przypadki raka piersi wychodzące ze ściany klatki piersiowej albo z jamy pachowej po profilaktycznej mastektomii. Stwierdzono jednak, że tylko u 1% pacjentek z grupy wysokiego ryzyka rozwija się rak piersi mimo wcześniejszej mastektomii (89). Profilaktyczna mastektomia wykonana w wieku 25 lat wiąże się z podniesieniem wskaźnika przeżycia do 80 roku o 9%, natomiast wykonana w wieku 50 lat tylko o 2.8% (90). Wydaje się rozsądnym zarezerwowanie profilaktycznej mastektomii dla wysoko umotywowanych pacjentek z wysokim ryzykiem definitywnie rozpoznany i szczególnie dla tych, u których stwierdza się guzowate i mammograficznie gęste gruczoły piersiowe, a więc posiadające budowę utrudniającą wczesną diagnozę. Obecnie najczęściej wykonywane są podskórne mastektomie z następczą natychmiastową rekonstrukcją. Postępowanie takie zapewnia uzyskanie dobrego efektu kosmetycznego (91).

BADANIA KONTROLNE

Schemat badań kontrolnych w rodzinach z zespołami HBC-ss, HBOC, HOC, jak również u nosicielek mutacji *BRCA1/BRCA2* bez rodowodowo-klinicznych cech tych zespołów

podano w tabeli 4. Schemat ten jest indywidualizowany dla poszczególnych pacjentów/rodziny co do wieku, w którym poszczególne badania się rozpoczynają jak i co do rodzaju stosowanych badań. W niektórych rodzinach, gdzie odnotowano np. raka piersi w wieku poniżej 25 r.ż., czy raka jajnika poniżej 35 r.ż. badania ultrasonograficzne piersi czy narządu rodowego należy rozpoczynać odpowiednio wcześniej - w wieku co najmniej 5 lat niższym od najmłodszego wieku, w którym rozpoznano u krewnej raka kontrolowanego narządu. Badania kontrolne piersi i jajników są dodatkowo poszerzane o kolonoskopię, gastrokopię czy ocenę PSA i USG prostaty wówczas, gdy u członków rodziny występują dolegliwości odpowiednio ze strony jelita grubego, żołądka czy dróg moczowych. Z wieloletniego doświadczenia wiemy, że do błędów w interpretacji wyników badań kontrolnych należy brak świadomości lekarzy, że raki piersi u nosicielek mutacji *BRCA1* dają często obraz torbieli lub gruczolakowłókniaków. Niemniej jednak należy podkreślić, że badania kontrolne mają bardzo ograniczone możliwości wykrywania wczesnych raków u nosicielek mutacji *BRCA1*. U kobiet z tym zaburzeniem raki jajnika w I^o zaawansowania klinicznego wykrywa się zaledwie w około 10% przypadków mimo rzetelnego wykonywania badań kontrolnych (32, 71). Znaczący postęp w diagnostyce wczesnych raków piersi u nosicielek mutacji *BRCA1* stanowi rezonans magnetyczny. Badanie to umożliwia wykrycie około 77% raków piersi o średnicy poniżej 1cm, a w kombinacji z USG i badaniem palpacyjnym czułość rośnie do ponad 90% (92). Należy mieć świadomość, że nawet przy rozbudowanym schemacie badań kontrolnych u 10-15% pacjentek w momencie diagnozy raka piersi występują przerzuty do węzłów pachowych.

Tab. 4. Schemat badań kontrolnych w rodzinach z zespołami wysokiego ryzyka raka sutka/jajnika.

Narząd	Badanie	Wiek rozpoczęcia (lata)	Częstość
Pierś	samokontrola	20	co miesiąc
	palpacyjne badanie lekarskie	20-25	co 6 miesięcy
	USG	25	co 12 miesięcy (6 miesięcy po mammografii)
	MRI	25	co 12 miesięcy
	mammografia	30	co 12 miesięcy
Narząd rodny	USG dopochwowe	30	co 12 miesięcy

	CA 125	30	co 12 miesięcy (6 miesięcy po USG)
--	--------	----	---------------------------------------

LECZENIE

Istniejące dane wskazują, że u nosicielek mutacji *BRCA1* należy zastosować odrębne zasady leczenia raków piersi. Obejmują one:

- wskazanie do radykalnej mastektomii a nie lumpektomii z następową radioterapią, ponieważ ryzyko wznowy miejscowej przy pierwszej metodzie postępowania wynosi około 1% a przy drugiej około 8% (Narod SA, dane nieopublikowane).
- wskazanie do stosowania tamoxifenu mimo tego, że raki są na ogół ER-, ze względu na około 50% zmniejszenie ryzyka raka drugiej piersi dzięki hormonoterapii (80-82).
- wskazanie do adnexektomii nie tylko ze względu na profilaktykę, ale i dlatego, że jak wykazują wstępne dane, zabieg ten zmniejsza ryzyko zgonu w ciągu 10 lat o około 70% (93) Ostatnio zaobserwowano, że dobroczynny wpływ adnexektomii jest najsilniejszy u nosicielek mutacji genu *BRCA1*, które zachorowały na raka piersi z nieobecny receptorem estrogenowym (94). Takim pacjentkom adnexektomia powinna być zalecana możliwie szybko po zdiagnozowaniu raka piersi.
- w przypadku pacjentek z rakiem piersi leczonych chemioterapią wykazano znacznie lepsze efekty stosując schematy pozbawione taxanów (95). Niezwykle atrakcyjne są wyniki stosowania cisplatyny w leczeniu neoadjuwantowym pacjentek z rakiem piersi (96-97). W grupie 107 nosicielek mutacji *BRCA1* całkowitą patologiczną remisję guza osiągnięto u około 61% pacjentek. Wyniki leczenia były nieznacznie lepsze (69% pacjentek z całkowitą remisją patologiczną, jeśli przed zastosowaniem cis-platyny pacjentki nie były leczone innymi chemioterapeutykami. Efekt leczenia w pewnym stopniu zależy od stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu. Całkowitą patologiczną remisję obserwowano u 56% pacjentek z rakiem piersi w stopniu IIB-III, natomiast u 78% pacjentek, u których nowotwór zdiagnozowano w stopniu I-IIA. Dużą skuteczność cis-platyny stwierdziliśmy też w leczeniu pacjentek z rozsianym rakiem piersi (98). Równocześnie trwają próby kliniczne z wykorzystaniem inhibitorów PARP w leczeniu nosicielek mutacji *BRCA1* z rakiem piersi lub jajnika. Ostatnio zaobserwowano, że nosicielki mutacji genu *BRCA1* z rakiem piersi zdiagnozowanym w I stopniu zaawansowania klinicznego odnoszą korzyść jeśli leczenie chirurgiczne było

uzupełnione chemioterapią w stosunku do pacjentek, które chemioterapii nie otrzymały (HR = 0.28; 95 % CI 0.10-0.79; p = 0.02) (99).

INNE ZESPOŁY ZWIĄZANE ZE ZMIANAMI GENETYCZNYMI ZWIĘKSZONEGO RYZYKA RAKA PIERSI

Istotnym problemem genetyki klinicznej jest zwiększona dziedziczna predyspozycja do nowotworów piersi lub jajnika w rodzinach, w których takie zachorowania wcześniej nie występowały.

Ze względu na małą liczebność rodzin, dziedziczenie przez linię męską oraz niepełną penetrację również w takich rodzinach należy brać pod uwagę wpływ genów wysokiego ryzyka jak *BRCA1/2* [około 50% nosicielek mutacji *BRCA1* z rakiem piersi ma nieobciążony wywiad rodzinny (35)]. Jednak zdecydowana większość zachorowań w takich rodzinach powiązana jest z innymi czynnikami. Wpływ na ryzyko raka wielorakich czynników środowiskowych udokumentowano już w przeszłości. W ostatnim czasie udało się wykazać, że u ponad 90% pacjentek z rakiem piersi występują zmiany genetyczne predysponujące do rozwoju tego nowotworu (100). W większości są to zmiany umiarkowanie zwiększonej penetracji. W tym kontekście należy przypuszczać, że niekorzystne czynniki środowiskowe mogłyby powodować raka tylko u pacjentów o odpowiednim podłożu genetycznym. Dotychczas w populacji polskiej udokumentowano znaczenie kilku zmian tego typu, co wiąże się z opcją odmiennego postępowania klinicznego rekomendowanego tym pacjentom. Stwierdzono, że zmiany w genach *CHEK2* (I157T), *NBS1* (657del5), *NOD2* (3020insC), *CDKN2A* (A148T), *BRCA2* (5972C/T polimorfizm) *CYP1B1* (homozygota GTC), wiążą się z podwyższonym ryzykiem rozwoju raka piersi w populacji polskiej (101-102).

Nosicielki mutacji *CHEK2* typu I157T mają ryzyko podwyższone w mniejszym stopniu (1,4-krotnie wyższe niż populacyjne). Występowanie raka piersi w młodym wieku nie jest charakterystyczną cechą tego typu mutacji. Stwierdzono, że u pacjentek z tą mutacją znacząco częściej występuje typ lobularny raka piersi (6, 53).

Zmiana w genie w *NBS1* (657del5) wiąże się z około 3,5-krotnym wzrostem ryzyka raka piersi, a wzrost ten jest jeszcze silniej wyrażony dla pacjentek w wieku poniżej 40 r.ż. (103) i obciążonym wywiadem rodzinnym (104). Z kolei mutacja w genie *NOD2* typu 3020insC jest zasocjowana z rakiem piersi występującym w młodym wieku (OR=1,9). Zmianie tej towarzyszy również charakterystyczny typ histopatologiczny raka - rak przewodowy z komponentą DCIS (105). Rakom tego typu najczęściej towarzyszą mikrozwapnienia, dlatego też mammografia powinna być szczególnie przydatnym badaniem w profilaktyce pacjentek ze

zmianami w genie *NOD2*. Również polimorfizm 5972C/T w genie *BRCA2* wiąże się podwyższonym ryzykiem rozwoju raka piersi przed 40 r.ż. (OR=1,4). Ryzyko raka znacznie bardziej rośnie u pacjentek z układem homozygotycznym (OR=4,8). Efekt ten jest zauważalny zarówno w młodym jak i późniejszym wieku (106). Podwyższone ryzyko raka piersi stwierdzono również u nosicielek mutacji *CDKN2A* (A148T) (OR=1,5) oraz *CYP1B1* (homozygota GTC) (OR=1,5). Również w przypadkach tych zmian odnotowuje się podwyższenie ryzyka raka w młodym wieku. Opiekę nad pacjentkami z mutacjami *NBS1* (657del5), *NOD2* (3020insC), *BRCA2* (5972C/T), *CDKN2A* (A148T), *CYP1B1* (homozygota GTC) rozpoczyna się w 25 r.ż. wg opcji przedstawionych w tabeli 5.

Tab. 5. Opcje badań kontrolnych piersi u pacjentek z poszczególnymi typami mutacji niskiego/pośredniego ryzyka nowotworowego.

Narząd	Badanie	Wiek rozpoczęcia (lata)	Częstość
<i>NBS1</i> (657del5)	samokontrola	20	co miesiąc
<i>CHEK2</i> (I157T)	palpacyjne badanie	20-25	co 6 miesięcy
<i>NOD2</i> (3020insC)	lekarskie		
<i>CDKN2A</i> (A148T)	USG	25	co 12 miesięcy
<i>BRCA2</i> (5972C/T)			
<i>CYP1B1</i> (homozygota GTC)	mammografia	35	co 12 miesięcy (6 miesięcy po usg)

Badania nad grupą pacjentek z rodzinną historią raka jajnika pozwoliły na wyodrębnienie charakterystycznych cech klinicznych raków jajnika bez mutacji konstytucyjnych w genach *BRCA1* i *BRCA2*. Raki w tej grupie w odróżnieniu od przypadków powstałych na bazie mutacji *BRCA1* i *BRCA2* częściej wykrywane są w okresie pomenopauzalnym (pomiędzy 51 a 60 r.ż.) oraz w niższym - II^o morfologicznej złośliwości, a także w II^o klasyfikacji FIGO. Nie stwierdzono nadreprezentacji żadnego typu histologicznego. Analiza rodzaju i lokalizacji nowotworów wśród krewnych badanych kobiet wykazała zwiększoną częstość występowania gruczolako-torbielaków jajnika (*cystadenoma ovarii*) (107-108).

Gruczolako-torbielaki jajnika to łagodne nowotwory, mogące jednakże w niektórych przypadkach przechodzić złośliwą transformację w nowotwór graniczny o niskim potencjale złośliwości (*borderline malignancy tumors*), a niekiedy nawet w raka (*cystadenocarcinoma*) (109-110).

Do rozwoju tego nowotworu predysponować może występowanie następujących zmian konstytucyjnych: *NOD2* 3020insC, *CHEK2* I157T, *CYP1B1* 355T/T oraz *DHCR7* W151X. W grupie „zwiększonego ryzyka” znajdują się zwłaszcza kobiety w wieku reprodukcyjnym (<50 r.ż.), które, będąc nosicielkami co najmniej jednej z wymienionych zmian, mają ponad 2-krotnie zwiększone ryzyko rozwoju nowotworu jajnika o granicznej złośliwości (OR 2,26; p = 0,0005). Dlatego też kobietom tym proponuje się wykonywanie raz na rok USG przezpochwowego już od 20-25 r.ż. Wczesne wykrycie guza i jego chirurgiczna resekcja może zapobiec rozwojowi raka jajnika. Ponadto w przypadku nosicielek wariantu 355T/T genu *CYP1B1* opcję badań kontrolnych poszerza się o coroczne badanie piersi z użyciem usg i mammografii od 30-35 r.ż. ze względu na 2,7-krotne zwiększenie ryzyka rozwoju raka tego narządu (OR 2,75; p = 0,03) (110-111).

Badania profilaktyczne zaleca się również krewnym I° i/lub II° w wieku reprodukcyjnym pacjentek z gruczolakotorbielakiem jajnika, w tym:

- coroczne kontrolne USG przezpochwowe, jeśli u pacjentki zdiagnozowano nowotwór jajnika o granicznej złośliwości i wykryto zmianę *CHEK2* I157T;
- coroczne badanie piersi z zastosowaniem rezonansu magnetycznego w przypadku krewnych pacjentek z wariantem 355T/T genu *CYP1B1* i zdiagnozowanym łagodnym gruczolakotorbielakiem jajnika.

Badania nad genetyczną predyspozycją do rozwoju raka piersi czy gruczolakotorbielaków jajnika wskazują na istnienie wielogenowych zależności prowadzących do wysokiego ryzyka rozwoju nowotworu. Ich odkrycie wymagać będzie najprawdopodobniej wielu lat kolejnych analiz.

PODSUMOWUJĄC

Corocznie w Polsce zachorowuje na raka piersi i jajnika kilkanaście tysięcy kobiet. Osiągnięte postępy w genetyce klinicznej nowotworów pozwalają zapobiec znacznemu odsetkowi tych zachorowań. Ponadto raki o znanym podłożu genetycznym można skuteczniej wykrywać i leczyć dzięki zastosowaniu specjalistycznego, odmiennego od standardowego, systemu badań kontrolnych i postępowania terapeutycznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Lynch HT: Genetics and breast cancer. Van Nostrand - Reinhold, New York 1981.
2. Broca P: Traite de tumeurs. Paris, Asselin 1866.

3. Miki Y, et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
4. Wooster R, et al.: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792.
5. Lichtenstein P, et al.: Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85.
6. Cybulski C, et al: Risk of Breast Cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Aug 29; ;29(28):3747-52.
7. Cybulski C, et al.: [Mutations Predisposing to Breast Cancer in 12 Candidate Genes in Breast Cancer Patients from Poland.](#) *Clin Genet.* 2014 Oct 20. doi: 10.1111/cge.12524.
8. Cybulski C, et al.: [Clinical outcomes in women with breast cancer and a PALB2 mutation: a prospective cohort analysis.](#) *Lancet Oncol.* 2015 Jun;16(6):638-44. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70142-7. Epub 2015 May 7.
9. Cybulski C , et al.: [Germline RECQL mutations are associated with breast cancer susceptibility.](#) *Nat Genet.* 2015 Jun;47(6):643-6. doi: 10.1038/ng.3284. Epub 2015 Apr 27.
10. Antoniou AC, et al.: Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *J Med Genet* 2005; 42: 602-603.
11. Gronwald J, et al.: Cancer risks in first degree relatives of BRCA1 mutation carriers: effects of mutation and proband disease status. *J Med Genet* 2006; 43: 424-428.
12. Risinger JI, et al.: Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet* 1994; 7: 98-102.
13. Thorlacius S, et al.: Populationbased study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *Lancet* 1998; 352: 1337-1339.
14. Metcalfe K, et al.: [Family history of cancer and cancer risks in women with BRCA1 or BRCA2 mutations.](#) *J Natl Cancer Inst.* 2010 Dec 15;102(24):1874-8.
15. Lubinski J, et al.: [The risk of breast cancer in women with a BRCA1 mutation from North America and Poland.](#) *Int J Cancer.* 2012 Jul 1;131(1):229-34.
16. Osorio A, et al: Evaluation of the XRCC1 gene as a phenotypic modifier in BRCA1/2 mutation carriers. Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/BRCA2 (CIMBA). *British Journal of Cancer* 2011 Apr 12; 104(8), 1356-1361. Epub 2011 Mar 22.
17. Antoniou AC, et al: Common alleles at 6q25.1 and 1p11.2 are associated with breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Human Molecular Genetics* 2011 Aug 15; 20(16): 3304-21. Epub 2011 May 18.
18. Antoniou AC, et al: A locus on 19p13 modifies risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers and is associated with hormone receptor negative breast cancer in the general population. *Nature Genetics* 2010 Oct; 42(1-): 885-92. Epub 2010 Sep 19.
19. Engel C, et al: Association of the variants CASP8 D302H and CASP10 V410I with breast and ovarian cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 2010 Nov; 19(11):2859-2868. Epub 2010 Oct 26.
20. Ramus SJ, et al: Genetic variation at 9p22.2 and ovarian cancer risks in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* 2011 Jan 19; 103(2): 105-16. Epub 2010 Dec 17.
21. Antoniou AC, et al: Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Research* 2010 Dec 1; 70(23): 9742-54. Epub 2010 Nov 30.
22. Gaudet MM, et al: Common genetic variants and modification of penetrance of BRCA2-associated breast cancer. *PLoS Genet.* 2010 Oct 28; 6(10): e1001183.
23. Walker LC, et al: Evidence for SMAD3 as a modifier of breast cancer risk in BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research* 2010; 12(6): R102. Epub 2010 Nov 29.
24. Wang X, et al: Common variants associated with breast cancer in genome-wide association studies are modifiers of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Hum Mol Genet.* 2010 Jul 15; 19(14): 2886-97. Epub 2010 Apr 23.
25. Osorio A, et al: Evaluation of a candidate breast cancer associated mSNP in ERCC4 as a risk modifier in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Results from the consortium of investigators of modifiers of BRCA1/BRCA2 (CIMBA). *British Journal of Cancer* 2009 Dec 15; 101(12): 2048-54. Epub 2009 Nov 17.
26. Jakubowska A, et al: The Leu33Pro polymorphism in the ITGB3 gene does not modify BRCA1/2-associated breast or ovarian cancer risks: results from a multicenter study among 15,542 BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010 Jun; 121(3): 639-49. Epub 2009 Oct 30.

27. Antoniou AC, et al: Common variants in LSP1, 2q35 and 8q24 and breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Human Molecular Genetics* 2009 Nov 15; 18(22): 4442-56. Epub 2009 Aug 5.
28. Osorio A, et al: An evaluation of the polymorphisms Ins16bp and Arg72Pro in p53 as breast cancer risk modifiers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *British Journal of Cancer* 2008 Sep 16; 99(6): 974-7.
29. Antoniou et al: Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet.*2008 Apr, 82(4): 937-48. Epub 2008 Mar 20.
30. Couch FJ, et al: AURKA F31I polymorphism and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a consortium of investigators of modifiers of BRCA1/2 study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jul; 16(7): 1416-21.
31. Antoniou AC, et al: RAD51 135G→C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. *Am J Hum Genet.* 2007 Dec; 81(6): 1186-200. Epub 2007 Oct 16.
32. Marcus JN, et al.: Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer* 1996; 77: 697-709.
33. Martin AM, et al.: Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast-ovarian families from a breast cancer risk evaluation clinic. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2247-2253.
34. Li FP, Fraumeni JF Jr: Soft-tissue sarcomas, breast cancer and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71: 747-752.
35. Menkiszak J, et al.: Hereditary ovarian cancer: summary of 5 years of experience. *Ginekol Pol* 1998; 69: 283-287.
36. Loman N, et al.: Prognosis and clinical presentation of BRCA2-associated breast cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1365-1373.
37. Lubinski J, et al.: BRCA1-positive breast cancers in young women from Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 99: 71-76.
38. Lakhani SR: The pathology of familial breast cancer: Morphological aspects. *Breast Cancer Res* 1999; 1: 31-35.
39. Górski B, et al.: Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1963-1968.
40. Loman N, et al.: Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer* 1998; 83: 310-319.
41. Wooster R, et al.: Localisation of a breast cancer susceptibility gene BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2088-2090.
42. Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 in a population based series of breast cancer cases. *Br J Cancer* 2000; 83: 1301-1308.
43. Ford D, et al.: Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 676-689.
44. Hopper JL, et al.: Australian Breast Cancer Family Study. Population-based estimate of the average age specific cumulative risk of breast cancer for a defined set of protein-truncating mutations in BRCA1 and BRCA2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 741-747.
45. Warner E, et al.: Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1241-1247.
46. Semple J, et al.: Does the age of breast cancer diagnosis in first-degree relatives impact on the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers? *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Nov;154(1):163-9.
47. Jakubowska A, et al.: BRCA2 gene mutation in families with aggregations of breast and stomach cancers. *Br J Cancer* 2002; 87: 888-891.
48. Jakubowska A, et al.: A high frequency of BRCA2 gene mutations in Polish families with ovarian and stomach cancer. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 955-958.
49. Kwiatkowska E, et al.: BRCA2 germline mutations in male breast cancer patients in the Polish population. *Hum Mutat* 2001; 17: 73.
50. Boyd J, et al.: Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA* 2000; 283: 2260-2265.
51. Gronwald J, et al.: [Cancer risks in first-degree relatives of CHEK2 mutation carriers: effects of mutation type and cancer site in proband.](#) *Br J Cancer.* 2009 May 5;100(9):1508-12.
52. [Cybulski C](#), et al.: Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Oct 1;29(28):3747-52.
53. Huzarski T, et al.: Pathology of breast cancer in women with constitutional CHEK2 mutations. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90: 187-189.
54. Serrano-Fernández P, et al.: [Synergistic interaction of variants in CHEK2 and BRCA2 on breast cancer risk.](#) *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Sep;117(1):161-5. doi: 10.1007/s10549-008-0249-1.

55. NCCN Guidelines® Insights Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian (Version 2.2017). Features Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15(1): 9-20.
56. Malkin D, et al.: Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-1238.
57. Nelen MR, et al.: Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* 1996; 13: 114-116.
58. Hanssen AM, Fryns JP: Cowden syndrome. *J Med Genet* 1995; 32: 117-119.
59. Risinger JI, et al.: Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as on integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer* 1996; 77: 1836-1843.
60. Spigelman AD, Murday V, Phillips RK: Cancer and Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 1989; 30: 1588-1590.
61. Cohen MM Jr: A comprehensive and critical assessment of overgrowth and overgrowth syndromes. *Adv Hum Genet* 1989; 18: 181-303, 373-376.
62. Shiloh Y: Ataxia telangiectasia: closer to unraveling the mystery. *Eur J Hum Genet* 1995; 3: 116-138.
63. Swift M, et al.: Breast and other cancers in families with ataxiatelangiectasia. *N Engl J Med* 1987; 316: 1289-1294.
64. Lynch HT, Kaplan AR, Lynch JF: Klinefelter syndrome and cancer. A family study. *JAMA* 1974; 229: 809-811.
65. Wooster R, et al.: A germline mutation in the androgen receptor in two brothers with breast cancer and Reifenstein syndrome. *Nat Genet* 1992; 2: 132-134.
66. Familial breast cancer: classification, care and managing breast cancer and related risks in people with a family history of breast cancer. Clinical guideline [CG164] Published date: June 2013 Last updated: March 2017. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg164>.
67. Narod SA, et al.: Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 424-428.
68. Kotsopoulos J, et al.: [Timing of oral contraceptive use and the risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers](#). *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Feb;143(3):579-86.
69. McLaughlin JR, et al.: Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. Reproductive risk factors for ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study. *Lancet Oncol* 2007; 8: 26-34.
70. Narod SA, et a.: Oral contraceptives and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1773-1779.
71. Grabrick DM, et al.: Risk of breast cancer with oral contraceptive use in women with a family history of breast cancer. *JAMA* 2000; 284: 1791-1798.
72. Gronwald J, et al.: Treatment of infertility does not increase the risk of ovarian cancer among women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. [Fertil Steril](#). 2016 Mar;105(3):781-5.
73. Armstrong K, et al.: Hormon replacement therapy and life expectancy after prophylactic oophorectomy in women with BRCA1/2 mutations: a decision analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1045-1054.
74. Rebbeck TR, et al.: The Prevention and Observation of Surgical End Points Study Group. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002; 346: 1616-1622.
75. Rebbeck TR, et al.: Effect of Short-Term Hormone Replacement Therapy on Breast Cancer Risk Reduction After Bilateral Prophylactic Oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: The PROSE Study Group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7804-7810.
76. Kotsopoulos J, et al.: Hormone replacement therapy after menopause and risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers: a case-control study. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Jan;155(2):365-73.
77. Narod SA: Hormonal prevention of hereditary breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 952: 36-43.
78. Gronwald J, et al.: Influence of selected lifestyle factors on breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers from Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 95: 105-109.
79. Kotsopoulos J, et al.: Age at first birth and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 105: 221-228.
80. Gronwald J, et al.: Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. Tamoxifen and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers: an update. *Int J Cancer* 2006; 118: 2281-2284.
81. Narod SA, et al.: Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. *Lancet* 2000; 356: 1876-1881.
82. Gronwald J, et al.: [Duration of tamoxifen use and the risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers](#). *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jul;146(2):421-7.
83. Lubinski J, et al.: Serum selenium levels predict survival after breast cancer. [Breast Cancer Res Treat](#). 2017 Oct 17. doi: 10.1007/s10549-017-4525-9. [Epub ahead of print]
84. Kotsopoulos J, et al.: [Plasma micronutrients, trace elements, and breast cancer in BRCA1 mutation carriers: an exploratory study](#). *Cancer Causes Control*. 2012 Jul;23(7):1065-74.

85. Kotsopoulos J, et al.: [Oophorectomy after menopause and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers](#). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Jul;21(7):1089-96.
86. [Kotsopoulos J](#), et al.: Bilateral Oophorectomy and Breast Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2016 Sep 6;109(1).
87. Finch AP, Lubinski J, Møller P, Singer CF, Karlan B, Senter L, Rosen B, Maehle L, Ghadirian P, Cybulski C, Huzarski T, Eisen A, Foulkes WD, Kim-Sing C, Ainsworth P, Tung N, Lynch HT, Neuhausen S, Metcalfe KA, Thompson I, Murphy J, Sun P, Narod SA. [Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation](#). *J Clin Oncol*. 2014 May 20;32(15):1547-53.
88. Menkiszak J, et al.: Attitudes toward preventive oophorectomy among BRCA1 mutation carriers in Poland. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 93-95.
89. Zeigler LD, Kroll SS: Primary breast cancer after prophylactic mastectomy. *Am J Clin Oncol* 1991; 14: 451-454.
90. Giannakeas V, et al.: The expected benefit of preventive mastectomy on breast cancer incidence and mortality in BRCA mutation carriers, by age at mastectomy. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Sep 15. doi: 10.1007/s10549-017-4476-1. [Epub ahead of print]
91. Temple WJ, et al.: Technical considerations for prophylactic mastectomy in patients at high risk for breast cancer. *Am J Surg* 1991; 161: 413-415.
92. Warner E, et al.: Comparison of breast magnetic resonance imaging, mammography, and ultrasound for surveillance of women at high risk for hereditary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3524-3531.
93. Huzarski T, et al.: [Ten-Year Survival in Patients With BRCA1-Negative and BRCA1-Positive Breast Cancer](#). *J Clin Oncol*. 2013 Sep 10;31(26):3191-3196.
94. [Metcalfe K](#), et al.: Effect of Oophorectomy on Survival After Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA Oncol*. 2015 Jun;1(3):306-13.
95. Byrski T, et al.: Response to neo-adjuvant chemotherapy in women with BRCA1-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 108: 289-296.
96. Byrski T, et al.: [Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy](#). *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):375-9. Epub 2009 Dec 14.
97. Byrski T, et al.: [Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients](#). *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Sep;147(2):401-5.
98. Byrski T, et al.: Results of a phase II open-label, non-randomized trial of cisplatin chemotherapy in patients with BRCA1-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012; 20;14(4): R110.
99. Narod SA, et al.: [Should all BRCA1 mutation carriers with stage I breast cancer receive chemotherapy?](#) *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Feb;138(1):273-9.
100. Lubinski J, et al.: Genetic contribution to all cancers: the first demonstration using the model of breast cancers from Poland stratified by age at diagnosis and tumour pathology. *Breast Cancer Res Treat* 2009 Mar;114(1):121-6. Epub 2008 Apr 15.
101. Cybulski C, et al.: CHEK2-positive breast cancers in young Polish women. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4832-4835.
102. Cybulski C, et al.: A deletion in CHEK2 of 5,395 bp predisposes to breast cancer in Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 102: 119-122.
103. Steffen J, et al.: Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *Int J Cancer* 2006; 119: 472-475.
104. Górski B, et al.: Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 106: 379-381.
105. Huzarski T, et al.: The 3020insC allele of NOD2 predisposes to early onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89: 91-93. 69.
106. Górski B, Narod SA, Lubinski J: A common missense variant in BRCA2 predisposes to early onset breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R1023-R1027.
107. Menkiszak J, et al.: Clinical features of familial ovarian cancer lacking mutations in BRCA1 or BRCA2. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 99-100.
108. Hart WR: Mucinous tumors of the ovary: A review. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24: 4-25.
109. Shih IeM, Kurman RJ: Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164: 1511-1518.
110. Szymańska A: Identyfikacja genów związanych z predyspozycją do gruczolako-torbielaków oeluzowych jajnika. Doctor's thesis. Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin 2006.
111. Szymańska-Pasternak J: Identyfikacja genów związanych z predyspozycją do gruczolako-torbielaków surowiczych jajnika. Doctor's thesis. Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin 2007.

*Tadeusz Dębniak, Józef Kładny, Grzegorz Kurzawski, Janina Suchy, Katarzyna Tutlewska,
Jan Lubiński*



Zespół Lyncha (HNPCC)

Lynch syndrome

Streszczenie

Praca jest przeglądem doświadczeń własnych oraz danych z piśmiennictwa na temat diagnostyki, profilaktyki i leczenia nowotworów w przebiegu zespołu Lyncha (HNPCC).

Unikalną wartość wnoszą odmienne od standardowych kryteria rozpoznawania „HNPCC susp”. Taką sytuację kliniczną według własnych badań autorów należy rozpoznawać wówczas, gdy:

1. u probanta lub któregośkolwiek z jego krewnych I° lub II° stwierdza się raka jelita grubego;
2. u chorego z rakiem jelita grubego, spełniającego kryterium 1) lub wśród jego krewnych I° stwierdza się raka z tzw. spektrum HNPCC - raka jelita grubego, trzonu macicy, jelita cienkiego lub dróg moczowych;
3. co najmniej jeden z raków spełniających kryteria 1) lub 2) zdiagnozowany został poniżej 50 r.ż.
4. wykluczono polipowatość rodzinną.

Słowa kluczowe: HNPCC, kryteria diagnostyczne, prewencja, leczenie

Summary

Publication is the review based on author's own experience and literature data concerning diagnosis, prevention and treatment of tumors in families with Lynch Syndrome (HNPCC).

The unique value is provided by special, distinct from standard, criteria of diagnosing "HNPCC susp". According to authors studies such diagnosis can be established when:

1. proband or at least one of his I° or II° relatives is affected by colorectal cancer (CRC);
2. patient with CRC matching criterium 1) or one of his I° relatives is affected by at least one cancer from so called HNPCC spectrum - CRC, cancer of the endometrium or of the small bowel or of the urinary tract;
3. at least one of cancers matching criteria 1) or 2) has been diagnosed under age of 50 years;
4. familial adenomatous polyposis is excluded.

Key words: HNPCC, diagnostic criteria, prevention, treatment

Szacuje się, że wysoka genetyczna predyspozycja jest przyczyną 10-20% wszystkich raków jelita grubego (RJG) (1, 2, 3, 4, 5). Do dobrze znanych zespołów dziedzicznej predyspozycji do nowotworów w przebiegu których dochodzi do rozwoju RJG należą dziedziczące się zgodnie z prawami Mendla takie zespoły jak: dziedziczny nie związany z polipowatością rak jelita grubego (HNPCC, zespół Lyncha), polipowatość rodzinna w tym zespół Gardnera, zespoły Zankasa, Turcota, Peutz-Jeghersa i polipowatości młodzieńczej.

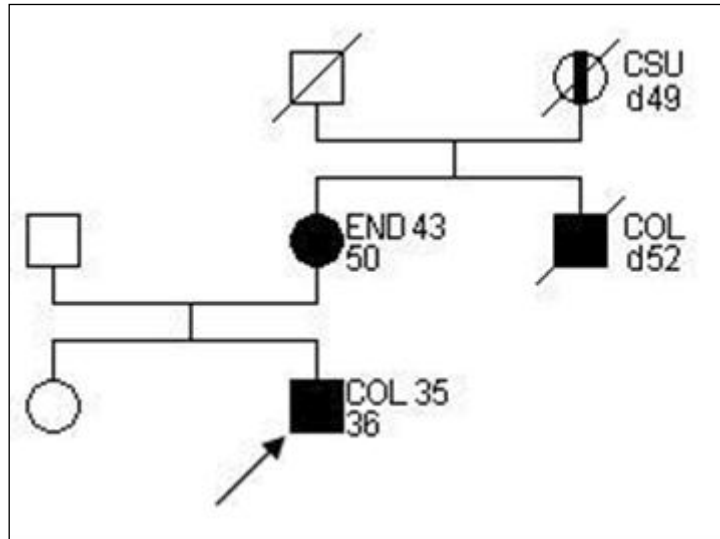
ZESPÓŁ LYNCHA (HNPCC)

Opisany przez Lyncha (6) w latach sześćdziesiątych zespół dziedzicznego niezwiązanego z polipowatością RJG stanowi przynajmniej około 5% wszystkich RJG. Wykazano, że HNPCC powstaje w wyniku mutacji jednego z kilku genów takich jak MSH2, MLH1, MSH6, PMS2. Mutacje w obrębie dwóch pierwszych z nich są najczęstszą przyczyną zespołów Lynch (7, 8, 9, 10). Do charakterystycznych cech klinicznych zespołu Lyncha należą:

- wczesny wiek zachorowania (średnio ok. 45 r.ż.)
- częstsza prawostronna lokalizacja guza
- 2 i więcej przypadków RJG wśród krewnych I°
- wiele synchronicznych i metachronicznych ognisk RJG
- występowanie choroby w kolejnych pokoleniach (transmisja pionowa)
- zwiększona częstość występowania wśród krewnych raków trzonu macicy, jelita cienkiego i dróg moczowych.

Według międzynarodowej grupy ekspertów (International Collaborative Group on HNPCC - ICG-HNPCC) zespół Lyncha można jednoznacznie rozpoznawać wówczas, gdy wykryta zostanie mutacja konstytucyjna w jednym z genów związanych z HNPCC jak np. MSH2 czy MLH1 lub też na podstawie danych rodowodowo-klinicznych, wówczas, gdy spełnione są kryteria przedstawione w tabeli 1 (11, 12).

Na rycinie 1 przedstawiono rodzinę spełniającą kryteria definitywnego HNPCC wg ICG-HNPCC.



Ryc. 1. Rodowód rodziny z cechami HNPCC wg ICG-HNPCC (14).

Ze względu na niepełną penetrację genów typową dla chorób mendlowskich dominujących, zgony z powodu różnych chorób, czy też trudności w uzyskaniu pełnych informacji o wszystkich członkach rodzin, znaczna część - być może większość - rodzin w rzeczywistości obciążonych HNPCC, nie może być rozpoznana w oparciu o kryteria wg tabeli 1, tj. amsterdamskie.

Tab. 1. Kryteria diagnostyczne HNPCC wg ICG-HNPCC (12).

1.	u co najmniej 3 członków danej rodziny wykryto zweryfikowanego histopatologicznie RJG lub raka trzonu macicy, jelita cienkiego lub dróg moczowych; jeden z nich jest krewnym I ^o dwóch pozostałych; wykluczono polipowatość rodzinną*
2.	co najmniej 2 z tych osób to krewni I ^o w dwóch różnych pokoleniach,
3.	przynajmniej u 1 spośród tych osób zdiagnozowano raka przed 50 r.ż.

Wszystkie pozostałe parametry (prawostronna lokalizacja, syn- lub metachroniczne guzy) według tych badaczy powinny być traktowane jako cechy dodatkowe.

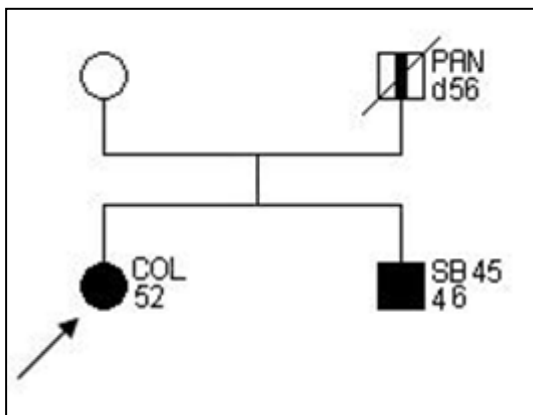
**wykluczono występowanie mnogich polipów (polipowatości) jelita grubego, wrodzonego przerostu nabłonka barwnikowego siatkówki, torbieli i kostniaków kości twarzoczaszki oraz desmoidów*

Dlatego też szereg autorów proponuje stosowanie innego typu kryteriów, spełnienie których nie upoważnia do jednoznacznego rozpoznania HNPCC, jednak jest pomocne w wykrywaniu rodzin ze zwiększonym ryzykiem (12, 13, 14, 15). Naszym zdaniem w identyfikacji przypadków podejrzanych o HNPCC szczególnie użyteczne są kryteria zestawione w tabeli 2.

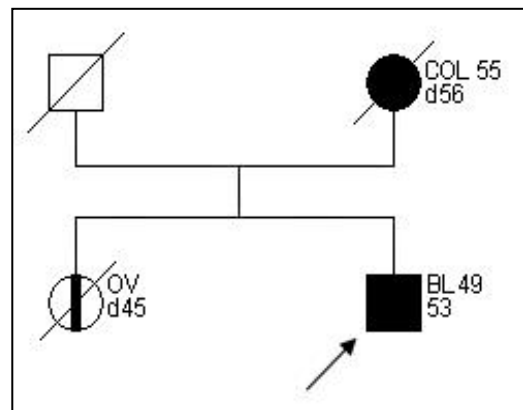
Tab. 2. Kryteria rozpoznawania rodzin podejrzanych o HNPCC (16).

1.	U pacjenta z RJG wśród krewnych I° stwierdzono zachorowanie na RJG, raka trzonu macicy, jelita cienkiego, raka jajnika przed 50 r.ż lub dróg moczowych.
2.	Co najmniej jeden z tych nowotworów rozpoznano poniżej 50 r.ż.
3.	Wykluczono polipowatość rodzinną

Przykłady rodzin spełniających kryteria „podejrzenia HNPCC” przedstawiono na rycinach 2 i 3.



Ryc. 2. Rodzowód rodziny „podejranej o HNPCC”.



Ryc. 3. Rodzowód rodziny „podejranej o HNPCC”.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA NOSICIELSTWA MUTACJI W GENACH ZWIĄZANYCH Z ROZWOJEM HNPCC

Wykrycie mutacji markerowej dla rodziny z HNPCC ma bardzo istotne znaczenie kliniczne, ponieważ: A) umożliwia wykluczenie ok. 50% członków rodziny z grupy wysokiego ryzyka. B) ułatwia podjęcie decyzji o radykalności zabiegów chirurgicznych np. kolektomii zamiast klasycznej resekcji odcinkowej oraz profilaktycznej histerektomii i owariektomii w sytuacji, gdy zabiegi te wykonywane są u zdiagnozowanych nosicieli mutacji.

TEST *MSH2* I *MLH1*

Wykonywanie testów DNA powinno być poprzedzone analizami danych rodowodoklinicznych. Taki algorytm pozwala na kilkudziesięciokrotne obniżenie kosztów wykrycia mutacji w genach predysponujących do zespołu Lyncha bez znaczącego obniżenia czułości ich wykrywania. Wykonanie testów DNA jest wskazane w rodzinach spełniających co najmniej kryteria podejrzenia o HNPCC.. Po wykluczeniu FAP (występowanie cech charaktery-

stycznych dla FAP to: polipowatość jelit, przerost nabłonka barwnikowego siatkówki oka, występowanie zmian torbielowato-kostniakowych kości twarzoczaszki i desmoidów), jeżeli dysponujemy tkanką z guza, należy wykonać immunohistochemiczną ocenę ekspresji białek *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* w tkance nowotworowej, ponieważ badanie to może zawęzić dalsze postępowanie do poszukiwania mutacji w obrębie jednego genu (brak ekspresji - może wskazywać na zmutowany gen!).

Wieloletnie wielośrodkowe badania doprowadziły do scharakteryzowania częstości i rodzajów występujących w Polsce mutacji genów *MSH2* i *MLH1* (17). Najważniejsze ustalenia przydatne w opracowaniu testu to:

- najczęstszą przyczyną zespołu Lyncha w Polsce są mutacje w obrębie *MSH2* i *MLH1*, które stanowią 90% wszystkich mutacji związanych z tym zespołem;
- mutacje wykrywane testem MLPA stanowią około 10% wszystkich mutacji;
- mutacje powtarzalne występują u ponad 60% wszystkich rodzin z mutacjami.

Biorąc pod uwagę te wytyczne oraz koszty analiz, po immunohistochemii w następnej kolejności należy wykonać badanie najczęstszych charakterystycznych dla populacji polskiej mutacji w *MSH2* i *MLH1* w DNA z krwi obwodowej pacjenta. W przypadku wyniku negatywnego następnym krokiem powinno być wykonanie badania MLPA dla *MSH2*, *MLH1*. Ostatnim etapem wykrywania mutacji jest sekwencjonowanie genów predysponujących do zespołu Lyncha.

TEST *EpCAM*

Badania międzynarodowe z ostatnich lat ujawniły kolejną przyczynę zespołu Lyncha. Wykryto germinalne delecje ostatnich exonów genu *EpCAM*. Ryzyko raka jelita grubego u nosicieli delecji w genie *EpCAM* okazało się porównywalne do sytuacji, gdy pacjenci są nosicielami mutacji w genie *MSH2*. U nosicieli delecji w genie *EpCAM* zaobserwowano również niższe ryzyko raka trzonu macicy w stosunku do nosicieli innych mutacji w genach MMR (18).

Gen *EpCAM* koduje glikoproteinę transbłonową pośredniczącą w adhezji międzykomórkowej w nabłonkach. Jest on zaangażowany w sygnalizację komórkową, migrację, proliferację, a także różnicowanie komórek. W zdrowych tkankach produkt genu *EpCAM* zlokalizowany jest w błonie boczno-podstawnej, zaś w tkankach nowotworowych proteina ta zostaje przeniesiona na powierzchnię komórki, dzięki czemu jest bardziej dostępna dla przeciwciał (19). Delecje ostatnich exonów w genie *EpCAM* powodują wyciszenie genu *MSH2* poprzez mechanizm zwany hipermetylacją promotora genu *MSH2*. Mechanizm ten polega na dołącze-

niu dodatkowych grup metylowych do promotora genu *MSH2*, co powoduje redukcję ekspresji tegoż genu i wiąże się z mniejszą ilością białka produkowanego przez *MSH2* w komórkach nabłonkowych. Częstość mutacji w genie *EpCAM* jest populacyjnie zróżnicowana (1-3% pacjentów z zespołem Lyncha w populacji holenderskiej oraz niemieckiej) (20). Wstępne wyniki badań pacjentów polskiej populacji prowadzone w Ośrodku Nowotworów Dziedzicznych w Szczecinie ujawniły obecność delecji w genie *EpCAM* u 7% pacjentów podejrzanych o zespół Lyncha na podstawie danych rodowodowo-klinicznych. Mutacje (delecje 8 i 9 exonu) w genie *EpCAM* wykryto testem MLPA. Ostatnim etapem weryfikacji mutacji jest sekwencjonowanie ostatnich exonów genu *EpCAM*, w celu zmapowania delecji (ustalenia tzw. „breakpoints”].

Biorąc pod uwagę wyniki badań z różnych ośrodków na świecie, jak również wstępne wyniki badań polskiej populacji, wydaje się, że należy wprowadzić test wykrywający mutacje w genie *EpCAM* do rutynowej diagnostyki zespołu Lyncha.

PROWADZENIE RODZIN Z HNPCC

Posiadana obecnie wiedza na temat tego zespołu wskazuje na konieczność zastosowania specjalnej formy opieki profilaktyczno-diagnostycznej i leczniczej. W poszczególnych ośrodkach obowiązują różne programy (4, 21, 22). Według kryteriów opracowanych przez międzynarodową grupę ekspercką dziedzicznego raka żołądka i jelita (tzw. Grupa „Majorca”) zasady prowadzenia rodzin z HNPCC powinny zostać zastosowane w rodzinach spełniających kryteria Amsterdamskie II lub zmodyfikowane kryteria Betesda: (1) RJG rozpoznany poniżej 50 rż, 2) obecność guzów syn- lub metachronicznych lub innych nowotworów ze spektrum HNPCC, niezależnie od wieku (rak żołądka, jajnika, trzustki, dróg moczowo-płciowych, guzy OUN), 3) RJG z niestabilnością mikrosatelitarną rozpoznany poniżej 60 rż, 4) pacjent z RJG i krewnym I stopnia z nowotworem ze spektrum HNPCC- jeden z nowotworem poniżej 50 rż, 5) pacjent z RJG oraz co najmniej dwoma krewnymi I stopnia dotkniętymi nowotworem ze spektrum HNPCC niezależnie od wieku (23).

OPTIMALIZACJA DIETY

U osób z wysokim ryzykiem rozwoju RJG zalecana jest dieta ubogotłuszczowa z ograniczeniem mięsa czerwonego, z dodatkiem otrąb pszennych i bogata w błonnik (24).

PREWENCJA FARMAKOLOGICZNA

Istnieją doniesienia, że do leków hamujących karcinogenezę RJG należą: sulindac, piroxicam, wapń, witamina C. Przydatność tych preparatów w zapobieganiu HNPCC jest prawdopodobna, jednak jak dotąd nieudowodniona (22, 25, 26). Ostatnio wykazano, że doustne przyjmowanie Aspiryny w dawce 600 mg na dobę przez przynajmniej 25 miesięcy zmniejsza ryzyko zachorowania na RJG wśród nosiceli mutacji genów MLH1/MSH2/MSH6 (27).

KOLONOSKOPIA

Pełna kolonoskopia zalecana jest, co 1-2 lata poczynając od 20-25 r.ż. W rodzinach, w których RJG wystąpił w młodszym wieku kolonoskopie należy rozpocząć wykonywać o 5 lat wcześniej od wieku najmłodszej osoby z RJG. W przypadkach, w których w trakcie endoskopii nie można było dokładnie ocenić całego jelita wskazane jest wykonanie wlewu kontrastowego (22, 28).

CHIRURGIA

Polipektomia endoskopowa zalecana jest w przypadku polipów łagodnych, nienawrotowych. Natomiast u pacjentów z gruczolakami: mnogimi i/lub - nawrotowymi i/lub - o dużym stopniu dysplazji i/lub - kosmkowymi, należy rozważyć profilaktyczną kolektomię (28). Przeważa pogląd, że nie jest wskazana profilaktyczna chirurgia u pacjentów bez zmian patologicznych jelita grubego nawet wówczas, gdy osoby badane są nosicielami zmutowanych genów dla HNPCC (22). Stwierdzenie wysokiego odsetka guzów synchronicznych (u ponad 15% chorych w chwili pierwotnej diagnozy) oraz metachronicznych (ok. 45% pojawia się w ciągu 10 lat od usunięcia pierwotnego guza) zdecydowało, iż zarówno w profilaktycznej chirurgii jak i u chorych z rodzin z HNPCC z rozpoznaniem histopatologicznie RJG polecane są następujące rodzaje zabiegów chirurgicznych (22, 28):

1. proktokolektomia z ileostomią;
2. kolektomia z zespoleniem ileo-rektalnym;
3. proktokolektomia z ileoanalnym „pouchem” - S, J, W lub H.

Pierwszy z proponowanych zabiegów jest wprawdzie najbardziej radykalny, pozbywamy się bowiem w całości śluzówki jelita grubego, a zatem i ryzyka nawrotu, ale zabieg ten oznacza równocześnie ciężkie okaleczenie często połączone z zaburzeniami w oddawaniu moczu i dysfunkcją seksualną.

Kolektomia z zespoleniem ileo-rektalnym chroni od tego rodzaju powikłań wymaga jednak częściej kontroli pozostawionego odcinka odbytnicy z uwagi na ryzyko nawrotu.

Proktokolektomia z ileoanalnym „pouchem” S, J, W lub H jest metodą mającą dopiero historię kilkunastoletnią stąd trudno o jej jednoznaczną ocenę.

Wszystkie te zabiegi są bardziej rozległe od zabiegów klasycznych stosowanych w leczeniu RJG i cechuje je zwiększona częstość ww. powikłań. Ich efektywność w przedłużeniu życia pacjentów z HNPCC wymaga dalszych badań, jak dotąd nie opublikowano wyników badań prospektywnych. Dane retrospektywne nie wykazały statystycznie istotnych różnic w przeżywalności pacjentów, u których wykonano zabieg totalnej lub subtotalnej kolektomii w porównaniu do pacjentów leczonych za pomocą segmentowej resekcji jelita grubego (29, 30). Porównanie jakości życia pacjentów leczonych za pomocą subtotalnej kolektomii oraz przy zastosowaniu częściowej kolektomii nie wykazało znaczącego wpływu rozległości zabiegu chirurgicznego na jakość życia (31). W związku z wysokim ryzykiem rozwoju drugiego pierwotnego RJG (syn- lub metachronicznego) u pacjentów z zespołem Lyncha aktualnie uważa się, że decyzja co do rodzaju zabiegu chirurgicznego powinna być indywidualna, ze wskazaniem na bardziej rozległy zabieg chirurgiczny (32, 33, 34)

Wykazano już, że zastosowanie odpowiednich programów opieki medycznej w rodzinach z HNPCC zapewnia zwiększoną wykrywalność wczesnych, bezobjawowych RJG. Ponadto badania prospektywne potwierdziły założenie, iż dzięki odpowiedniemu postępowaniu zmniejsza się również zachorowalność na RJG - ryzyko spada z ok. 80 do 30% oraz większy jest odsetek wyleczeń i czas przeżycia chorych z RJG w rodzinach z zespołem Lyncha. Odpowiednio prowadzony nosiciel mutacji MSH2/MLH1 nie powinien umrzeć z powodu RJG (35).

DIAGNOSTYKA GUZÓW POZAOKRĘŻNICZYCH

W związku ze zwiększoną częstością występowania w rodzinach z HNPCC nowotworów trzonu macicy oraz jajnika, u kobiet zalecane są od 35 r.ż. coroczne szczegółowe badania ginekologiczne z dopochwowym USG (w części ośrodków dodatkowo z histopatologicznym badaniem wyskrobin z jamy macicy) oraz markerem CA125 (36, 37, 38).

Ponadto w części przypadków wskazane są badania ukierunkowane na wykrywanie innych nowotworów częściej występujących w danej rodzinie (np. żołądek, układ moczowy, piersi) (5, 22).

Rak trzonu macicy

U kobiet z rodzin z HNPCC istnieje wysokie (30-70%) ryzyko życiowe (lifetime risk) zachorowania na raka trzonu macicy. W piśmiennictwie międzynarodowym opublikowano wyniki 6 projektów badawczych wczesnego wykrywania raka trzonu macicy, przeprowadzonych łącznie w grupie 1518 kobiet (39, 40, 41, 42, 43, 44). W badaniach w których wykorzystywano USG dopochwowe jako jedyną metodę diagnostyczną często rozpoznawano interwałowe raki trzonu macicy (42, 44). W badaniach w których stosowano również tzw. „endometrial sampling” skuteczność wykrywania raka trzonu macicy oraz zmian przedrakowych znacząco wzrosła. (40, 41, 43). W przeciwieństwie do tych danych Helder-Woolderink i wsp po przebadaniu 75 kobiet zasugerowali brak wzrostu efektywności badań przesiewowych po ich poszerzeniu o procedurę „endometrial sampling” (45). Wyniki obszernej meta-analizy danych literaturowych wykazały, że procedura „Pipelle endometrial sampling” jest skuteczną metodą wykrywania raka trzonu macicy u kobiet zarówno przed jak i po menopauzie (46).

Do tej pory nie opublikowano wyników badań prospektywnych oceniających wpływ ginekologicznych badań kontrolnych na przeżywalność pacjentek z rodzin z HNPCC. Jednakże ze względu na wysokie ryzyko raka trzonu macicy zgodnie z rekomendacjami międzynarodowej grupy ekspertów u pacjentek z rodzin z zespołem Lyncha strategia badań profilaktyczno-diagnostycznych powinna uwzględniać USG ginekologiczne oraz biopsję aspiracyjną endometrium, rozpoczynając od 35-40 roku życia. (47).

Rak jajnika

Ryzyko zachorowania na raka jajnika (life-time risk) wynosi od 3 do 20% dla kobiet z rodzin z HNPCC (43). Średni wiek zachorowania wynosi 41 lat w rodzinach z zespołem Lyncha i z wykrytymi mutacjami w genach HNPCC oraz 66 lat u kobiet z rodzin z HNPCC bez wykrytych mutacji. (22). W polskich rodzinach z zespołem Lyncha ryzyko zachorowania dla kobiet młodych, przed 50 rokiem życia, jest ponad 30-krotnie zwiększone w stosunku do ogólnej populacji polskiej (submitted)

Ostatnio wykazano, że kontrolne badania onkologiczne wczesnego wykrywania raka jajnika u kobiet z rodzin z zespołem Lyncha, oparte na corocznym USG dopochwowym i markerze CA125, nie są efektywne. Rijcken i wsp. w ciągu 5 lat badań 41 nosicielek mutacji genów MMR nie wykrył żadnych zaburzeń w USG i poziomie CA125 (41). Z kolei w grupie 175 fińskich nosicielek mutacji genów HNPCC kontrolowanych przez 4 lata rak jajnika rozwinął się u 4 pacjentek- żaden z nich nie został wykryty podczas rutynowych badań kontrolnych (43). Gerritzen i wsp. przez okres 2,5 lat badali 100 kobiet (nosicielek lub z rodzin speł-

niających kryteria Amsterdamskie)- w grupie tej wykryto 1 rak jajnika- w zaawansowanym stadium (III C) (40). Brak skuteczności USG ginekologicznego oraz markera CA125 wykazano również po przebadaniu 236 Duńskich kobiet z rodzin z zespołem Lyncha- rak jajnika wykryto u 4 kobiet, u 3 z nich rozpoznano nowotwór interwałowy po zgłoszeniu przez pacjentki dolegliwości ginekologicznych (39).

Ostatnio opublikowano wyniki retrospektywnych analiz oceniających efektywność corocznego USG dopochwowego i markera CA125 wykonywanych w grupie 54 nosicielek w porównaniu do grupy kontrolnej 54 sparowanych pod względem wieku nosicielek, u których nie wykonywano ginekologicznych badań kontrolnych (USG ginekologiczne+CA125). W grupie badanej w ciągu 4 lat rozpoznano raka jajnika u 6 kobiet, dwie z nich zmarły w ciągu 2 lat od momentu rozpoznania. W grupie kontrolnej rak jajnika zdiagnozowano również u 6 pacjentek, połowa z nich zmarła w ciągu 2 lat od rozpoznania (48). Autorzy wskazali na zasadność wykonania profilaktycznego zabiegu wycięcia macicy wraz z przydatkami u kobiet z rodzin z zespołem Lyncha po urodzeniu zaplanowanej liczby dzieci. Schmeler i wsp wykazali skuteczność takiej procedury- raka jajnika rozpoznano u 12 (5%) spośród 223 kobiet, u których nie wykonano takiego zabiegu; zaś w grupie 47 kobiet po profilaktycznym usunięciu macicy wraz z przydatkami przydatków nie wykryto żadnego zachorowania na ten nowotwór (49). W związku z wysokim ryzykiem raka jajnika u młodych kobiet z rodzin z zespołem Lyncha oraz brakiem skuteczności dostępnych metod diagnostycznych we wczesnym wykrywaniu tego nowotworu, zgodnie z zaleceniami międzynarodowej grupy ekspertów (47) należy rozważyć jako opcję profilaktyczną adneksktomię u kobiet powyżej 35-40 roku życia.

PIŚMIENNICTWO

1. Lovett E: Family studies in cancer of the colon and rectum. *Br J Surg* 1976, 63: 13-18.
2. Lynch HT, Lynch J, Lynch P: Management and control of familial cancer. In: Mulvill JJ, Miller RW, Fraumeni JF, eds. *Genetics of Human Cancer*. New York, Raven Press, 1977, 3: 235-55.
3. Ponz de Leon M, et al.: Familial aggregation of tumors in the three-year experience of a Population-based Colorectal Cancer Registry. *Cancer Research* 1989, 49: 4344-8.
4. Lynch HT, et al.: Hereditary colorectal cancer. *Seminars in Oncology* 1991, 18: 337-66.
5. Vasen H: Inherited forms of colorectal, breast, and ovarian cancer. *Surgical Oncology Clin. N-Am.* 1994, 3: 501.
6. Lynch HT, Krush AJ: Cancer family "G" revisited: 1895. 1970. *Cancer* 1971, 27: 1505-11.
7. Fishel R, et al.: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993, 75: 1027-38.
8. Leach FS, et al.: Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993, 75: 1215-25.
9. Nicolaides NC, et al.: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994, 371: 75-80.
10. Papadopoulos N, et al.: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994, 263: 1625-9.

11. Vasen HF, et al.: The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991, 34: 424-5.
12. Vasen HFA, et al.: New Clinical Criteria for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC, Lynch syndrome) Proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999, 116: 1453-6.
13. Rodrigues-Bigas MA, et al.: A National Cancer Institute Workshop on Hereditary on-polyposis Colorectal Cancer Syndrome meeting highlights and Bethesda Guidelines. *J. Nat Cancer Ist* 1997, 89: 1758-62.
14. Park JG, et al.: Suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum* 1999, 42: 710-6.
15. Park JG, et al.: Suspected HNPCC and Amsterdam criteria II: evaluation of mutation detection rate, an international collaborative study. *Int. J. Colorectal Dis* 2002, 17: 109-14.
16. Kladny J, et al.: Nuclear pedigree criteria of suspected HNPCC. *Her Can in Clin Pract* 2003, 1: 34-8.
17. Kurzawski G, et al.: Germline *MSH2* and *MLH1* mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study). *Clin Genet* 2006, 69: 40-7.
18. Pérez-Cabornero L, et al.: Frequency of rearrangements in Lynch syndrome cases associated with *MSH2*: characterization of a new deletion involving both *EPCAM* and the 5' part of *MSH2*. *Cancer Prev Res* 2011, 4:1556-62.
19. Munz M, Baeuerle PA, Gires O: The emerging role of *EPCAM* in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 2009, 69:5627-9.
20. Kuiper RP, et al.: Recurrence and variability of germline *EPCAM* deletions in Lynch syndrome. *Hum Mutat.* 2011, 32:407-14.
21. Vasen HF, et al.: Surveillance in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: an international cooperative study of 165 families. The International Collaborative Group on HNPCC. *Dis Colon Rectum* 1993, 36: 1-4.
22. Lynch H, Lynch J: Lynch syndrome: Natural history, Genetic Counseling and Prevention. *J Clin Oncol* 2000, 18: 19-31.
23. Vasen HFA, Möslein G, Alonso A et al.: Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 2007; 44: 353-362.
24. Willet W, et al.: Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990, 323: 1664-72.
25. Bralow SP: Primary and secondary chemoprevention of colorectal cancer: Hereditary colorectal cancer. Springer Verlag Tokyo 1990, 231.
26. Muscat JE, Stellman SD, Wynder EL: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and colorectal cancer. *Cancer* 1994, 74: 1847.
27. Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, Eccles D, Evans DG, Maher ER, Bertario L, Bisgaard ML, Dunlop MG, Ho JW, Hodgson SV, Lindblom A, Lubinski J, Morrison PJ, Murday V, Ramesar R, Side L, Scott RJ, Thomas HJ, Vasen HF, Barker G, Crawford G, Elliott F, Movahedi M, Pylvanainen K, Wijnen JT, Fodde R, Lynch HT, Mathers JC, Bishop DT; CAPP2 Investigators. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2011 Dec 17;378(9809):2081-7.
28. Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM: Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 1995, 345: 1183-4.
29. Baucom RB, Wise PE. Endoscopic and surgical management of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Colon Rectal Surg.* 2012 Jun;25(2):90-6.
30. Natarajan N, Watson P, Silva-Lopez E, Lynch HT. Comparison of extended colectomy and limited resection in patients with Lynch syndrome. *Dis Colon Rectum.* 2010 Jan;53(1):77-82.
31. Haanstra JF, de Vos Tot Nederveen Cappel WH, Gopie JP, Vecht J, Vanhoutvin SA, Cats A, van der Zaag-Loonen HJ, Langers AM, Bergmann JH, van de Meeberg PC, Dekker E, Kleibeuker JH, Vasen HF, Nagengast FM, van Duijvendijk P. Quality of life after surgery for colon cancer in patients with Lynch syndrome: partial versus subtotal colectomy. *Dis Colon Rectum.* 2012 Jun;55(6):653-9.
32. Kalady MF, McGannon E, Vogel JD, Manilich E, Fazio VW, Church JM. Risk of colorectal adenoma and carcinoma after colectomy for colorectal cancer in patients meeting Amsterdam criteria. *Ann Surg.* 2010 Sep;252(3):507-11
33. Parry S, Win AK, Parry B, Macrae FA, Gurrin LC, Church JM, Baron JA, Giles GG, Leggett BA, Winship I, Lipton L, Young GP, Young JP, Lodge CJ, Southey MC, Newcomb PA, Le Marchand L, Haile RW, Lindor NM, Gallinger S, Hopper JL, Jenkins MA. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut.* 2011 Jul;60(7):950-7.

34. Rodriguez-Bigas MA, Möeslein G. Surgical treatment of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome). *Fam Cancer*. 2013 Jun;12(2):295-300.
35. Weissman SM, Bellcross C, Bittner CC, Freivogel ME, Haidle JL, Kaurah P, Leininger A, Palaniappan S, Steenblock K, Vu TM, Daniels MS. Genetic Counseling Considerations in the Evaluation of Families for Lynch Syndrome-A Review. *J Genet Couns*. 2010
36. Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, Kinney AY, Miesfeldt S, Lu KH, Lynch P, Burke W, Press N: Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. *JAMA* 2006, 296:1507-1517.
37. Schmeler KM, Lu KH: Gynecologic cancers associated with Lynch syndrome/HNPCC. *Clin Transl Oncol* 2008, 10:313-317.
38. Meyer LA, Broaddus RR, Lu KH: Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. *Cancer Control* 2009, 16:14-22.
39. Ketabi Z, Gerdes AM, Mosgaard B, Ladelund S, Bernstein I: The results of gynecologic surveillance in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol* 2014, 133:526-30.
40. Gerritzen LH, Hoogerbrugge N, Oei AL, Nagengast FM, van Ham MA, Massuger LF, de Hullu JA: Improvement of endometrial biopsy over transvaginal ultrasound alone for endometrial surveillance in women with Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2009, 8:391-397.
41. Rijcken FE, Mourits MJ, Kleibeuker JH, Hollema H, van der Zee AG: Gynecologic screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol Oncol* 2003, 91:74-80.
42. Dove-Edwin I, Boks D, Goff S, Kenter GG, Carpenter R, Vasen HF, Thomas HJ: The outcome of endometrial carcinoma surveillance by ultrasound scan in women at risk of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma and familial colorectal carcinoma. *Cancer* 2002, 94:1708-1712.
43. Renkonen-Sinisalo L, Bützow R, Leminen A, Lehtovirta P, Mecklin JP, Järvinen HJ: Surveillance for endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer* 2007, 120:821-824.
44. Lécuru F, Le Frère Belda MA, Bats AS, Tulpin L, Metzger U, Olschwang S, Laurent-Puig P: Performance of office hysteroscopy and endometrial biopsy for detecting endometrial disease in women at risk of human non-polyposis colon cancer: a prospective study. *Int J Gynecol Cancer* 2008, 18:1326-1331.
45. Helder-Woolderink JM, De Bock GH, Sijmons RH, Hollema H, Mourits MJ: The additional value of endometrial sampling in the early detection of endometrial cancer in women with Lynch syndrome. *Gynecol Oncol* 2013, 131:304-308.
46. Dijkhuizen FP, Mol BW, Brölmann HA, Heintz AP: The accuracy of endometrial sampling in the diagnosis of patients with endometrial carcinoma and hyperplasia: a meta-analysis. *Cancer* 2000, 89:1765-1772.
47. Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, Burn J, Capella G, Colas C, Engel C, Frayling IM, Genuardi M, Heinimann K, Hes FJ, Hodgson SV, Karagiannis JA, Laloo F, Lindblom A, Mecklin JP, Møller P, Myrholm T, Nagengast FM, Parc Y, Ponz de Leon M, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Sijmons RH, Tejpar S, Thomas HJ, Rahner N, Wijnen JT, Järvinen HJ, Möeslein G; Mallorca group: Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 2013, 62:812-23.
48. Stuckless S, Green J, Dawson L, Barrett B, Woods MO, Dicks E, Parfrey PS. Impact of gynecological screening in Lynch syndrome carriers with an MSH2 mutation. *Clin Genet*. 2013 Apr;83(4):359-64.
49. Renkonen-Sinisalo L, Bützow R, Leminen A, Lehtovirta P, Mecklin JP, Järvinen HJ. Surveillance for endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer*. 2007 Feb 15;120(4):821-4.

Janina Suchy, Grzegorz Kurzawski, Jan Lubiński



Zespół *MSH6*

MSH6 syndrome

Streszczenie

Szacuje się, że około 5-10% nowotworów jest wynikiem obecności konstytucyjnej mutacji w pojedynczym genie o wysokiej penetracji. Geny związane z rozwojem nowotworów pełnią funkcje genów supresorowych, onkogenów czy genów mutatorowych jak *hMLH1*, *hMSH2* i *hMSH6*, które są odpowiedzialne za naprawę DNA. Mutacje w genach *hMLH1* i *hMSH2* stanowią większość zmian wykrywanych u pacjentów z HNPCC. Konstytucyjne mutacje w pozostałych genach naprawy DNA (*hMSH6*, *hPMS2*, *hMLH3*, *hPMS1*) są rzadkie i stanowią około 20% wykrywanych zmian w HNPCC. Jak dotąd w genie *hMSH6* opisano ponad 400 różnych wariantów/mutacji (www.med.mun.ca/MMRvariants). Ponad 60% z tych zmian zlokalizowanych jest w eksonach 4, 5 i 9. Według danych literaturowych u nosicieli mutacji w genie *hMSH6* najczęściej występują nowotwory jelita grubego, trzonu macicy i jajnika, ponadto rodziny z mutacją w tym genie często nie spełniają kryteriów rodowodowych HNPCC. Obecnie w polskiej populacji zidentyfikowano 13 patogenicznych zmian i 19 wariantów o nieustalonej jednoznacznie patogeniczności. Analiza mutacji w genie *hMSH6* powinna być wykonywana u pacjentów chorujących na raka jelita grubego, trzonu macicy lub jajnika z rodzinną historią tych nowotworów. Ponadto badanie takie powinno być rozważone u pacjentów z mnogimi nowotworami pierwotnymi (jednym z nich powinien być rak jelita grubego, trzonu macicy lub jajnika) oraz u probantów ze sporadycznym, zdiagnozowanym w młodym wieku rakiem jelita grubego. Analizy laboratoryjne powinny rozpocząć się od badania immunohistochemicznego genu *hMSH6*, a następnie być kontynuowane poprzez analizę metodami DHPLC/sekwencjonowanie regionów kodujących genu (począwszy od eksonów 4, 5 i 9).

Słowa kluczowe: *hMSH6*, rak jelita grubego i trzonu macicy, kryteria diagnostyczne

Summary

It is estimated, that 5-10% of human cancers are a result of a constitutional mutation in a single, highly penetrant gene. Genes involved in tumour development play the function of tumour suppressor genes, oncogenes or mutator genes such as *hMLH1*, *hMSH2*, or *hMSH6*, responsible for DNA mismatch repair (MMR). *hMSH2* and *hMLH1* genes account for the majority of HNPCC patients harbouring mutations in MMR genes. Constitutional mutations in other MMR genes (*hMSH6*, *hPMS2*, *hMLH3*, *hPMS1*) are rare, accounting for about 20% of all MMR mutations in HNPCC.

Thus far, more than 400 different variants/mutations have been described in the *hMSH6* gene (www.med.mun.ca/MMRvariants). More than 60% of the identified changes are located in exons 4, 5 and 9. According to the literature, *hMSH6* mutation carriers are affected most frequently by cancers of the colorectum, endometrium or ovaries and *hMSH6* families often do not match the HNPCC diagnostic criteria.

Currently, in the Polish population, 13 pathogenic and 19 variants of unknown significance in the *hMSH6* gene have been identified.

hMSH6 should be investigated for the occurrence of germline abnormalities in probands affected by colorectal cancer (CRC), endometrial cancer (EC) or ovarian cancer (OC) who have a family history of these tumours. Additionally, *hMSH6* examination should be considered for probands with multiple primary tumours (one of them is CRC, EC or OC) or probands with sporadic, early onset CRC. It is appropriate to begin analysis by *hMSH6* immunostaining, followed by DHPLC/sequencing examination of the coding regions.

Key words: *hMSH6*, colorectal and endometrial cancer, diagnostic criteria

Gen *MSH6* uczestniczy w procesie naprawy DNA, zwanym „methyl directed mismatch repair”, wspólnie z genami *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MLH3*, *PMS1* i *PMS2* (1, 2, 3). Mutacje w genach *hMSH2* i *hMLH1* niemal zawsze prowadzą do obrazu klinicznego charakterystycznego dla zespołu Lyncha (HNPCC) (4, 5, 6). Obraz kliniczny nowotworów w rodzinach z konstytucyjną mutacją w genie *hMSH6* w większości przypadków jest jedynie zbliżony do HNPCC i nie spełnia kryteriów rodowodowo-klinicznych, takich jak kryteria amsterdamskie (7, 8, 9, 10, 11).

Dotychczas opisano w piśmiennictwie ponad 400 rodzin z konstytucyjną mutacją w genie *MSH6* (www.med.mun.ca/MMRvariants). Wśród nosicieli mutacji w genie *MSH6* stwierdzono:

- 1) zwiększone ryzyko zachorowania na raka jelita grubego (~70% dla mężczyzn i ~30% dla kobiet), trzonu macicy (~70%) oraz raka jajnika, górnych dróg moczowych, żołądka i piersi (<10%); (12)
- 2) zwiększoną w porównaniu z HNPCC częstość występowania pozajelitowych nowotworów (31,9% v 15,3%); (13)
- 3) późniejszy aniżeli w HNPCC wiek diagnozowania raków np. średni wiek rozpoznawania raka jelita grubego wynosi ~56, raka trzonu macicy ~54 lat, a raka jajnika 49 lat (12, 13);
- 4) częstszą lewostronną lokalizację raków jelita grubego (9).

Ostatnie badania oparte o dużą serię - 113 rodzin z mutacjami w *MSH6* wskazują, że ryzyko zachorowania na raka jelita grubego jest jeszcze niższe i wynosi 44% dla mężczyzn i tylko 20% dla kobiet, a ryzyko zachorowania na raka trzonu macicy wynosi 44% (14).

Częstość występowania mutacji konstytucyjnych w genie *hMSH6* szacuje się na 5-10% w rodzinach spełniających kryteria amsterdamskie (8, 9). Ze względu na niewystarczająco precyzyjnie określoną częstość mutacji w genie *MSH6* w różnych grupach rodzin na razie przyjmujemy schemat diagnostyczny wykrywania mutacji w genie *hMSH6*, który obejmuje:

- 1) selekcję rodzin, w których rodowodowo stwierdzono agregację raków jelita grubego, trzonu macicy, jajnika, dróg moczowych i/lub żołądka, piersi;
- 2) badanie IHC na występowanie homogennej utraty ekspresji białka *MSH6* w rakach jelita grubego i trzonu macicy (15, 16, 17);
- 3) w przypadku utraty ekspresji - DHPLC/sekwencjonowanie genu *hMSH6*.

Brak ekspresji *MSH2*, bądź *MSH2* i *MSH6* w przypadku gdy nie wykryliśmy mutacji w tych genach wskazuje na delecję w w genie *EPCAM*, która może być powodem metylacji

promotora *MSH2* (18). Delecje w obrębie *EPCAM* łatwo wykryć testem MLPA (www.mrc-holland.com).

Około 30 z opisanych w piśmiennictwie mutacji w genie *hMSH6* wykazuje charakter powtarzalny tj. stwierdzono je w więcej niż jednej rodzinie (19, 20, 21). Można przypuszczać, że w najbliższej przyszłości zostaną opracowane testy umożliwiające szybkie, proste i tanie wykrywanie mutacji wykazujących „founder effect” charakterystyczny dla danej grupy etnicznej. Niektóre z nich wykrywa test ostatnio opracowany w naszym ośrodku (22).

SCHEMAT BADAŃ KONTROLNYCH

Jak dotąd nie opracowano zasad postępowania w rodzinach z mutacjami w genie *hMSH6*, które byłyby zweryfikowane na podstawie wyników prospektywnej analizy prowadzonych rodzin.

W naszym Ośrodku przyjęliśmy następujące zasady badań kontrolnych:

- jelito grube - kolonoskopia począwszy od wieku o 15 lat młodszego od najmłodszego wieku
- rozpoznania raków jelita grubego wśród krewnych, raz na 2-3 lata;
- trzon macicy - USG dopochwowe raz na rok począwszy od wieku o 15 lat młodszego od najmłodszego wieku rozpoznania raka trzonu macicy wśród krewnych;
- kontrola pozostałych narządów w zależności od spektrum nowotworów w rodzinie.

LECZENIE

W związku z opisywanymi w piśmiennictwie przypadkami synchronicznych i metachronicznych raków oraz znacznie zwiększonym ryzykiem raka trzonu macicy powyżej 50 roku życia u nosicieli mutacji w genie *hMSH6* (12, 19, 23), wydaje się celowe rozważenie zasad leczenia chirurgicznego takich jak w zespole Lyncha tj. w leczeniu raków jelita grubego - kolektomia z zespoleniem ileorektalnym poszerzona u kobiet w okresie pomenopauzalnym o profilaktyczne usunięcie macicy i przydatków.

PIŚMIENNICTWO

1. Fleck O, et al.: DNA repair. *J Cell Science* 2004, 117: 515-517.
2. Pinto LA, et al.: *Escherichia coli* as a model system to study DNA repair genes of eukaryotic organisms. *Genetics Mol Res* 2003, 2: 77-91.
3. Marti T, et al.: DNA Mismatch Repair and Mutation Avoidance Pathways. *J Cell Phys* 2002, 191: 28-41.
4. Abel-Rahman WM, et al.: The genetics of HNPCC: application to diagnosis and screening. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006, 58: 208-20.
5. Robinson KL, et al.: Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007, 99: 291-9.

6. Lynch HT, et al.: Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med. Genet* 1999, 36: 801-18.
7. Wagner A, et al.: Atypical HNPCC owing to *MSH6* germline mutations: analysis of a large Dutch pedigree. *J Med Genet* 2001, 38: 318-22.
8. Roncari B, et al.: Frequency of constitutional *MSH6* mutations in a consecutive series of families with the clinical suspicion of HNPCC. *Clin Genet* 2007, 72: 230-7.
9. Berends MJW, et al.: Molecular and clinical characteristics of *MSH6* variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002, 70: 26-37.
10. Suchy J, et al.: Ovarian cancer of endometrioid type as part of the *MSH6* gene mutation phenotype. *J Hum Genet* 2002, 47: 529-31.
11. Suchy J, et al.: Frequency and nature of h*MSH6* germline mutations in Polish patients with colorectal, endometrial and ovarian cancers. *Clin Genet* 2006, 70: 68-70.
12. Hendriks YMC, et al.: Cancer Risk in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Due to *MSH6* Mutations: Impact on Counseling and Surveillance. *Gastroent* 2004, 127: 17-25.
13. Plaschke J, et al.: Lower Incidence of Colorectal Cancer and Later Age of Disease Onset in 27 Families With Pathogenic *MSH6* Germline Mutations Compared With Families With *MLH1* or *MSH2* Mutations: The German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium. *J Clin Oncol* 2004, 22: 4486-94.
14. Baglietto et al: Risks of Lynch syndrome cancers for *MSH6* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2010, 102: 193-201.
15. Rigau V, et al.: Microsatellite Instability in Colorectal Carcinoma. The Comparison of Immunohistochemistry and Molecular Biology Suggests a Role for h*MSH6* Immunostaining. *Arch Pathol Lab Med* 2003, 127: 694-700.
16. Plaschke J, et al.: Involvement of h*MSH6* in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer revealed by immunostaining is based on germline mutations, but rarely on somatic inactivation. *Int J Cancer* 2002, 97: 643-8.
17. Plaschke J, et al.: Eight Novel *MSH6* Germline Mutations in Patients With Familial and Nonfamilial Colorectal Cancer Selected By Loss of Protein Expression in Tumor Tissue. *Hum Mut* 2004, Online.
18. Ligtenberg MJ, et al: Heritable somatic methylation and inactivation of *MSH2* in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of *TACSTD1*. *Nat Genet.* 2009, 41: 112-7.
19. Cederquist K, et al.: Mutation analysis of the *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in Northern Sweden. *Int J Cancer* 2004, 109: 370-6.
20. Wu Y, et al.: Association of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-Related Tumors Displaying Low Microsatellite Instability with *MSH6* Germline Mutations. *Am J Hum Genet* 1999 65: 1291-8.
21. Shin K-H, et al.: Germline mutations in a polycytosine repeat of the h*MSH6* gene in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Hum Genet* 1999, 44: 18-21.
22. Dymerska D, et al.: Combined iPLEX and TaqMan assays to screen for 45 common mutations in Lynch syndrome and FAP patients. *J Mol Diagn.* 2010, 12: 82-90.
23. Charames G, et al.: Do *MSH6* mutations contribute to double primary cancers of the colorectum and endometrium? *Hum Genet* 2000, 107: 623-9.

Opracowano częściowo w ramach projektu EUROSTARS E! 4292 MCCGTP Multi-platform Colorectal Cancer genetic testing Portfolio

*Andrzej Pławski, Paweł Boruń, Piotr Krokowicz, Michał Drews, Jacek Paszkowski,
Jan Lubiński, Tomasz Banasiewicz*



Rodzinna polipowatość gruczolakowata jelita grubego

Familial adenomatous polyposis of colon

Streszczenie

Rodzinna polipowatość jelita (FAP) jest dobrze poznanym zespołem predyspozycji do występowania choroby nowotworowej rozwijającej się z licznych polipów okrężnicy i odbytnicy, dziedziczonym w sposób autosomalno dominujący. Pierwszymi objawami FAP są biegunka i krew w stolcu. Wraz z rozwojem choroby nowotworowej dochodzi do utraty masy ciała i osłabienia organizmu. FAP występuje z częstością 1 na 10000 nowourodzonych. Czas wystąpienia polipów i ich liczba są w przypadku tej choroby zróżnicowane. Klasyczna forma FAP charakteryzuje się występowaniem więcej niż 100 polipów, które pojawiają się w drugiej dekadzie życia. Średni wiek występowania polipów to 15 lat. Najmłodszy chory miał 3 lata. Polipy charakteryzują się dużym potencjałem rozwoju w kierunku nowotworu złośliwego. Nowotwór złośliwy może wystąpić od późnego dzieciństwa do 70 roku życia. Łagodna forma polipowatości rodzinnej charakteryzują się łagodniejszym przebiegiem niż klasyczny FAP. Występowanie FAP jest związane z mutacjami w genie supresorowym nowotworów *APC*, który został opisany w 1991 roku. Gen *APC* jest zlokalizowany na chromosomie 5q21 i związany jest z kontrolą proliferacji komórek. Forma recesywna FAP jest spowodowana przez mutacje w genie *MUTYH*. Gen *MUTYH* jest zaangażowany w naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Polipowatość związana z *MUTYH* (MAP) jest skłonnością do występowania polipów jelita, ale liczba polipów jest niższa w klasycznym FAP. Wysokie ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej w tych chorobach sprawia, że należą do ważnych zagadnień medycznych. W Polsce badania molekularne wykonywane są od ponad piętnastu lat. W Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu utworzono Bank DNA dla polskich pacjentów z polipowatościami. W Banku DNA zgromadzono próbki DNA od siedemset rodzin z FAP.

Słowa kluczowe: FAP, gen *APC*, rak jelita grubego, predyspozycje do raka

Summary

Familial adenomatous polyposis (FAP) is a well-known predisposition to occurrence of a large number of polyps in colon and rectum inherited in an autosomal dominant manner. First symptoms of FAP are diarrhea and blood in stool. Weight lost and weaknesses occur after development of advanced tumor. The incidence of FAP disorder is one per 10,000 newborns. There is a high heterogeneity with regard to the number and time of occurrence of polyps. The classical form of FAP is characterized by the occurrence of more than 100 polyps, which appear in the second decade of life. The average time of occurrence of polyps is 15 years. The earliest symptoms of polyposis were observed in a three-year-old child. The polyps are characterized by large potential for development towards malignant tumor. Turning into malignancy can occur from the late childhood to the 70s. Attenuated adenomatous polyposis coli cases are characterized by benign course of disease as opposed to the classical FAP. The occurrence of FAP is associated with mutations in the *APC* tumor suppressor gene, which has been described in 1991. The *APC* gene is tumor suppressor gene localized on chromosome 5q21 involved in cell proliferation control. The recessive form of FAP is caused by mutation in the *MUTYH* gene occurred in both alleles of gene. The *MUTYH* gene is involved in a repairing of the oxidative DNA damage. *MUTYH* associated polyposis (MAP) is predisposition to occurrence polyps of colon but the number of polyps is lower in comparison to classical FAP. The high risk of cancer observed in those syndromes make them important medical issues. The molecular studies of polyposis of colon are performed in Poland for over fifteen years. In Institute of Human Genetics in Poznań the DNA Bank for Polish FAP patients was established. In DNA Bank the DNA samples from four hundreds FAP families were collected so far.

Key words: FAP, *APC* gene, colon cancer, cancer predisposition

Rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP, ang. *familial adenomatous polyposis*) stanowi przyczynę około 1% wszystkich raków jelita grubego[1]. Choroba występuje z częstością 1 na 8000-10000 urodzeń[2]. Wiek występowania objawów u chorych jest dość zróżnicowany, obserwuje się również różnice w wieku występowania objawów u rodzeństwa. Jednak można przyjąć, że wystąpienie raka jelita grubego w młodym wieku powinno być sygnałem do przeprowadzenia wywiadu rodzinnego, który pozwala na określenie, czy w rodzinie występuje wysoka dziedziczna predyspozycja[3]. Występowanie pojedynczego przypadku choroby nie wyklucza wysokiej dziedzicznej predyspozycji, ponieważ chory może być pierwszym nosicielem mutacji. Objawy FAP występują wcześniej, niż w HNPCC(ang. *Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer*) i pojawiają się w drugiej dekadzie życia, choć obserwuje się przypadki występowania choroby nawet w wieku 5 lat w naszej grupie najmłodszy chory w chwili zdiagnozowania polipów miał 3 lata[4]. Podłożem genetycznym występowania polipów gruczolakowatych jest występowanie mutacji w genach *APC* u pacjentów z FAP i *MUTYH* w przypadku recesywnej formy polipowatości jelita.

Geny supresorowe nowotworów zaangażowane są w kontrolę proliferacji komórek. Produkty białkowe genów supresorowych biorą udział w kontroli cyklu komórkowego jako jego inhibitory, są także składnikami układu kontaktowego hamowania wzrostu. Geny supresorowe pełnią funkcję w utrzymywaniu liczby komórek na stałym poziomie. Zaburzenia tych mechanizmów prowadzą do zwiększenia częstości podziałów komórkowych, jak również wzrostu liczby błędów powstających podczas podziału. Prowadzi to do gromadzenia zmian w materiale genetycznym i wyselekcjonowania nieśmiertelnego klonu o bardzo częstych podziałach komórkowych, zdolnego zasiedlać inne tkanki.

W przypadku genów supresorowych fenotyp mutacji jest maskowany przez prawidłowy allel genu. W inicjacji procesu nowotworowego występują dwie niezależne mutacje w obrębie locus genu supresorowego[5]. W przypadku nosicielstwa zmutowanego allelu genu *APC* ryzyko wystąpienia drugiej mutacji, a tym samym inicjacji choroby nowotworowej, jest bardzo wysokie.

HISTORIA BADAŃ GENU *APC*

FAP została zidentyfikowana jako dziedziczny zespół chorobowy już w latach 20-tych dwudziestego wieku. W 1972 r. został opisany zespół Gardnera, który jest postacią FAP charakteryzującą się nie tylko obecnością setek czy tysięcy polipów w jelicie, lecz także kostnia-

ków oraz przebarwień siatkówki (CHRPE, ang. *congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium*). Występowanie FAP zaczęto wiązać z regionem q21-q22 chromosomu 5 na podstawie obserwacji dużej delecji wykrytej w badaniach cytogenetycznych oraz wyników badań sprzężeń markerów RFLP pacjenta z zespołem Gardnera i zaawansowanym rozwojem polipów w jelicie grubym[6]. Pod koniec lat osiemdziesiątych badania sprzężeń ukierunkowały poszukiwania genu na region obejmujący oddalone od siebie o 150 kbp geny *APC* i *MCC*. W 1991 r. u chorych z FAP przebadano trzy geny: *DPI*, *SRP19* i *DP2.5* znajdujące się w regionie, który uległ delecji. U czterech niespokrewnionych chorych z FAP zaobserwowano 4 mutacje w genie *DP2.5* (obecnie gen *APC*) prowadzące do powstania kodonu Stop, z których jedna była przekazana potomstwu[1]. W następnym roku przebadano 79 chorych z FAP i zaobserwowano mutacje w genie *APC* u 67% chorych. W 92% były to mutacje prowadzące do skrócenia produktu białkowego genu *APC*[7]. W wielu krajach zaczęto badać występowanie mutacji w genie *APC* i utworzono bazę danych mutacji dziedzicznych i somatycznych, w których zgromadzono dane o 826 mutacjach dziedzicznych i 650 mutacjach somatycznych[8]. Funkcja białka *APC* była badana od 1993 r., gdy zaobserwowano, że wiąże się ono z β -kateniną, co wskazywało na uczestniczenie w adhezji komórek [8].

W naszym kraju badania genu *APC* rozpoczęto w połowie lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku a Bank DNA chorych, z FAP został utworzony w 1997 roku w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu z inicjatywy A. Pławskiego i R. Słomskiego[9]. W 2011 bank został przekształcony w Bank DNA chorych z polipowatościami jelit[10]. Obecnie bank obejmuje 758 rodzin w tym 677 FAP, 28 JPS 48 PJS oraz 5 przypadków zespołu Cowden.. Prowadzone badania molekularne pozwoliły na zdiagnozowanie mutacji w genie *APC* w 323 rodzinach. Zidentyfikowano 194 typy mutacji z czego 147 to delecje, 32 insercje i 115 to substytucje a także opracowano metodyki badań dziedzicznych predyspozycji do występowania polipowatości jelit[11-19].

BUDOWA GENU *APC* I FUNKCJA BIAŁKA *APC*

Gen *APC* (ang. *adenomatous polyposis coli*) położony jest na chromosomie 5 w regionie q21 i zawiera 21 eksonów[20]. Charakterystyczną cechą genu *APC* jest występowanie dużego eksonu 15, który obejmuje ponad 70% sekwencji kodującej. Ekspresja genu obserwowana jest we wszystkich tkankach. Produktem transkrypcji jest mRNA o długości 8538 nukleotydów[1, 21]. Pierwsze eksony genu mogą tworzyć specyficzne tkankowo alternatywne

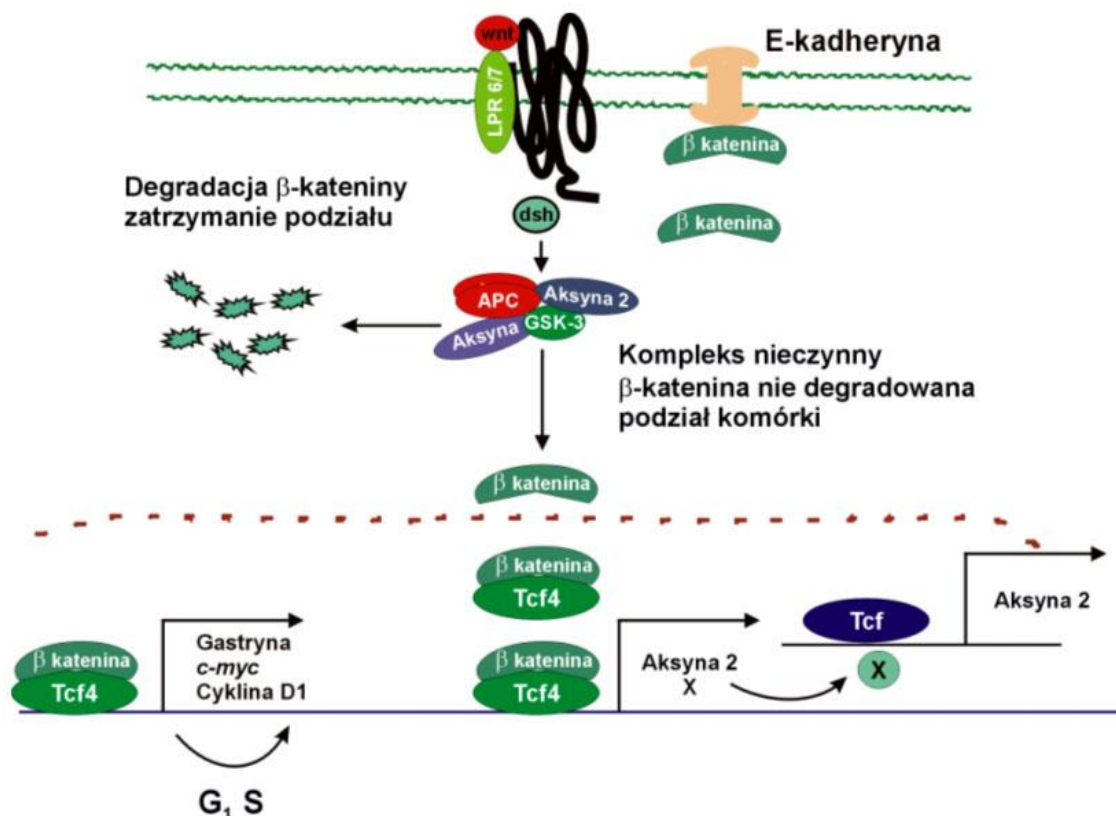
transkrypty[22], np. w mózgu występuje produkt genu *APC*, dla którego kodon Start położony jest w eksonie BS (ang. *brain specific*). Wyeliminowanie kodonu 1, który koduje domenę super spirali, o której wiadomo, że służy do homo- lub heterodimeryzacji, wpływa na funkcjonalność produktu białkowego[20]. Alternatywne składanie początkowych eksonów genu może być związane z występowaniem łagodnej formy polipowatości - *AAPC* (ang. *attenuated adenomatous polyposis coli*)[23]. Podobny efekt zaobserwowano w jednej z dwóch rodzin z mutacjami na końcu 3' eksonu 9, gdzie w jednym przypadku wykazano modyfikujący efekt alternatywnego składania, prowadzący do łagodnej formy FAP. W związku z tym uważa się, że rodzaj, położenie mutacji, jak również efekt alternatywnego składania wpływają na przebieg choroby.

Bardzo ciekawa jest obserwacja międzygenowego składania, w którego wyniku z genu *APC* zostaje usunięty ekson 14 i obejmujący prawie 70% genu ekson 15, a pozostały fragment łączy się z końcem 3' genu *SRP1*. Wycięcie eksonu 14 lub 15 prowadzi do powstania dwóch izoform produktu różniących się zdolnością wiązania mikrotubul i β -kateniny, jak również sekwencją regionu 3' nie podlegającego translacji, co może wpływać na stabilność mRNA oraz na funkcje produktu[24]. Alternatywne składanie genu jest w tym przypadku związane z regulacją aktywności białka APC i nasuwa przypuszczenie, że pełni ono wiele różnych funkcji w komórce zwłaszcza, że w alternatywnym składaniu bierze udział ponad 75% eksonów.

Pełnej długości białko APC składa się z 2843 aminokwasów i występuje w cytoplazmie oraz w jądrze komórkowym[1, 21]. Dotychczas poznano kilka białek wchodzących w interakcję z białkiem APC. Należą do nich białko DLG, białko mikrotubul, GSK β -3, β -katenina, γ -katenina, p34, Tid56, białko Auxin. Interakcje z wieloma białkami oznaczają, że białko APC bierze udział w regulacji wielu procesów w komórce, obejmujących podział, migrację, adhezję i różnicowanie komórek (ang. *cell fate determination*)[1]. W białku APC wyodrębniono kilka funkcjonalnych domen. Domena zasadowa obejmuje aminokwasy 2200-2400[1]. Fragment końcowy białka, między aminokwasami 1-171, zaangażowany jest w oligomeryzację. W białku APC występują dwa miejsca wiązania β -kateniny - we fragmencie obejmującym trzy 15-nukleotydowe powtórzenia między aminokwasami 1020-1169 i w regionie 20 aminokwasowych powtórzeń między aminokwasami 1324-2075. Wiązanie z mikrotubulami, występujące podczas zwiększonej ekspresji genu, odbywa się za pomocą fragmentu obejmującego aminokwasy 2130-2483. Aminokwasy 2560-2843 są miejscem wiązania z białkiem EB1, a aminokwasy 2771-2843 wiążą się z białkiem DLG [1]. Nie wyodrębniono

regionu związanego z procesem apoptozy, zaobserwowano jednak, że ekspresja prawidłowego białka APC w komórkach linii nowotworowej jelita prowadzi do wystąpienia tego zjawiska. W komórkach śluzówki jelita grubego produkt genu *APC* o masie 300 kDa uczestniczy w kontaktowym hamowaniu wzrostu komórek.

Białko APC oddziałuje także z γ -kateniną i β -kateniną. Obydwa białka wiążą się z białkiem adhezyjnym E-kadheryną. Fearon (1997) zaproponował schemat, w którym białko APC bierze udział w transdukcji sygnału i przez degradację β -kateniny wpływa na aktywność czynnika transkrypcji Tcf4 (ang. *T-cell transcription factor 4*) (Ryc.1) [25]. Białkiem regulującym tworzenie kompleksu białka APC z β -kateniną jest kinaza białkowa ZW3/GSK3 β . Fosforylacja białka APC aktywuje wiązanie β -kateniny. Aktywność kinazy GSK3 β jest regulowana poprzez białko dsh, wchodzące w interakcje z produktem genu *WNT1*. Białko APC związane z kinazą ZW3/GSK3 β posiada zdolność hamowania transkrypcji indukowanej przez β -kateninę. W przypadku utraty funkcji produktu genu *APC* następuje aktywacja czynnika transkrypcji Tcf4 (*TCF7L2*). Komórka jest pobudzona do proliferacji w wyniku aktywacji transkrypcji genu *c-MYC* przez Tcf4 [26]. Produkt genu *c-MYC* występuje w jądrze komórkowym i posiada zdolność wiązania z DNA, aktywuje gen wzrostu - dekarboksylazę ornityny (*ODC1*) i gen *CDC25A*, ponadto jest inhibitorem genu *GAS1*. Wykazano również, że aktywowany kompleks β -katenina-Tcf4 indukuje ekspresję Tcf1 [27]. W komórkach śluzówki jelita grubego gen *APC* działa jako negatywny regulator cyklu komórkowego przez regulację poziomu β -kateniny sygnał proliferacji pochodzący od transmembranowego białka E-kadheryny. W przypadku utraty funkcjonalności tego genu w tkance zostaje zaburzona równowaga między podziałami i śmiercią komórek.



Ryc. 1. Rola białka APC w regulacji cyklu komórkowego.

MUTACJE GENU *APC*

Od 1991 roku, kiedy wykryto związek mutacji genu *APC* z FAP nastąpił rozwój badań molekularnych. W okresie minionych 17 lat zaobserwować można rozwój technik a co za tym idzie zwiększenie się liczby doniesień dotyczących spektrum mutacji w coraz to nowych krajach czy grupach etnicznych. Badania prowadzone przez szereg lat z użyciem takich technik jak analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP), analiza heterodupleksów (HD) czy metoda rozdziału w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE) oraz sekwencjonowania DNA pozwoliły na stworzenie komputerowych baz danych. Obecnie najlepiej zorganizowaną bazą mutacji genu *APC* jest baza Institute of Medical Genetics w Cardiff <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Jest najbardziej aktualną bazą mutacji dla większości opisanych genów[28]. W bazie danych dla genu *APC* zgromadzono dane o 858 typach mutacji. Największy odsetek mutacji genu *APC* stanowią małe delecje, których opisano 356 i w większości prowadzą do zmiany ramki odczytu i skrócenia produktu białkowego genu. Rzadziej występowały duże delecje (54), mutacje w miejscach składania genu (49), małe delecje połączone z insercjami (17), duże insercje (7), kompleksowe rearanżacje (6) a w sekwencjach regulatorowych stwierdzono 3 mutacje. Następnym pod względem częstości ty-

pem mutacji są substytucje, których opisano 235. Prowadzą one do zamiany aminokwasu lub do powstania kodonu Stop w miejscu występowania mutacji. Małych insercji opisano dotychczas 131. W przypadku substytucji, które stanowią 30% mutacji, kodon Stop powstaje w miejscu mutacji, a w przypadku delecji lub insercji stanowiących 68% mutacji powstaje w jej pobliżu w wyniku zmiany ramki odczytu. W genie występuje region o podwyższonej częstotliwości występowania mutacji MCR (ang. *mutation cluster region*), który obejmuje kodony 1055-1309. W regionie tym występuje 23% wszystkich mutacji germinalnych. Ponadto wśród mutacji germinalnych zaobserwowano podwyższoną częstość trzech mutacji: delecji 5 pz w kodonie 1309 (10%), delecji 5 pz w kodonie 1061 oraz delecji 4 pz w kodonie 1064[29]. Większość mutacji występuje w regionie 5' eksonu 15 genu *APC*. Charakterystyczną cechą FAP jest utrata heterozygotyczności (LOH, ang. *loss of heterozygosity*) w genie *APC* powstająca w wyniku mutacji somatycznej w drugim allelu genu *APC*. Rozkład częstości tych mutacji jest różny od mutacji germinalnych. Do 60% mutacji somatycznych znajduje się we fragmencie, który obejmuje 8% genu między kodonami 1286 i 1513. Mutacje somatyczne występują w dwóch gorących miejscach (ang. *hot spots*) w kodonie 1309 i kodonie 1450. Mutacje w genie *APC* występują również w przypadkach raków jelita grubego niezwiązanych z polipowatością. W przypadkach tych nowotworów występują pojedyncze guzy, ponieważ musi dojść do mutacji w jednym z alleli genu *APC*, a następnie utraty heterozygotyczności w wyniku mutacji somatycznych. W przypadku zespołu Lynch (HNPCC) proces ten jest przyspieszany przez dziedziczne mutacje w genach naprawy DNA[30]. Według najnowszych badań, dla inicjacji nowotworu jelita grubego niezwiązanego z FAP nie musi wystąpić LOH w *APC*. W 50% sporadycznych nowotworów, w których nie zaobserwowano zmian w *APC*, powstanie nowotworu związane jest z heterozygotycznymi mutacjami w genie β -kateniny (*CTNNB1*). Mutacje występują w miejscu fosforylacji β -kateniny przez kinazę GSK3 β . Powodują one wyłączenie regulacyjnej funkcji genu *APC*, co prowadzi do kumulacji β -kateniny, a tym samym ekspresji genu *MYC* i rozwoju nowotworu jelita grubego [31]. β -katenina znajduje się za genem *APC* (ang. *downstream*) w szlaku kontaktowego hamowania wzrostu i w przypadku mutacji w tym genie proces nowotworowy przebiega niezależnie od stanu genu *APC*.

Podjęto próbę określenia związku między położeniem mutacji terminujących translację a obrazem klinicznym choroby i wystąpieniem objawów pozajelitowych. Zaobserwowano, że wystąpienie kodonu Stop przed kodonem 157 powoduje zmniejszenie liczby polipów i łagodny przebieg choroby. Klasyczny przebieg polipowatości z licznymi polipami ma miejsce w przypadku wystąpienia sygnału Stop między kodonami 169 a 1600. Mutacje występujące

między kodonami 1403 i 1587 prowadzą do nasilenia objawów pozajelitowych. Występowanie włókniakowatości naciekowej związane jest z mutacjami w regionie między kodonami 1445 a 1578. Mutacje w końcu 3' genu *APC* dają zróżnicowany obraz przebiegu choroby zarówno pod względem liczby polipów, jak również występowania objawów pozajelitowych.

PROGRESJA ZMIAN MORFOLOGICZNYCH I GENETYCZNYCH W RODZINNEJ POLIPOWATOŚCI GRUCZOLAKOWATEJ

Dziedziczenie zmutowanego allelu genu *APC* nie wywołuje obrazu klinicznego choroby. Pojawienie się objawów klinicznych związane jest z sekwencją dalszych zdarzeń w komórce. Zarówno w przypadku FAP jak i HNPCC komórki charakteryzują się bardzo wysokim ryzykiem wystąpienia utraty heterozygotyczności w locus genu *APC*. W czasie rozwoju nowotworu zachodzą zmiany w obrębie genów supresorowych, onkogenów i genów naprawy DNA. Delecje obserwuje się w regionach występowania genów hamujących proliferację, położonych na chromosomach 5q (*APC*, *MCC*), 17p (*TP53*) i 18q (*DCC*) oraz obserwuje się mutacje punktowe w obrębie protoonkogenu *K-ras*. W przypadku FAP ryzyko utraty heterozygotyczności jest bardzo wysokie, ponieważ jeden z alleli dziedziczony jest w formie zmutowanej. Ryzyko inicjacji nowotworu jest również wysokie w wyniku dziedziczenia mutacji. Mimo różnych przyczyn pierwszym etapem inicjacji choroby nowotworowej jest utrata heterozygotyczności w locus *APC*, prowadząca do zwiększenia proliferacji komórek w wyniku aktywacji transkrypcji protoonkogenu *c-MYC*. Częste podziały komórek prowadzą do wyselekcjonowania klonu z uszkodzonym genem *MCC*, co powoduje dysplazję i w dalszym etapie powstanie gruczolaka stopnia pierwszego. Wzrost tempa podziałów komórek powoduje dalsze gromadzenie błędów genetycznych i w wyniku tego następuje aktywacja protoonkogenu *K-ras* i delecja *DCC* (ang. *deleted in colorectal cancer*). Kolejnym etapem rozwoju nowotworu jest utrata funkcjonalności produktu genu *TP53*, co prowadzi do powstania gruczolakoraka, a dalsze gromadzenie błędów do powstania nowotworu inwazyjnego. Różnica w podłożu molekularnym FAP i HNPCC sprawia, że pojedyncze guzy w HNPCC rozwijają się szybciej do formy inwazyjnej niż w przypadku FAP.

BUDOWA I LOKALIZACJA GENU *MUTYH*

Gen *MUTYH* (*MutY*, *e.coli*, *Homolog*) jest homologiem bakteryjnego genu *mutY* zaangażowanego w systemie naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Gen *MUTYH* jest często potocznie nazywany *hMYH* lub *MYH* jednak te nazwy są uważane za nieprawidłowe. *MUTYH*

u człowieka został opisany w 1996r. Gen obejmuje 7100 pz na chromosomie 1 w regionie p34.3-p32.1 i składa się z 16 eksonów. Żaden z 15 intronów genu *MYH* nie przekracza 200 pz. Gen koduje 535 aminokwasowe białko w 41% identyczne z białkiem mutY z *E.coli* [32]. Najczęściej występują dwie substytucje Y165C i G382D, obserwowane u 80 % chorych z mutacjami obu alleli genu[33-35]

OPIS KLINICZNY

FAP jest dobrze poznaną dziedziczną predyspozycją do występowania nowotworów układu pokarmowego. U chorych występują setki lub nawet tysiące polipów w jelicie grubym i odbytnicy. Polipy rozwijają się do nowotworu złośliwego, jeśli nie zostaną usunięte. Obserwuje się dużą heterogenność w zakresie liczby polipów jak i wieku ich wystąpienia. Poza objawami w jelicie, w przypadku FAP, obserwuje się różne nasilenie występowania objawów pozajelitowych. Taki fenotyp choroby związany jest z dominującymi mutacjami w genie *APC* [1, 36, 37]. FAP z licznymi objawami pozajelitowymi w formie torbieli gruczołów łojowych skóry, kostniaków i włókniakowatości naciekowej, a także zmian w uzębieniu, polegających na zmianach liczby zębów oraz występowaniu zębów o długich i zaokrąglonych korzeniach, określana była jako zespół Gardnera (MIM 175100.0006) [38]. W najnowszej literaturze przeglądowej odnotowuje się zanik stosowanego terminu zespół Gardnera, takiej jednostki chorobowej nie ma już również w bazie MIM. W FAP można wyróżnić formę klasyczną i łagodną. Poza tym w formie klasycznej wyróżniono ostry przebieg z bardzo licznymi objawami pozajelitowymi. [39, 40]. Badania poszczególnych grup pozwoliły wyłonić z grupy chorych te osoby u których nie wykryto mutacji w genie *APC*. Po ich analizie stwierdzono, że w niektórych przypadkach nie obserwuje się dominującego dziedziczenia choroby. Doprowadziło to do konkluzji, że mutacje w innym genie mogą prowadzić do podobnego fenotypu jak mutacje genu *APC*. Genem tym okazał się gen *MUTYH* (ang. *MutY, E.coli, homolog*) [33, 35, 41-43]. Wyodrębniono zatem nową jednostkę chorobową - recesywną, autosomalną postać polipowatości gruczolakowatej jelita (ang. *colorectal adenomatous polyposis, autosomal recessive*).

FENOTYP MUTACJI W GENIE *APC*

Rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP) (MIM 175100)

Rodzinna polipowatość jelita grubego, FAP (ang. *familial adenomatous polyposis*) jest dziedziczną autosomalnie dominująco predyspozycją do występowania licznych polipów w

jelicie grubym. Objawy w postaci licznych (setki lub tysiące) polipów w śluzówce jelita grubego pojawiają się pod koniec drugiej dekady życia. Średni wiek występowania polipów to 15 lat[44]. Polipy charakteryzują się wysokim potencjałem do rozwoju w kierunku nowotworu złośliwego. Ryzyko wystąpienia nowotworu u chorych z FAP jest praktycznie 100%. Wystąpienie nowotworu złośliwego może nastąpić od późnego dzieciństwa do 70 lat. Najwcześniejsze wystąpienie objawów polipowatości zaobserwowano w wieku 5 lat[45]. Pierwszymi objawami wystąpienia polipów są biegunki i krew w stolcu a w dalszej kolejności spadek masy ciała i ogólne osłabienie. Choroba występuje z częstością 1/10000 nowourodzonych[44]. Klasyczna forma polipowatości jelita charakteryzuje się występowaniem powyżej 100 polipów, które pojawiają się najczęściej w drugiej dekadzie życia jako polipy gruczolakowate i mogą współwystępować z limfoidalnymi[46]. Najczęściej występują polipy cewkowe o średnicy nawet do kilku centymetrów. Obserwuje się także występowanie polipów cewkowo-kosmkowych i kosmkowych[47]. Polipy jelita mogą również występować jako płaskie polipy tabularne[48]. W klasycznej formie polipowatości wyróżniono fenotyp z ciężkim przebiegiem (ang. *severe FAP*), gdzie liczebność polipów sięga powyżej tysiąca[40]. Ciężki przebieg FAP charakteryzuje się wcześniejszym wiekiem występowania nowotworu w jelicie, średnio 34 lata oraz większą częstością występowania objawów pozajelitowych.

U chorych z FAP obserwuje się występowanie objawów pozajelitowych w różnym zakresie. Należą do nich:

- Przebarwienie barwnikowe siatkówki dna oka - CHRPE, związane jest z położeniem mutacji w genie *APC*. CHRPE występuje u ponad połowy nosicieli mutacji w genie *APC*[49]. Przebarwienie siatkówki nie występuje, jeżeli produkt zmutowanego genu jest mniejszy niż 50 kDa, a ekson 9 uważany jest za graniczny między mutacjami niepowodującymi i powodującymi przebarwienie. W kierunku 3' genu *APC* granicą występowania przebarwienia jest kodon 1387[49]. Długość produktu genu *APC* ma wpływ na obraz przebarwienia. Produkty białkowe genu o długości poniżej 1014 aminokwasów przedstawiają obraz małego okrągłego przebarwienia (ang. *small round pigmented*) lub dużego okrągłego przebarwienia (ang. *large round pigmented*). Produkty białkowe powyżej 1014 aminokwasów powodują wzrost występowania pozostałych dwóch typów zmian w siatkówce dna oka tj. owalnego przebarwienia okrażonego aureolą (ang. *oval pigmented with a surrounding halo*) i dużego okrągłego odbarwienia (ang. *large round de-pigmented*) [50]. Kodon 1014 jest miejscem wiązania dwóch białek cytoplazmatycznych α i β -kateniny, są one istotne dla białka czynnego

w adhezji komórek E-kadheryny. Produkty dłuższe od 1014 aminokwasów mogą wiązać się z tymi białkami, co może wpływać na zmianę fenotypu przebarwienia.

- Zmiany w uzębieniu najczęściej polegające na występowaniu dodatkowych zębów, a także kostniaków i zmian w zębach
- Polipy w wyższych odcinkach przewodu pokarmowego. Polipy dwunastnicy oraz polipy żołądka, które mogą być polipami dna żołądka i gruczolakami [51, 52]. Polipy żołądka występują u około 50% chorych z FAP i nie wykazują wysokiego potencjału do nowotworzenia. Gruczolaki obserwowane u 6% przypadków ulegają nowotworzeniu jeszcze rzadziej niż polipy dna żołądka [53]. Polipy dwunastnicy obserwuje się u 33% do 44% chorych z FAP [52, 54-56]. Opisano jednak grupę, w której częstość występowania polipów dwunastnicy sięgała 80% [56]. Polipy zlokalizowane są najczęściej w części zstępującej dwunastnicy. U części chorych obserwuje się również większe polipy w okolicy brodawki większej dwunastnicy.
- Włókniakowatość naciekowa obserwowana jest u około 10% chorych z FAP, a jej pojawienie następuje częściej po zabiegu chirurgicznym [57]. U pacjentów z FAP obserwuje się wzrost częstości występowania włókniakowatości naciekowej w stosunku do populacji ogólnej. Obserwuje się także modyfikujący efekt płci. Choroba ta występuje rzadziej u mężczyzn z FAP niż u kobiet w stosunku 1:3 [57, 58].
- Nowotwór tarczycy obserwowany jest w 94% przypadków u kobiet [59-61].
- Nowotwory centralnego układu nerwowego. Występują z niską częstością, ok. 1% i są to glejaki. Występowanie tych nowotworów z objawami FAP w jelicie określano jako formę drugą zespołu nowotwór mózgu polipowatość jelita znanego jako zespół Turcot'a 2 lub brain tumor-polyposis syndrome 2 (BTSP2) [62-64]. Występowanie nowotworu mózgu w przypadkach FAP wiąże się raczej z występowaniem locus modyfikującego przebieg choroby niż z określonym spektrum mutacji w genie *APC*. Tym bardziej, że w przypadkach sporadycznych glejaków czy rdzeniaków mózgu nie obserwowano mutacji w genie *APC* [64, 65].
- Wątrobiaki zarodkowe są rzadkimi nowotworami występującymi u dzieci. Zaobserwowano wzrost ryzyka występowania tych nowotworów u nosicieli mutacji w genie *APC*, ale jest on niski i nie przekracza 1% [40, 66-68].

Łagodna forma rodzinnej polipowatości gruczolakowatej jelita grubego (AAPC)

Łagodna forma rodzinnej polipowatości jelita grubego AAPC (ang. *attenuated adenomatous polyposis coli*) charakteryzuje się występowaniem małej liczby polipów od kilku do stu. Z objawów pozajelitowych rzadko obserwuje się występowanie polipów dna żołądka[69]. Występowanie tej formy rodzinnej polipowatości jelita związane jest z występowaniem mutacji na końcu 5' genu *APC*. Przyjmuje się, że kodon 159 jest granicą między mutacjami powodującymi AAPC a FAP, jednak ustalenie jednoznacznej granicy jest trudne, ponieważ ta forma choroby wystąpiła również w przypadkach, gdy mutacja prowadziła do powstania kodonu Stop w eksonie 9 genu *APC*[69].

FENOTYP MUTACJI GENU MUTYH

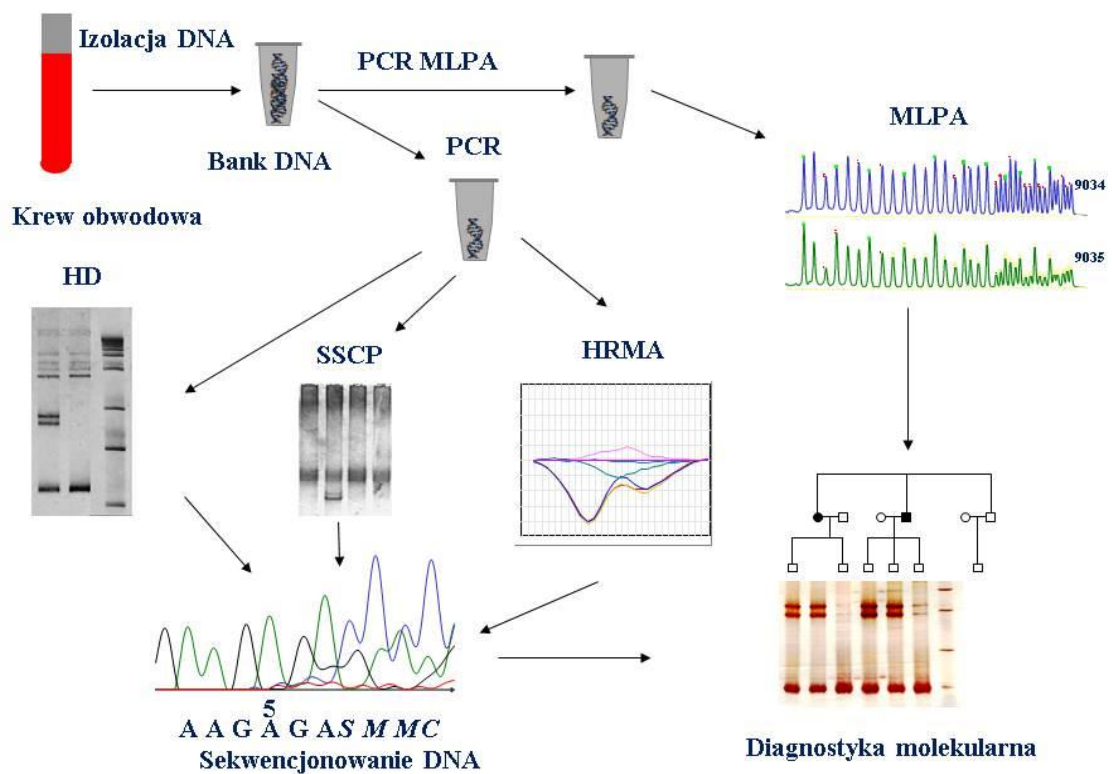
Polipowatość recesywna (MIM 608456) MAP (ang. *MUTYH associated polyposis*)

Polipowatość recesywna jest autosomalną recesywną predyspozycją do występowania licznych polipów w jelicie grubym, których liczebność jest niższa niż w przypadku FAP, nie przekracza 100 [42]. Ryzyko wystąpienia nowotworu u nosicieli mutacji obu alleli genu *MUTYH* jest 93 razy wyższe niż populacji ogólnej a nowotwór jelita występuje prawie zawsze przed 60 rokiem życia[70]. Zaobserwowano również, że mutacje obu alleli genu *MUTYH* podnoszą ryzyko występowania nowotworu endometrium, co przy niewielkiej liczbie polipów lub ich braku, może upodabniać fenotyp do dziedzicznego nowotworu jelita bez polipowatości (HNPCC) [71]. Różnice w zakresie występowania objawów choroby obserwuje się także u krewnych nosicieli tych samych mutacji[72].

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA FAP

Materiałem do badań jest DNA wyizolowany z komórek krwi obwodowej. Poszukiwanie mutacji wykonuje się z zastosowaniem metod przesiewowych, takich jak: analiza heterodupleksów, analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych DNA, a także analizy topnienia w wysokiej rozdzielczości (ang. High Resolution Melting – HRM). Analiza ta zasługuje na dłuższy komentarz. Zasada działania metody opiera się na monitorowaniu zachowania wcześniej zamplifikowanych fragmentów DNA w trakcie procesu denaturacji. Analizę umożliwia obecność barwnika fluorescencyjnego w mieszaninie reakcyjnej, który interkaluje jedynie dwuniciowy DNA, dając silny sygnał fluorescencyjny. Podczas topnienia DNA poziom fluorescencji spada zależnie od ilości zdenaturowanych wiązań między zasadami. Bardzo dokładny pomiar fluorescencji na poszczególnych etapach zmiany temperatury o 0,01°C umożliwia zaobserwowanie różnic w szybkości topnienia wynikających nie tylko z występowania niesparowań w tworzących się heterodupleksach, a nawet z zamian zasad z adeniny na tymine

i odwrotnie. Porównując ze sobą profile topnienia poszczególnych fragmentów, możliwe jest wyselekcjonowanie tych wykazujących różnice w przebiegu denaturacji, które odzwierciedlają tym samym zmiany w sekwencji. HRM jest techniką przesiewową i nie pozwala uzyskać dokładnych informacji na temat zmian w sekwencji, dlatego wszystkie nietypowe profile topnienia podobnie jak dodatkowe konformery w analizie SSCP czy heterodupleksy w analizie heterodupleksów, wymagają potwierdzenia sekwencjonowaniem. Jednakże wysoka czułość metody, sięgająca wg niektórych badań 100%, pozwala znacznie zredukować liczbę sekwencjonowań, a tym samym koszty analiz, przy jednoczesnym zachowaniu (a nawet zwiększeniu) skuteczności wykrywania mutacji w porównaniu do starszych metod przesiewowych[1, 2]. Po zakończeniu badań metodami przesiewowymi wykryte zmiany charakteryzuje się w badaniu sekwencji. Istotnym zagadnieniem jest badanie dużych zmian w obrębie genu APC. Poszukiwanie dużych zmian w obrębie genów dotyczących poszczególnych eksonów lub nawet całych genów uległo znacznemu uproszczeniu, gdy w 2002 roku, Schoutern opisał metodę prostej ilościowej analizy nawet do 40 fragmentów DNA amplifikowanych identycznymi startarami MLPA (ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Od tego czasu nastąpił gwałtowny rozwój tej techniki i obecnie metoda stosowana jest w badaniach predyspozycji do występowania chorób dziedzicznych charakterystyki nowotworów analiz RNA badaniu metylacji i farmakogenetyce. Metoda oparta jest na hybrydyzacji sond do wybranych fragmentów DNA ligowaniu ich a następnie amplifikacji. Pozwala to na ilościową ocenę produktów PCR. Hybrydyzacja sond do znanego fragmentu DNA otwiera możliwości w badaniu znanych mutacji występujących z podwyższoną częstością w przypadkach niektórych chorób. Zestaw P043 dla genu APC poza sondami do badania poszczególnych eksonów zawiera dwa zestawy sond do wykrywania mutacji 3183-3187delACAAA 3927-3931delAAAGA. Te dwie mutacje stanowią w przypadkach niektórych populacji nawet do kilkunastu procent mutacji wykrywanych u chorych z FAP. W naszej grupie chorych z FAP te dwie mutacje występują prawie u 15% chorych. Po wykryciu mutacji w genie *APC* przeprowadza się analizę dziedziczenia zmutowanego allelu genu *APC* u wszystkich osób w badanej rodzinie (Ryc.2). Rodzinna polipowatość jelita grubego jest badana w naszym kraju od ponad 10 lat w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Utworzony Bank DNA Polskich chorych z polipowatością rodzinną zawiera materiał od prawie 600 rodzin. Wyniki prac na zgromadzonym materiale prezentowano w specjalistycznych czasopismach[10, 12, 14-19, 61, 73-87]. Problem diagnostyczny stanowi około 50% rodzin z FAP bez zidentyfikowanej mutacji w genie *APC*. Ostatnie doniesienia wskazują że należałoby zainteresować się zmianami poza sekwencją kodującą ponieważ ich wpływ na zaburzenia prawidłowości ekspresji może być istotny.



Ryc. 2. Diagnostyka molekularna FAP.

PROFILAKTYKA FAP

Określenie nosicieli mutacji wiąże się z zastosowaniem u nich odpowiedniej profilaktyki. Obecnie, wobec osób obciążonych ryzykiem wystąpienia choroby stosuje się sigmoidoskopię wykonywaną co 12 miesięcy począwszy od okresu dojrzenia. Pozwala to na wykrycie objawów na długo przed rozwinięciem się nowotworu inwazyjnego. Po pojawieniu się polipów jedynym sposobem uniknięcia wystąpienia nowotworu inwazyjnego jest operacyjne usunięcie całego jelita grubego. Profilaktyczna kolektomia wykonana w odpowiednim czasie i w odpowiedni sposób pozwala na wydłużenie życia chorych z FAP średnio z 45 do 60 lat.

W zabiegu operacyjnym usuwa się całe jelito grube wytwarzając z jelita cienkiego zbiornik J (ang. *J pouch*). Obserwuje się dużą adaptację śluzówki jelita cienkiego tak, że morfologicznie upodobnia się ona do śluzówki jelita grubego. Zabieg chirurgiczny, będący obecnie jedyną możliwością przedłużenia życia osób chorych, mimo skuteczności, powoduje poważne okaleczenie, zwłaszcza przy zaawansowanym rozwoju choroby, gdy usuwa się odbył. Wobec tego bardzo duże nadzieje wiąże się z badaniem wpływu składu żywienia i niestero-

idowych leków przeciwzapalnych wpływających na obniżenie liczby występowania polipów. Badając zawartość skrobi w żywności i zachorowania na nowotwory jelita grubego stwierdzono odwrotną korelację między ilością skrobi w diecie, a częstością występowania nowotworu jelita grubego. Badania prowadzi się na modelach zwierzęcych. Opracowano kilka modeli mysich, do których należą myszy pozbawione funkcjonalnego genu (ang. *knock-out*) $APC^{\Delta 716}$ [88]. Myszy te są heterozygotami mutacji w genie *APC* w kodonie 716, co daje klasyczny obraz polipów występujących od 3 tygodnia życia. Homozygoty mutacji są prenatalnie letalne. Podawanie pokarmu o wysokiej zawartości skrobi i niskiej zawartości tłuszczu nie wpłynęło na częstość wystąpienia choroby, lecz zmniejszyło o 64% liczebność polipów a także rozmiar polipów u osobników chorych. Obniżenie liczebności wystąpienia polipów powodowane jest także przez niesterydowe leki przeciwzapalne. W badaniach stosuje się aspirynę, Piroxicam i Sulindac, które powodują obniżenie liczebności polipów w jelicie grubym u myszy ze zmutowanym genem *APC* od 40 do 60% [89].

Podjęmowane są również próby zastosowania terapii genowej w leczeniu FAP. Warunkowanie choroby mutacją w jednym genie znacznie ułatwia podjęcie prób naprawy błędu. Do linii komórek śluzówki jelita grubego SW480 ze zmutowanym genem *APC* wprowadzono cały funkcjonalny gen *APC* z zastosowaniem liposomów jako wektora. Wydajność tego systemu jest niska i gen nie ulega integracji z genomem komórki docelowej, jednak liposomy są dużo bezpieczniejsze od wektorów retrowirusowych. Transfer genu *APC* pozwolił uzyskać ekspresję prawidłowego genu *APC* w komórkach SW480 po 72 godzinach, która była obserwowana przez okres tygodnia na poziomie zapewniającym biologiczny efekt.

Choroby nowotworowe jelita grubego są dobrze poznane, konieczne jest jednak poznanie wszystkich czynników wpływających na inicjację i rozwój nowotworu oraz interakcje między nimi. Badanie mutacji występujących w czasie rozwoju choroby nowotworowej pozwoli na wybranie najskuteczniejszego sposobu profilaktyki lub minimalizowanie skutków choroby. Największe nadzieje wiąże się ze stosowaniem terapii genowej. W tym przypadku, aby całkowicie wyeliminować przyczynę choroby należałoby przeprowadzić korektę genu w większości komórek organizmu (dla uniknięcia licznych objawów pozajelitowych). Mimo poznania mutacji powodującej chorobę, dla kompleksowej korekcji znanego błędu musi dojechać się przełom w technologii transferu genów.

1. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. Cell, 1991. 66(3): p. 589-600.
2. Bisgaard, M.L., et al., *Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate*. Hum Mutat, 1994. 3(2): p. 121-5.
3. Lynch, H.T. and T.C. Smyrk, *Identifying Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*. N Engl J Med, 1998. 338: p. 1537-1538.
4. Distant, S., et al., *Familial adenomatous polyposis in a 5 year old child: a clinical, pathological, and molecular genetic study*. J Med Genet, 1996. 33(2): p. 157-60.
5. Knudson, A.J.R., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Nat Acad Sci, 1971. 68: p. 820-823.
6. Herrera, L., et al., *Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q*. Am J Med Genet, 1986. 25(3): p. 473-6.
7. Miyoshi, Y., et al., *Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene*. Hum Mol Genet, 1992. 1(4): p. 229-33.
8. Rubinfeld, B., et al., *Association of the APC gene product with beta-catenin*. Science, 1993. 262(5140): p. 1731-4.
9. Pawlak, A., et al., *Familial polyposis coli - inducing mutations in APC gene in Poland*. J. Appl. Genet., 1977. 38(1): p. 77-85.
10. Plawski, A., M. Podralska, and R. Slomski, *DNA bank for Polish patients with predispositions to occurrence of colorectal polyposis*. Hereditary Cancer in Clinical Practice, 2011. 9(suppl 2)(A8).
11. Borun, P., et al., *Comparative high resolution melting: a novel method of simultaneous screening for small mutations and copy number variations*. Hum Genet, 2014. 133(5): p. 535-45.
12. Plawski, A., et al., *Familial adenomatous polyposis of the colon*. Hered Cancer Clin Pract, 2013. 11(1): p. 15.
13. Borun, P., et al., *High Resolution Melting analysis as a rapid and efficient method of screening for small mutations in the STK11 gene in patients with Peutz-Jeghers syndrome*. BMC Med Genet, 2013. 14: p. 58.
14. Stec, R., et al., *Colorectal cancer in the course of familial adenomatous polyposis syndrome ("de novo" pathogenic mutation of APC gene): case report, review of the literature and genetic commentary*. Arch Med Sci, 2010. 6(2): p. 283-7.
15. Dymerska, D., et al., *Combined iPLEX and TaqMan assays to screen for 45 common mutations in Lynch syndrome and FAP patients*. J Mol Diagn, 2010. 12(1): p. 82-90.
16. Plawski, A. and R. Slomski, *APC gene mutations causing familial adenomatous polyposis in Polish patients*. J Appl Genet, 2008. 49(4): p. 407-14.
17. Plawski, A., M. Podralska, and R. Slomski, *Recurrent APC gene mutations in Polish FAP families*. Hered Cancer Clin Pract, 2007. 5(4): p. 195-8.
18. Plawski, A., et al., *The AAPC case, with an early onset of colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2007. 22(4): p. 449-51.
19. Plawski, A., et al., *Novel germline mutations in the adenomatous polyposis coli gene in Polish families with familial adenomatous polyposis*. J Med Genet, 2004. 41(1): p. e11.
20. Santoro, I.M. and J. Groden, *Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation*. Cancer Res, 1997. 57(3): p. 488-94.
21. Kinzler, K.W., et al., *Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21*. Science, 1991. 253(5020): p. 661-5.
22. Lambert, S. and W.G. Ballhausen, *Identification of an alternative 5' untranslated region of the adenomatous polyposis coli gene*. Hum Genet, 1993. 90(6): p. 650-2.
23. Samowitz, W.S., et al., *Alternatively spliced adenomatous polyposis coli (APC) gene transcripts that delete exons mutated in attenuated APC*. Cancer Res, 1995. 55(17): p. 3732-4.
24. Sulekova, Z., J. Reina-Sanchez, and W.G. Ballhausen, *Multiple APC messenger RNA isoforms encoding exon 15 short open reading frames are expressed in the context of a novel exon 10A-derived sequence*. Int J Cancer, 1995. 63(3): p. 435-41.
25. Fearon, E.R., *Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer*. Science, 1997. 278(5340): p. 1043-50.
26. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. 281(5382): p. 1509-12.
27. Roose, J., et al., *Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1*. Science, 1999. 285(5435): p. 1923-6.

28. Stenson, P.D., et al., *Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update*. Hum Mutat, 2003. 21(6): p. 577-81.
29. Mandl, M., et al., *Frequency of common and novel inactivating APC mutations in 202 families with familial adenomatous polyposis*. Hum Mol Genet, 1994. 3(1): p. 181-4.
30. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. 61(5): p. 759-67.
31. Morin, P.J., *beta-catenin signaling and cancer*. Bioessays, 1999. 21(12): p. 1021-30.
32. Slupska, M.M., et al., *Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage*. J Bacteriol, 1996. 178(13): p. 3885-92.
33. Sieber, O.M., et al., *Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH*. N Engl J Med, 2003. 348(9): p. 791-9.
34. Al-Tassan, N., et al., *Inherited variants in MYH are unlikely to contribute to the risk of lung carcinoma*. Hum Genet, 2003.
35. Jones, S., et al., *Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C->T:A mutations*. Hum Mol Genet, 2002. 11(23): p. 2961-7.
36. Kinzler, K.W., et al., *Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers*. Science, 1991. 251(4999): p. 1366-70.
37. Joslyn, G., et al., *Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus*. Cell, 1991. 66(3): p. 601-13.
38. Gardner, E., *Discovery of the Gardner syndrome*. Birth Defects Orig Art Ser, 1972. 2: p. 48-51.
39. Nieuwenhuis, M.H. and H.F. Vasen, *Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. 61(2): p. 153-61.
40. Cetta, F. and A. Dharmo, *Inherited multitumoral syndromes including colorectal carcinoma*. Surg Oncol, 2007. 16 Suppl 1: p. S17-23.
41. Cheadle, J.P. and J.R. Sampson, *Exposing the MYH about base excision repair and human inherited disease*. Hum Mol Genet, 2003. 12 Spec No 2: p. R159-65.
42. Sampson, J.R., et al., *Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH*. Lancet, 2003. 362(9377): p. 39-41.
43. Al-Tassan, N., et al., *Inherited variants of MYH associated with somatic G:C->T:A mutations in colorectal tumors*. Nat Genet, 2002. 30(2): p. 227-32.
44. Cruz-Correa, M. and F.M. Giardiello, *Familial adenomatous polyposis*. Gastrointest Endosc, 2003. 58(6): p. 885-94.
45. Krush, A.J., et al., *Hepatoblastoma, pigmented ocular fundus lesions and jaw lesions in Gardner syndrome*. Am J Med Genet, 1988. 29(2): p. 323-32.
46. Giardiello, F.M., et al., *Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac*. N Engl J Med, 2002. 346(14): p. 1054-9.
47. Giardiello, F.M., et al., *Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis*. N Engl J Med, 1993. 328(18): p. 1313-6.
48. Cohen, M., et al., *Colonic and duodenal flat adenomas in children with classical familial adenomatous polyposis*. Int J Surg Pathol, 2006. 14(2): p. 133-40.
49. Caspari, R., et al., *Predictive diagnosis in familial adenomatous polyposis: evaluation of molecular genetic and ophthalmologic methods*. Z Gastroenterol, 1993. 31(11): p. 646-52.
50. Wallis, Y.L., et al., *Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis*. Hum Genet, 1994. 94(5): p. 543-8.
51. Jagelman, D.G., *Familial Polyposis coli: the clinical spectrum*. Prog Clin Biol Res, 1988. 279: p. 169-75.
52. Domizio, P., et al., *Upper gastrointestinal pathology in familial adenomatous polyposis: results from a prospective study of 102 patients*. J Clin Pathol, 1990. 43(9): p. 738-43.
53. Kashiwagi, H., et al., *Development of duodenal cancer in a patient with familial adenomatous polyposis*. J Gastroenterol, 2000. 35(11): p. 856-60.
54. Zwick, A., et al., *Gastric adenocarcinoma and dysplasia in fundic gland polyps of a patient with attenuated adenomatous polyposis coli*. Gastroenterology, 1997. 113(2): p. 659-63.
55. Sarre, R.G., et al., *Gastric and duodenal polyps in familial adenomatous polyposis: a prospective study of the nature and prevalence of upper gastrointestinal polyps*. Gut, 1987. 28(3): p. 306-14.
56. Heiskanen, I., I. Kellokumpu, and H. Jarvinen, *Management of duodenal adenomas in 98 patients with familial adenomatous polyposis*. Endoscopy, 1999. 31(6): p. 412-6.
57. Jones, I.T., et al., *Desmoid tumors in familial polyposis coli*. Ann Surg, 1986. 204(1): p. 94-7.

58. Klemmer, S., L. Pascoe, and J. DeCosse, *Occurrence of desmoids in patients with familial adenomatous polyposis of the colon*. Am J Med Genet, 1987. 28(2): p. 385-92.
59. Camiel, M.R., et al., *Thyroid carcinoma with Gardner's syndrome*. N Engl J Med, 1968. 279(6): p. 326.
60. Bell, B. and E.L. Mazzaferri, *Familial adenomatous polyposis (Gardner's syndrome) and thyroid carcinoma. A case report and review of the literature*. Dig Dis Sci, 1993. 38(1): p. 185-90.
61. Brozek, I., et al., *Thyroid cancer in two siblings with FAP syndrome and APC mutation*. Int J Colorectal Dis, 2008. 23(3): p. 331-2.
62. Itoh, H. and K. Ohsato, *Turcot syndrome and its characteristic colonic manifestations*. Dis Colon Rectum, 1985. 28(6): p. 399-402.
63. Itoh, H., et al., *Turcot's syndrome and its mode of inheritance*. Gut, 1979. 20(5): p. 414-9.
64. Paraf, F., S. Jothy, and E.G. Van Meir, *Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases?* J Clin Oncol, 1997. 15(7): p. 2744-58.
65. Van Meir, E.G., *"Turcot's syndrome": phenotype of brain tumors, survival and mode of inheritance*. Int J Cancer, 1998. 75(1): p. 162-4.
66. Giardiello, F.M., et al., *Hepatoblastoma and APC gene mutation in familial adenomatous polyposis*. Gut, 1996. 39(96): p. 867-9.
67. Gruner, B.A., et al., *Hepatocellular carcinoma in children associated with Gardner syndrome or familial adenomatous polyposis*. J Pediatr Hematol Oncol, 1998. 20(3): p. 274-8.
68. Krawczuk-Rybak, M., et al., *Hepatoblastoma in a 3-month-old infant with APC gene mutation - case report*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011.
69. Soravia, C., et al., *Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli*. Am J Hum Genet, 1998. 62(6): p. 1290-301.
70. Farrington, S.M., et al., *Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects*. Am J Hum Genet, 2005. 77(1): p. 112-9.
71. Barnetson, R.A., et al., *Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer*. Clin Genet, 2007. 72(6): p. 551-5.
72. Nielsen, M., et al., *Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis*. Clin Genet, 2007. 71(5): p. 427-33.
73. Skrzypczak, M., et al., *The MYH gene status in Polish FAP patients without the APC gene mutations*. Hereditary Cancer in Clinical Practice, 2006. 4: p. 43-47.
74. Kubinska, I., et al., *Using of molecular screening in children with familial polyposis background - own experience*. Polish Journal of Environmental Studies, 2006. 15(5b): p. 98-101.
75. Plawski, A. and R. Slomski, *The APC gene mutations causing FAP in Polish patients*. Journal of Applied Genetics, 2008. 49(4): p. 407-414.
76. Plawski, A., J. Jura, and R. Slomski, *Wykrywanie mutacji punktowych w genie supresorowym APC człowieka metoda heterodupleksów. Przykłady analiz DNA*, 2001: p. 80-89.
77. Plawski, A., W. Juzwa, and R. Slomski, *Zastosowanie analizy powtórzeń dinukletydów (CA)_n w diagnostyce dziedzicznych podatności na wystąpienie choroby nowotworowej. Przykłady analiz DNA*, 2001: p. 139-144.
78. Plawski, A., et al., *Wykrywanie delecji i duplikacji metoda MLPA. Analiza DNA teoria i praktyka*, 2008: p. 225-229.
79. Plawski, A., D. Lipinski, and R. Slomski, *Test terminacji translacji (PTT). Przykłady analiz DNA*, 2001: p. 183-190.
80. Plawski, A., D. Lipinski, and R. Slomski, *Test terminacji translacji. Analiza DNA teoria i praktyka*, 2008: p. 429-434.
81. Plawski, A., et al., *Rodzinna polipowatość gruczolakowata jelita grubego*. Postepy Nauk Medycznych, 2008. XXI(7): p. 463-471.
82. Plawski, A., M. Podralska, and R. Slomski, *Wykrywanie mutacji metoda heterodupleksów. Analiza DNA teoria i praktyka*, 2008: p. 202-208.
83. Plawski, A., M. Podralska, and R. Slomski, *Wykrywanie mutacji metoda DHPLC. Analiza DNA teoria i praktyka*, 2008: p. 209-212.
84. Plawski, A., et al., *Diagnostyka molekularna FAP*. Proktologia, 2005. 6(1): p. 51-60.
85. Podralska, M., et al., *First Polish CS patient with confirmed PTEN gene mutation*. Archives of Medical Science, 2008. In press(AMS-00315-2008-02).
86. Teisseyre, M., et al., *Morphological features of juvenile polyposis syndrome associated with new detected BMPRIA gene mutation*. Ann. Diagn. Paediatr. Pathol., 2007. 11(3-4): p. 115-118.
87. Pawlak, A.L., et al., *Familial polyposis coli - inducing mutations in APC gene in Poland*. Journal of Applied Genetics, 1997. 38: p. 77-85.
88. Oshima, M., et al., *Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)*. Cell, 1996. 87(5): p. 803-9.

89. Chiu, C.H., M.F. McEntee, and J. Whelan, *Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis*. *Cancer Res*, 1997. 57(19): p. 4267-73.

Paweł Boruń, Kacper Sałanowski, Kinga Borowczyk, Wojciech Cichy, Andrzej Pławski



Polipowatości hamartomatyczne

Hamartomatous polyposis

Streszczenie

Polipy hamartomatyczne są rodzajem malformacji błony śluzowej zbudowane ze zdrowej, zdeorganizowanej tkanki. Ich rodzinne występowanie jest charakterystyczne dla zespołu polipowatości młodzieńczej, zespołu Peutza-Jeghersa, zespołu polipowatości mieszanej oraz zespołów guzów hamartomatycznych związanych z mutacjami PTEN. Wszystkie wyżej wymienione zespoły są dziedziczone w sposób autosomalnie dominujący i tworzą grupę chorób heterogennych pod względem liczebności i miejsca występowania polipów, a także ryzyka wystąpienia nowotworów układu pokarmowego i innych narządów. Poszczególne polipowatości często objawiają podobne symptomy, szczególnie we wczesnych etapach rozwoju, co w wielu przypadkach nie pozwala na ich rozróżnienie. Ich poprawna diagnoza, wykorzystując metody z zakresu biologii molekularnej, pozwala na zastosowanie efektywnego leczenia na wczesnych etapach choroby oraz monitoring narządów, które zagrożone są rozwojem nowotworu. Badania na dziedzicznych predyspozycjach do występowania polipowatości hamartomatycznych prowadzone są przez autorów rozdziału w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. W banku DNA polskich pacjentów z polipowatościami zgromadzono materiał 81 rodzin z polipowatościami hamartomatycznymi

Słowa kluczowe: polipowatości hamartomatyczne, polipowatość młodzieńcza, zespół Peutza i Jeghersa, zespół Cowdena

Summary

Hamartomas are malformations of mucosa, consisting of disorganized normal tissues. Hamartomatous polyps occurrence is characteristic for juvenile polyposis syndrome, Peutz-Jeghers' syndrome, hereditary mixed polyposis syndrome and PTEN hamartoma tumour syndrome. All the aforementioned syndromes are inherited in an autosomal dominant manner. They form a rather heterogenous group of disorders in respect to the number and localization of polyps and the risk of cancer in the alimentary tract and other organs. Individual syndromes frequently manifest similar symptoms, particularly during the early stage of the diseases when in several cases their clinical pictures do not allow for differential diagnosis. The correct diagnosis using molecular methods allows to implement treatment earlier and therefore more effectively since it is followed by a strict monitoring of organs that manifest a predisposition for neoplastic transformation.

Research considering of hereditary hamartomatous polyposis are conducted by the authors of the chapter at the Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences in Poznan. In the DNA bank of Polish patients with polyposis material from 81 families with hamartomatous polyposis have been collected

Key words: hamartomatous polyposis, juvenile polyposis syndrome, Peutz-Jeghers syndrome, Cowden syndrome

Pojęcie hamartoma określa guz nienowotworowy złożony ze zdeorganizowanych tkanek prawidłowych charakterystycznych dla miejsca występowania guza. Termin ten wprowadzony został w 1904 roku przez niemieckiego patologa Eugena Albrechta [1]. Rodzinne występowanie polipów hamartomatycznych obserwuje się w szeregu zespołów chorobowych. Do chorób tych należą zespół polipowatością młodzieńczej (Juvenile polyposis syndrome JPS), zespół Peutza i Jeghersa (ang. Peutz-Jeghers syndrome PJS), zespołu polipowatości mieszanej (Hereditary Mixed Polyposis Syndrome HMPS) oraz zespół guzów hamartomatycznych związanych z mutacjami genu PTEN (PTEN hamartoma tumor syndrome PHTS). Do PHTS przyporządkowano między innymi Zespół Cowden (ang. Cowden syndrome CS), zespół Bannayan-Riley-Ruvalcaba (Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome BRRS), zespół Proteusa (ang. Proteus syndrome PS). Wszystkie wyżej wymienione zespoły dziedziczne są w sposób autosomalny dominujący. Oprócz występowania w przewodzie pokarmowym polipów hamartomatycznych cechuje je także wzrost ryzyka transformacji nowotworowej. Rozwój zmian nowotworowych nie jest ograniczony jedynie do przewodu pokarmowego, może on wystąpić również w innych narządach. Progresa zmian nowotworowych w tego typu polipach nie jest w pełni poznana, ale wykazuje odmienny mechanizm nowotworzenia niż jest to obserwowane w gruczolakach.

Poszczególne zespoły polipowatości hamartomatycznych często charakteryzują się występowaniem podobnych objawów, zwłaszcza na początkowym etapie rozwoju choroby cechy kliniczne w wielu przypadkach nie pozwalają na ich rozróżnienie[2]. Właściwe rozpoznanie choroby z pomocą molekularnej diagnostyki różnicowej umożliwia szybsze i skuteczniejsze leczenie, gdyż monitorowane są narządy, które wykazują zwiększone predyspozycje do transformacji nowotworowej[3].

Tab. 1. Ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej w zespołach polipowatości hamartomatycznych dla poszczególnych narządów

Narząd	Kumulatywne ryzyko (%) rozwoju nowotworu w poszczególnych zespołach polipowatości hamartomatycznych		
	Zespół polipowatości młodzieńczej	Zespół Peutza i Jeghersa	PHTS
Tarczycza			3-7
Piersi		54	19-28
Żołądek	21	29	

Trzustka	Dwa przypadki	36	
Jelito cienkie		13	
Jelito grube	9 - 68 (17 - 22 do 25 r.ż.)	57 (9 do 40 r. ż.)	
Nerki			2
Pęcherz moczowy			3
Macica		9	6
Szyjka macicy		10	3
Jajniki		21	2
Jądra		9	

Tab. 2. Geny warunkujące występowanie zespołów polipowatości hamartomatycznych

Gen	<i>BMPRIA</i>	<i>SMAD4</i>	<i>PTEN</i>	<i>STK11</i>
Nazwa	Bone morphogenetic protein receptor, type Ia	Mothers against decapentaplegic, drosophila, homolog of, 4	Phosphatase and tensin homolog	Serine/threonine protein kinase 11
Funkcja białka	receptor	Białko sygnałowe	fosfataza	kinaza
MIM	*601299	*600993	*601728	*602216
Chromosom	10q22.3	18q21	10q23.31	19q13.3
Wielkość	168,5 kbz	38,5 kpz	108 kbz	23 kbz
Eksony	13	11	9	10
Aminokwasy	532	552	403	433
Transkrypt (pz)	3613	8365	9007	3276
Masa białka	60 kDa	60 kDa	47 kDa	48,6 kDa

POLIPOWATOŚĆ MŁODZIEŃCZA

Polipowatość młodzieńcza (JPS) (MIM # 174900) jest rzadką chorobą dziedziczną w sposób autosomalny dominujący opisaną przez McColl'a w 1966 roku.[4]. JPS występuje 1 na 100000 nowych urodzeń[5]. W większości notowanych przypadków ma ona przebieg rodzinny. Diagnoza choroby opiera się na stwierdzeniu występowania polipów, które pod względem histopatologicznym są określane jako młodzieńcze. Polipy młodzieńcze wyróżniają się: hiperplazją gruczołów śluzowych, torbielami retencyjnymi powiązаныmi z obrzękiem, zatorami otworów gruczołowych, obfitą blaszką właściwą z brakiem mięśni gładkich, naciekami zapalnymi oraz dominującym zrębem[6]. Średnica polipów waha się od 1 milimetra do kilku centymetrów. Polipy występują zazwyczaj w jelicie grubym i odbycie (80%), choć zdarzają się w wyższych odcinkach układu pokarmowego takich jak żołądek i jelito cienkie. Polipy pojedyncze występują u 75% pacjentów, natomiast w pozostałych przypadkach stwierdza się polipy mnogie. Pod względem liczebności polipów obserwuje się zróżnicowanie nawet u członków jednej rodziny. Pojedyncze polipy młodzieńcze występują u około 2% dzieci i dorastającej młodzieży, nie mają one jednak złośliwego potencjału[7]. Tymczasem wśród pacjentów z polipowatością młodzieńczą ryzyko nowotworu jest znacznie wyższe. Ryzyko transformacji nowotworowej jelita w tym zespole według różnych danych literaturowych waha się od kilku do kilkudziesięciu procent, od 9 do ponad 50 %.

Polipowatość młodzieńcza diagnozowana jest na podstawie poniższych kryteriów[8]:

- co najmniej 3 polipy obserwowane w kolonoskopii
- polipy młodzieńcze w całym układzie pokarmowym
- dowolna liczba polipów młodzieńczych w przypadku rodzinnej historii choroby

Wyróżnia się trzy kategorie choroby [9, 10]:

- polipowatość młodzieńcza niemowląt
- polipowatość młodzieńcza jelita grubego
- ogólna postać młodzieńczej polipowatości

Podział na polipowatość młodzieńczą jelita grubego i ogólną postać młodzieńczej polipowatości został przyjęty umownie na podstawie miejsca występowania polipów. Szacuje się, że u ponad 20% pacjentów z JPS wykrywano wady wrodzone w różnych narządach. W przewodzie pokarmowym obserwowano uchyłki Meckela z przetoką pępkową oraz malrotacje jelita cienkiego. W układzie moczowo-płciowym rejestrowano przypadki niezstąpionych

jąder, jednostronnej agenezji nerkowej, rozszczepienia macicy. Wady wrodzone w obrębie klatki piersiowej to ubytek przegrody międzyprzedsionkowej, naczyniaki tętniczo-żylne płuc, zwężenie zastawki pnia tętnicy płucnej, tetralogia Fallota, zwężenie aorty, przetrwały przewód tętniczy. Natomiast w obrębie ośrodkowego układu nerwowego stwierdzano makrocefalię, wodogłowie komunikujące, rozszczepienie kręgosłupa. Ponadto notowano również kostniaki, naczyniaki chłonne krezki, dziedziczne teleangiektazje, hiperteloryzm, wrodzoną amiotonię, dodatkowe palce kończyny dolnej oraz ostrą przerywaną porfirię.

Za wystąpienie polipowatości młodzieńczej odpowiedzialne są mutacje w genach *SMAD4* i *BMPRIA* [5, 11, 12]. Gen *BMPRIA* (OMIM *601299; ang. *Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type IA*) znajduje się w chromosomie 10, w regionie q22-23. Gen ten składa się z 11 eksonów kodujących 532 aminokwasowe białko należące do rodziny TGF- β /BMP, będące receptorem typu I o właściwościach kinazy serynowo-treoninowej[13]. Transkrypt genu *BMPRIA* składa się z 3613 nukleotydów[14, 15]. Ulega on ekspresji w większości tkanek w tym w mięśniach szkieletowych, w mniejszym stopniu w sercu i łożysku.

Gen *SMAD4* (OMIM*600993 ang. *mothers against decapentaplegic, drosophila, homolog of, 4*) zlokalizowany w chromosomie 18, w regionie q21.1. Składa się z 11 eksonów. Sekwencja genu obejmuje 50 tysięcy par zasad, a mRNA składa się z 3197 nukleotydów. *SMAD4* jest genem supresorowym, a kodowane przez niego 552 aminokwasowe białko uczestniczy w przekazywaniu sygnału na szlaku transformującego czynnika wzrostu β (TGF β) i jego ligandów[13]. Białko SMAD4, zaliczane do „common” SMAD, posiada dwie konserwatywne domeny MH1 i MH2 (ang. *Mad Homology domain*). Na końcu aminowym białka znajduje się domena MH1 o strukturze spinki do włosów, wykazująca aktywność wiążącą DNA. Na końcu karboksylowym białek SMAD znajduje się bardzo konserwatywna domena MH2. Odpowiada ona za oddziaływanie z białkami uczestniczącymi w translokacji kompleksu do jądra jak i z kofaktorami wiążącymi DNA[16]. Linker Co-SMAD posiada bogaty w leucynę NES (ang. *nuclear export signal*) rozpoznawany przez CMR1. Interakcja SMAD4 z ufosforylowanymi Co-SMAD maskuje NES, chroniąc SMAD4 przed rozpoznaniem przez CMR1 i eksportem z jądra. Dopiero defosforylacja receptorowych SMAD oraz oddysocjowanie kompleksu umożliwia eksport SMAD4. Import białek SMAD do jądra odbywa się bez udziału czynników transportu jądrowego. Taki niezależny od importyn transport opisano również w przypadku składników uczestniczących w innych przemianach, na przykład β -kateniny w szlaku Wnt. Jest to możliwe dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu SMAD z nukleoporynami, dzięki interakcji hydrofobowego korytarza (ang. *hydrophobic corridor*) w domenie MH2 z regionem powtórzeń FG nukleoporyn[17].

Ufosforylowane receptorowe SMAD łączy się z Co-SMAD. Utworzony w ten sposób kompleks przechodzi do jądra, gdzie uczestniczy w kontrolowaniu ekspresji bardzo wielu genów jako pozytywny lub negatywny regulator zmian[18, 19]. Aktywacja, jak i represja wymaga uczestnictwa tych samych białek SMAD, a komórkowo specyficzna interakcja z czynnikami będącymi koaktywatorami i korepresorami powoduje właściwą odpowiedź. Kompleks SMAD4 z R-SMAD wiąże się z DNA przez domenę MH1, rozpoznającą sekwencję palindromową DNA GTCTAGAC. Taka sekwencja wiążąca SMAD (SBE) jest często obserwowana wśród genów, które ulegają ekspresji w wyniku obecności ligandów TGF β /BMP. SBE GTCTAGAC występuje średnio, co 1024 par zasad w genomie albo przypada, co najmniej jedno takie miejsce w regulatorowym regionie każdego średniej wielkości genu[17]. W literaturze opisano trzy mechanizmy regulacji transkrypcji w promotorze lub enhancerze przez SMAD i inne czynniki transkrypcyjne[16]. Pierwszy sposób to wiązanie się aktywnego kompleksu R-SMAD i Co-SMAD z czynnikiem transkrypcyjnym i łączenie się takiego kompleksu z rozpoznawaną sekwencją DNA. Drugi mechanizm polega na oddzielnym wiązaniu się SMAD i kofaktora z DNA, ale dopiero interakcja tych białek stabilizuje właściwości enhancerowe. Ostatni sposób regulacji odbywa się przez niezależnie od siebie wiązanie SMAD i dodatkowego czynnika do określonego miejsca DNA. Ich działanie jest oddzielnie, ale jednak w sposób synergistyczny.

Mutacje w *SMAD4* są obserwowane u około 20% pacjentów z rodzinną polipowatością młodzieńczą[11, 20]. Z podobną częstością wykrywane są mutacje genu *BMPRIA*. W sumie w obu genach wykryto już blisko 200 typów mutacji prowadzących do rozwoju polipów związanych z zespołem polipowatości młodzieńczej. Wykryte mutacje to przede wszystkim małe zmiany, mutacje punktowe i małe delecje. Dość wysoki odsetek zmian u chorych z polipowatością młodzieńczą stanowią także duże zmiany. Obserwowano duże delecje dotyczące regionu q22-q23 w chromosomie 10. Zmiany te obejmowały dwa sąsiadujące geny *PTEN* i *BMPRIA*. Mutacje w obu genach zaangażowane są w rozwój różnych zespołów polipowatości hamartomatycznych. Dotychczas opisane mutacje mają heterogenny charakter poza jedną mutacją, c.1244-1247delAGAC w eksonie 9 genu *SMAD4*. Mutacja ta znajduje się w gorącym miejscu, w regionie zawierającym cztery dwunukleotydowe powtórzenia AG, gdzie prawdopodobnie dochodzi do wypętlenia fragmentu nici DNA, który ulega delecji.

Zauważono pewne korelacje między fenotypem a genotypem u chorych z JPS. Z mutacjami w genie *SMAD4* powiązano wyższą częstość występowania dużych polipów w żołądku. Germinalne mutacje tego genu są odpowiedzialne za bardziej agresywny fenotyp młodzieńczej polipowatości jelita, ujawniający się jako malformacje naczyń w obrębie składników

podścieliska, kiedy mutacja znajdowała się przed kodonem 423. Zauważono także, że polipy z mutacją w genie *SMAD4* są obserwowane zarówno w wyższych jak i niższych odcinkach przewodu pokarmowego, gdy polipy z mutacjami w genie *BMPRIA* ograniczone są do regionu okrężnicy i odbytu.

ZESPÓŁ PEUTZA I JEGHERSA

Zespół Peutza i Jeghersa (PJS; OMIM 175200) jest chorobą dziedziczną w sposób autosomalny dominujący. Pierwszego opisu choroby dokonał w 1921 roku L.A. Peutz. 28 lat później w 1949 roku H. Jeghers określił szczegółowo cechy kliniczne choroby. Pierwsze objawy w postaci polipów hamartomatycznych oraz zmian barwnikowych skóry pojawiają się już w dzieciństwie. Częstość występowania zespołu waha się od 1/29 000 do 1/120 000 nowych urodzeń. Polipy pojawiają się podczas drugiej i trzeciej dekady życia u 80-100% pacjentów[21]. Mogą być zlokalizowane na całej długości przewodu pokarmowego, choć ich częstość występowania jest różna i zależy od odcinka. Najczęściej stwierdzane są w jelicie cienkim (96%), następnie okrężnicy i żołądka. Polipy w obrazie histopatologicznym wyglądają jak drzewkowato rozgałęziające się pęczki mięśni gładkich. Rdzeń polipów stanowi tkanka podścieliska i mięśnie gładkie. Całość zmiany pokryta jest prawidłowo wyglądającym nabłonkiem. U chorych stwierdzano łagodne polipy, występujące poza przewodem pokarmowym: w nosie, oskrzelach, pęcherzyku żółciowym i pęcherzu moczowym. Występują mnogo, a ich wielkość waha się od 1 do 3 centymetrów. Ryzyko nowotworów jelita u chorych z zespołem Peutza i Jeghersa jest nieznacznie większe niż w przypadku populacji ogólnej. Należy jednak zauważyć, że polipy hamartomatyczne, zwłaszcza mnogie, mogą być powodem wielu dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego. Stanowią przyczynę niedrożności (z powodu wgłobienia) i krwawień z dolnego odcinka przewodu pokarmowego, ze względu na łatwą samoamputację polipów[22, 23]. W literaturze u chorych z zespołem Peutza i Jeghersa były opisywane przypadki nowotworów pozajelitowych. Stwierdzano podwyższone ryzyko wystąpienia nowotworu trzustki, sutka, płuc, jajnika i macicy [24-26]. Drugim charakterystycznym objawem choroby jest występowanie przebarwień śluzówkowo-skórnych, które pojawiają się już w wieku niemowlęcym, jak i wczesnym dzieciństwie. Ciemno brązowe, czarne bądź niebieskie plamki, wielkości od 1 do 5 milimetrów występują u ponad 90% pacjentów. Mogą rozwijać się wokół ust, nozdrzy, oczu, policzków, na języku i podniebieniu. Opisywano również przypadki, w których przebarwienia występowały na rękach, stopach, w okolicach pępka, jak i obszarze okołoodbytniczym. Przebarwienia mogą blednąć po okresie pokwitania i w

czasie dorosłego życia. Zdiagnozowanie polipowatości Peutza i Jeghersa następuje poprzez rozpoznanie objawów klinicznych. Kryteria diagnostyczne przyjęte dla tej choroby w przypadku osób z rodzinnym przebiegiem choroby ograniczają się jedynie do stwierdzenia złogów melaninowych. Natomiast przy braku historii rodzinnej wymagane jest potwierdzenie wystąpienia przynajmniej dwóch polipów hamartomatycznych.

Zespół Peutza i Jeghersa warunkowany jest mutacjami w genie *STK11* (OMIM*602216 Serine/Threonine Protein Kinase 11) położonym na krótkim ramieniu chromosomu 19 w regionie 13.3. Gen ten składa się z 10 eksonów, z których 9 koduje białko o właściwościach kinazy serynowo-treoninowej. Ulega on powszechnej ekspresji podczas rozwoju embrionalnego, ale występuje, także w narządach ludzi dorosłych, zwłaszcza w trzustce, wątrobie i mięśniach szkieletowych. Białko STK11 składa się z trzech głównych domen, N-terminalnej, nie katalitycznej domeny, która zawiera dwa sygnały lokalizacji jądrowej; wysoce konserwatywnej domeny kinazowej i domeny regulatorowej znajdującej się na karboksylowym końcu. Domena kinazowa tego 433 aminokwasowego białka zlokalizowana jest pomiędzy 49 a 309 aminokwasem. Białko STK11 zawiera kilka miejsc, które ulegają fosforylacji i prenylacji, a także sygnał lokalizacji jądrowej (NLS). W wyniku aktywności kinaz fosforylowane są seryny w pozycji 31 i 325 oraz treonina w pozycji 363. STK11 jest również zdolny do autofosforylacji treoniny w pozycji 185, 189, 336, jak również seryny w pozycji 402. Autofosforylacja STK11 w pozycji Thr189 jest bardzo ważna dla aktywności kinazowej tego białka. Natomiast motyw prenylacyjny Cys⁴³⁰-Lys-Gln-Gln⁴³³ zlokalizowany jest na końcu karboksylowym. Utrata funkcji przez białko STK11 pociąga za sobą rozwój różnych wad. Związane jest to z uczestnictwem STK11 w wielu ważnych procesach komórkowych. U *Xenopus*, homolog genu *STK11*, XEEX1, zaangażowany jest w proces wczesnego rozwoju embrionalnego. Natomiast myszy pozbawione genu *STK11* umierają około ósmego dnia podczas embriogenezy. W przypadku myszy *STK11*^{+/-} stwierdza się występowanie polipów, które pod względem histopatologicznym są bardzo podobne do tych występujących w zespole PJS. W analizie molekularnej potwierdzono, że do rozwoju polipów wystarczy utrata jednego allelu genu *STK11*. Po 45 tygodniu życia u >70% myszy *STK11*^{+/-} płci męskiej i 20% myszy *STK11*^{+/-} płci żeńskiej obserwowane są różne pod względem histopatologicznym typy nowotworów wątroby. W komórkach nowotworowych stwierdzono utratę obu alleli genu *STK11*[27, 28]. Wykazano, że STK11 kontroluje szlak TGF β tworząc kompleks z białkiem SMAD4 poprzez LIP1. LIP1, tworzy specyficzny pomost pomiędzy tymi dwoma białkami[29]. STK11 oddziałuje również z białkiem PTEN[30]. Ponadto, kinaza STK11 uczestniczy w apoptozie zależnej od p53.

Germinalne mutacje genu *STK11* wykrywa się u 70% chorych z dziedziczną postacią tej choroby. W przypadku pacjentów bez historii rodzinnej wykrywalność wynosi około 50% [31]. W genie *STK11* opisano do tej pory ponad 230 mutacji w tym 70 mutacji punktowych. Dużą część tych mutacji stanowią małe delecje (54) i małe insercje (33). Wśród pacjentów z PJS częste są także duże delecje obejmujące poszczególne eksony jak i delecje całego genu [32].

ZESPÓŁ COWDENA

Zespół Cowdena (OMIM #158350; ang. *Cowden Disease*; CD) jest bardzo rzadkim zespołem polipowatości hamartomatycznych. Częstość występowania tego zespołu szacuje się 1 na 200000 nowych urodzeń. Cechą charakterystyczną są wielorakie zmiany hamartomatyczne tkanek pochodzących z trzech listków zarodkowych: endodermy, ektodermy i mezodermy. Oprócz regionu żołądkowo-jelitowego (71% chorych) zmiany te występują na skórze, błonach śluzowych jak i innych organach. Międzynarodowe konsorcjum zajmujące się zespołem Cowdena opracowało kryteria diagnostyczne, wśród których można wyróżnić zmiany skórno-śluzówkowe, w tym włókniaki śluzówki jamy ustnej oraz zmiany brodawkowate i hiperkeratotyczne na twarzy i na kończynach[33]. U prawie 99% chorych przed 30 rokiem życia rozwijają się zmiany skórno-śluzówkowe. Zmiany hamartomatyczne w obrębie przewodu pokarmowego występują na całej jego długości[34]. Najczęściej jednak zdarzają się w żołądku, okrężnicy i przetyku. W przetyku mają postać glikogenowych zrogowaceń. Zmiany hamartomatyczne w tym zespole to przede wszystkim polipy, tłuszczaki i nerwiaki zwojowe. Polipy w zespole Cowdena wyróżniają się obecnością elementów nerwowych, które nie są obserwowane w innych zespołach polipowatości hamartomatycznych. Poza tym w zespole Cowdena obserwowane są również wady centralnego układu nerwowego, takie jak makrocefalia (38%), opóźnienie umysłowe, choroba Lhermitte-Dulclos (LDD), nerwiaki zwojowe mózdzku. Oprócz tego zdarzają się wady oczu i tętniczo-żylne wady rozwojowe[35-37]. Wady kości czaszki, kręgosłupa i rąk występują u jednej trzeciej pacjentów. W zespole istnieje podwyższone ryzyko rozwoju łagodnych, jak i złośliwych nowotworów tarczycy, płuc, nerki, siatkówki, piersi, macicy i skóry. U 30 do 50% kobiet z zespołem Cowdena obserwowany jest nowotwór piersi, przy czym u 25% jest on obustronny. Rak piersi u tych kobiet występuje w bardzo młodym wieku, mniej więcej 10 lat wcześniej w porównaniu z populacją ogólną [35]. Ryzyko wystąpienia chorób tarczycy wynosi 53%. Najczęściej obserwuje się występowanie wola (22%), natomiast gruczolaki występują w 12%. Rak pęcherzykowy występuje u około

4% pacjentów z zespołem Cowdena a brodawkowaty u 3%. Występują również pojedyncze przypadki rdzeniastego raka tarczycy[38, 39]. Gen *PTEN* (OMIM*601728; *Phosphatase And Tensin Homolog*; PTEN) odpowiedzialny za rozwój zespołu Cowdena został zmapowany w 1997 roku na chromosomie 10 w regionie q23. Jest to gen supresorowy, który koduje białko złożone z 403 aminokwasów, będące fosfatazą. Określenie struktury krystalicznej PTEN ujawniło, że N-terminalna domena fosfatazy ściśle przylega do domeny C2 na końcu karboksylowym. Dwie domeny razem tworzą podstawową jednostkę katalityczną zajmującą prawie całą sekwencję peptydową białka, oprócz małego ogona w N- terminalnej części i dłuższego 50 aminokwasowego fragmentu na końcu karboksylowym. Domeny fosfatazy i C2 tworzące rdzeń katalityczny białka są wystarczające do jego prawidłowego funkcjonowania. Wydaje się, że pozostałe części uczestniczą w regulacji aktywności lub/i interakcji PTEN z innymi białkami[40]. PTEN ma właściwości defosforylujące zarówno białka, jak i lipidów błony komórkowej. Usuwa grupę fosforanową z pozycji D3 pierścienia izoizopropylowego z 3,4,5 trifosforanu fosfatydyloinozytolu i 3,4- difosforanu fosfatydyloinozytolu, które są produkowane podczas przekazywania sygnałów komórkowych w wyniku aktywności kinazy fosfoinozytolu 3' (PI3K)[41]. PTEN działa jako swoisty wyłącznik szlaku przewodzenia sygnałów na drodze PI3K, a tym samym prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1. Działanie genu *PTEN*, polegające na antagonizowaniu działania kinazy fosfoinozytolu 3', hamuje aktywność wielu onkoprotein wywierających swój wpływ właśnie przez kinazę PI3K. PTEN-PI3K regulują fundamentalne procesy komórkowe związane z mechanizmem transformacji nowotworowej. PTEN uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego poprzez kinazę Akt. Wśród substratów kinazy Akt odgrywających znaczącą rolę w cyklu komórkowym można wyróżnić takie czynniki transkrypcyjne jak: *FKHR* (Forkhead transcription factor), *AFX*, *FKHRL1* czy *GSK3*. PTEN kontroluje również podziały komórkowe. W fibroblastach *PTEN*^{-/-} dochodzi do obniżenia odpowiedzi na stymulację procesu apoptozy w wyniku zwiększonej transkrypcji genów proapoptotycznych tj. *FAS* i *Bim*. Aktywność fosfatazy białkowej PTEN prowadzi do hamowania kinazy FAK (*Focal Adhesion Kinase*) odpowiedzialnej za adhezję komórkową i zdolność migracji komórek[42]. Białko PTEN odgrywa również ważną rolę w procesie angiogenezy i uczestniczy w kontroli szlaku mTOR. U *D melanogaster* utrata funkcji genu *dpten* powoduje wzrost rozmiaru komórek i organów, podczas gdy nadeskresja *dpten* u drożdży powoduje, że efekt fenotypowy jest odwrotny. W przypadku myszy brak genu *PTEN* w komórkach neuronalnych powoduje rozwój zespołu cech podobnych do tych, jakie występują w chorobie Lhermitte-Duclos stanowiącej jedną z cech klinicznych zespołu Cowdena[43].

Mutacje somatyczne w genie *PTEN* powodują rozwój szeregu różnych typów nowotworów. Obserwowane są u 80% pacjentów z zespołem Cowdena. Mutacje genu *PTEN* wykrywane są także w innych zespołach polipowatości hamartomatycznych, między innymi w zespole Bannayan-Riley-Ruvalcaba[44]. Wykrywalność zmian w genie *PTEN* jest bliska 60%. W komputerowej bazie mutacji w genie *PTEN* opisano 208 mutacji, przeważającą większość stanowiły mutacje typu zmiany sensu i mutacje nonsensowne (87 mutacji) oraz małe delecje i insercje (75 mutacji). U pacjentów z zespołem Cowdena mutacje w genie *PTEN* obserwowane są w regionie promotorowym, natomiast delecje części lub całego genu dotyczą zazwyczaj pacjentów z zespołem Bannayan-Riley-Ruvalcaba

POLIPOWATOŚĆ MIESZANA

Polipowatość mieszaną (MIM #610069 ang. *Hereditary Mixed Polyposis Syndrome*, HMPS) pojawiła się w literaturze w roku 1971. Opisano wtedy przypadek 11-letniej dziewczynki z polipami młodzieńczymi i gruczolakami w okrężnicy i w jelicie cienkim. Jednak dopiero w 1987 roku Sarles zaproponował nazwę polipowatość mieszaną, opisując przypadek ojca i syna z licznymi, różnego typu polipami okrężnicy. U ojca były to polipy metaplastyczne i gruczolaki, a u syna zdiagnozowano oprócz tego polipy młodzieńcze. Najdokładniej kliniczne cechy zespołu polipowatości mieszanej przedstawiono w kilkupokoleniowej rodzinie, nazwanej SM96[45, 46]. Spośród ponad 200 członków rodziny 42 osoby wykazywały obecność różnego typu polipów, od gruczolaków cewkowych, gruczolaków brodawkowatych i gruczolaków płaskich po polipy hiperplastyczne, aż do atypowych polipów młodzieńczych. Pod względem histologicznym atypowe polipy młodzieńcze posiadały cechy polipów hiperplastycznych i gruczolaków. Badania kolonoskopowe uwidaczniały zazwyczaj kilkanaście polipów w okrężnicy i odbycie. Średni wiek diagnozowania pacjentów z HMPS w rodzinie SM96 to 40 lat.

Natomiast Cao przedstawił dwie trzypokoleniowe rodziny o bardzo podobnym przebiegu choroby jak w rodzinie SM96[45]. W większości przypadków polipy były zlokalizowane w jelicie grubym. Cao u chorych członków rodzin nie obserwował także żadnych zmian pozajelitowych. Stwierdzono również, że osoby z HMPS wykazują zwiększoną predyspozycję do rozwoju nowotworu jelita grubego.

Gen odpowiedzialny za rozwój polipowatości mieszanej nie został jeszcze zidentyfikowany. W wyniku analizy sprzężeń ustalono region silnie związany z pojawieniem się objawów choroby. Został nazwany CRAC1 i jest zlokalizowany na długim ramieniu chromoso-

mu 15. U probanta z jednej z rodzin przedstawionych przez Cao zidentyfikowano heterozygotyczną delecję 11 nukleotydów w eksonie 2 genu *BMPRIA*. Nie wykryto tej mutacji u pozostałych chorych członków rodziny. W 2012 roku opublikowano pracę na temat duplikacji w obrębie końca 3' genu *SCG5* i końca 5' genu *GREM*, która powieliła region enhancera genu *GREM1*. Ta duplikacja obejmuje 40kpz i powoduje wzrost allelo-specyficjnej ekspresji genu *GREM1*, który blokuje aktywność szlaku BMP[47]. Podobny mechanizm jest podłożem wystąpienia nowotworu jelita w przypadku polipowatości młodzieńczej. Polipowatość mieszana jest najmniej poznaną chorobą z zespołów polipowatości hamartomatycznych i wciąż wymaga dalszych badań.

Tab. 3. Kryteria diagnostyczne rozpoznania polipowatości hamartomatycznych

Zespół polipowatości hamartomatycznych	Kryteria diagnostyczne
Polipowatość młodzieńcza	<ul style="list-style-type: none"> • Liczne polipy młodzieńcze (3-10 polipów) w jelicie grubym i odbytnicy • Jakakolwiek liczba polipów młodzieńczych u pacjentów z rodzinnym przebiegiem choroby • Polipy młodzieńcze poza okrężnicą (w żołądku albo jelicie cienkim).
Zespół Peutza i Jeghersa	<ul style="list-style-type: none"> • Trzy lub więcej polipów potwierdzonych pod względem histologicznym • Jakakolwiek liczba polipów charakterystycznych dla PJS u pacjentów z obciążonym wywiadem rodzinnym • Charakterystyczne zmiany barwnikowe skórno-śluzówkowe u pacjentów z obciążonym wywiadem rodzinnym • Jakakolwiek liczba polipów charakterystycznych dla PJS i charakterystyczne zmiany barwnikowe skórno-śluzówkowe
Zespół Cowden	<p>Kryteria symptomatyczne:</p> <p>Zmiany skórno-śluzówkowe</p> <ul style="list-style-type: none"> • torbiele trichilemmalna • brodawka akralna • zmiany brodawkowate • zmiany na błonie śluzowej <p>Główne kryteria:</p>

	<p>Nowotwór piersi</p> <p>Rak tarczycy (zwłaszcza pęcherzykowaty)</p> <p>Makrocefalia (czołowo-potyliczny obwód czaszki ≥ 97 percentyle)</p> <p>Zwojak dysplastyczny mózdzku</p> <p>Rak endometrium</p> <p>Pomniejsze kryteria:</p> <p>Inne zmiany tarczycy (np. powiększenie gruczołu tarczycy)</p> <p>Opóźnienie umysłowe ($IQ \leq 75$) polipy hamartomatyczne</p> <p>Dysplazja włóknisto-torbielowata sutka</p> <p>Tłuszczaki</p> <p>Włókniaki</p> <p>Nowotwory narządów moczowo-płciowych</p>
Zespół mieszanej polipowatości	<p>Brak określonych kryteriów diagnostycznych tego zespołu.</p> <p>Rozpoznanie opiera się na występowaniu licznych polipów, różnych pod względem histopatologicznym</p>

OPIEKA NAD CHORYMI Z ZESPOŁAMI HAMARTOMATYCZNYMI.

Zespoły chorobowe związane z polipowatościami hamartomatycznymi są dość heterogenną grupą, zarówno pod względem ilości i lokalizacji polipów, jak i ryzyka wystąpienia nowotworów układu pokarmowego i innych narządów. Mimo, że choroby nie należą do częstych to jednak pozostają groźne dla pacjentów nie tylko z powodu predyspozycji do wystąpienia choroby nowotworowej, ale także z powodu objawów nienowotworowych, do których należą krwawienia, wgłębienia i niedrożności jelit. Każda z polipowatości hamartomatycznych ma narządowo-specyficzną lokalizację występowania objawów i dlatego każda z nich wymaga innej strategii postępowania diagnostycznego. Z tego powodu prawidłowe zakwalifikowanie chorych do określonego zespołu chorobowego jest podstawowym krokiem w kierunku prawidłowej opieki nad osobami obciążonymi tymi predyspozycjami. Zalecenia badań diagnostycznych dla polipowatości hamartomatycznych bazują jednak tylko na opiniach ekspertów. Nie prowadzono badań randomizowanych określających skuteczność programów opieki medycznej w tych chorobach[48]. W zespole Peutza i Jeghersa opieka diagnostyczna obejmuje zagrożone transformacją nowotworową narządy ze zróżnicowaniem pod względem płci. Dla obu płci zalecane jest badanie jelita cienkiego (pasaż jelita cienkiego) od 8 roku życia raz na 2 - 3 lata. Kolonoskopia co 2 - 3 lata od 18 roku życia. Od 24 roku życia badanie

USG trzustki raz na 1 - 2 lata. U kobiet badanie piersi od 18 roku życia, samokontrola raz w miesiącu, od 24 roku życia coroczne wykonywanie badań ultrasonograficznych i MRI, natomiast od 35 roku życia mammografię. Badanie jajników zaleca się przeprowadzać raz na rok począwszy od urodzenia do 12 roku życia, a następnie od 21. U chorych płci męskiej zalecane jest badanie jąder od urodzenia do 12 roku życia [48, 49]. W polipowatości młodzieńczej opieka nad chorymi skupia się na kontrolowaniu układu pokarmowego. Jednak w kilku rodzinach obserwowano współwystępowanie naczyniakowatości krwotocznej w przypadku mutacji w genie *SMAD4*, więc zaburzenia rozwoju naczyń również są możliwe. Należy zwracać uwagę na występowanie u chorych krwawień, anemii, bólów brzucha, biegunek lub zmian w kształcie lub kolorze stolca. Występowanie takich objawów jest wskazaniem do dalszych badań obejmujących również kolonoskopię. U chorych bez dolegliwości badania endoskopowe: gastroduodenoskopie i kolonoskopie rozpoczynać się powinny od 15 roku życia. Jeśli w badaniu endoskopowym zaobserwowano polipy należy je usunąć i w takiej sytuacji badanie oraz usuwanie powtarzać corocznie[48]. Gdy polipów nie obserwuje się badanie może być wykonywane raz na 3 lata. W ciężkich przebiegach choroby kolektomia może być jedynym sposobem leczenia[3]. W polipowatości mieszanej zalecane jest badanie endoskopowe jelita grubego raz do roku, a występujące polipy należy usuwać przez polipektomię[49, 50]. Zespół Cowdena niesie ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej w różnych narządach, więc badania profilaktyczne obejmują tarczycę, piersi i endometrium. Nie ma specjalnych rekomendacji dla badania przewodu pokarmowego, jednak niektórzy autorzy zalecają badać okresowo za pomocą kontrastu [3, 48, 51]. Badanie piersi należy rozpocząć od 30 roku życia. Samokontrola powinna być wykonywana raz w miesiącu, corocznie badanie ultrasonograficzne i MRI, a od 35 roku życia wykonywać coroczne badanie mammograficzne. Badanie USG tarczycy należy uzupełniać biopsją aspiracyjną cienkoigłową wykrytych guzów[3, 51].

PIŚMIENNICTWO:

1. Ober, W.B., *Selected items from the history of pathology: Eugen Albrecht, MD (1872-1908): hamartoma and choristoma*. Am J Pathol, 1978. 91(3): p. 606.
2. Mongin, C., et al., *Unexplained polyposis: a challenge for geneticists, pathologists and gastroenterologists*. Clin Genet, 2012. 81(1): p. 38-46.
3. Calva, D. and J.R. Howe, *Hamartomatous polyposis syndromes*. Surg Clin North Am, 2008. 88(4): p. 779-817, vii.
4. Veale, A.M., et al., *Juvenile polyposis coli*. J Med Genet, 1966. 3(1): p. 5-16.
5. Howe, J.R., et al., *The prevalence of MADH4 and BMPRIA mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations*. J Med Genet, 2004. 41(7): p. 484-91.
6. Drut, R., *The mucosa beyond the polyps in juvenile polyposis*. Fetal Pediatr Pathol, 2012. 31(1): p. 6-10.
7. Attard, T.M. and R.J. Young, *Diagnosis and management of gastrointestinal polyps: pediatric considerations*. Gastroenterol Nurs, 2006. 29(1): p. 16-22; quiz 23-4.

8. Manfredi, M., *Hereditary hamartomatous polyposis syndromes: understanding the disease risks as children reach adulthood*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2010. 6(3): p. 185-96.
9. Merg, A. and J.R. Howe, *Genetic conditions associated with intestinal juvenile polyps*. Am J Med Genet, 2004. 129C(1): p. 44-55.
10. Dahdaleh, F.S., et al., *Juvenile polyposis and other intestinal polyposis syndromes with microdeletions of chromosome 10q22-23*. Clin Genet, 2012. 81(2): p. 110-6.
11. Houlston, R., et al., *Mutations in DPC4 (SMAD4) cause juvenile polyposis syndrome, but only account for a minority of cases*. Hum Mol Genet, 1998. 7(12): p. 1907-12.
12. Zhou, X.P., et al., *Germline mutations in BMPRIA/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes*. Am J Hum Genet, 2001. 69(4): p. 704-11.
13. Elliott, R.L. and G.C. Blobe, *Role of transforming growth factor Beta in human cancer*. J Clin Oncol, 2005. 23(9): p. 2078-93.
14. Ide, H., et al., *Assignment of the BMPRIA and BMPR1B genes to human chromosome 10q22.3 and 4q23-->q24 by in situ hybridization and radiation hybrid map ping*. Cytogenet Cell Genet, 1998. 81(3-4): p. 285-6.
15. Astrom, A.K., et al., *Chromosomal localization of three human genes encoding bone morphogenetic protein receptors*. Mamm Genome, 1999. 10(3): p. 299-302.
16. Whitman, M., *Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily*. Genes Dev, 1998. 12(16): p. 2445-62.
17. Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. Embo J, 2000. 19(8): p. 1745-54.
18. He, X.C., et al., *BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling*. Nat Genet, 2004. 36(10): p. 1117-21.
19. Winkler, D.G., et al., *Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is Indirect and mediated by BMP proteins*. J Biol Chem, 2004.
20. Carr, J.C., et al., *Germline mutations in SMAD4 disrupt bone morphogenetic protein signaling*. J Surg Res, 2012. 174(2): p. 211-4.
21. Tse, J.Y., et al., *Peutz-Jeghers syndrome: a critical look at colonic Peutz-Jeghers polyps*. Mod Pathol, 2013. 26(9): p. 1235-40.
22. Homan, M., Z. Dolenc Strazar, and R. Orel, *Peutz-Jeghers syndrome. A case report*. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, 2005. 14(1): p. 26-9.
23. Mehenni, H., et al., *Molecular and clinical characteristics in 46 families affected with Peutz-Jeghers syndrome*. Dig Dis Sci, 2007. 52(8): p. 1924-33.
24. Kilic-Okman, T., et al., *Breast cancer, ovarian gonadoblastoma and cervical cancer in a patient with Peutz-Jeghers Syndrome*. Arch Gynecol Obstet, 2008.
25. Kaluzny, A., et al., *Organ-sparing surgery of the bilateral testicular large cell calcifying sertoli cell tumor in patient with atypical Peutz-Jeghers syndrome*. Int Urol Nephrol, 2012. 44(4): p. 1045-8.
26. Kilic-Okman, T., et al., *Breast cancer, ovarian gonadoblastoma and cervical cancer in a patient with Peutz-Jeghers Syndrome*. Arch Gynecol Obstet, 2008. 278(1): p. 75-7.
27. Miyoshi, H., et al., *Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice*. Cancer Res, 2002. 62(8): p. 2261-6.
28. Nakau, M., et al., *Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice*. Cancer Res, 2002. 62(16): p. 4549-53.
29. Smith, D.P., et al., *LIP1, a cytoplasmic protein functionally linked to the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1*. Hum Mol Genet, 2001. 10(25): p. 2869-77.
30. Mehenni, H., et al., *LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes*. Hum Mol Genet, 2005. 14(15): p. 2209-19.
31. Ylikorkala, A., et al., *Mutations and impaired function of LKB1 in familial and non-familial Peutz-Jeghers syndrome and a sporadic testicular cancer*. Hum Mol Genet, 1999. 8(1): p. 45-51.
32. Volikos, E., et al., *LKB1 exonic and whole gene deletions are a common cause of Peutz-Jeghers syndrome*. J Med Genet, 2006. 43(5): p. e18.
33. Eng, C., *Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria*. J Med Genet, 2000. 37(11): p. 828-30.
34. Kersseboom, R., et al., *PTEN in colorectal cancer: a report on two Cowden syndrome patients*. Clin Genet, 2012. 81(6): p. 555-62.
35. Celebi, J.T., et al., *Phenotypic findings of Cowden syndrome and Bannayan-Zonana syndrome in a family associated with a single germline mutation in PTEN*. J Med Genet, 1999. 36(5): p. 360-4.
36. Gicquel, J.J., et al., *Retinal angioma in a patient with Cowden disease*. Am J Ophthalmol, 2003. 135(3): p. 400-2.

37. Turnbull, M.M., et al., *Arteriovenous malformations in Cowden syndrome*. J Med Genet, 2005. 42(8): p. e50.
38. Eng, C., *Cowden Syndrome*. Journal of Genetic Counseling, 1997. 6(2): p. 181-192.
39. Hall, J.E., D.J. Abdollahian, and R.J. Sinard, *Thyroid disease associated with Cowden syndrome: A meta-analysis*. Head Neck, 2013. 35(8): p. 1189-94.
40. Leslie, N.R. and C.P. Downes, *PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it*. Biochem J, 2004. 382(Pt 1): p. 1-11.
41. Sansal, I. and W.R. Sellers, *The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway*. J Clin Oncol, 2004. 22(14): p. 2954-63.
42. Lu, Y., et al., *The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells*. Oncogene, 1999. 18(50): p. 7034-45.
43. Backman, S., V. Stambolic, and T. Mak, *PTEN function in mammalian cell size regulation*. Curr Opin Neurobiol, 2002. 12(5): p. 516-22.
44. Pritchard, C.C., et al., *A mosaic PTEN mutation causing Cowden syndrome identified by deep sequencing*. Genet Med, 2013.
45. Cao, X., et al., *Mapping of hereditary mixed polyposis syndrome (HMPS) to chromosome 10q23 by genomewide high-density single nucleotide polymorphism (SNP) scan and identification of BMPR1A loss of function*. J Med Genet, 2006. 43(3): p. e13.
46. Jaeger, E.E., et al., *An ancestral Ashkenazi haplotype at the HMPS/CRAC1 locus on 15q13-q14 is associated with hereditary mixed polyposis syndrome*. Am J Hum Genet, 2003. 72(5): p. 1261-7.
47. Jaeger, E., et al., *Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1*. Nat Genet, 2012. 44(6): p. 699-703.
48. Zbuk, K.M. and C. Eng, *Hamartomatous polyposis syndromes*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2007. 4(9): p. 492-502.
49. Estrada, R. and H.J. Spjut, *Hamartomatous polyps in Peutz-Jeghers syndrome. A light-, histochemical, and electron-microscopic study*. Am J Surg Pathol, 1983. 7(8): p. 747-54.
50. Sarles, J.C., et al., *Mixed familial polyposis syndromes*. Int J Colorectal Dis, 1987. 2(2): p. 96-9.
51. Walton, B.J., et al., *Cowden's disease: a further indication for prophylactic mastectomy*. Surgery, 1986. 99(1): p. 82-6.



Genetyka kliniczna raka prostaty

Hereditary prostate cancer

Streszczenie

Badania epidemiologiczne ostatniego dwudziestolecia dowodzą, że czynniki genetyczne mają ogromne znaczenie w etiologii raka gruczołu krokowego, jednakże geny związane z dziedziczną predyspozycją do tego nowotworu pozostają w dużej mierze niepoznane. W Polsce prowadzimy badania, których celem jest wyjaśnienie podłoża genetycznego raka prostaty. Dotychczas wykryliśmy jednoznaczny związek pomiędzy nosicielstwem mutacji konstytucyjnych genów *CHEK2*, *NBS1*, *HOXB13* a zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka prostaty. Nasze badania dowodzą, że do poznanych genetycznych markerów wysokiego ryzyka raka prostaty również można zaliczyć nosicielstwo specyficznych zmian tych genów, u których w rodzinie stwierdzono co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty u krewnego I lub II stopnia (ryzyko zachorowania zwiększone około 3-8-krotnie). Identyfikacja genetycznych markerów podatności na raka prostaty ma na celu usprawnienie profilaktyki, diagnostyki i postępowania z rakiem stercza w Polsce.

Słowa kluczowe: rak prostaty, genetyka, diagnostyka

Summary

Epidemiologic research conducted over the last two decades has led us to believe that inherited factors play an important role in the etiology of prostate cancer, but the genes, which underlie the inherited susceptibility are elusive. In Poland, we have initiated a program to identify DNA variants, which confer an increased risk of prostate cancer. We found that germline mutations in *CHEK2*, *NBS1*, *HOXB13* confer an increased prostate cancer risk in Polish men. Our studies provide evidence that the list of known genetic markers of high risk of prostate cancer can be extended by specific mutations in these genes in men with a positive family history of prostate cancer in at least one first or second degree relative (the risk increased about 3-8 fold). Identification of genetic markers of prostate cancer susceptibility will improve prevention, diagnosis and management with prostate cancer in Poland.

Key words: prostate cancer, genetics, diagnostics

Rodzinne występowanie raka prostaty opisano już w 1955 roku, lecz pojęcie dziedziczny rak stercza (HPC) funkcjonuje dopiero od 1992 roku, gdy Carter ogłosił wyniki analizy sprzężeń w grupie 691 mężczyzn z rakiem prostaty (PC) (1). Analiza ta wykazała, że aż w 9% przypadków rodzinny rak prostaty wiąże się z występowaniem rzadkiego allele. Penetrację tego allele oszacowano na 88% w wieku 85 lat. W roku 1996 stwierdzono, że allele ten, powodujący wysokie ryzyko PC jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 1 w obrębie prążka 24-25, a miejsce to nazwano HPC1 (2).

Od tego czasu poznano kilka loci, które zawierają geny związane z wysokim ryzykiem raka prostaty. Niestety nie udało się dotąd w obrębie tych miejsc odnaleźć konkretnych genów, które odpowiadałyby za znaczący odsetek przypadków HPC i miały istotne znaczenie w praktyce klinicznej. Chociaż podłoże molekularne HPC nadal pozostaje zagadką, nie ma wątpliwości, że znaczny odsetek PC rozwija się na podłożu dziedzicznej predyspozycji. Badania epidemiologiczne wskazują, że geny dominujące wysokiej predyspozycji mogą odpowiadać za 5-10% kolejnych PC oraz 30-40% przypadków występowania tego nowotworu w młodym wieku (3). Wyniki badań zgodności zachorowań bliźniąt jednojajowych na nowotwory wskazują, że czynniki genetyczne odpowiadają aż za 42% przypadków PC (4). W świetle tych obserwacji PC jest uwarunkowany genetycznie w większym stopniu niż inne nowotwory u człowieka.

RYZYKO RAKA PROSTATY A WYWIAD RODZINNY

Rodzinne występowanie PC jest najistotniejszym czynnikiem ryzyka PC (3, 5). Wiele badań epidemiologicznych wskazuje na zwiększone znacznie ryzyko nowotworu u braci i synów pacjentów z PC. Ryzyko raka w zależności od wywiadu rodzinnego przedstawiono w tabeli 1. Należy podkreślić, że ryzyko, zwłaszcza wystąpienia raka w młodym wieku, zwiększa się szczególnie u krewnych osób z PC zdiagnozowanym wcześniej. Niektóre badania wykazują, że ryzyko jest wyższe u braci niż u synów mężczyzn z PC (co może odpowiadać dziedziczeniu sprzężonemu z X lub autosomalnemu recesywnemu obserwowanemu w niektórych rodzinach HPC).

Tab. 1. Wywiad rodzinny a ryzyko raka prostaty (PC).

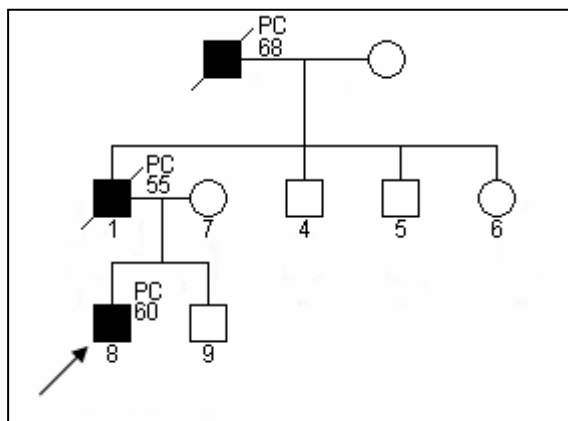
Wywiad rodzinny	Ryzyko względne
Ujemny	1
Ojciec z PC w lub po 60 rż.	1,5

1 brat z PC w lub po 60 rż.	2
Ojciec z PC przed 60 rż.	2,5
1 brat z PC przed 60 rż	3
2 krewnych I° z PC lub II° przez kobietę	4
3 lub więcej krewnych z PC	5

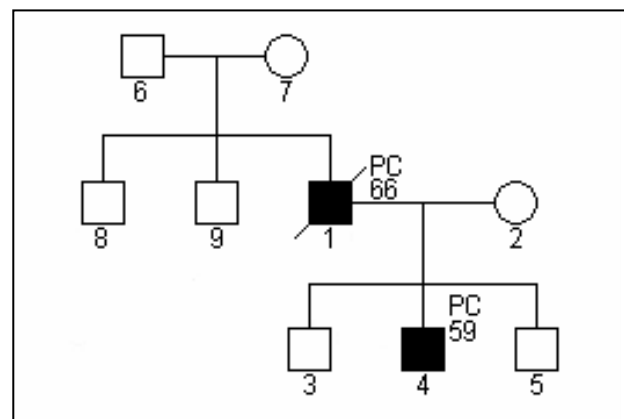
KRYTERIA KLINICZNE ROZPOZNAWANIA HPC (Carter; Ryc. 1a i 1 b) (6)

1. Rozpoznanie definitywne HPC - spełniona jest co najmniej jedna z cech:

- PC u 3 lub więcej krewnych I°;
- PC w 3 kolejnych pokoleniach;
- PC w wieku poniżej 56 lat u co najmniej 2 krewnych.



Ryc. 1a. Rodzowód przedstawiający rodzinę spełniającą kryteria definitywnej diagnozy HPC.



Ryc. 1b. Rodzowód przedstawiający przypadek HPC rozpoznany z wysokim prawdopodobieństwem, lecz niespełniający kryteriów definitywnej diagnozy.

2. Rozpoznanie HPC z wysokim prawdopodobieństwem (HPC-wp) - spełniona jest co najmniej jedna z cech:

- PC u 3 lub więcej krewnych bez spełnienia warunków a) i/lub b) dla diagnozy definitywnej;
- PC u 2 krewnych, z których co najmniej jeden rozpoznano poniżej 60 r.ż. i/lub stwierdzono transmisję pionową bez spełnienia warunku c) dla diagnozy definitywnej;
- co najmniej jednego PC rozpoznano poniżej 50 r.ż. bez spełnienia kryteriów dla diagnozy definitywnej.

CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA HPC

Najważniejsze charakterystyczne cechy HPC to: rodowodowo autosomalny dominujący typ dziedziczenia oznaczający występowanie raka prostaty u blisko połowy męskich członków rodziny z HPC (tylko wyjątkowo HPC wykazują dziedziczenie autosomalne recesywne lub dominujące sprzężone z X), oraz młody wiek zachorowania średnio poniżej 56 roku życia, a więc około 6-7 lat młodszy niż w przypadkach sporadycznych (2). W związku z rozwojem nowotworu w młodszym wieku większy odsetek pacjentów z HPC umiera z powodu tego nowotworu (75%) niż ma to miejsce w przypadkach sporadycznych (50%) (7, 8).

WYSTĘPOWANIE INNYCH NOWOTWORÓW W RODZINACH Z HPC

Badania epidemiologiczne zgodnie wskazują na zwiększone ryzyko wystąpienia PC u krewnych osób z tym nowotworem, lecz badania asocjacji PC z innymi nowotworami nie są jednoznaczne. Wydaje się, że w pewnych rodzinach występuje zwiększone ryzyko PC oraz innych nowotworów takich jak guzy mózgu, rak żołądka i rak piersi, jednak większość badań wskazuje, że w zdecydowanej większości rodzin z HPC inne nowotwory nie występują ze zwiększoną częstością. Kwestia ta pozostanie nierozstrzygnięta do chwili zidentyfikowania zdecydowanej większości genów predysponujących do HPC i obserwacji fenotypu nosicieli mutacji tych genów (9).

NAJCZĘSTSZE ZESPOŁY DZIEDZICZNEJ PREDYSPOZYCJI DO NOWOTWORÓW A RYZYKO PC

Nosiciele mutacji konstytucyjnych genów *BRCA1* i *BRCA2* predysponujących do dziedzicznego raka piersi i jajnika prawdopodobnie znajdują się w grupie zwiększonego ryzyka PC. Dane odnośnie związku mutacji genu *BRCA1* z etiologią PC nie są jednoznaczne. W populacji Żydów Aszkenazyjskich opisano 2-krotnie zwiększone ryzyko zachorowania na PC u nosicieli mutacji 185delAG i 5382insC genu *BRCA1* (10, 11, 12). Jednak badania innych grup etnicznych nie potwierdzają związku pomiędzy nosicielstwem mutacji genu *BRCA1* a predyspozycją do raka prostaty (13, 14, 15, 16). Przyczyn tych rozbieżności można upatrywać w odmiennych spektrach mutacji genu *BRCA1* i/lub obecności różnych czynników modyfikujących w specyficznych populacjach.

Związek mutacji genu *BRCA2* ze zwiększonym ryzykiem PC jest stosunkowo dobrze udokumentowany. Oszacowano, że ryzyko zachorowania na PC u nosicieli mutacji genu *BRCA2* jest zwiększone około 5 razy, 7-krotnie do 65 roku życia, a nawet 20-krotnie do 56

roku życia (9). Ostatnie badania wskazują, że u nosicieli mutacji genu *BRCA2* diagnozowane są nowotwory o wysokim stopniu złośliwości (głównie G3, 4) w młodszym wieku (średnio o 5 lat). Ponadto średni okres przeżycia nosicieli mutacji z HPC jest krótszy o około 10 lat (2 lata w porównaniu do 12,4 lat u osób bez mutacji). Jednakże mutacje *BRCA2* (czy *BRCA1*) są stosunkowo rzadkie i mogą odpowiadać jedynie za niewielki odsetek przypadków zachorowań na PC, który w większości jest „site specific” (co oznacza, że w rodzinie występują jedynie PC bez innych nowotworów).

Ponadto rak prostaty występuje z nieznacznie większą częstością u pacjentów z zespołem Cowdena, Li-Fraumeni, dziedzicznym rakiem żołądka wywołanym mutacjami E-kadheryny (3, 9).

GENY DZIEDZICZNEJ PREDYSPOZYCJI DO PC

Ogromne nadzieje pokładano w poszukiwaniach genu wysokiego ryzyka raka prostaty poprzez badania rodzin z agregacją tego nowotworu za pomocą analizy sprzężeń. W ten sposób zlokalizowano wiele regionów chromosomalnych predysponujących do HPC, np: HPC1(1q25-25), PCaP (1q42-43), HPCX (Xq27-28), CAPB (1p36), HPC2 (17p12), HPC20, (20q13). W obrębie tych regionów zidentyfikowano jedynie trzy geny, między innymi *RNASEL* oraz *MSR1*. Mutacje germinalne genów *RNASEL* i *MSR1* zidentyfikowano w rodzinach z agregacją raków prostaty w USA, a częste polimorfizmy tych genów opisano jako zmiany niskiej penetracji dla raka gruczołu krokowego (17, 18, 19). Niestety związek tych potencjalnych genów wysokiej penetracji z etiologią PC nie został potwierdzony w kolejnych analizach w tym w badaniach w polskiej populacji (20).

Gen HOXB13:

Chociaż za pomocą analizy sprzężeń w rodzinach z HPC zidentyfikowano kilkanaście regionów chromosomalnych zawierających potencjalne geny wysokiego ryzyka, jednak dopiero w roku 2012 w jednym z tych regionów wykryto gen wysokiego ryzyka raka prostaty – HOXB13. Ewing i wsp. (21) wykonali sekwencjonowanie nowej generacji ponad 200 genów w regionie 17q21-22 w grupie 94 badanych rodzin z rakiem prostaty i wykryli powtarzalną mutację G84E w genie HOXB13 (Ewing et al: N Engl J Med 2012). Stwierdzili pełną segregację G84E z rakiem prostaty w rodzinach z HPC. Na podstawie badania asocjacyjnego oszacowano, że mutacja G84E jest związany z wysokim ryzykiem raka prostaty (OR = 20, p <0,0001). Związek między mutacją G84E a wysokim ryzykiem raka stercza został potwierdzony w innych badaniach i w różnych grupach etnicznych, w tym w polskiej populacji (22).

Gen CHEK2

Gen CHEK2 jest jednym z genów w układzie naprawy DNA. Mutacje CHEK2 u pacjentów z rakiem prostaty wykryto po raz pierwszy w USA. W tej heterogennej genetycznie populacji stwierdzono aż 18 rzadkich mutacji genu CHEK2 (23). W homogennej genetycznie populacji fińskiej wykryto dwie powtarzalne zmiany genu CHEK2 (1100delC i I157T). Na podstawie tych badań oszacowano, że mutacje skracające białko CHEK2 zwiększają ryzyko zachorowania na PC około 3-krotnie. Ryzyko zachorowania u nosicieli mutacji CHEK2 1100delC w populacji fińskiej, których co najmniej jeden krewny zachorował na raka prostaty było zwiększone 8-krotnie (24).

Gen NBS1

Gen dla zespołu Nijmegen (gen NBS1) należy do grupy genów, które są zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA. Badania eksperymentalne wykazują istotne znacznie upośledzenia funkcji układu naprawy DNA w etiologii raka gruczołu krokowego. Zespół Nijmegen występuje wielokrotnie częściej w populacjach słowiańskich, niż w innych grupach etnicznych, gdyż w krajach słowiańskich występuje mutacja założycielska genu NBS1 - delecja pięciu nukleotydów w obrębie eksonu szóstego (657del5) (25). W polskiej populacji nosicielstwo mutacji NBS1 wiąże się z 2.5 krotnie zwiększonym ryzykiem raka stercza.. Ponadto, nosicielstwo zmiany 657del5 wiąże się z krótszym przeżyciem mężczyzn z rakiem stercza - ponad połowa z nich zmarła w ciągu 5 lat od postawienia diagnozy tego nowotworu (HR = 1,9, p = 0,008) (26). Gen NBS1 jest genem naprawy DNA a raki prostaty u nosicieli mutacji NBS1 nie posiadają prawidłowej nibryny (produktu genu NBS1) i mają skrajnie upośledzoną naprawę DNA. Tak więc, pacjenci z rakiem stercza i mutacją genu NBS1 mogą dobrze odpowiadać na leczenie cisplatyną i inhibitorami PARP (co może być przedmiotem przyszłych prób klinicznych).

Wykryto również szereg zmian prawdopodobnie związanych ze zwiększonym ryzykiem PC w innych geneach. Jednakże te zmiany powiązано ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka prostaty na podstawie pojedynczych badań (27-29). Większość z nich zmian DNA jest zlokalizowana w obrębie genów układu naprawy DNA i regulacji cyklu komórkowego (np. *CDKN1B*, *CDKN1A*, *ATM*, *XRCC1*, *ERCC2*).

Podłoże dziedziczne PC w znacznym stopniu może wynikać z nosicielstwa zmian o niskiej penetracji. Współdziałanie takich zmian w wielu genach oraz dodatkowo wpływ czynników środowiskowych może znacząco zwiększać ryzyko PC. Wydaje się, że uszkodzenia DNA nieznacznie modyfikujące ryzyko zachorowania odpowiadają za mało nasilone rodzinne agregacje zachorowań. Taki patomechanizm może mieć istotne znaczenie kliniczne, bowiem słaba rodzinna agregacja PC jest częsta (~ 20% ogółu PC). W ostatnich latach za pomocą badań GWAS (Genome-wide Association Studies; GWAS) zidentyfikowano ponad 70 regionów chromosomalnych, które zawierają zmiany genetyczne o niskiej penetracji dla raka prostaty (30). W chwili obecnej zmiany te nie mają zastosowania w praktyce klinicznej. Pierwszy region chromosomalny wykryty dla raka stercza za pomocą badań GWAS to fragment długiego ramienia chromosomu 8 o lokalizacji 8q24.21. Spośród zmian wykrytych przez badania GWAS zaburzenia regionu 8q24 wykazują najsilniejszy związek z predyspozycją do raka stercza. Markery podatności na raka prostaty zidentyfikowano również na chromosomach 2, 3, 6, 7, 10, 11, 17, 19 i X.

PREDYSPOZYCJA DZIEDZICZNA DO RAKA PROSTATY W POLSKIEJ POPULACJI

Identyfikację markerów genetycznej predyspozycji do chorób szczególnie efektywnie można wykonywać w populacjach o wysokim stopniu homogenności z silnie zaznaczonymi efektami mutacji/polimorfizmów założycielskich, jak np. populacja polska. W takich populacjach z reguły niewielka liczba zmian konstytucyjnych DNA odpowiada za występowanie chorób genetycznych, co umożliwia opracowanie tanich i efektywnych testów DNA. Ostatnio w polskiej populacji zidentyfikowaliśmy nowe genetyczne markery PC. Nosiciele mutacji konstytucyjnych genów *CHEK2*, *NBS1* i *HOX13* znajdują się w grupie zwiększonego ryzyka PC.

W polskiej populacji występują cztery mutacje genu *CHEK2* z łączną częstością około 5.8%, w tym trzy mutacje skracające białko *CHEK2* (del5395, 1100delC, IVS2+1G>A) występujące z częstością 1-1,5% oraz mutacja missense I157T stwierdzona w populacji z częstością około 5% (26, 31, 32). Nosicielstwo jednej z czterech mutacji *CHEK2* wiąże się z około 2-krotnie zwiększonym ryzykiem raka stercza. U nosicieli mutacji *CHEK2*, u których w rodzinie stwierdzono co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty ryzyko to jest zwiększone około 3-krotnie. Ryzyko dla nosicieli mutacji skracających białko jest wyższe niż dla zmiany missense I157T. Dla nosicieli mutacji skracających białko, u których w rodzinie stwierdzono zachorowania na raka stercza ryzyko jest zwiększone około 4-krotnie (26). Wyniki najnowszych badań na grupie 2907 mężczyzn z populacji polskiej, u których wykonano badania prze-

siewowe raka prostaty wykazały, że szczególnie efektywne jest wykrywanie wczesnego raka prostaty za pomocą PSA u nosicieli mutacji CHEK2 I157T. Zwiększone ryzyko dotyczyło zwłaszcza nosicieli tej mutacji w wieku 40-60 lat (OR=5,5, p =0.001) i mężczyzn z rakiem prostaty wśród krewnych (OR = 3,2, p = 0.0004) (33). Ryzyko zachorowania na raka stercza do 85 r.ż. u nosiciela jednej z mutacji CHEK2 wynosi około 16%, a u nosicieli mutacji CHEK2, u których w rodzinie stwierdzono co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty wynosi około 24% (u nosili mutacji skracających białko z dodatnim wywiadem rodzinnym wynosi około 32%)

W polskiej populacji nosicielstwo mutacji genu NBS1 657del5 wiąże się z 2.5 krotnie zwiększonym ryzykiem raka stercza. U nosicieli mutacji NBS1 u których w rodzinie stwierdzono co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty ryzyko to jest zwiększone 4,3-krotnie. Ponadto, nosicielstwo zmiany 657del5 wiąże się z krótszym przeżyciem mężczyzn z rakiem stercza - ponad połowa z nich zmarła w ciągu 5 lat od postawienia diagnozy tego nowotworu (HR = 1,9, p = 0,008) (26). Ryzyko zachorowania na raka stercza do 85 r.ż. u nosiciela mutacji wynosi około 20%, a u nosicieli mutacji NBS1, u których w rodzinie stwierdzono co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty wynosi około 34%. Częstość populacyjna 657del5 wynosi 0.6%, częstość u mężczyzn z rakiem stercza wynosi 1,4%, a w przypadkach rodzinnych agregacji raka prostaty wynosi około 2,5%.

W polskiej populacji nosicielstwo mutacji G84E genu HOXB13 wiąże się z 5-krotnie zwiększonym ryzykiem raka prostaty. U mężczyzn, nosicieli mutacji u których w rodzinie stwierdzono co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty w krewnych I lub II stopnia ryzyko to było zwiększone 8,4-krotnie. Ryzyko zachorowania na raka stercza do 85 r.ż. u nosiciela mutacji wynosi około 40%, a u nosicieli mutacji G84E, u których w rodzinie stwierdzono co najmniej jedno zachorowanie na raka prostaty wynosi około 67%. Częstość populacyjna mutacji G84E wynosi około 0.12%. Częstość w rakach stercza wynosi 0.6%, a w przypadkach rodzinnych agregacji raka prostaty wynosi około 1% (22).

BADANIA DNA W DIAGNOSTYCE HPC

Grupy osób ze zwiększoną genetyczną predyspozycją do raka prostaty w polskiej populacji można zidentyfikować poprzez badanie specyficznych zmian konstytucyjnych w genach *NBS1*, *CHEK2* i *HOXB13*. Do poznanych genetycznych markerów wysokiego ryzyka raka prostaty w polskiej populacji można zaliczyć nosicielstwo specyficznych zmian genów *NBS1*, *CHEK2* i *HOXB13* u mężczyzn, u których w rodzinie stwierdzono, co najmniej

jedno zachorowanie na raka prostaty u krewnego I° lub II° (ryzyko zachorowania zwiększone od około 3-krotnie do 8-krotnie).

Testy DNA można także wykonywać dla genu *BRCA2*, p53 (Li-Fraumeni), PTEN (choroba Cowdena), E-kadheryna. Mutacje powyższych genów występują jednak rzadko. Badanie powyższych genów może być uzasadnione tylko w przypadkach PC, które występują w przebiegu tych określonych zespołów dziedzicznej predyspozycji.

METODY DIAGNOSTYKI PC

Rak gruczołu krokowego we wczesnym okresie rozwoju przebiega bezobjawowo. Podstawowe metody diagnostyczne obejmują oznaczanie w surowicy stężenia markera specyficznego dla prostaty (PSA, *prostate specific antygen*), badanie gruczołu krokowego palcem przez odbytnicę (DRE, *digital rectal examination*) i ultrasonografię przezodbytniczą (TRUS, *transrectal ultrasonography*). Nie istnieje ogólnie zaakceptowany najniższy poziom odcięcia dla PSA, chociaż wartość > 4 ng/ml jest najczęściej stosowana. Wiadomo też, że część raków prostaty rozwija się bez wzrostu PSA (np. raki o niskim stopniu zróżnicowania). Możliwość wykrycia raka stwarza - w stopniu ograniczonym - badanie gruczołu krokowego palcem przez odbytnicę. Podstawowe znaczenie ultrasonografii przezodbytniczej TRUS sprowadza się do roli metody ułatwiającej wykonanie biopsji stercza/kierowania igłą. Rozpoznanie PC stawia się na podstawie badania histopatologicznego materiału pobranego podczas biopsji. Biopsja gruboigłowa stercza pod kontrolą TRUS (*core biopsy*) stanowi współcześnie standard w diagnostyce PC. Zalecane jest wykonywanie jako pierwszorazowej biopsji tzw. sześciokrotnej bocznej (*sextant lateral*, 6-10 wycinków). Rozszerzenie protokołu biopsji >20 wycinków (biopsja saturacyjna) pozwala wykryć raka u chorych z silnym podejrzeniem choroby, przy ujemnych wynikach biopsji dotychczasowych (biopsja kolejna).

BADANIA SKRYNINGOWE W RODZINACH Z HPC

Nie ma wątpliwości, że regularne badania PSA bezobjawowych mężczyzn w średnim wieku zmniejszą liczbę przypadków PC zdiagnozowanych późno w zaawansowanym stopniu klinicznym. W porównaniu do badania całej populacji mężczyzn, badania skryningowe wyselekcjonowanej grupy pacjentów wysokiego ryzyka mają głębokie uzasadnienie ekonomiczne. Dlatego też badania okresowe powinny być wykonywane w pierwszej kolejności w grupie pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym oraz podwyższonym PSA. Obejmują one oznaczanie PSA, przezodbytnicze palpacyjne badanie prostaty (oraz biopsję stercza w razie podejrzenia PC). Według American Cancer Society u osób z grupy wysokiego ryzyka PC badania

okresowe należy rozpocząć od około 45 roku życia. U członków rodzin z HPC należy rozpoczynać badania co najmniej 5 lat poniżej najniższego wieku, w którym zdiagnozowano PC w rodzinie i co najmniej 10 lat poniżej wieku najmłodszego członka rodziny, u którego wystąpiły przerzuty PC.

Zaleca się, aby badania przeprowadzać do 70 roku życia, gdyż powyżej tego wieku ryzyko śmierci z powodu PC jest niskie (33). Należy być świadomym znaczenia wzrostu poziomu PSA u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka PC. Wartości PSA już ponad 3 ng/ml u tych pacjentów są wskazaniem do biopsji gruczołu krokowego. W przypadku ujemnego wyniku biopsji u tych mężczyzn badanie palpacyjne, PSA i/lub biopsję należy powtarzać w krótkich odstępach czasu (3, 34, 35).


W polskiej populacji wydaje się uzasadnione uzupełnienie programu badań okresowych o badania nosicieli mutacji *NBS1*, *CHEK2* i *HOXB13*, które są związane z predyspozycją do PC.

PIŚMIENNICTWO

1. Carter BS, et al.: Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 3367-71.
2. Smith JR, et al.: Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. Science 1996, 274: 1371-4.
3. Bratt O: Hereditary prostate cancer: clinical aspects. J Urol 2002, 168: 906-13.
4. Lichtenstein P, et al.: Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. N Engl J Med 2000, 343: 78-85.
5. Virtanen A, Gomari M, Kranse R, Stenman UH: Estimation of prostate cancer probability by logistic regression: free and total prostate-specific antigen, digital rectal examination, and heredity are significant variables. Clin Chem 1999, 45: 987-94.
6. Carter BS, et al.: Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. J Urol 1993, 150: 797-802.
7. Bratt O, Damber JE, Emanuelsson M, Gronberg H: Hereditary prostate cancer: clinical characteristics and survival. J Urol 2002, 167: 2423-6.
8. Keetch DW, et al.: Clinical and pathological features of hereditary prostate cancer. J Urol 1996, 155: 1841-3.
9. Sigurdsson S, et al.: *BRCA2* mutation in Icelandic prostate cancer patients. J Mol Med 1997, 75: 758-61.
10. Struwing JP, et al.: The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. N Engl J Med 1997, 336: 1401-8.
11. Warner E, et al.: Prevalence and penetrance of *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. J Natl Cancer Inst 1999, 91: 1241-7.
12. Giusti RM, et al.: A twofold increase in *BRCA* mutation related prostate cancer among Ashkenazi Israelis is not associated with distinctive histopathology. J Med Genet 2003, 40: 787-92.
13. Thompson D, Easton DF: Breast Cancer Linkage Consortium: Cancer incidence in *BRCA1* mutation carriers. J Natl Cancer Inst 2002, 94: 1358-65.
14. Sinclair CS, et al.: *BRCA1* and *BRCA2* have a limited role in familial prostate cancer. Cancer Res 2000, 60: 1371-5.
15. Ikonen T, et al.: *BRCA1* and *BRCA2* mutations have no major role in predisposition to prostate cancer in Finland. J Med Genet 2003, 40, E98.
16. Zuhlke KA, et al.: Truncating *BRCA1* mutations are uncommon in a cohort of hereditary prostate cancer families with evidence of linkage to 17q markers. Clin Cancer Res 2004, 10: 5975-80.
17. Carpten J, et al.: Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. Nat Genet 2002, 30, 181-4.

18. Casey G, et al.: RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nat Genet* 2002, 32: 581-3.
19. Xu J, et al.: Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* 2002, 32: 321-5.
20. Cybulski C, et al.: DNA variation in MSR1, RNASEL and e-cadherin genes and prostate cancer in Poland. *Urol Int* 2007, 79: 44-9,
21. Ewing CM, Ray AM, Lange EM, et al: Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med* 366:141-9, 201
22. Kluźniak W, Wokołorczyk D, Gołąb A, et al. The G84E mutation in the HOXB13 gene is associated with an increased risk of prostate cancer in Poland. *Prostate*. 2013 Apr;73(5):542-8.
23. Dong X, et al.: Mutations in *CHEK2* associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet* 2003, 72: 270-80.
24. Seppala EH, et al.: *CHEK2* variants associate with hereditary prostate cancer. *Br J Cancer* 2003, 89: 1966-70.
25. Cybulski C, et al.: *NBS1* is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 2004, 64: 1215-9.
26. Cybulski C, et al, An Inherited *NBS1* Mutation is Associated with Poor Prognosis Prostate Cancer. *Br J Cancer*. 2013 Feb 5;108(2):461-8.
27. Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J: *CDKN1A* and *CDKN1B* polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res* 2003, 63: 2033-6.
28. Angèle S, et al.: ATM polymorphisms as risk factors for prostate cancer development. *Br J Cancer* 2004, 91: 783-7.
29. Rybicki BA, et al.: DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2004, 13: 23-9.
30. Eeles RA, et al. Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nat Genet*. 2013 Apr;45(4):385-91,
31. Cybulski C, et al.: A novel founder *CHEK2* mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 2004, 64: 2677-9.
32. Cybulski C, et al.: A large germline deletion in the *CHEK2* kinase gene is associated with an increased risk of prostate cancer. *J Med Genet* 2006, 43: 863-6.
33. Cybulski C et al. A personalised approach to prostate cancer screening based on genotyping of risk founder alleles. *Br J Cancer*. 2013 Jun 25;108(12):2601-9.
34. von Eschenbach A, et al.: American Cancer Society guidelines for the early detection of prostate cancer: update, *Cancer* 1997, 80: 1805-7.
35. Machoy P, Lubiński J: Dziedziczny rak prostaty. *Urologia Polska* 2002, 55: 3.

*Barbara Jarzab, Małgorzata Oczko-Wojciechowska, Jolanta Krajewska, Jan Włoch,
Zbigniew Wygoda*



**Genetyka kliniczna raka rdzeniastego
tarczycy**

Clinical genetic of medullary thyroid carcinoma

Streszczenie

Rak rdzeniasty tarczycy (RRT) jest neuroendokrynnym nowotworem złośliwym, wywodzącym się z okołopęcherzykowych komórek C. Komórki te pochodzą z grzebienia nerwowego, w czasie rozwoju płodowego migrują z V kieszonki skrzelowej do tarczycy, gdzie produkują kalcytoninę. Kalcytonina jest hormonem peptydowym, ułatwiającym przejście wapnia z krwi do kości. W około 25% przypadków RRT występuje w zespołach mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego uwarunkowanych germinálną mutacją protoonkogenu *RET*.

Rak rdzeniasty tarczycy występuje w postaci sporadycznej oraz dziedzicznej, której wystąpienie związane jest z obecnością mutacji germinálnych protoonkogenu *RET*. Dziedzicznemu RRT mogą nie towarzyszyć żadne inne objawy i mówi się wówczas o rodzinnym raku rdzeniastym tarczycy (ang. *familial medullary thyroid carcinoma*, FMTC). Częściej jednak dziedziczny RRT jest objawem zespołu mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego typu 2 (ang. *multiple endocrine neoplasia type 2*, MEN 2).

Zespół mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego typu 2A (MEN 2A), zwany przedtem zespołem Sipple'a, charakteryzuje się skojarzeniem RRT z guzami chromochłonnymi nadnerczy (u około 50% chorych) i gruczolakami lub hiperplazją przytarczyc (u około 15-25% chorych). Rozpoznanie zespołu MEN 2B jest daleko bardziej jednoznaczne, tak ze względu na charakterystyczny obraz kliniczny jak i charakterystyczne mutacje. W tym zespole RRT rozwija się najszybciej, jeszcze u małych dzieci i towarzyszą mu nerwiaki błon śluzowych oraz przerost zwojów przywspółczulnych śluzówki jelita grubego. Guzy chromochłonne nadnerczy występują później i ujawniają się u około połowy chorych, natomiast nadczynność przytarczyc nie występuje.

W rozdziale przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat molekularnego podłoża dziedzicznej postaci RRT oraz zależność między lokalizacją mutacji punktowej *RET* i obrazem klinicznym choroby. Omówiono również postępowanie diagnostyczne i lecznicze w dziedzicznej postaci RRT oraz postępowanie w razie wykrycia nosicielstwa mutacji protoonkogenu *RET*. Jednocześnie w podsumowaniu podano krótkie wskazówki dotyczące postępowania w przypadku wykrycia dziedzicznej postaci RRT.

Słowa kluczowe: dziedziczny rak rdzeniasty tarczycy, protoonkogen *RET*, zespół MEN 2

Summary

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is neuroendocrine malignant neoplasm, arising from the parafollicular thyroid cells. These cells arising from the neural crest, migrate from the fifth branchial cleft into thyroid gland, during the embryogenesis, and the calcitonin hormone is produced by them. Calcitonin is the peptide hormone, facilitating calcium transition from the blood to the bones.

Medullary thyroid carcinoma occurs in the sporadic and hereditary form, which presence is related to germline protooncogene *RET* mutations. Hereditary form of MTC can be divided into familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) without any endocrinopathies and, more frequently it is diagnosed, as a part of multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2).

Multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN 2A), named earlier as Sipple syndrome also, can be characterized as presence of MTC, pheochromocytoma (in about 50% of patients) and parathyroid adenomas or hyperplasia (15-25% of patients). Recognition of syndrome MEN2B is more unequivocal because of characteristic clinical symptoms and characteristic *RET* mutations. In this syndrome, MTC develops the most quickly, even in young children. Characteristic symptom is the presence of mucosal neuromas and neurogangliomatosis of the distal gastrointestinal tract. Pheochromocytomas occur later and in the half of patients. Parathyroid adenomas are absent.

In this chapter actual state of knowledge about the molecular basis of hereditary form of MTC and its relation to localization of *RET* mutations and clinical disease status are presented. Diagnostic and therapeutic procedures in hereditary form of MTC and the way of proceeding in the case of *RET* mutation presence are discussed. Management in the case of hereditary form of MTC is presented also.

Key words: hereditary medullary thyroid carcinoma, *RET* protooncogene, syndrome MEN 2

Rak rdzeniasty tarczycy jest neuroendokrynnym nowotworem złośliwym, wywodzącym się z okołopęcherzykowych komórek C. W piśmiennictwie jego odkrycie wiąże się z nazwiskiem Hazarda (1). Należy jednak podkreślić, że pierwsze doniesienie opisujące ten typ raka zostało opublikowane wcześniej w piśmiennictwie polskim, w „Nowotworach” przez prof. Laskowskiego, który nazwał ten typ nowotworu „ca hyalinicum”.

Komórki C pochodzą z grzebienia nerwowego, w czasie rozwoju płodowego migrują z V kieszonki skrzelowej do tarczycy, gdzie produkują kalcytoninę. Kalcytonina jest hormonem peptydowym, ułatwiającym przejście wapnia z krwi do kości.

Rak rdzeniasty tarczycy (RRT) zlokalizowany jest najczęściej w środkowo-górnej części bocznych płatów tarczycy, gdzie nagromadzenie komórek okołopęcherzykowych jest największe. Komórki raka zwykle ułożone są w gniazda, oddzielone od siebie cienkimi warstwami włóknisto-naczyniowego zrębu, rzadziej tworzą belecзки, wysepki lub przyjmują utkanie lite. W otaczającym miększu tarczycy mogą być widoczne cechy hiperplazji komórek C. Cechą charakterystyczną, ale nie zawsze stwierdzaną, jest obecność amyloidu, dlatego rozpoznanie histopatologiczne raka rdzeniastego wymaga, obok klasycznego badania mikroskopowego, badania immunohistochemicznego, przede wszystkim zastosowania przeciwciał przeciw kalcytoninie. W ponad 90% przypadków obecność RRT wiąże się też ze znacznym wzrostem stężenia kalcytoniny (Ct) w surowicy krwi. Dlatego oznaczenie kalcytoniny we krwi u chorych z podejrzeniem RRT ułatwia jego rozpoznanie.

Rak rdzeniasty tarczycy szerzy się zarówno drogą chłonną, jak i krwionośną. Przerzuty do węzłów chłonnych stwierdza się w czasie rozpoznania w 50-75% przypadków, często obustronnie, z naciekami pozatorebkowymi. Rozsiew węzłowy dotyczy na ogół najpierw węzłów przedtchawicznych, a dopiero następnie bocznych szyi i nie zawsze można go uwidocznić w badaniu ultrasonograficznym. Stopień zajęcia węzłów chłonnych zwykle koreluje z wielkością ogniska pierwotnego. Drogą krwionośną powstają przerzuty do wątroby, płuc i kości.

W przypadku zaawansowanego miejscowo raka rdzeniastego tarczycy nacieki nowotworowy może szerzyć się przez ciągłość poza torebkę narządu, obejmując pęczki naczyniowo-nerwowe, mięśnie szyi, a także tchawicę i przełyk.

Pierwszym objawem RRT większości chorych jest guzek tarczycy, stopniowo powiększający się, o różnej dynamice wzrostu, najczęściej wolnej, z reguły bezbolesny. U kilku - kilkunastu procent chorych występuje biegunka, która czasem może być pierwszym objawem RRT i wiąże się z zaawansowaną postacią nowotworu, a spowodowana jest wydzielaniem przez guz czynnych biologicznie peptydów i amin. Przy znacznym zaawansowaniu miejscowym choroby pojawia się duszność, uczucie przeszkody przy połykaniu lub wręcz zaburzenia

połykania. Kaszel, powiększenie wątroby, bolesność samoistna i uciskowa kośćca, szybka utrata wagi ciała mogą towarzyszyć rozsianej postaci nowotworu. RRT należy do tych nowotworów, w których udział predyspozycji dziedzicznej jest stosunkowo wysoki i wynosi 20-25% wszystkich przypadków, a w populacjach objętych intensywnymi badaniami przesiewowymi wśród członków rodzin nawet ponad 30% przypadków (2, 3).

DZIEDZICZNY RAK RDZENIASTY TARCZYCY

Dziedzicznemu RRT mogą nie towarzyszyć żadne inne objawy i mówimy wówczas o rodzinnym raku rdzeniastym tarczycy (ang. *familial medullary thyroid carcinoma*, FMTC). Częściej jednak dziedziczny RRT jest objawem zespołu mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego typu 2 (ang. *multiple endocrine neoplasia type 2*, MEN 2)(tab. 1).

Zespół mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego typu 2 typu 2A (MEN 2A), zwany przedtem zespołem Sipple'a, charakteryzuje się skojarzeniem RRT z guzami chromochłonnymi nadnerczy (u około 50% chorych) i gruczolakami lub hiperplazją przytarczyc (u około 15- 25% chorych). RRT jest zwykle pierwszym objawem zespołu i ujawnia się na ogół w pierwszych dwu dekadach życia. Guzy chromochłonne nadnerczy na ogół ujawniają się później i rzadko są pierwszym objawem choroby. Najpóźniej dochodzi do ujawnienia nadczynności przytarczyc, dlatego też ocena jej występowania różni się w zależności od wieku chorych w badanej populacji.

Tab. 1. Dziedziczny rak rdzeniasty tarczycy: postaci kliniczne.

Objaw	FMTC	MEN 2A	MEN 2B
rak rdzeniasty tarczycy	> 95%	> 95%	> 95%
guz chromochłonny	-	~ 50%	~ 50%
nadczynność przytarczyc	-	15-60%	-
typowy wygląd twarzy, duża żuchwa, nerwiaki błon śluzowych, przerost zwojów przywspółczulnych błony śluzowej jelita grubego, da-	-	-	100%

jące objawy podobne do z. Hirschprunga			
--	--	--	--

W nietypowych postaciach zespołu MEN 2A towarzyszą mu także liszaj amyloidowy (ang. *cutaneous lichen amyloidosis*, CLA) lub choroba Hirschsprunga, są to jednak zespoły stosunkowo rzadkie (2).

Guzy chromochłonne nadnerczy charakteryzują się napadowym nadciśnieniem tętniczym, przebiegającym z tachykardią, może im towarzyszyć zblednięcie i nadmierne pocenie się. Nierozpoznany/nieleczony guz chromochłonny może być przyczyną nagłej śmierci i stanowi większe nawet zagrożenie dla życia chorego niż RRT, który w zespole MEN 2A może przebiegać mało agresywnie.

Nadczynność przytarczyc prowadzi do wzrostu poziomu wapnia w surowicy krwi, wywołanego nadmiarem parathormonu. Parahormon nasila resorpcję kostną, stąd wczesnym objawem jest osteoporoza; objawy resorpcji podokostnowej, czy guzy brunatne pojawiają się znacznie później. Do cech zaawansowanej nadczynności przytarczyc należą objawy kamicy nerkowej, może pojawić się choroba wrzodowa żołądka i zapalenie trzustki. Nieleczona nadczynność przytarczyc może doprowadzić do przełomu hiperkalcemicznego.

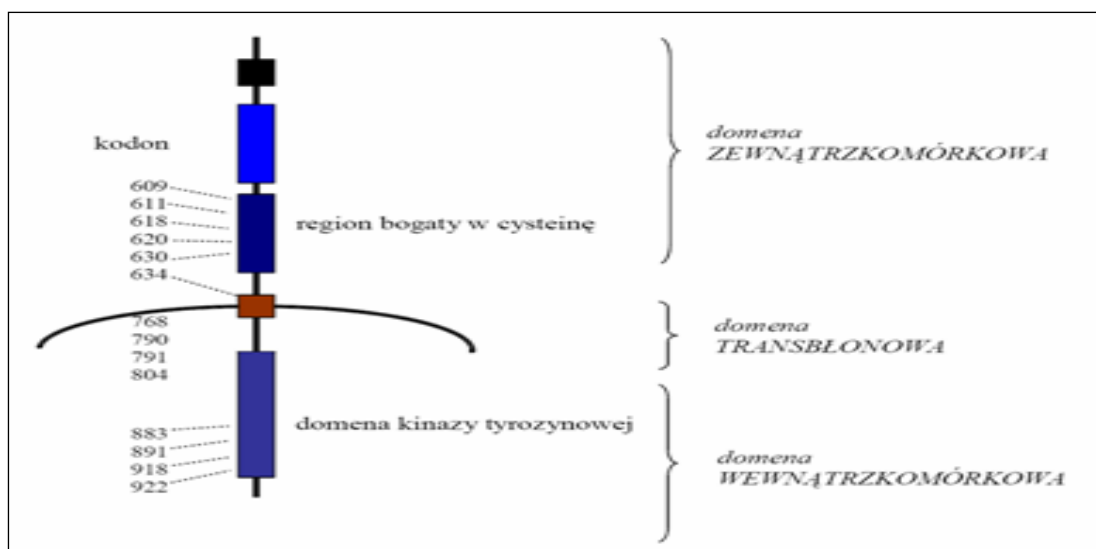
Ponieważ RRT ujawnia się najwcześniej, odróżnienie rodzinnego RRT od klasycznego zespołu MEN 2A wymaga dłuższej obserwacji, gdyż guzy chromochłonne mogą się ujawnić po latach i nigdy nie wystąpią u wszystkich członków rodziny, u których rozwinął się RRT. W piśmiennictwie przyjmuje się na ogół, że rozpoznanie prawdziwego raka rodzinnego jest pewne dopiero, kiedy w rodzinie są już co najmniej 4 przypadki RRT, którym nie towarzyszy ani guz chromochłonny tarczycy ani nadczynność przytarczyc. Jeżeli liczba chorych na RRT jest mniejsza od 4, mówimy o postaci niesklasyfikowanej, gdyż nawet test DNA nie pozwala na jednoznaczne różnicowanie w tym zakresie (patrz niżej).

Rozpoznanie zespołu MEN 2B jest daleko bardziej jednoznaczne, tak ze względu na charakterystyczny obraz kliniczny jak i charakterystyczne mutacje. W tym zespole RRT rozwija się najszybciej, jeszcze u małych dzieci. Guzy chromochłonne nadnerczy występują później i ujawniają się u około połowy chorych, natomiast nadczynność przytarczyc nie występuje. Cechy fenotypowe zespołu MEN 2B pozwalają doświadczonemu klinicyście na rozpoznanie już przy pierwszym kontakcie z chorym. Jego wygląd jest niezwykle charakterystyczny, z podłużną wąską twarzą, dużą żuchwą i bardzo wydatnymi ustami. Stwierdzenie licznych drobnych nerwiaków na brzegach języka i śluzówce jamy ustnej jest bardzo swoistą cechą w badaniu fizykalnym. U części chorych zaznaczają się też marfanoidalne cechy budowy ciała.

Dziedziczny charakter części przypadków RRT był znany już od lat sześćdziesiątych XX wieku. Dla wczesnego wykrywania raka wśród członków rodziny chorego stosowano oznaczenie kalcytoniny po podaniu pentagastryny (4). Badania takie przeprowadzano co roku wśród wszystkich członków rodziny do czasu osiągnięcia przez nich czterdziestego roku życia. Dla uniknięcia wyników fałszywie dodatnich (pentagastryna może stymulować wzrost wydzielania kalcytoniny także u zdrowych osób, szczególnie u młodych mężczyzn) jako patognomoniczny dla dziedzicznego RRT traktowano wzrost kalcytoniny powyżej 100 pg/ml. W chwili obecnej znacznie częściej stosuje się próbe wapniową polegającą na podaniu wapnia zamiast pentagastryny. Oznaczenie stężenia kalcytoniny niekiedy umożliwiło dobrą charakterystykę predyspozycji genetycznej wśród członków rodziny, ułatwiło więc badanie sprzężenia między występowaniem RRT i markerami genetycznymi.

PROTOONKOGEN RET I RAK RDZENIASTY TARCZYCY

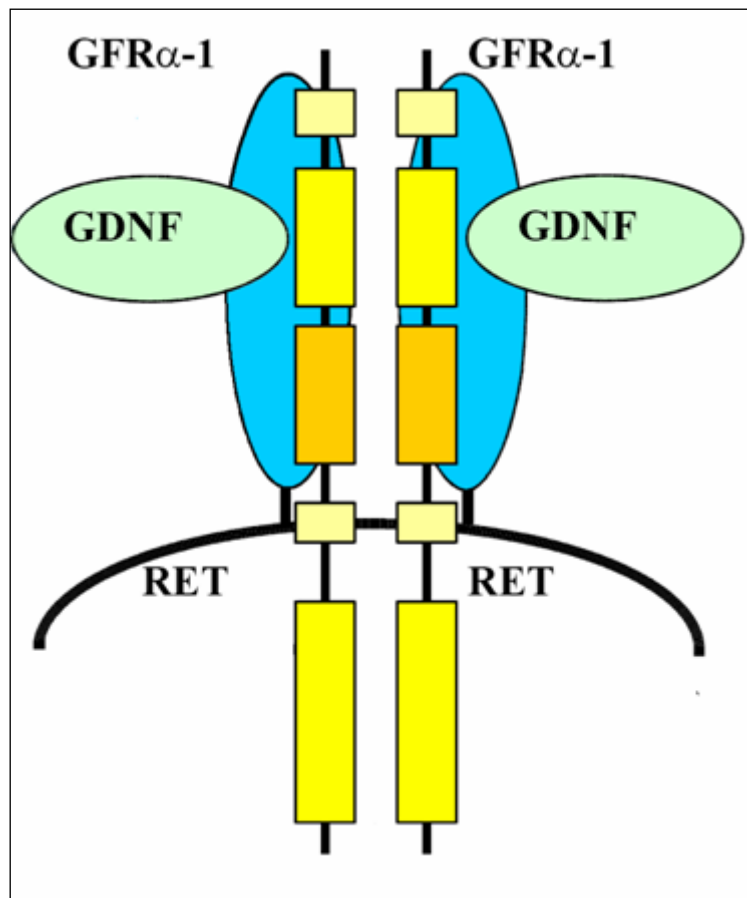
W 1987 roku zlokalizowano gen odpowiedzialny za dziedziczne postaci RRT w centromerowym regionie chromosomu 10. W 1993 zidentyfikowano go jako protoonkogen *RET* oraz opisano mutacje odpowiedzialne za zespół MEN 2A, FMTC i zespół MEN 2B (5, 6, 7). Protoonkogen *RET* koduje błonową receptorową kinazę tyrozynową. W części zewnątrzkomórkowej tego białka błonowego znajduje się region podobny do kadheryny oraz zlokalizowany blisko błony komórkowej region bogaty w cysteinę (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat budowy receptorowej kinazy tyrozynowej RET wraz z lokalizacją kodonów podlegających mutacjom aktywującym.

Krótką część przezbłonową utrzymuje białko w błonie komórkowej, a w części wewnątrzcytoplazmatycznej znajduje się domena, a właściwie dwie blisko położone domeny o aktywności kinazy tyrozynowej. Budowa białka ściśle nawiązuje do budowy innych receptorów dla czynników wzrostowych (np. EGF), które są *de facto* receptorowymi kinazami ty-

rozynowymi. Ligandem odpowiedzialnym za przekazywanie sygnału wzrostowego poprzez białko RET jest niewielki neuropeptyd, glijopochodny czynnik neurotropowy (ang. *glial cell-derived neurotrophic factor*, GDNF). Peptyd ten nie łączy się bezpośrednio z białkiem RET, a z innym białkiem błonowym, zwanym receptorem α dla GDNF (obecnie GFR α -1), pełniącym funkcję koreceptora dla RET (ryc. 2). Następstwem aktywacji receptora jest jego autofosforylacja, uruchamiająca kaskadę kinaz MAP i transkrypcję genów uczestniczących w proliferacji komórkowej.



Ryc. 2. Fizjologiczna aktywacja kinazy tyrozynowej RET.

Mutacje protoonkogeny *RET*, prowadzące do rozwoju RRT, mają charakter mutacji aktywujących funkcję produktu białkowego (2). Protoonkogen *RET* składa się z 21 eksonów. Mutacje występują jednak zaledwie w kilku z nich i w przeważającej większości mają charakter mutacji punktowych (na rycinie 1 pokazano ich lokalizację w odniesieniu do kodowanego białka). Najczęściej dotyczą one kodonów kodujących cysteiny w części zewnątrz błonowej receptora, blisko błony komórkowej. W przeważającej liczbie (w 75-80% wszystkich przypadków dziedzicznego RRT) ulega mutacji kodon 634, zlokalizowany w eksonie 11, wchodzącym już w skład części przez błonową (tab. 2). Większość mutacji w tym kodonie (ponad

90%) stanowią mutacje, których następstwem jest zamiana cysteiny na argininę, tyrozyne lub tryptofan (8, 9, 10).

Klasyczny zespół MEN 2A jest najbardziej prawdopodobny, jeżeli mamy do czynienia z germinalną mutacją RET w kodonie 634, podczas gdy inne mutacje wiążą się ze znacznie mniejszym prawdopodobieństwem rozwoju guza chromochłonnego - najczęściej w jej wyniku rozwija się zespół rodzinnego RRT bez innych endokrynopatii (tab. 2).

Tab. 2. Lokalizacja mutacji protoonkogenu *RET* powodujących dziedzicznego raka rdzeniastego tarczycy (11).

Kodon/Ekson /zapis	Zespół	Częstość występowania (500)	Częstość występowania (%)
609/10 /c.1825T>A/C/G	MEN 2A/FMTC MEN 2A/ch. Hirschsprunga	8	1,6%
611/10 /c.1831T>A/C/G	MEN 2A/FMTC	8	1,6%
618/10 /c.1852T>A/C/G	FMTC/MEN 2A MEN 2A/ch. Hirschsprunga	32	6,4%
620/10/ c.1853G>A/C/T	FMTC/MEN 2A MEN 2A/ch. Hirschsprunga	35	7,0%
630/11 /c.1888T>C	MEN 2A/FMTC	5	1,
634/11 /c.1900T>A/C/G /c.1901G>A/C/T	MEN 2A MEN 2A/CLA	171	34,2%
635/11 / c.1903C>T	MEN 2A	rzadko	nie badano
649/11 / c.1946C>T	FMTC	rzadko	nie badano
768/13 / c.2304G>C/T	FMTC	13	2,6%
790/13/ c.2370G>C/T	FMTC/MEN 2A	38	7,6%
791/13 /c.2372A>T	FMTC	16	3,2%
804/13 / c.2410G>A/C/T	MEN 2A/FMTC	86	17,2%
883/15 /c.2647_2648 delTT	MEN 2B	rzadko	Nie badano
891/15 / c.2673G>A	FMTC	36	7,2
918/16 /c.2753T>C	MEN 2B	52	10,4%

Mutacje w kodonie 918 (ekson 16) dotyczą domeny kinazy tyrozynowej. Ponieważ fosforylacji ulegają nieco inne białka komórkowe, fenotyp zespołu MEN 2B różni się od fenotypu zespołu MEN 2A. Nadmierna aktywacja RET uwidacznia się także w nerwach obwodowych (nerwiaki języka i błony śluzowej jamy ustnej i warg, hyperganglioneza jelita grubego), rak rdzeniasty ujawnia się wcześniej i ma bardziej agresywny przebieg, nie dochodzi natomiast do hiperplazji przytarczyc (12, 13).

Mutacje w kodonach 768, 790, 791, 804 i 891 dotyczą także części wewnątrzkomórkowej białka RET (14, 15, 16, 17), występują rzadko (w Polsce za wyjątkiem 791), a ich potencjał transformujący jest niewielki - poza mutacją w kodonie 790, którą wykazano tak w FMTC jak i MEN 2A (14), prowadzą głównie do rozwoju rodzinnego RRT, który może ujawnić się stosunkowo późno - często dopiero w czwartej - piątej dekadzie życia. W odniesieniu do mutacji w kodonie 791 podnoszone są przypuszczenia, że jej penetracja może być niepełna. Pozostałe mutacje genu *RET* charakteryzują się prawie pełną penetracją - stwierdzenie mutacji germinalnej jest więc równoznaczne z ponad 90% pewnością rozwoju RRT. W rodzinach z mutacją RET 791 istnieje duża zmienność ryzyka i co najmniej w niektórych z nich stosunkowo wcześnie ujawnia się pełnoobjawowy RRT.

ZALEŻNOŚĆ GENOTYP-FENOTYP W POSTACI DZIEDZICZNEJ RAKA RDZENIASTEGO TARCZYCY

W dziedzicznym RRT da się wyraźnie wyodrębnić zależność między lokalizacją mutacji punktowej *RET* i obrazem klinicznym choroby.

Z genetycznego punktu widzenia, zespół MEN 2A i rodzinny RRT są do siebie zbliżone i dzisiaj raczej traktuje się te zespoły łącznie - rodzinny RRT jest jedną z postaci zespołu MEN 2A. Zespół MEN 2B wydziela się osobno, tak ze względu na typowe mutacje jak i typowy fenotyp. Prawdopodobieństwo wystąpienia typowego zespołu MEN 2A silnie zależy od lokalizacji mutacji - jest bardzo wysokie, jeżeli mutacja dotyczy kodonu 634 (przy czym pełen zespół, z nadczynnością przytarczyc, występuje szczególnie często przy podstawieniu cysteiny arginina), niższe w eksonie 10, a bardzo niskie przy mutacji w eksonie 13 i 15 (tab. 2) (18).

TESTY DNA

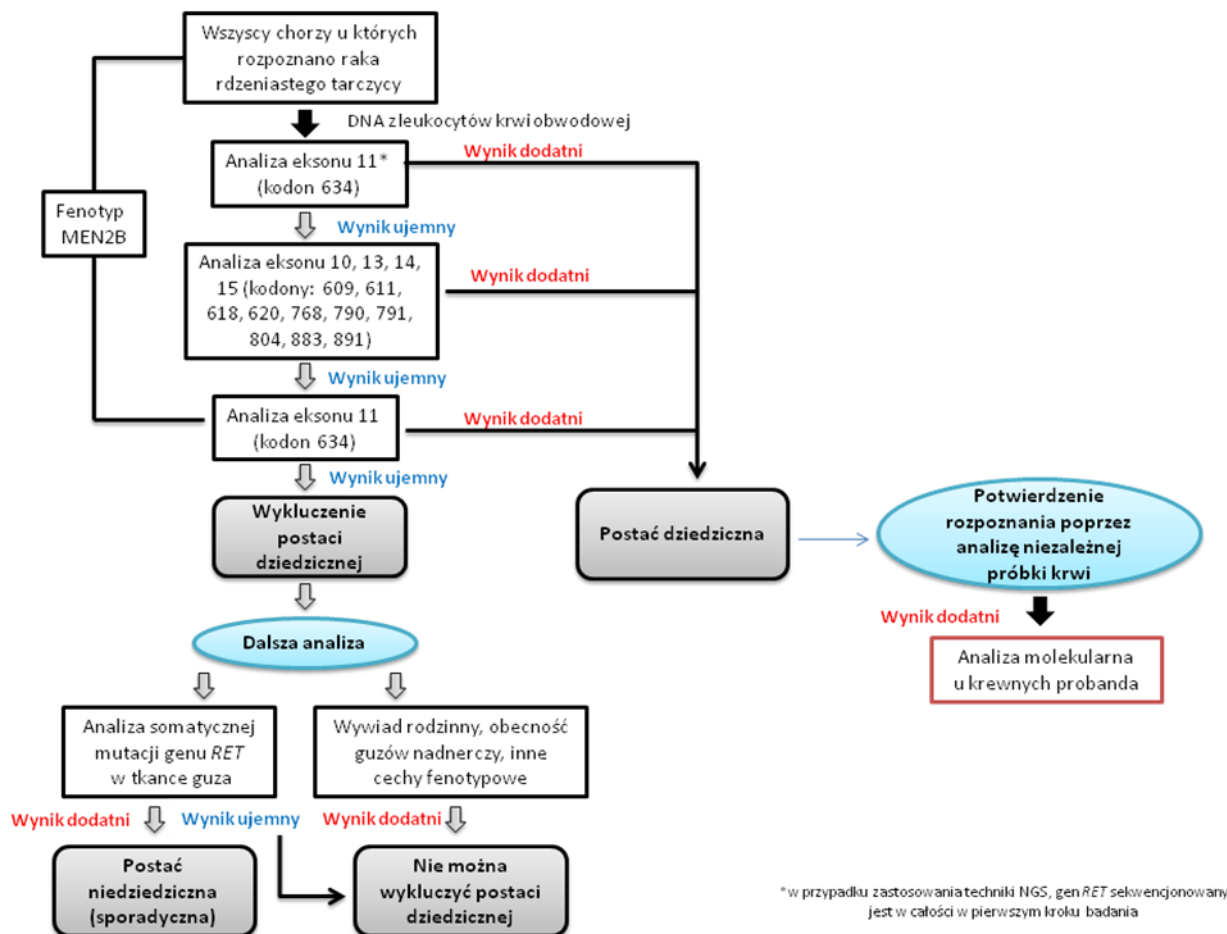
Ponieważ rak dziedziczny stanowi znaczącą część wszystkich przypadków RRT i może klinicznie nie odróżniać się od raka nie-dziedzicznego, pełne badanie DNA w kierunku obecności mutacji germinalnych musi być przeprowadzone u wszystkich chorych,

u których postawiono takie rozpoznanie. Nawet, jeżeli u chorego nie występują inne cechy zespołu MEN 2 i wywiad rodzinny jest ujemny, ryzyko wykrycia mutacji germlinalnej wynosi w naszej populacji około 10% (3). Na rycinie 3 przedstawiono algorytm poszukiwania mutacji w protoonkogenie *RET* (19, 20). Standardową techniką stosowaną nadal do analizy mutacji genu *RET* jest sekwencjonowanie metodą Sanger'a wymagające sekwencjonowania każdego badanego eksonu osobno. Jednakże w chwili obecnej coraz większy dostęp do aparatów umożliwiających sekwencjonowanie nowej generacji (*ang. Next Generation Sequencing*) pozwala na sekwencjonowanie całego genu jednocześnie. Kolejność badania kodonów protoonkogeny *RET* jest podyktowana częstością mutacji, zaczyna się więc od badania w kierunku mutacji w kodonie 634.. Niemniej, ujemny wynik tego badania nie upoważnia do rezygnacji z badania w kierunku pozostałych znanych mutacji, gdyż blisko połowa nowo wykrytych przypadków raka dziedzicznego dotyczy mutacji w eksonach 13-15. Z tego samego powodu nie należy rezygnować z badania DNA przy rozpoznaniu RRT u osób starszych - jak już wspomniano, niektóre mutacje charakteryzują się wyraźnie późniejszym ujawnieniem RRT.

. Badanie w kierunku mutacji w kodonie 918 wykonuje się na ogół na podstawie informacji o fenotypie, chociaż w części przypadków cechy fenotypowe zespołu MEN 2B mogą być słabo zaznaczone i dopiero badanie DNA pozwala na postawienia prawidłowego rozpoznania. Należy podkreślić, że niewielki rozmiar genu i ograniczona liczba charakterystycznych mutacji są czynnikami ułatwiającymi badanie DNA metodą Sanger'a. W naszym kraju badanie to przeprowadza kilka ośrodków¹. Zidentyfikowanie mutacji germlinalnej u chorego na RRT niesie istotne korzyści dla chorego i jego rodziny. U samego chorego pozwala określić ryzyko wystąpienia guza chromochłonnego nadnercza i nadczynności przytarczyc, determinuje więc częstość badań przesiewowych w tym kierunku. Jednocześnie, wykazanie predyspozycji dziedzicznej u chorego stanowi bezwzględne wskazanie do wdrożenia badań DNA u członków jego rodziny. Ryzyko wykrycia mutacji wśród krewnych pierwszego stopnia wynosi 50%. Nasze badania wskazują, że wykrywa się wówczas średnio co najmniej 1 nosiciela mutacji na każdy nowo wykryty przypadek dziedzicznego RRT (3, 21). Prawdopodobieństwo wczesnego wykrycia raka u nosiciela mutacji zmienia się w zależności od typu mutacji i wieku członków rodziny - u części badanych mamy już do czynienia z wykrywalnym klinicznie rakiem tarczycy, u innych stwierdzamy wzrost stężenia kalcytoniny albo w badaniu podstawowym albo po stymulacji pentagastryną, ale jeszcze bez widocznego w USG tarczycy guz-

¹ Instytut Onkologii w Gliwicach wykonuje badania DNA u każdego chorego z rakiem rdzeniastym tarczycy, można więc kierować pacjentów z terenu całego kraju (tel. 032 278 93 01).

ka. Przy wczesnym wdrożeniu badań możliwe jest wykrycie nosicielstwa w stadium w pełni bezobjawowym.



Ryc. 3. Algorytm diagnostyki DNA u chorych na raka rdzeniastego tarczycy.

Równie istotny jest negatywny wynik badania w kierunku mutacji germlinalnej. Pozwala on wyłączyć danego członka rodziny z dalszych badań kontrolnych, jeżeli nie stwierdza się mutacji charakterystycznej dla danej rodziny. Natomiast negatywny wynik badania DNA, wykonywanego po rozpoznaniu raka rdzeniastego dla wykrycia postaci dziedzicznej, ma wartość predykcyjną około 90% (2). Istnieją bowiem rodziny (szczególnie dotyczy to rodzinnego RRT), u których pomimo kilku przypadków raka rdzeniastego nie udało się znaleźć mutacji germlinalnej. Jeżeli więc wywiad rodzinny lub osobniczy jest dodatni, a test DNA jest ujemny, jedynym wyjściem jest kontynuacja corocznych testów prowokacyjnych (wapniowy lub pentagastrynowy) u całej rodziny (22). Według rekomendacji American Thyroid Association, diagnostyka genetyczna protoonkogenu *RET* powinna również dotyczyć eksonu 8. Mutacje w tym eksonie są częste u pacjentów pochodzących z Grecji i Brazylii. Wykonane badania prze-

siewowe przeprowadzone w populacji polskiej nie wykazały obecności tej mutacji i nie jest ona standardowo oceniana u pacjentów z RRT w Polsce (za wyjątkiem zastosowania metod typu NGS, analizujących pełną sekwencję genu).

BADANIA BIOCHEMICZNE STOSOWANE W ROZPOZNANIU I MONITOROWANIU RAKA RDZENIASTEGO TARCZYCY I ZESPOŁU MEN 2

Komórki RRT wydzielają na ogół duże ilości kalcytoniny. Jej oznaczanie daje możliwość przedoperacyjnej detekcji raka, a ponadto jest dobrym narzędziem oceny skuteczności zastosowanego leczenia i monitorowania dalszego przebiegu choroby (23, 24, 25). Obecnie rutynowe wykonywanie testów prowokacyjnych (test wapniowy, wcześniej pentagastrynowy) u członków rodziny chorego nie jest potrzebne, skoro postać dziedziczną można zidentyfikować badaniem DNA. Oznaczanie kalcytoniny powinno odbywać się w wyspecjalizowanej pracowni, dobre testy mają zakres normy do dziesięciu-kilkunastu pg/ml. Oznaczanie stężenia kalcytoniny jest niezbędnym elementem oceny skuteczności zastosowanego leczenia w raku rdzeniastym tarczycy. Normalizacja podwyższonego przedoperacyjnego stężenia hormonu do wartości prawidłowych po przebytej operacji potwierdza jej radykalność. Utrzymywanie się wartości nieprawidłowych, pomimo makroskopowej i mikroskopowej radykalności zabiegu, przemawia za obecnością mikroognisk raka w węzłach chłonnych szyjnych lub w wątrobie.

Niskie stężenie hormonu (poniżej 10-12 pg/ml) w badaniach kontrolnych, wykonywanych co 3 miesiące, przemawia za całkowitą regresją guza. Konieczne jest jednak wykonanie raz do roku próby prowokacyjnej. Stosuje się w tym celu dożylne podanie wapnia, pentagastryny czy doustnie omeprazolu, przy czym próba wapniowa jest stosowana najczęściej. Oznaczenie stężenia kalcytoniny przeprowadza się w próbkach pobranych w 2, 5 i 10 minut po podaniu wapnia (0,5 µg/kg masy ciała). Wzrost stężenia kalcytoniny powyżej 30 pg/ml sugeruje obecność komórek nowotworowych.

Wysokie stężenie kalcytoniny jest wskazaniem do badań obrazowych dla lokalizacji ogniska nowotworowego. Jeżeli ich wynik jest ujemny, można rozważyć cewnikowanie żył szyjnych i wątrobowych. Wzrost stężenia kalcytoniny w określonej próbce po podaniu pentagastryny pozwala zlokalizować wznowę lub przerzut w dorzeczu żyły, z której pobrano próbkę.

Stosunkowo rzadko obserwuje się prawidłowe stężenie kalcytoniny u chorych z jawnym klinicznie rakiem rdzeniastym. U części chorych może on wynikać z niskiego stopnia zróżnicowania nowotworu i utraty czynności hormonalnej. Należy też pamiętać, że wysokie stężenia antygenu (w tym przypadku kalcytoniny) może hamować jego wiązanie

z przeciwciałem, używanym w teście radioimmunologicznym, przez co uzyskuje się wynik fałszywie ujemny (tzw. „hook effect”). Aby wykryć to zjawisko, wystarczy oznaczyć surowicę po rozcieńczeniu. Rozcieńczenie surowicy jest zresztą konieczne bardzo często, gdyż stężenia kalcytoniny obserwowane u chorych na raka rdzeniastego tarczycy mogą 10-1000 razy przekraczać zakres stężeń oznaczalnych w dostępnych testach immunometrycznych. Nie mniej najważniejsze testy oparte są na „hook effect” i niewymaganych rozcieńczeniach.

Inne markery nowotworowe mają w raku rdzeniastym tarczycy mniejsze znaczenie, najczęściej stosuje się badanie CEA. Wzrost CEA przemawia za znacznym zaawansowaniem choroby.

Biochemiczne rozpoznanie guza chromochłonnego wymaga oznaczania katecholamin i ich metoksy pochodnych w dobowej zbiorce moczu lub we krwi (26).

Rozpoznanie nadczynności przytarczyc wymaga oznaczenia wapnia zjonizowanego i fosforu w surowicy krwi oraz oznaczenia parathormonu metodą immunoradiometryczną, pozwalającą na swoisty pomiar stężenia natywnej cząsteczki PTH.

BADANIA OBRAZOWE

Oprócz klasycznych badań radiologicznych, bardzo pomocnych dla rozpoznania RRT i guza chromochłonnego, w obrazowaniu RRT stosuje się scyntyografię dedykowanymi znacznikami, do których należą, ^{131}I -mIBG lub ^{123}I -mIBG, przeciwciała monoklonalne przeciw CEA lub kalcytoninie oraz analogi somatostatyny. W ostatnich latach coraz większe znaczenie dla lokalizacji ognisk nowotworowych ma scyntygrafia ^{18}F -DG-PET lub ^{18}F -DOPA PET. Niemniej, także tu istnieje problem granicznej masy guza, poniżej której nie daje się zlokalizować ogniska mimo podwyższonego stężenia Ct. Kalcytonina jest bardzo czułym markerem rozsiewu raka tarczycy i sygnalizuje obecność niewielkich ognisk, które nie mogą być wykryte jeszcze w żadnym badaniu obrazowym. Przydatny klinicznie jest próg stężenia kalcytoniny >500 pg/ml. Poniżej tego progu nie warto wdrażać badań obrazowych gdyż przy niewielkiej masie guza ich czułość i rozdzielczość jest niewystarczająca.

W nadczynności przytarczyc stosuje się badanie USG i scyntyografię $^{99\text{mTc}}$ -MIBI. Te badania są dość skuteczne w lokalizowaniu gruczolaków, mniej przydatne w diagnostyce rozrostu przytarczyc, który jest częstą przyczyną nadczynności przytarczyc w MEN 2A.

LECZENIE DZIEDZICZNEGO RAKA RDZENIASTEGO TARCZYCY

Leczenie jawnego dziedzicznego RRT nie odbiega zasadniczo od leczenia postaci niedziedzicznej, trzeba jednak uwzględnić kilka elementów charakterystycznych dla postaci

dziedzicznej (11). Najistotniejsze z nich obejmują konieczność wykluczenia obecności guza chromochłonnego przed podjęciem operacji tarczycy i szersze wskazania do elektywnej limfadenektomii (to znaczy wykonywanej planowo, niezależnie od tego czy obserwuje się cechy przerzutów do węzłów chłonnych czy też nie stwierdza się ich powiększenia).

Polskie rekomendacje leczenia operacyjnego dziedzicznego raka rdzeniastego tarczycy zostały opracowane w roku 1995 i zmodyfikowane w 2000 i 2006 (26), oraz w 2010 i 2016 (28, 29) rekomendacje leczenia guzów chromochłonnych nadnerczy ukazały się w roku 2006 (30).

Leczenie operacyjne

Radykalna operacja jest leczeniem z wyboru w raku rdzeniastym tarczycy.

Minimalny zakres operacji powinno obejmować całkowite wycięcie gruczołu tarczowego wraz z wycięciem centralnych węzłów chłonnych szyi. Wielu autorów uważa, że rutynowo należy usuwać także węzły boczne szyi, a mniej rozległa operacja węzłowa może być przeprowadzona tylko u młodych pacjentów (12). Wieloogniskowy wzrost nowotworu w postaci dziedzicznej oraz wysokie ryzyko przerzutów do węzłów chłonnych szyi oraz towarzyszące wysokie stężenie kalcytoniny uzasadniają wskazania do elektywnej limfadenektomii, znacznie szersze, niż w raku zróżnicowanym.

Przynajmniej u 50% chorych w chwili rozpoznania choroby występują już przerzuty do węzłów chłonnych. Usuwanie węzłów chłonnych śródpiersia górnego z dostępu szyjnego jest też zalecane u chorych, u których stwierdza się przerzuty w węzłach środkowych szyi. Niemniej, w ostatnich latach zaleca się raczej indywidualizację leczenia w zależności od lokalizacji mutacji, wieku chorego i stężenia kalcytoniny (322, 31).

W leczeniu operacyjnym guza chromochłonnego nadnerczy stosuje się adrenalektomię. Z wyboru stosuje się operacje laparoskopowe z subtotalną resekcją nadnercza. Zasadniczą rolę w przygotowaniu chorego do operacji odgrywa co najmniej dwutygodniowe leczenie antagonistami receptora α -adrenergicznego (26).

Leczenie operacyjne nadczynności przytarczyc jest również leczeniem z wyboru. Ponieważ u większości chorych dochodzi do rozrostu wszystkich przytarczyc, konieczna jest subtotalna paratyreoidektomia (usunięcie 3 i 1/2 przytarczyc). Nawroty są jednak częste i dlatego ostatnio rozważa się leczenie farmakologiczne bifosfonianami lub kalcymimetykami, podejmując decyzję o leczeniu operacyjnym tylko w razie ich nieskuteczności.

Radioterapia

Korzyści pooperacyjnej radioterapii uzupełniającej RRT nie zostały jednoznacznie udowodnione i dlatego nie jest ona stosowana rutynowo.

Chemioterapia

W RRT nie uzyskano zadowalających efektów po leczeniu zarówno chemioterapią monolekową, jak i schematami wielolekowymi.

Terapia inhibitorami kinaz tyrozynowych

Dla raka rdzeniastego tarczycy istnieje kilka badań II/III fazy dla oceny skuteczności swoistych inhibitorów kinaz tyrozynowych, hamujących receptor VEGF i receptor RET dokumentuje skuteczność tych leków w leczeniu progresywnego, zaawansowanego raka tarczycy. Dla leczenia raka rdzeniastego zostały zarejestrowane w Europie wanedanib i kabozantinib (32). Polskie rekomendacje zalecają jednak w pierwszym rzędzie leczenie w ramach badań klinicznych (29).

Terapia 131I-mIBG

W RRT nie ma wskazań do leczenia izotopem jodu 131I, stosowanonamiast znakowaną jodem 131I metajodobenzyloguanidynę (131I-mIBG). Ten sam radiofarmaceutyk może być stosowany w leczeniu nieoperacyjnych guzów chromochłonnych nadnerczy. Niemniej, wobec alternatywy stawianej przez rejestrację TKI, leczenie 131mIBG nie znajduje obecnie zastosowania.

POSTĘPOWANIE W RAZIE WYKRYCIA NOSICIELSTWA MUTACJI PROTOONKOGENU *RET*

Wraz z rozwojem diagnostyki molekularnej pojawia się pytanie - jakie konsekwencje terapeutyczne winny wiązać się z wykryciem nosicielstwa mutacji u zdrowych członków rodziny. Obowiązujące obecnie zasady badania i wskazania do dalszego postępowania w RRT zawiera tabela 3.

Tab. 3. Zasady postępowania u członków rodziny chorego na dziedzicznego raka rdzeniastego tarczycy.

	FMTC	MEN 2A	MEN 2B
badanie DNA	jak najszybciej po wykryciu mutacji u chorego członka rodziny, optymalnie:		
	do 6 roku życia	2-3 rok życia	zaraz po urodzeniu
badanie podstawowego stężenia kalcytoniny	u wszystkich członków rodziny, szczególnie krewnych I° równolegle do badania DNA		

próba wapniowa	u tych nieoperowanych nosicieli mutacji, u których podstawowe stężenie kalcytoniny jest prawidłowe; potem co rok u tych nosicieli, którzy nie zdecydowali się na operację profilaktyczną		
badanie USG tarczycy	pierwszy raz po wykryciu nosicielstwa mutacji, potem co rok		
profilaktyczna tyreoidektomia	5-6 rok życia*	5-6 rok życia	do 1 roku życia
badanie metoksykatecholamin w dobowej zbiórce moczu	niepotrzebne u nosicieli mutacji w kodonach 768 i 891, a przy innych mutacjach w tych rodzinach, w których jest co najmniej 4 członków rodziny z RRT i nie ma żadnego przypadku guza chromochłonnego nadnerczy	w 5 roku życia, potem od 10 roku życia co rok	w 2 roku życia, potem co rok
badanie TK nadnerczy	niepotrzebne u nosicieli mutacji w kodonach 768 i 891, a w innych mutacjach w tych rodzinach, w których jest co najmniej 4 członków rodziny z RRT i nie ma żadnego przypadku guza chromochłonnego nadnerczy	pierwszy raz w 10 roku życia, potem co 2-3 lata	pierwszy raz w 5 roku życia, od 10 r.ż. co rok

badanie stężenia wapnia zjonizowanego i fosforu oraz PTH	niepotrzebne	między 20-30 rokiem życia co 2 lata, potem co rok	niepotrzebne
* Rekomendacje Towarzystwa Naukowego American Thyroid Association podają, że w przypadku dzieci będących nosicielami mutacji w kodonach określanych jako umiarkowanie agresywne (klasa MODERATE) (609, 611, 618, 620, 630, 768, 790, 791, 804, 891) profilaktyczne wycięcie tarczycy może nastąpić po zaobserwowaniu wzrostu poziomu kalcytoniny (22)			

Dziedziczny RRT stanowi przykład dziedzicznego nowotworu, w którym sprawdzilo się stosowanie operacji profilaktycznych. Pierwsze doniesienia o profilaktycznych tyreoidektomiach pojawiły się w 1995 roku. Wells i wsp. opisali wówczas 5 członków rodzin z zespołem MEN 2A, u których wykryto mutacje protoonkogenu *RET* i w konsekwencji przeprowadzono całkowite wycięcie tarczycy, mimo, że podstawowe i stymulowane pentagastryną stężenie kalcytoniny było prawidłowe. W analogicznej sytuacji Pacini i wsp. wykazali u dwóch operowanych nosicieli mnogie mikroogniska raka. W dyskusji opublikowanej w *Surgery* już wówczas, w 1995 roku, podkreślano, że pytanie o profilaktyczną tyreoidektomię w dziedzicznym RRT nie brzmi „Czy operować?”, ale raczej „Kiedy operować?” (33).

Analiza opublikowanych prac dotyczących profilaktycznych tyreoidektomii wykazuje, że u nosiciela mutacji w eksonie 10 lub 11 przy ujemnej próbie prowokacyjnej ryzyko wykrycia mikroogniska raka wynosi około 35-40%. W około 55% stwierdza się wówczas hiperplazję komórek C, a zaledwie 10% tarczyc opisano jako prawidłowe. Przy dodatknej próbie pentagastrynowej aż w 85% przypadków wykryto mikroogniska raka (34-36).

Także własne wyniki w pełni odpowiadają tej analizie, skoro u wszystkich operowanych przez nas dzieci stwierdzaliśmy nadmierną proliferację komórek C. U trojga dzieci uchwyciliśmy moment konwersji próby pentagastrynowej, do której doszło między 7 a 12 rokiem życia (21). Hiperplazja komórek C, stwierdzana mikroskopowo, jest zjawiskiem wcześniejszym niż konwersja próby pentagastrynowej - potrzebne jest osiągnięcie pewnej „masy krytycznej” komórek C, zanim ich rozrost ujawni się nadmiernym wydzielaniem kalcytoniny, nawet po silnym bodźcu stymulacyjnym.

Te wyniki podsumował Włoch J w swojej pracy habilitacyjnej (30). Przedstawiając zalety profilaktycznej operacji należy stwierdzić, że w razie wykrycia mutacji prawdopodobnie

bieństwo wystąpienia choroby nowotworowej do 35-40 roku życia przekracza 95%. U większości nosicieli rak rozwinie się w 10-15 roku życia, ale możliwy jest także jego wcześniejszy rozwój. Co więcej, z piśmiennictwa wynika, że operacja wykonana w momencie, kiedy próba prowokacyjna jest od dłuższego czasu dodatnia lub wręcz obserwuje się zwiększone podstawowe stężenie kalcytoniny, obciążona jest około 50% ryzykiem nieskuteczności - mimo radykalnej makroskopowo operacji, stężenie kalcytoniny pozostaje po operacji nieprawidłowe. Przyczyna niepowodzeń leży w wieloogniskowym wzroście raka i szybkim przerzutowaniu do niepowiększonych węzłów chłonnych. Skoro dobre wyniki leczenia (ponad 90% wyleczeń) można osiągnąć tylko we wczesnym stadium choroby, a ryzyko powikłań pooperacyjnych w wyspecjalizowanych ośrodkach nie przekracza 2%, można w tych ośrodkach polecać profilaktyczne całkowite wycięcie tarczycy, tym bardziej, że leczenie substytucyjne tyroksyną, konieczne po operacji, może być dobrze monitorowane i w pełni zapewnia eutyreozę. Uważne kontrolowanie stężeń TSH i fT4 gwarantuje prawidłowy rozwój dziecka, dlatego też obawa przed niedoczynnością tarczycy i jej konsekwencjami nie powinna być przyczyną dla odkładania operacji.

Przeciwnicy profilaktycznej tyreoidektomii argumentują, że możliwość wcześniejszego wykrycia raka rdzeniastego poprzez powtarzanie oznaczeń poziomu kalcytoniny w próbie pentagastrynowej pozwala na dokonanie operacji we wczesnej fazie choroby, a więc obniża ryzyko operacji niepotrzebnej. W świetle własnego doświadczenia, w którym hiperplazja komórek C tarczycy była obecna u wszystkich chorych, nawet przy prawidłowych wartościach próby prowokacyjnej, i w świetle danych z piśmiennictwa, takie postępowanie wydaje się niepotrzebnym zwiększeniem ryzyka rozwoju raka, tym bardziej, że ewentualny zysk wynikający z opóźnienia operacji jest nieduży przy znaczącym ryzyku przeoczenia progresji choroby nowotworowej.

Dralle i wsp. podkreślają, że profilaktyczna tyreoidektomia powinna obejmować również wycięcie centralnego układu chłonnego szyi, jeżeli stężenie kalcytoniny jest nieprawidłowe lub jeżeli pacjent jest starszy niż 10 lat. Obustronna limfadenektomia szyjna powinna być przeprowadzona w przypadku podejrzenia przerzutów do węzłów chłonnych lub wykazania podwyższonego stężenia kalcytoniny u chorych starszych niż 15 lat (34, 35).

Odrębna kwestia to zagadnienie trwałych powikłań po operacji profilaktycznego całkowitego wycięcia tarczycy. Większość autorów widzi je rzadko, duża analiza Dralle'a oceniła ryzyko wywołania niedoczynności przytarczyc na 6,7%, a ryzyko jednostronnego uszkodzenia nerwu krtaniowego wstecznego na 1,3%, przy czym nie zależało ono od wieku operowanych dzieci.

Ostatecznym kryterium, które powinno przemawiać za profilaktyczną tyreoidektomią jest zwiększenie zysku terapeutycznego - wzrost odsetka wyleczeń bez zwiększenia ryzyka powikłań. Ze względu na fakt, że operacje profilaktyczne wynikające ze wskazań uzyskanych z analizy genetycznej są przeprowadzane dopiero od 1994 roku, w piśmiennictwie nie ma jeszcze pełnej oceny tego zagadnienia, niemniej w ogromnej większości przypadków, w tym także w doświadczeniu Instytutu Onkologii w Gliwicach, uzyskano normalizację pooperacyjnego stężenia kalcytoniny (30). Nie opisano dotąd w piśmiennictwie ani jednego przypadku nawrotu hiperkalcytoninemii po profilaktycznej tyreoidektomii, chociaż teoretycznie jest to oczywiście możliwe, choćby ze względu na obecność komórek C w grasicy. Ze względu na krótki czas obserwacji nie wiadomo, jak będzie przebiegał rozwój guzów chromochłonnych u chorych operowanych profilaktycznie. W chwili obecnej nie ma też wskazań do profilaktycznej operacji nadnerczy.

PODSUMOWANIE

Pamiętaj:

1. Każdy przypadek raka rdzeniastego tarczycy wymaga przeprowadzenia badania DNA pod kątem germinalnych mutacji protoonkogenu *RET*, nawet przy ujemnym wywiadzie osobniczym i rodzinnym.
2. U wszystkich chorych na dziedzicznego raka rdzeniastego tarczycy konieczne jest wdrożenie badań w kierunku poszukiwania tej samej mutacji u członków ich rodzin - szczególnie krewnych I^o. Umożliwia to wczesne wykrycie raka rdzeniastego tarczycy i innych chorób wchodzących w skład zespołu MEN 2.
3. U bezobjawowych nosicieli mutacji genu *RET* wskazane jest wykonanie profilaktycznego całkowitego wycięcia tarczycy.
4. Wiele przypadków dziedzicznego raka rdzeniastego tarczycy wywołane jest przez mutacje prowadzące do zespołu MEN 2A, w którym może wystąpić też guz chromochłonny nadnerczy i (znacznie rzadziej) nadczynność przytarczyc. Dlatego w przypadku rozpoznania raka dziedzicznego należy sprawdzić, czy typ mutacji wiąże się z koniecznością wdrożenia programu badań dla wczesnego rozpoznania guza chromochłonnego i nadczynności przytarczyc.
5. W pełnoobjawowym zespole MEN 2A należy najpierw wykonać operację guza chromochłonnego nadnerczy, dopiero potem operację raka rdzeniastego tarczycy.

6. W zespole MEN 2A należy pamiętać, że nie tylko nieprawidłowo leczony rak rdzeniasty tarczycy, ale także zbyt późno rozpoznany lub nieprawidłowo leczony guz chromochłonny nadnerczy może być przyczyną śmierci chorego.

PIŚMIENNICTWO

1. Hazard JB, Hawk WA, Crile G Jr: Medullary (solid) carcinoma of the thyroid - a clinicopathology entity. *J Clin Endocrinol Metab* 1959, 19: 152-61.
2. Eng C: RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17 (1): 380-93.
3. Wiench M, et al.: Genetic diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Endokrynologia Polska* 2000, 51: 67-76.
4. Barbot N, et al.: Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary thyroid carcinoma using immunoradiometric assay of calcitonin: comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78: 114-20.
5. Donis-Keller H, et al.: Mutations of the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993, 2: 851-6.
6. Hofstra RM, et al.: A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994, 367: 375-6.
7. Mulligan LM, et al.: Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993, 363: 458-60.
8. Eng C, et al.: The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET Mutation Consortium analysis. *JAMA* 1996, 276: 1575-9.
9. Eng C, Mulligan LM: Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumors, and Hirschsprung disease. *Human Mutation* 1997, 9: 97-109.
10. Gagel RF, Cote GJ: Pathogenesis of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid Cancer*. Kluwer Academic Publisher. Boston/Dordrecht/ London, 1998.
11. Brandt ML, et al.: Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86: 5658-71.
12. Machens A1, Lorenz K, Sekulla C, Höppner W, Frank-Raue K, Raue F, Dralle H. Molecular epidemiology of multiple endocrine neoplasia 2: implications for RET screening in the new millennium. *Eur J Endocrinol*. 2013 Feb 15;168(3):307-14. doi: 10.1530/EJE-12-0919. Print 2013 Mar.
13. Kitamura Y, et al.: Novel germline RET protooncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): mutation analysis in Japanese patients with MTC. *Oncogene* 1997, 14: 3103-6.
14. Berndt I, et al.: A new hot spot for mutations in the RET protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 770-4.
15. Bolino A, et al.: RET mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene* 1995, 10: 2415-9.
16. Eng C, et al.: A novel point mutation in the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in family with FMTC. *Oncogene* 1995, 10: 509-13.
17. Hofstra RM, et al.: A novel point mutation in the intracellular domain of the RET protooncogene in a family with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82: 4176-8.
18. Wohllk N, et al.: Relevance of RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 3740-5.
19. Jarzab B, et al.: Wczesna diagnostyka zespołu mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej typu 2 poprzez analizę genetyczną germinalnych mutacji protoonkogenu RET. *Endokrynol Pol* 1999, 50: 127-34.
20. Lips CJ, et al.: Clinical screening as compared with DNA analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med* 1994, 331: 828-35.
21. Włoch J, et al.: Profilaktyczne całkowite wycięcie tarczycy u nosicieli mutacji w protoonkogenie RET powodujących dziedzicznego raka rdzeniastego tarczycy. *Pol Przegl Chir* 2001, 73: 569-85.
22. Wells SA Jr1, Asa SL2, Dralle H3, Elisei R4, Evans DB5, Gagel RF6, Lee N7, Machens A3, Moley JF8, Pacini F9, Raue F10, Frank-Raue K10, Robinson B11, Rosenthal MS12, Santoro M13, Schlumberger M14, Shah M15, Waguespack SG6; American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid Carcinoma. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma *Thyroid*. 2015 Jun;25(6):567-610. doi: 10.1089/thy.2014.0335.
23. Krassowski J, et al.: Oznaczanie kalcytoniny w rozpoznawaniu i ocenie wyników leczenia raka rdzeniastego tarczycy. *Pol Tyg Lek* 1989, 44: 757-9.

24. Pacini F, et al.: Routine measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78: 826-9.
25. Wasylewski A, et al.: Przydatność oznaczania kalcytoniny w ocenie doszczętności zabiegu operacyjnego u chorych z rakiem rdzeniastym tarczycy. *Endokrynol Pol* 1981, 32: 239-44.
26. Januszewicz A: Nadciśnienie tętnicze. Zarys patogenezy, diagnostyki i leczenia. *Medycyna Praktyczna* 2002.
27. Rekomendacje Diagnostyka i Leczenie raka tarczycy przyjęte podczas III Konferencji naukowej. *Rak tarczycy.*, Szczyrk, 25.03.2006 *Endokrynol Pol* 2006, 57: 458-77.
28. Bałdys-Waligórska A, Barczyński M, Bręborowicz D, Brzeziński J, Bruszeńska E, Chmielik E, Chosia M, Czarniecka A, Czetwertyńska M, Dedecjus M, Domagała W, Drabik G, Dusza-Kozera J, Dziecioł J, Handkiewicz-Junak J, Hasse-Lazar K, Herman K, Hilarowicz-Pacanowska E, Jakubowski W, Jarzab B, Jastrzębska H, Jaworska M, Jurecka-Lubieniecka B, Kaczka K, Kalemba M, Kalicka-Kasperczyk A, Konturek A, Kos-Kudła B, Kowalska A, Kozłowicz-Gudzińska I, Krajewska J, Krawczyk A, Kropińska A, Krzakowski M, Kukulska A, Kulig A, Kuzdak K, Lange D, Lewiński A, Ławniczak-Cielińska D, Łącka K, Maksymiuk B, Niedziela M, Olszewski W, Paliczka-Cieślik E, Pałyga I, Pankowski J, Pomorski L, Prokurat A, Puch Z, Roskosz J, Shafie D, Sikora K, Słowiaczek M, Słowińska-Klencka D, Sowiński J, Sporny S, Stęchły T, Stobiecka E, Sygut J, Syrenicz A, Szramek-Urbaniak A, Szpak-Ulczoł S, Tomkałski T, Waler J, Włoch J, Wołoszyńska K, Wygoda Z. : Diagnostyka i leczenie raka tarczycy - rekomendacje polskie. *Endokrynol Pol.* 2010; 5(61):518-568.
29. Jarzab B, Dedecjus M, Handkiewicz-Junak D, Lange D, Lewiński A, Nasierowska-Guttmejer A, Ruchała M, Słowińska-Klencka D, Nauman J, Adamczewski Z, Bağlaj M, Bałdys-Waligórska A, Barczyński M, Bednarczuk T, Cichocki A, Czarniecka A, Czepczyński R, Gawlik A, Hubalewska-Dydejczyk A, Jażdżewski K, Kamiński G, Karbownik-Lewińska M, Kos-Kudła B, Kulakowski A, Kuzdak K, Łącka K, Małecka-Tendera E, Niedziela M, Pomorski L, Sporny S, Stojcev Z, Syrenicz A, Włoch J, Krajewska J, Szpak-Ulczoł S, Kalemba M, Buziak-Bereza M. *Diagnostics and Treatment of Thyroid Carcinoma.* *Endokrynol Pol.* 2016;67(1):74-107. doi: 10.5603/EP.2016.0011.
30. Januszewicz A, i wsp.: Wytyczne dotyczące diagnostyki i leczenia chorych z guzem chromochłonnym. *Nadciśnienie tętnicze* 2006; 10: 1-19.
31. Włoch J: Postępowanie chirurgiczne w dziedzicznym raku rdzeniastym tarczycy: modyfikacje wynikające z diagnostyki mutacji germinalnych protoonkogenu RET i badania profilu molekularnego guzów (rozprawa habilitacyjna). *Nowotwory* 2007; 57(5): 1-51
32. Krajewska J, Jarzab B.: Novel therapies for thyroid cancer *Expert Opin on Pharmacother.* *Expert Opin.* 2014;15(18):2641–2652
33. Pacini F1, Romei C, Miccoli P, Elisei R, Molinaro E, Mancusi F, Iaconi P, Basolo F, Martino E, Pinchera A. Early treatment of hereditary medullary thyroid carcinoma after attribution of multiple endocrine neoplasia type 2 gene carrier status by screening for ret gene mutations. *Surgery.* 1995 Dec;118(6):1031-5.
34. Dralle H, et al.: Prophylactic thyroidectomy in 75 children an adolescent with hereditary medullary thyroid carcinoma: German and Austrian experience. *World J Surg* 1998, 22: 744-750.
35. Skinner M, et al.: Prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med* 2005, 15; 353: 1105-13.
36. Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M: How effective is prophylactic thyroidectomy in asymptomatic multiple endocrine neoplasia type 2A? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006, 2: 256-7.



**Zespoły mnogich nowotworów układu
wydzielania wewnętrznego**

Multiple endocrine neoplasia syndromes

Zespoły mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego

Tą nazwą określa się w endokrynologii chorobę, polegającą na występowaniu mnogich nowotworów gruczołów wydzielania wewnętrznego, uwarunkowanych dziedzicznie. W ostatnim czasie zaliczono do zespołów wielogruzołowych także przypadki dziedzicznych zespołów nowotworowych, jak zespół VHL, czy nerwiakowłóknikowatość(1), omówionych w innych rozdziałach. Konieczna jest świadomość lekarza klinicysty-genetyka, że tym zespołom mogą towarzyszyć zaburzenia endokrynne, wymagające interwencji specjalisty. Na Rycinie 1 podano zestawienie takich zespołów wielogruzołowych.

Zespoły mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego

AKRONIM	MEN1	MEN2	VHL		NF1		
NAZWA CHOROBY	Zespół wielogruzołowy typu 1	Zespół wielogruzołowy typu 2	Zespół von Hippel i Lindaua	Zespół guzów chromochłonnych i przyzwojaków	Nerwiakowłóknikowatość typu 1	Zespół Carneya	Zespół nadczynności (raka) przytarczyc i guza szczęki lub zuchwy
GEN, KTÓRY ULEGA MUTACJI	MEN1	RET	VHL	SDHB-D	NF1	PRKAR1A	HRPT2/CDC73

Ryc. 1.

PIŚMIENNICTWO

1. Lewiński A, Jarzab B, Płaczkiwicz-Jankowska E. Zespoły wielogruzołowe. Choroby układu wewnątrzwydzielniczego. W: Interna Szczeklika. Podręcznik chorób wewnętrznych. Red: Gajewski P. 2013, 1339-1346.



Zespół mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego typu 1

Multiple endocrine neoplasia type 1, MEN 1

Streszczenie

Zespół wieloguczołowy jest dziedzicznym schorzeniem, w którym u jednego pacjenta występują nowotwory bądź hiperplazja kilku (co najmniej dwóch) narządów wydzielania wewnętrznego. Zespół MEN1 obejmuje współwystępowanie guzów przysadki, przytarczyc z ich nadczynnością oraz neuroendokrynnych guzów trzustki. Gruczolaki przytarczyc są z reguły mnogie. Również guzy trzustki w zespole MEN1 są mnogie. Powstanie nowotworu poprzedza hiperplazja. Rozpoznanie zespołu MEN 1 polega na rozpoznaniu kolejnych patologii układających się w charakterystyczny obraz kliniczny. Najczęstszym skojarzeniem jest nadczynność przytarczyc (PNP) i *gastrinoma* oraz *prolactinoma*.

W zespole MEN1 charakterystyczną cechą jest obecność germinalnej mutacji genu MEN1. Jest to mutacja typu utraty funkcji.

PNP jest najczęstszą chorobą w MEN 1. Objawy nadczynności przytarczyc ujawniają się przed 50 r. ż. prawie u 100% nosicieli genu MEN 1. Zwykle pierwszą nieprawidłowością wskazującą na możliwość PNP jest hiperkalcemia. Hiperkalcemii towarzyszy obniżony lub niski prawidłowy poziom fosforanów. Leczenie PNP jest operacyjne. Wskazaniem do operacji są powikłania kostne lub nerkowe oraz wysokie poziomy Ca^{++} (>12 mg/dl).

Gastrinoma (zespół Zollinger-Ellisona) jest to najczęstszy guz neuroendokrynnego przewodu pokarmowego występujący w MEN 1. Około 30% przypadków *gastrinoma* jest skojarzonych z MEN 1. *Gastrinoma* jest też najczęstszą przyczyną zgonów w MEN 1. Rozpoznanie *gastrinoma* jest oparte na jednoczesnym wykazaniu hipergastrynemii i nadkwasoty. Obecnie inhibitory pompy protonowej są podstawą leczenia farmakologicznego *gastrinoma*. Leczenie chirurgiczne winno być ukierunkowane na usunięcie guza (guzów) o zwiększonym ryzyku zezłośliwienia. Leczenie operacyjne *gastrinoma* skojarzonego z MEN 1 jest trudne i wynika zarówno z mnogości guzów jak i ich małej wielkości.

Około 10 % przypadków *insulinoma* kojarzy się z MEN 1 i *insulinoma* jest po *gastrinoma* drugim co do częstości guzem neuroendokrynnym przewodu pokarmowego w zespole MEN 1.

Pozostałe guzy endokryne trzustki znacznie rzadziej kojarzą się z MEN 1. Decyzję o operacji podejmuje się zazwyczaj przy zlokalizowaniu guza i podwyższonym poziomie jednego z markerów, zwykle PP lub chromograniny A (CgA). Dodatkowym ważnym kryterium jest średnia guza >2 cm.

W zespole MEN 1 występują z reguły rakowiaki zlokalizowane w górnej części przewodu pokarmowego.

Guzy przysadki rozpoznawane są w około 50% przypadków MEN 1. Najczęstszym guzem jest *prolactinoma* (ok. 60%). Postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne nie różni się od postępowania w guzach nie-dziedzicznych.

Częstość guzów nadnerczy w MEN 1 sięga ok. 40% - są to typowe *incidentaloma*.

Wśród markerów biochemicznych MEN 1 najistotniejsze znaczenie ma oznaczenie poziomu Ca^{++} , chromograniny A (CgA), polipeptydu trzustkowego (PP) i protaktyny (PRL). Ponieważ PNP jest najczęstszą patologią MEN 1 oznaczenie poziomu Ca^{++} ma kardynalne znaczenie. Uzupełnieniem badań biochemicznych są badania lokalizacyjne, które wykonuje się co 3 lata przy prawidłowych poziomach markerów biochemicznych.

Rokowanie w MEN 1 zależy w dużej mierze od rodzaju guza endokrynnego przewodu pokarmowego. Chorzy z MEN 1 żyją przeciętnie 49 lat, a złośliwy guz trzustki jest najczęstszą przyczyną zgonu w MEN 1.

Summary

MEN1 syndrome is hereditary disease which affects at least two hormone-producing glands developing benign or malignant tumors of pituitary, parathyroid (and primary hyperparathyroidism) as well as neuroendocrine tumors of pancreas. Parathyroid adenomas and pancreatic tumors in MEN1 are usually multiple and usually develop after hyperplasia. The diagnosis of MEN1 syndrome is based on recognition of a pattern of appearing pathologies which give characteristic clinical picture of disease. The most common sign of MEN1 syndrome is the co-occurrence of hyperparathyroidism, prolactinoma and gastrinoma. Molecular characteristic feature of MEN1 syndrome is germinal mutation of *MEN1* gene. It is a mutation of loss of function type. Primary hyperparathyroidism is the most typical disease in MEN1 syndrome. Its symptoms are present in almost 100% of *MEN1* gene carriers at the age < 50 years. Usually first manifestation of hyperparathyroidism is hypercalcemia associated with lowered level of phosphates. Hyperparathyroidism is treated surgically. Indications to surgery are bone or kidney related disorders.

Gastrinoma (Zollinger-Ellison syndrome) is the most common neuroendocrine tumor in MEN1. About 30% of gastrinomas are associated with MEN1. Gastrinoma, as well, is the most frequent cause of death. Gastrinoma is found on the basis of simultaneous diagnosis of hypergastrinemia and hyperacidity. At present, application of inhibitors of proton pump is the basic pharmacological treatment of this syndrome. Surgical treatment should cover removal of tumor(s) with increased risk of malignancy, however this treatment approach is difficult due to the multiplicity of tumors and their small size.

About 10% of insulinoma cases are associated with MEN1. It is second, after gastrinoma, neuroendocrine tumor in the digestive tract. Other endocrine pancreatic tumors, especially non-functioning ones, are less often associated with MEN1. The decision about operation is undertaken when the tumor is localized and when the increase of PP or chromogranin A marker is observed. Another important criterion for surgery is the tumor dimension >2 cm. In MEN1 carcinoid tumors are localized mainly in the upper part of digestive tract.

Pituitary tumors are recognized in 50% of MEN1 syndrome cases. The most common are prolactinomas (c.a. 60%). The diagnostic and therapeutic way of dealing with these tumors is not different from non-inherited tumors.

The frequency of adrenal tumors in MEN1 reaches 40% and these are typical incidentalomas.

The most important biochemical markers in MEN1 are Ca^{++} , pancreatic polypeptide (PP) and prolactin (PRL). As hyperparathyroidism is the most frequent pathology of MEN1, the monitoring of Ca^{++} is of utmost importance. Complementation to biochemical tests are scans performed every 3 years if the biochemical marker levels are normal.

The prognosis in MEN1 depends on the type of endocrine tumor in digestive tract. MEN1 patients live averagely 49 years, however, pancreatic tumor is the most fatal.

Zespół mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego jest rozpoznawany w przypadku, kiedy u jednego pacjenta występują nowotwory bądź hiperplazja kilku (co najmniej dwóch) narządów wydzielania wewnętrznego. Wyróżnia się dwa podstawowe zespoły kliniczne, określane jako typ 1 i typ 2 (MEN 1 i MEN 2). Zespół MEN 2 dzieli się dalej na MEN 2A i MEN2B (nazywany w przeszłości także MEN 3). Ponadto istnieją tzw. zespoły mieszane (mixed MEN, overlap syndromes), w których współistnieją równocześnie patologie charakterystyczne dla MEN 1 i MEN 2 obecnie nazywane zespołem MEN 4. W przeszłości używany był również termin MEA (Multiple Endocrine Adenomatosis), ale ze względu na potencjalną złośliwość zmian powszechnie przyjął się termin MEN (Multiple Endocrine Neoplasia). Patologie (nowotwory) wchodzące w skład zespołów MEN zestawiono w Tab.1.

Tab. 1. Zespoły kliniczne MEN.

Zespół kliniczny	Zajęty narząd (guz)	Gen (najczęściej zmutowane kodony)
MEN 1	Przytarczyce Część neuroendokrynną przewodu pokarmowego Przysadka Rzadziej: kora nadnerczy tarczyca nowotwór neuroendokrynną grasicy Często: tłuszczaki	<i>MEN1</i> (mutacje punktowe oraz delecje i insercje, brak mutacji typu „hot spot”)
MEN 2A	Rak rdzeniasty tarczycy Guz chromochłonny Przytarczyce	<i>RET</i> Kodon 634, ekson11 /c.1900T>A/C/G i inne
MEN 2B	Rak rdzeniasty tarczycy Guz chromochłonny liczne nerwiakowłókniaki języka i błon śluzowych oraz neuronogliomatosis w dystalnym odcinku jelita	<i>RET</i> Kodon 918, ekson16 /c.2753T>C i inne
Mieszany MEN/ME	Przytarczyce Przysadka	<i>CDKN1B</i> (brak mu-

N 4	Układ rozrodczy Nadnercza + nerka	tacji typu „hot spot”)
-----	--------------------------------------	------------------------

Zespoły MEN mają kilka cech charakterystycznych, wyróżniających je od sporadycznych nowotworów układu endokrynnego. Bardzo charakterystyczna dla MEN jest wieloogniskowość zmian nowotworowych w zajęтым narządzie. I tak gruczolaki przytarczyc są z reguły mnogie. Również guzy trzustki w zespole MEN 1 są mnogie.

Drugą cechą charakterystyczną dla MEN jest fakt, że powstanie nowotworu poprzedza hiperplazja, najczęściej wieloogniskowa, która często współistnieje z guzem. Daje to możliwość wcześniejszego rozpoznania patologii MEN i tym samym może wpłynąć na rokowanie.

Trzecią cechą charakterystyczną MEN jest rodzinne występowanie patologii. Guzy nowotworowe powstają w efekcie germinalnej mutacji genów MEN, przy czym w MEN 1 gen (*menin*) ma charakter supresorowy, natomiast w MEN 2 gen (*RET*) jest protoonkogenem.

Komórki guzów MEN1 mają wiele wspólnych, charakterystycznych cech histochemicznych. Guzy MEN1 są często wielohormonalne i mogą wykazywać ektopową produkcję hormonalną. W efekcie obraz kliniczny zespołów MEN jest bardzo zróżnicowany i zmienny w czasie.

Zespół MEN 1, wcześniej określany jako zespół Wermera, jest zespołem klinicznym charakteryzującym się występowaniem nowotworów lub hiperplazji przytarczyc, części wewnętrzwydzielniczej przewodu pokarmowego oraz przysadki. Częstość występowania MEN 1 nie jest znana, jest jednak prawdopodobnie znacznie częstsza niż dotychczas się wydawało. Cechy sugerujące MEN 1 obserwuje się w 0.25% autopsji. Większość chorych zachorowuje przed 40 rż, najczęściej w 2 i 3 dekadzie życia. Obraz kliniczny MEN 1 jest bardzo zróżnicowany a objawy mogą być bardzo dyskretne, co utrudnia rozpoznanie.

Patogeneza

W 1997 roku po wielu latach poszukiwań zlokalizowano gen MEN 1 na chromosomie 11 (11q13). Gen MEN 1 ma 10 eksonów i koduje białko *meninę*, którego budowa nie wykazuje istotnej homologii z dotychczas znanymi białkami. W ciągu kilku lat od identyfikacji genu MEN 1 opisano kilkaset mutacji. W przeciwieństwie do genu MEN 2 charakterystyczny jest brak tzw. „gorących miejsc” (hot spots), tzn. mutacje mogą występować praktycznie w całym genie. Do tej pory nie udało się wykazać korelacji genotyp-fenotyp w MEN 1.

Rozpoznanie

Rozpoznanie zespołu MEN 1 nie jest łatwe i polega na rozpoznaniu kolejnych patologii układających się w charakterystyczny obraz kliniczny. Patologie związane z MEN 1 ujawniają się zwykle kolejno, co kilka-kilkanaście lat, wyjątkowo jednocześnie. Obecnie zespół MEN 1 jest najczęściej rozpoznawany w czasie badań członków rodziny dotkniętej chorobą. Rzadziej rozpoznaje się MEN 1 w czasie rozszerzonej diagnostyki hormonalnej przy podejrzeniu MEN 1, co ma miejsce w przypadkach wcześniejszego rozpoznania jednej z patologii występującej w MEN 1 (nadczynność przytarczyc, guz gastrynowy, guz insulinowy). W tym ostatnim przypadku mówi się o „sporadycznym” MEN 1, który jest spowodowany nową mutacją. Bez potwierdzenia na poziomie DNA do rozpoznania sporadycznego MEN 1 konieczne jest rozpoznanie patologii co najmniej dwóch podstawowych dla rozpoznania narządów endokrynnych.

Obraz kliniczny MEN 1 zależy od kombinacji poszczególnych patologii u danego pacjenta, stopnia ich nasilenia i kolejności ujawniania się. Najczęstszym skojarzeniem jest nadczynność przytarczyc (PNP), nowotwór neuroendokryny trzustki oraz guz prolaktynowy przysadki. Prospektywne badania rodzin z MEN 1 wykazały, że pierwsze nieprawidłowości hormonalne ujawniają się zwykle między 14 a 18 r.ż. Te przypadki (rodzina probanta MEN 1) rozpoznawane są wcześnie, natomiast sporadyczne, nowe przypadki zwykle w 4-5 dekadzie życia. Rozpoznanie zespołu MEN1 może być postawione na podstawie:

- cech klinicznych (pacjent z dwoma lub więcej nowotworami charakterystycznymi dla MEN1)
- rodzinie występującego zespołu MEN1 (pacjent ma zdiagnozowanego jeden nowotwór charakterystyczny dla MEN1 i jest krewnym probanda I°)
- analizy DNA (wykryto mutacje genu MEN1 ale nie obserwuje się jeszcze cech klinicznych np. nosiciel mutacji)

Diagnostyka DNA wykonywana jest u osób z podejrzeniem zespołu MEN 1 (obecność dwóch lub więcej nowotworów charakterystycznych dla MEN 1), u członków rodzin (w szczególności u krewnych I°) a także jeżeli zespół MEN 1 jest podejrzewany, a nie spełnione są powyższe rekomendacje np. obecność gruczolaka przytarczyc przed 30 rż, wieloogniskowość lub objawy klinicznie nie w pełni odpowiadają zespołowi MEN 1 (guz przytarczyc i guz nadnerczy). Obecność mutacji MEN 1 u pacjentów, u których rozwinął się guz przytarczyc przed 40 r.ż. sięga 5-13%. Diagnostyka DNA w pierwszej kolejności obejmuje analizę sekwencji całego genu np. metodą sekwencjonowania Sangera a następnie w przypadku nie wykrycia mutacji punktowej lub niewielkiej delecji/insercji należy ocenić obecność dużych

delecji w obrębie genu *MEN1* np. metodą MLPA (*ang. Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*). Metoda ta, dzięki zastosowaniu uniwersalnych adapterów pozwala na amplifikację dużych fragmentów, których rozdział przeprowadzany jest przy użyciu sekwenatora kapilarnego.

Nadczynność przytarczyc (PNP)

PNP jest najczęstszą chorobą w MEN 1. Objawy nadczynności przytarczyc ujawniają się przed 50 r.ż. prawie u 100% nosicieli genu *MEN1*. PNP jest pierwszą rozpoznaną patologią u 60% chorych z MEN 1 i ujawnia się średnio w 19 r.ż. Najczęściej obserwuje się hiperplazję przytarczyc i w bardziej zaawansowanych stadiach choroby gruczolaki przytarczyc. Charakterystyczne dla MEN 1 jest zajęcie wszystkich przytarczyc, chociaż we wstępnych stadiach choroby niektóre przytarczycy mogą być prawidłowe.

Zwykle pierwszą nieprawidłowością wskazującą na możliwość PNP jest hiperkalcemia. Rozpoznanie PNP opiera się na wykazaniu podwyższonego stężenia PTH (parathormonu) przy hiperkalcemii. Do oznaczania PTH używana jest metoda immunoradiometryczna. Hiperkalcemii towarzyszy obniżony lub niski prawidłowy poziom fosforanów.

Leczenie PNP jest operacyjne. W MEN 1 stosowane są dwa klasyczne postępowania chirurgiczne: subtotalna (3 i 1/2) paratyreoidektomia lub całkowita paratyreoidektomia z jednoczasowym przeszczepem heterotopowym, zwykle do mięśnia przedramienia. Wyniki leczenia operacyjnego PNP w MEN 1 są gorsze niż w postaci nie-dziedzicznej PNP. W MEN 1 pierwsza operacja jest nieskuteczna u 1/4 - 1/3 pacjentów, natomiast w postaci nie-dziedzicznej PNP pierwsza operacja daje 80-100% szans na całkowite wyleczenie. Nawrót PNP (ponowna hiperkalcemia po 6 miesiącach normokalcemii po pierwszej operacji) obserwuje się u 16% pacjentów już w pierwszym roku i u połowy operowanych po 10 latach. Wynika to przede wszystkim ze zbyt małej radykalności operacji jak i przeoczenia nadliczbowych, często ektopowo położonych przytarczyc, co w MEN 1 zdarza się często.

Z uwagi na nienajlepsze odległe wyniki leczenia chirurgicznego istotne staje się ustalenie właściwych wskazań do operacji i czasu jej wykonania. Ogólnie przyjęte zasady postępowania są następujące: wskazaniem do operacji są powikłania kostne lub nerkowe oraz wysokie poziomy Ca^{++} (>12 mg/dl) i hiperkalcuria. Bezobjawowa hiperkalcemia (poziom $\text{Ca}^{++} < 12$ mg/dl) nie musi być leczona operacyjnie. Leczenie chirurgiczne może być odłożone przy niewielkiej hiperkalcemii, braku powikłań PNP. W takim przypadku pacjent wymaga dokładnej obserwacji klinicznej z regularną oceną kalcemii, kalciurii oraz gęstości mineralnej kości i obrazowania nerek.

Guz gastrynowy (zespół Zollinger-Ellisona)

Jest to najczęstszy guz neuroendokryny przewodu pokarmowego występujący w MEN 1. Około 30% przypadków guzów gastrynowych jest skojarzonych z MEN 1. *Gastrinoma* jest też najczęstszą przyczyną zgonów w MEN 1.

Obserwacje ostatnich lat wskazują, że guz gastrynowy występuje równie często (jeśli nie częściej) w dwunastnicy jak i w trzustce. Szczególnie częsta jest lokalizacja dwunastnicza w MEN 1. Wykazanie lokalizacji dwunastniczej w zasadniczy sposób zmieniło postępowanie w guzie gastrynowym. Jest wielce prawdopodobne, że nieskuteczność wcześniejszych operacji była spowodowana przeoczeniem małych (często < 5 mm) guzków dwunastnicy i poszukiwaniem przez chirurga jedynie guza trzustki.

Rozpoznanie guza gastrynowego jest oparte na jednoczesnym wykazaniu hipergastrynemii i nadkwasoty. Mniej niż połowa chorych spełnia kryteria diagnostyczne *gastrinoma*, t.j. stężenie gastryny > 500 pg/ml i BAO>15 mEq/h (żołądek nieoperowany) lub > 5 mEq/h (żołądek operowany). Przy nieznacznej hipergastrynemii lub przy prawidłowych poziomach gastryny i uzasadnionym podejrzeniu guza gastrynowego zalecany jest test sekretynowy. Podanie sekretyny 2μg/kg iv. powoduje wzrost stężenia gastryny > 200 pg/ml w większości przypadków guza gastrynowego, natomiast nie zwiększa poziomu gastryny w hipergastrynemii innego pochodzenia.

Rozpoznanie guza gastrynowego jest trudne z kilku powodów. Po pierwsze oznaczenie kwasoty (sonda Kaya) jest obecnie coraz rzadziej wykonywane. Po drugie najczęściej stosowane leki, t.j. inhibitory pompy protonowej (omeprazol, pantoprazol) z uwagi na dużą skuteczność zmieniły naturalny przebieg choroby i obecnie tylko wyjątkowo spotyka się klasyczne objawy opisane przez Zollingera i Ellisona. Obraz kliniczny guza gastrynowego zwłaszcza w początkowych etapach rozwoju choroby praktycznie nie różni się od choroby wrzodowej. Po trzecie inhibitory pompy protonowej podwyższają stężenie gastryny, co jeszcze bardziej utrudnia rozpoznanie. Objawy wskazujące na możliwość guza gastrynowego przedstawiono w Tab. 2.

Tab. 2. Objawy kliniczne wskazujące na możliwość guza gastrynowego.

-
- Biegunka
 - Nietypowe umiejscowienie owrzodzeń (przetyk, jelito)
 - Mnogie owrzodzenia
 - Świeże owrzodzenie w zespoleniu po resekcji

- Obecność przerzutów do wątroby
- Mała skuteczność leczenia farmakologicznego
- Zespół MEN 1 w rodzinie
- Współistnienie nadczynności przytarczyc

Leczenie guza gastrynowego przeszło znamiennej ewolucję od momentu oryginalnego opisu tego zespołu. Przez wiele lat całkowita gastrektomia zaproponowana przez Zollingera i Ellisona była postępowaniem z wyboru. Chorzy, u których nie wykonano całkowitej gastrektomii, zwykle ginęli z powodu powikłań choroby wrzodowej, t.j. krwawień lub perforacji. Próby leczenia przyczynowego, tzn. resekcji guza produkującego gastrynę, były najczęściej nieskuteczne. W latach siedemdziesiątych wprowadzono do leczenia choroby wrzodowej blokery receptorów H₂ (cimetydyna, ranitydyna, famotydyna), a w latach osiemdziesiątych inhibitory pompy protonowej (omeprazol, pantoprazol, lanzoprazol). Obie grupy leków okazały się również skuteczne w zespole Zollinger-Ellisona, zwłaszcza inhibitory pompy protonowej, których działanie jest tak silne, że mówi się o „farmakologicznej” gastrektomii na skutek zahamowania produkcji kwasu solnego niemal do zera. Obecnie inhibitory pompy protonowej są podstawą leczenia farmakologicznego guza gastrynowego.

Leczenie chirurgiczne winno być ukierunkowane na usunięcie guza (guzów) o zwiększonym ryzyku zezłośliwienia. W przeszłości kierowano się często wielkością guza uznając średnicę guza > 3 cm za wskazanie do leczenia operacyjnego. Jednakże takie postępowanie niesie w sobie ryzyko zbyt późnej interwencji i może zwiększać śmiertelność w MEN 1. Obecnie wiadomo, że częstość przerzutów do wątroby wynosi 61% przy guzach > 3 cm i 28% przy guzach wielkości 1-3 cm. Dlatego też w większości ośrodków operuje się każdy przypadek guza gastrynowego. Leczenie operacyjne guza gastrynowego skojarzonego z MEN 1 jest trudne i wynika zarówno z mnogości guzów jak i ich małej wielkości. Leczenie to polega na subtotalnej dystalnej pankreatektomii z wyluszczeniem guzów z głowy trzustki oraz na duodenotomii z resekcją guzków w dwunastnicy. Usuwa się również okoliczne węzły chłonne. Tylko tak rozległe postępowanie chirurgiczne daje szansę na usunięcie wszystkich ognisk choroby i normalizację stężenia gastryny.

Guz insulinowy

Około 10 % przypadków guzów insulinowych kojarzy się z MEN 1 i guz insulinowy jest po guzie gastrynowym drugim co do częstości guzem neuroendokrynnym przewodu pokarmowego w zespole MEN 1.

Rozpoznanie oparte jest na wykazaniu w warunkach podstawowych (na czczo) nieadekwatnego hiperinsulinizmu ($> 6 \mu\text{U/ml}$) w trakcie hipoglikemii ($< 45 \text{ mg/dl}$). W obrazie klinicznym dominują objawy neuroglikopenii prowokowanej dłuższą przerwą w przyjmowaniu posiłku (stąd często hipoglikemia w nocy lub nad ranem) lub wysiłkiem fizycznym. W rozpoznaniu różnicowym należy wykluczyć inne przyczyny hiperinsulinizmu z towarzyszącą hipoglikemią (Tab. 3).

Tab. 3.Przyczyny hipoglikemii współistniejącej z hiperinsulinizmem.

-
1. Guz insulinowy
 2. Hipoglikemia poinsulinowa w cukrzycy
 3. Przedawkowanie pochodnych sulfonylomocznika
 4. Hipoglikemia autoimmunologiczna
 - a. przeciwciała p.insulinowe
 - b. przeciwciała p.receptorowe

Leczenie guza insulinowego w MEN 1 jest chirurgiczne, aczkolwiek w niektórych przypadkach leczenie farmakologiczne jest również skuteczne. Podobnie jak w guzie insulinowym leczenie operacyjne jest bardziej radykalne, trudniejsze a wyniki gorsze niż w niedziedzicznych guzach, gdzie pierwsza operacja jest skuteczna w ponad 90%. Podstawowym zabiegiem jest dystalna pankreatektomia z wyłuszczeniem guzów głowy trzustki. Tylko tak radykalny zabieg daje szansę na wyleczenie.

Postępowanie chirurgiczne jest zalecane przez większość autorów. W niektórych przypadkach, przede wszystkim po nieskutecznej pierwszej operacji lub przy przeciwwskazaniach do leczenia operacyjnego, stosuje się leczenie farmakologiczne (diazoksyd), które jest skuteczne u 80% pacjentów.

Inne guzy trzustki

Pozostałe guzy endokryne trzustki znacznie rzadziej kojarzą się z MEN 1. Spośród nich najczęstsze są guzy nieczynne, tzn. guzy nie dające objawów klinicznych. Guzy te zwykle produkują szereg hormonów, najczęściej polipeptyd trzustkowy (pancreatic polypeptide,

PP) i glukagon, ale klinicznie są nieme. Obecność nieczynnego guza trzustki jest przede wszystkim problemem onkologicznym. Podstawowym pytaniem jest: kiedy operować? Decyzję o operacji podejmuje się zazwyczaj przy zlokalizowaniu guza i podwyższonym poziomie jednego z markerów, zwykle PP lub chromograniny A (CgA). Dodatkowym ważnym kryterium jest średnia guza >2 cm.

Guzy przysadki

Guzy przysadki rozpoznawane są w około 50% przypadków MEN 1, ale wydaje się, że ich rzeczywista częstość jest znacznie większa. Najczęstszym guzem jest guz prolaktynowy (ok. 60%), w dalszej kolejności guzy nieczynne, guzy produkujące GH i ACTH. Postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne nie różni się od postępowania w guzach nie dziedzicznych. Guzy o typie *prolactinoma* są leczone w pierwszej kolejności zachowawczo agonistami dopaminy (bromokryptyna), natomiast w guzach produkujących GH lub ACTH wykonuje się transfenoidalną adenomektomię lub hipofizektomię. Guzy nieczynne, o ile nie ma wskazań okulistycznych lub neurologicznych, mogą być obserwowane. Złośliwe guzy przysadki zdarzają się bardzo rzadko.

Guzy nadnerczy

Częstość guzów nadnerczy w MEN 1 sięga ok. 40% - są to typowe *incidentaloma*. Guzy są zwykle nieczynne, często obustronne, może też występować hiperplazja. Podobnie jak w sporadycznych guzach nadnerczy, leczenie operacyjne guzów nieczynnych hormonalnie jest wskazane w przypadku dużych lub szybko powiększających się guzów nadnerczy, czy też podejrzanych radiologicznie.

Guzy neuroendokryne

W zespole MEN 1 występują z reguły nowotwory neuroendokryne typu „foregut”, tzn. zlokalizowane w górnej części przewodu pokarmowego. Najczęściej spotyka się nowotwory neuroendokryne żołądka, oskrzela i grasicy. Leczeniem z wyboru jest usunięcie guza, ewentualnie uzupełnione o chemioterapię (Tab.4). W leczeniu farmakologicznym tych guzów istotne znaczenie ma stosowanie analogów somatostatyny (oktreotyd, lanreotyd), które nie tylko skutecznie hamują objawy kliniczne ale hamują również progresję guza (Tab.4).

Tab. 4. Leczenie farmakologiczne w MEN 1

Lek (grupa leków)	<i>Zespół kliniczny</i>
1. inhibitory pompy protonowej	<i>guz gastrynowy</i>
2. diazoksyd	<i>guz insulinowy</i>
3. agoniści dopaminy	guz prolaktynowy
4. analogi somatostatyny	1. objawy związane z hipersekcją nowotworów neuroendokrynych 2. działanie antyproliferacyjne w nowotworach neuroendokrynych
5. chemioterapia a. streptozotocyna + 5-fluorouracil b. doxorubicyna + etopozyd	guzy neuroendokryne trzustki
6. sutent, ewerolimus	guzy neuroendokryne trzustki

Badania kontrolne

Badania kontrolne są istotnym elementem postępowania diagnostycznego w MEN 1. Znalezienie w DNA chorego mutacji markerowej dla rodziny dotkniętej MEN 1 pozwala wykluczyć średnio ok. 50% krewnych z grupy ryzyka i ograniczyć liczne badania biochemiczne (hormonalne) tylko do nosicieli mutacji. Dzięki badaniom kontrolnym wcześniej rozpoznaje się poszczególne patologie składające się na MEN 1, co może poprawić efekty leczenia i tym samym rokowanie.

Zespół MEN 1 ujawnia się zwykle w 4-5 dekadzie życia, wyjątkowo u dzieci. Penetracja poszczególnych patologii rośnie z wiekiem. Częstość poszczególnych patologii MEN 1 w wieku 40 lat przedstawiono w Tab.5. Badania kontrolne rozpoczyna się w 14-18 r.ż. i wykonuje co rok. Przy stwierdzeniu nieprawidłowości badania są wykonywane częściej. Zakres badań przedstawiono w Tab.6. Wśród markerów biochemicznych MEN 1 najistotniejsze znaczenie ma oznaczanie poziomu Ca^{++} , chromograninyA (CgA), polipeptydu trzustkowego (PP) i prolaktyny (PRL). Ponieważ PNP jest najczęstszą patologią MEN 1 oznaczanie poziomu Ca^{++} ma kardynalne znaczenie. Uzupełnieniem badań biochemicznych są badania obrazowe.

Tab.5 Częstość występowania poszczególnych patologii MEN 1 w wieku 40 lat (wg Brandi)

Patologia	Częstość (w %)
Gruzołaki przytarczyc	90
<i>Gastrinoma</i>	40
Nieczynne guzy nadnerczy	25
Nieczynne guzy trzustki	20
<i>Prolactinoma</i>	20
<i>Insulinoma</i>	10

Tab. 6. Proponowane badania kontrolne u osób predysponowanych do wystąpienia zespołu MEN1 (wg Thakker).

Guz/narząd	Wiek rozpoczęcia skriningu	Badania biochemiczne co roku	Badania obrazowe
przysadka	8 rż	PTH, wapń	-
guz gastrynowy	20 rż	gastryna (+/- pH soku żołądkowego)	-
guz insulinowy	5 rż	glukoza i insulina na czczo	-
inne guzy trzustki	<10 rż	chromogranina A, polipeptyd trzustkowy, glukagon, VIP	MR< TK lub EUS co rok
przysadka	5 rż	prolaktyna , IGF-1	MR co 3 lata
nadnercza	<10 rż	nie wymagane dopóki nie ma objawów klinicznych czynności hormonalnej lub guz uwidoczony w nadnerczu ma > 1 cm	MR lub TK co roku (razem z obrazowaniem trzustki)
rakowiak płuca lub grasicy	15 rż	-	TK lub MR co 1-2 lata

Dla lekarza praktyka najistotniejsza jest odpowiedź na dwa pytania: kiedy podejrzewać MEN 1 i w jakich sytuacjach wykonywać badania. Chorych, u których można podejrzewać zespół MEN 1 można podzielić na dwie grupy. Grupę pierwszą stanowią chorzy, w ro-


dzinie których rozpoznano już MEN 1, natomiast do drugiej grupy należą chorzy, u których rozpoznano jedną z patologii, która może być potencjalnie elementem MEN 1. Ci chorzy wymagają stałej obserwacji klinicznej i okresowej kontroli endokrynologicznej. Do tej grupy chorych należą pacjenci z PNP, guzami prolaktynowymi, gastrynowymi i insulinowymi. Szczególnie wnikliwej obserwacji wymagają pacjenci, u których patologie te ujawniły się wcześniej. Należy pamiętać, że choroby związane z MEN 1 rozwijają się powoli i zwłaszcza na początku skąpoobjawowo.

Rokowanie

Rokowanie w MEN 1 zależy w dużej mierze od rodzaju i zaawansowania guza neuroendokrynnego przewodu pokarmowego. Chorzy z MEN 1 żyją przeciętnie ok. 50 lat, a złośliwy guz trzustki jest najczęstszą przyczyną zgonu w MEN 1. Dlatego też leczenie MEN 1 powinno być ukierunkowane na wczesnym wykryciu złośliwego guza przewodu pokarmowego. Nie ma jak dotąd czułego markera nowotworowego w MEN 1. Każdy guz przewodu pokarmowego powinien być traktowany jako potencjalnie złośliwy i radykalnie leczony.

PIŚMIENNICTWO

1. Brandi M.L., Gagel R.F., Angeli A. et al. Consensus. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2001; 86: 5658-5671.
2. Calender A., Giraud S., Cougard P. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 in France: clinical and genetic studies. *J Int Med* 1995; 238: 263-268.
3. Carty S.E., Helm A.K., Amico J.A. et al. The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery* 1998; 124: 1106-1114.
4. DeLellis R.A. Multiple Endocrine Neoplasia Syndromes Revisited. *Lab Invest* 1995; 72: 494-505.
5. Marx S.J., Agarwal S.K., Kester M.B. et al. Germline and somatic mutation of the gene for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1). *J.Int.Med.* 1998; 243: 447-453.
6. Marx S., Spiegel A.M., Skarulis M.C. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic topics. *Ann.Intern.Med.* 1998; 129: 484-494.
7. Schussheim D.H., Skarulis M.C., Agarwal S.K. et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings. *Trends Endocrinol.Metab.* 2001; 12: 173-178.
8. Skogseid B., Öberg K., Akerström G. et al. Limited tumor involvement found at multiple endocrine neoplasia type 1 pancreatic exploration: can it be predicted by preoperative tumor localization? *World J.Surg.* 1998; 22: 673-678.
9. Thakker R.V. Editorial: multiple endocrine neoplasia - syndromes of the twentieth century. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1998; 83: 2617-2619.
10. Thakker R.V., Newey P. J., Walls G.V et al. Clinical Practice Guidelines for Multiple Endocrine. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2012; 97: 2990-3011.



**Predyspozycja dziedziczna do guzów
chromochłonnych i przyzwojaków.**

**Genetic predisposition to hereditary pheochromocytomas
and paraganglioma**

Streszczenie

Guzy chromochłonne i przyzwojaki są rzadkimi nowotworami wywodzącymi się z tkanki chromochłonnej rdzenia nadnerczy i współczulnych lub przywspółczulnych zwojów autonomicznego układu nerwowego. Mają zdolność do syntezy i wydzielania amin katecholowych, powodując nadciśnienie tętnicze, zaburzenia rytmu serca oraz w różnym stopniu wyrażone objawy wegetatywne. W około 40% rozwijają się na podstawie mutacji germinalnych w jednym z 17 genów predysponujących, co czyni je najbardziej uwarunkowanymi dziedzicznie guzami u ludzi. Najlepiej poznany jest obraz kliniczny u chorych z mutacjami najwcześniej wykrytych genów, uważanych obecnie za geny klasyczne, odpowiedzialnych za występowanie czterech zespołów uwarunkowanych dziedzicznie: zespołu nerwiakowłókniakowości typu 1 (gen supresorowy NF1), zespołu von Hippel-Lindau (gen supresorowy vHL), zespołu mnogich nowotworów endokrynych typu 2 (protoonkogen RET) oraz zespołu guza chromochłonnego i nerwiaka przyzwojowego z jego podtypami 1-5 (supresorowe geny kodujące podjednostki dehydrogenazy bursztynianowej SDHx). Guzy chromochłonne i przyzwojaki występują w nich jako jedyny element lub współwystępują z innymi nowotworami złośliwymi lub zmianami łagodnymi. Mutacje genów klasycznych odpowiadają za 25% wszystkich postaci dziedzicznych guzów chromochłonnych i przyzwojaków. Spośród innych genów biorących udział w predyspozycji dziedzicznej należy wymienić geny TMEM, MAX, FH, KIF1B, MDH2, MERTK, MET, EPAS1 EGLN1/PHD2. Obraz fenotypowy tych mutacji nie jest dokładnie poznany ze względu na niską częstość ich występowania oraz stosunkowo krótki czas obserwacji chorych, u których wykryto te mutacje.

Geny predysponujące do guzów chromochłonnych i przyzwojaków można podzielić na dwie grupy, zależnie od mechanizmu, w jaki ich mutacje prowadzą do transformacji nowotworowej: grupa genów indukujących proliferację poprzez szlaki sygnałowe zależne od hipoksji, do której należą geny vHL, PHD2, SDHx (SDHA-D), HIF2A/EPAS 1, MDH2, FH oraz grupa genów aktywująca szlaki sygnałowe kinaz: MAX, NF1, TMEM 127, KIF1B, MERTK, MET. Badanie DNA jest podstawowym badaniem u chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami ale ze względu na ograniczenia techniczne metod badawczych i heterogenne tło rozwoju nowotworów konieczny jest wybór genów badanych jako pierwsze i ustalenie kolejności badania następnych. Służy temu algorytm decyzyjny, w którym uwzględniane są wywiad osobniczy i rodzinny, badanie fizykalne, obecność procesu złośliwego, profil biochemiczny guza oraz jego lokalizacja. Za guzem uwarunkowanym dziedzicznie przema-

wiają: młody wiek ujawnienia, lokalizacja pozanadnerczowa, choroba złośliwa i wieloogniskowość guza.

Summary

Pheochromocytomas/paraganglioma are very rare tumours originating from chromaffin tissue in the adrenal medulla and/or autonomic nervous system ganglia. They are able to produce and secrete to blood catecholamines, causing hypertension and various vegetative symptoms. Pheochromocytoma/paraganglioma occurs with neurofibromatosis (NF), multiple endocrine neoplasia (MEN 1 and 2), von Hippel–Lindau (VHL), and familial paraganglioma syndromes. They develop against a background of germinal mutations in one of 17 predisposing genes, so the molecular grounds causing them are therefore highly heterogenic. The best discovered and described mutations are those in the earliest discovered genes, which are nowadays considered classical genes, namely RET, VHL, SDHB, SDHD and NF1, leading to hereditary conditioned syndromes with quite a well-known clinical picture. Pheochromocytomas / paraganglioma appear in these syndromes as the only element, or coexisting with changes in other organs, mainly with other cancers. Hereditary Pheochromocytoma can be either sporadic or hereditary and about 30% of cases having a known gene mutation. Most cases of familial pheochromocytoma/paraganglioma are caused by mutations in the succinate dehydrogenase (SDH) and its subunit genes (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, and SDHAF2). Hereditary tumors are commonly seen young patients and are usually multiple and have an extra-adrenal localization.

1. Wstęp

Guzy chromochłonne i przyzwojaki są rzadkimi nowotworami wywodzącymi się ze struktur ektodermalnych - komórek chromochłonnych rdzenia nadnerczy oraz współczulnych i przywspółczulnych zwojów autonomicznego układu nerwowego. Częstość ich występowania w populacji ogólnej jest bardzo niska i oceniana na 1/100 000-1/300000 osób, a w populacji pacjentów z nadciśnieniem tętniczym na 0,3-0,5%.

Przyzwojaki współczulne, zlokalizowane zwykle podprzeponowo (przestrzeń zaotrzewnowa, miednica mała) i rzadko w śródpiersiu, zależnie od stopnia zróżnicowania mogą produkować i wydzielać dopaminę lub noradrenalinę. Guzy chromochłonne, zaliczane do guzów współczulnych, jako jedyne mogą również produkować adrenalinę, ze względu na fakt, iż tylko one, podobnie jak fizjologiczne komórki rdzenia nadnerczy, wykazują ekspresję enzymu n-metylotransferazy, przekształcającej noradrenalinę w adrenalinę. Głównym objawem guzów współczulnych jest więc w różnym stopniu wyrażone nadciśnienie tętnicze, zaburzenia kardiologiczne oraz objawy wegetatywne, których ekspresja zależy od profilu biochemicznego guza.

Przyzwojaki przywspółczulne umiejscawiają się zwykle u podstawy czaszki, wzdłuż przebiegu naczyń szyjnych (te zlokalizowane w miejscu podziału naczyń szyjnych określane są jako guzy kłębka szyjnego - chemodectoma) lub w śródpiersiu górnym. Nie wykazują czynności hormonalnej lub rzadko, w około 4% przypadków, posiadają poronną zdolność do produkcji i sekrecji dopaminy i jej metabolitu, 3-metoksytyraminy, która jest ich markerem biochemicznym.

Uważa się, że w około 40% przypadków guzy chromochłonne i przyzwojaki rozwijają się na podłożu mutacji germinalnych w jednym z 17 genów predysponujących, co oznacza, że są najsilniej uwarunkowanymi dziedzicznie guzami u ludzi.

2. Geny predysponujące do guzów chromochłonnych i przyzwojaków oraz obraz fenotypowy ich mutacji

W latach 90-tych XX wieku oraz w pierwszej dekadzie wieku XXI opisano mutacje germinalne w obrębie siedmiu pierwszych genów – NF1, vHL, RET, SDHA, SDHB, SDHC i SDHD - uznanych obecnie za geny klasyczne. Prowadzą one do rozwoju czterech charakterystycznych zespołów uwarunkowanych dziedzicznie, w których guzy chromochłonne i przyzwojaki występują jako jedyny element lub współwystępują z innymi nowotworami lub zmianami łagodnymi. Należą do nich zespół nerwiakowłókniakowatości typu 1, zespół mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego typu 2, zespół von Hippel-Lindau oraz

zespoły guza chromochłonnego i nerwiaka przyzwojowego 1-5. Łącznie odpowiadają one za około 25-30% wszystkich postaci dziedzicznych guza chromochłonnego i nerwiaka przyzwojowego.

W opisanym najwcześniej zespole NF1 guzy chromochłonne zlokalizowane w nadnerczach są zwykle łagodne, jednostronne i czynne hormonalnie. Wydzielają adrenalinę oraz noradrenalinę i dają typowe objawy guza chromochłonnego: skokowo przebiegające nadciśnienie tętnicze z zaburzeniami rytmu serca, bólami głowy, potami i zblednięciem powłok. Pojawiają się zwykle około 40 roku życia a więc wtedy, gdy rozwinęły się już inne cechy fenotypowe zespołu NF1. Nie jest konieczne wykonywanie badań przesiewowych w kierunku guzów chromochłonnych u wszystkich nosicieli mutacji genu NF1, ponieważ pojawiają się one stosunkowo rzadko - u 0,5-5,7% wszystkich chorych. Dopiero w przypadku pojawienia się nadciśnienia tętniczego diagnostyka w tym kierunku staje się celowa. Zespół jest spowodowany inaktywującymi mutacjami supresorowego genu NF1, najdłuższego genu związanego z predyspozycją dziedziczną do guzów chromochłonnych, położonego na chromosomie 17, złożonego z 57 eksonów. Koduje neurofibrominę hamującą aktywność szlaków sygnałowych zależnych od RAS, biorących udział w kontroli proliferacji i różnicowania komórkowego. Zespół dziedziczy się autosomalnie dominująco. Guzy chromochłonne i przyzwojaki rozwijające się na tle tego zespołu stanowią około 3% wszystkich guzów dziedzicznych.

Zespół von Hippel-Lindau, spowodowany jest inaktywującymi mutacjami genu VHL, położonego na krótkim ramieniu chromosomu 3, składającego się z trzech eksonów i zaangażowanego w ekspresję białka HIF1 alfa, biorącego udział w regulacji szlaków sygnałowych zależnych od hipoksji. Guzy chromochłonne występują u 6-9% chorych z typem pierwszym zespołu i u 40-59% chorych z typem drugim. Średni wiek ich ujawnienia wynosi 30 lat ale mogą pojawiać się już w dzieciństwie, nawet poniżej 10 roku życia. Są czynne hormonalnie ale pomimo lokalizacji nadnerczowej wydzielają noradrenalinę, ze względu na brak w ich komórkach aktywnego enzymu metylotransferazy, przekształcającej noradrenalinę w adrenalinę. Ich głównym objawem jest więc różnie nasilone nadciśnienie tętnicze oraz zaparcia. Często bywają obustronne, w około 5% przypadków mogą być złośliwe. Stanowią około 8% wszystkich postaci uwarunkowanych dziedzicznie.

W zespołach mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego typu 2A i 2B (MEN2A i 2B), spowodowanych aktywującymi mutacjami protoonkogenu RET, guzy chromochłonne, obok raka rdzeniastego tarczycy są główną składową, choć nie wszystkie mutacje genu RET wiążą się z jednakowym ryzykiem rozwoju guzów chromochłonnych. Najczęściej, w około 50%, występują wśród nosicieli najbardziej onkogennych mutacji, zlokalizowanych

w kodonach 634 oraz 918. Umiejscowione w nadnerczach, w 50-80% obustronnie, poprzedzone są etapem hiperplazji komórek rdzenia nadnerczy. Produkują głównie adrenalinę ze względu na nadekspresję n-metylotransferazy i bardzo rzadko są złośliwe. Najczęściej ujawniają się pomiędzy 30-40 rokiem życia, choć mogą występować również u osób młodszych, szczególnie w zespole MEN 2B. Rozpoznanie raka rdzeniastego tarczycy zwykle poprzedza rozpoznanie guza chromochłonnego, ze względu na silniejszą ekspresję fenotypową, ale u ¼ chorych rozpoznanie guza chromochłonnego jest stawiane najpierw a u 35% chorych równocześnie z rakiem rdzeniastym tarczycy. Guzy chromochłonne w przebiegu zespołu mnogich nowotworów układu wydzielania wewnętrznego stanowią około 6% wszystkich postaci uwarunkowanych dziedzicznie.

Zespoły guzów chromochłonnych i przyzwojaków dziedziczą się autosomalnie dominująco i spowodowane są inaktywującymi mutacjami genów kodujących podjednostki dehydrogenazy bursztynianowej (SDH, succinate dehydrogenase), enzymu biorącego udział w cyklu Krebsa i w przenoszeniu elektronów w łańcuchu oddechowym. Składa się on z czterech podjednostek (A-D), z których podjednostka A i B budują centrum aktywne enzymu a podjednostki C i D przytwierdzają enzym do błony mitochondrium. Powstała w wyniku inaktywujących mutacji genów SDHx mniejsza aktywność enzymatyczna tego kompleksu prowadzi do nagromadzenia się w komórce bursztynianu, co aktywuje szlaki proliferacji zależnej od hipoksji drogą wtórnej aktywacji HIF2A i prowadzi do transformacji nowotworowej. Z kompleksem związane są jeszcze dwa białka stabilizujące cały kompleks (SDHAF1 i SDHAF2), a mutacje genów kodujących te białka są odpowiedzialne za część przypadków zespołu. Fenotypowo zespół cechuje się występowaniem mnogich, wzrastających synchronicznie lub metachronicznie, nieczynnych hormonalnie przyzwojaków regionu głowy i szyi lub współczulnych, czynnych hormonalnie przyzwojaków przestrzeni zaotrzewnowej i miednicy małej. Rzadko występują guzy chromochłonne. Opisuje się współistniejące z zespołem guzy przysadki, raki nerki lub guzy wywodzące się z podścieliska przewodu pokarmowego, bywają raki brodawkowe tarczycy. Na podstawie badania DNA wyodrębnia się 5 podtypów zespołów guzów chromochłonnych i nerwiaków przyzwojowych:

PGL1 powstający na podłożu mutacji genu SDHD, stanowi 9% wszystkich uwarunkowanych dziedzicznie guzów chromochłonnych i przyzwojaków i cechuje się występowaniem mnogich, łagodnych i przywspółczulnych przyzwojaków regionu głowy i szyi. Widywane są jednak jednostronne jak i obustronne guzy chromochłonne oraz czynne hormonalnie przyzwojaki przestrzeni zaotrzewnowej. Zespół może ujawniać się już u dzieci, średni wiek wystąpienia pierwszego przyzwojaka wynosi 28-31 lat. Podobnie jak pozostałe zespoły PGL

dziedziczny się autosomalnie dominująco, występuje jednak zjawisko „maternal imprinting” – choroba nie ujawnia się, gdy jest dziedziczona po linii matczynej.

PGL2 spowodowany inaktywującymi mutacjami białka SDHAF2 (succinate dehydrogenase complex assembly factor), wiodzie do powstania łagodnych przyzwojaków regionu głowy i szyi z średnim wiekiem ujawnienia 33 lat, czasem występują guzy chromochłonne. Mutacje genu SDHAF2 odpowiedzialne są za około 1% wszystkich postaci dziedzicznych.

PGL3 spowodowany przez mutacje genu SDHC jest związany z występowaniem pojedynczych przyzwojaków regionu głowy i szyi – łagodnych i nieczynnych hormonalnie a średni wiek ujawnienia zespołu wynosi około 38 lat. Występują u mniej niż 2% wszystkich postaci dziedzicznych.

PGL4 rozwija się na podłożu mutacji genu SDHB i został opisany po raz pierwszy w roku 2001. Związany jest z występowaniem guzów złośliwych, z których część w wyniku odróżnicowania utraciła zdolność do syntezy hormonalnej lub wykazuje tylko czynność poronną produkując dopaminę i jej metabolit – metoksytyraminę. Dlatego ujawniają się zwykle, gdy guz pierwotny lub jego przerzuty wywierają już efekt masy. Mogą być zlokalizowane w regionie głowy i szyi lub występować jako złośliwe guzy śródpiersia, przestrzeni zaotrzewnowej, miednicy jak i guzy chromochłonne. Średni wiek ujawnienia wynosi 25-30 lat, dotyczą więc dzieci i osób w młodym wieku. Mutacje genu SDHB odpowiedzialne są za występowanie około 50% wszystkich złośliwych guzów chromochłonnych i przyzwojaków. Odpowiada za 11% wszystkich postaci dziedzicznych.

PGL5 spowodowany jest mutacjami genu SDHA, wykrytego w 2010 roku. U homozygot prowadzi do letalnego zespołu Leigh a u heterozygot ujawnia się jako łagodne, czynne hormonalnie guzy chromochłonne. Występuje u mniej niż 2% wszystkich postaci dziedzicznych.

Zarówno dane molekularne dotyczące genów klasycznych (liczba i charakterystyka wariantów patogennych mutacji), jak i ich obraz fenotypowy są obecnie dość dobrze scharakteryzowane przede wszystkim ze względu na stosunkowo dużą częstość ich występowania wśród chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami (łącznie ocenioną na 25-30%), dane uzyskane z międzynarodowych badań obejmujących duże grupy chorych (co pozwala przełamać trudności epidemiologiczne związane z niską częstością występowania guzów chromochłonnych i przyzwojaków w ogólnej populacji) oraz ze względu na stosunkowo długi czas gromadzenia tych danych.

W latach 2000-2016 zostały wykryte kolejne geny, biorące udział w predyspozycji dziedzicznej do guzów chromochłonnych/pryzwojaków, ich łączny udział w częstości wy-

stępowania PCGL wynosi około 10-15%, ale dane dotyczące zależności genotyp-fenotyp pozostają ciągle w sferze badań i w kolejnych latach zostaną zapewne uzupełnione. Należą do nich:

Gen FH (fumarane hydratase) kodujący hydratazę fumaranu, enzym przekształcający kwas fumarowy w kwas malonowy w cyklu kwasów karboksylowych. Wykryty w 2005 roku, początkowo opisano jego mutacje w zespole wrodzonych mięśniaków gładkokomórkowych współistniejących z rakiem nerki. Dopiero w 2014 roku po raz pierwszy opisano mutację germinálną FH u dziecka z przyzwojakiem, następane doniesienia potwierdzają możliwą rolę tego genu w guzach złośliwych. Szacowana częstość mutacji tego genu w populacji chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami jest niska i wynosi około 1-2%.

Gen EPAS1 (endothelial pas domain protein 1) jest genem zaangażowanym w stabilizację czynnika HIF2A a jego germinálne mutacje zostały opisane u chorych z guzami chromochłonnymi/pryzwojakami skojarzonymi z polycytemią.

EGLN1/PHD2 regulują stabilność HIF1A i związane z występowaniem guzów chromochłonnych u chorych z polycytemią.

Gen MDH2 (malate dehydrogenase 2), znany od 1992 roku, jest genem supresorowym, związanym z oksydacją malonianu w oksalooctan malonianu w cyklu Krebsa, a proteina kodowana przez ten gen zlokalizowana jest w mitochondriach i może odgrywać kluczową rolę w koordynacji metabolizmu pomiędzy mitochondriami i cytozolem. W 2015 roku opisano po raz pierwszy mutację germinálną MDH2 u chorego z mnogimi złośliwymi przyzwojakami oraz u członków jego rodziny. Na podstawie do zgromadzonych tej pory danych uważa się, że mutacje MDH2 mogą prowadzić do zespołu podobnego w swym obrazie klinicznym do zespołu guzów chromochłonnych i przyzwojaków.

Gen TMEM 127 (transmembrane protein 127) jest genem supresorowym, a jego inaktywujące mutacje prowadzą do hiperfosforylacji białek zależnych od mTOR. Nadmierna aktywność tego szlaku sygnałowego została wykryta w wielu nowotworach. Mutacje TMEM 127 występują u około 2% - 4% chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami.

Gen MAX (myc associated factor X) odgrywa kluczową rolę w kontroli szlaku sygnałowego MYC/MAX, związanego z regulacją proliferacji komórkowej, różnicowania i śmierci. W dużym badaniu obejmującym 1600 chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami mutacje MAX znaleziono u 1,7% z nich. Może być związany z wystąpieniem choroby złośliwej oraz guzów mnogich.

Gen KIF1B (kinesin family member 1B) – zaliczany do kinezyn, rodziny genów odgrywających rolę w transporcie energii i poprzez swój supresorowy charakter, również w in-

dukcji apoptozy. Jego inaktywujące mutacje są badane w rozwoju różnych nowotworów, od 2008 roku również w rozwoju guzów chromochłonnych i przyzwojaków. W 2008 roku opisano mutacje tego genu w rodzinach z guzami chromochłonnymi. Szacowana częstość występowania wśród chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami jest oceniana na 1-4%.

Geny MERTK i MET wykryte w tym samym czasie są związane ze szlakiem sygnałowym kinaz i opisane u pojedynczych chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami.

3. Szlaki sygnałowe uwikłane w rozwój guzów chromochłonnych i przyzwojaków

Badania molekularne pozwoliły podzielić geny predysponujące do guzów chromochłonnych i przyzwojaków na dwie grupy, zależnie od mechanizmu, w jaki ich mutacje prowadzą do transformacji nowotworowej:

- Grupa genów indukujących proliferację poprzez szlaki sygnałowe zależne od hipoksji. Ich mutacje wiodą do uszkodzenia białek biorących udział w detekcji tlenu w komórce, co stwarza stan pseudohipoksji z następczym upośledzeniem produkcji energii, nagromadzeniem onkometabolitów i aktywacją szlaków sygnałowych zależnych od HIF1 alfa – EPO, VEGF, GLUT1 i P21 ras, co prowadzi do zaburzenia wzrostu komórki, jej proliferacji i rozwoju guza. Nowotwory, które rozwijają się na podłożu mutacji tych genów są zwykle dobrze unaczynione oraz wykazują nadekspresję VEGF i ich receptorów. Należą tu geny vHL, PHD2, SDHx (SDHA-D), HIF2A/EPAS 1, MDH2 oraz FH.
- Grupa genów aktywująca szlaki sygnałowe kinaz, takie jak PI3Kinaza/AKT, RAS/RAF/ERK lub szlak mTOR wiodąc do wzrostu, nieprawidłowej proliferacji i wydłużonego czasu przeżycia. Choroba pojawia się w wyniku aktywujących mutacji genu RET oraz inaktywujących mutacji genów MAX, NF1, TMEM 127, KIF1B, MERTK, MET.

4. Rola badań DNA u chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami.

Biorąc pod uwagę wysoką częstość występowania postaci dziedzicznych wśród chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami w każdym przypadku konieczne rozważenie jest diagnostyki DNA. U nosiciela mutacji pozwala ona na ocenę ryzyka choroby wieloogniskowej lub złośliwej, na oszacowanie spodziewanej lokalizacji nowych zmian a także na ocenę ryzyka wystąpienia zmian chorobowych w innych narządach, współwystępujących z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami w zespołach uwarunkowanych dziedzicznie. Możliwe staje się więc objęcie chorego ukierunkowanym monitorowaniem biochemicznym, radiologicznym i funkcjonalnym, którego intensywność i zakres zależy od typu mutacji. U chorych z

dziedzicznie uwarunkowanymi guzami nadnerczy wynik badania DNA pozwala również racjonalnie planować zakres leczenia operacyjnego. I tak wśród nosicieli mutacji RET i vHL, u których istnieje duże ryzyko pojawienia się w ciągu życia nowych łagodnych zmian w drugim nadnerczu, obecnie standardem stały się operacje oszczędzające korę nadnerczy, dla zapobieżenia rozwojowi jej niewydolności. Z kolei u nosicieli mutacji genów SDHB, FH lub MAX, gdzie istnieje duże ryzyko choroby złośliwej, celowe są operacje radykalne, w razie potrzeby uzupełnione o limfadenektomię. U tych chorych istnieje również konieczność starannej przedoperacyjnej diagnostyki radiologicznej i funkcjonalnej dla wykluczenia rozsiewu choroby. Badania DNA u członków rodziny chorego pozwalają na wczesne wykrycie choroby i jej skuteczne leczenie wśród nosicieli mutacji lub na uwolnienie od stygmatu choroby u osób wolnych od mutacji.

5. Czynniki wskazujące na predyspozycję dziedziczną do guzów chromochłonnych i przyzwojaków.

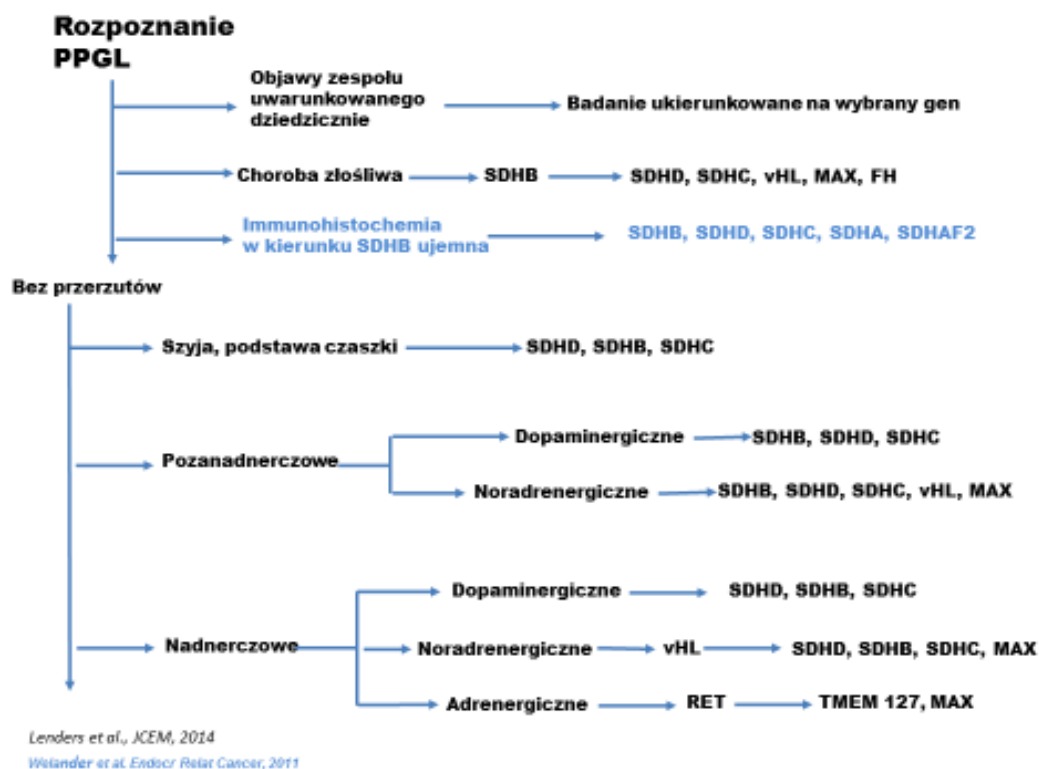
Rozpoznanie postaci uwarunkowanych dziedzicznie w części przypadków pozwalają postawić starannie przeprowadzony wywiad rodzinny oraz osobniczy (dotyczący zarówno guzów chromochłonnych/pryzwojaków jak i schorzeń syndromicznych) a także badanie fizykalne (rozpoznanie uliczne w zespole NF1 oraz MEN 2B). Silnie wskazują na uwarunkowania dziedziczne zmiany z zajęciem obu nadnerczy, mnogie, złośliwe oraz ujawniające się u osób młodych. Wśród chorych z pojedynczymi guzami ograniczonymi do nadnerczy, bez choroby złośliwej, bez innych schorzeń syndromicznych i bez dodatkowego wywiadu rodzinnego częstość postaci dziedzicznych oceniono jedynie na 11,6%.

6. Algorytm decyzyjny badań DNA.

W wielu laboratoriach badania DNA przeprowadza się obecnie przy pomocy czasochłonnej metody sekwencjonowania Sangera, która wymaga osobnego badania wszystkich eksonów wchodzących w skład badanego genu. Metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS), które pozwalają ominąć tę trudność i które w przyszłości pozwolą zapewne na szybkie i tanie badanie DNA z zastosowaniem paneli genowych, nie są jeszcze ogólnie dostępne, następująca zresztą szereg trudności interpretacyjnych i wymagają dużego doświadczenia. Dlatego, uwzględniając dużą liczbę genów biorących udział w predyspozycji dziedzicznej do guzów chromochłonnych i przyzwojaków, konieczny jest pewien wybór tych genów, które są badane jako pierwsze oraz ustalenie dalszej kolejności badania, w razie uzyskania wyniku ujemnego. Wybór ten, oparty o ocenę ryzyka wystąpienia mutacji, dokonywany jest każdorazowo na podstawie indywidualnych danych chorego uzyskanych z wywiadu i obrazu klinicznego.

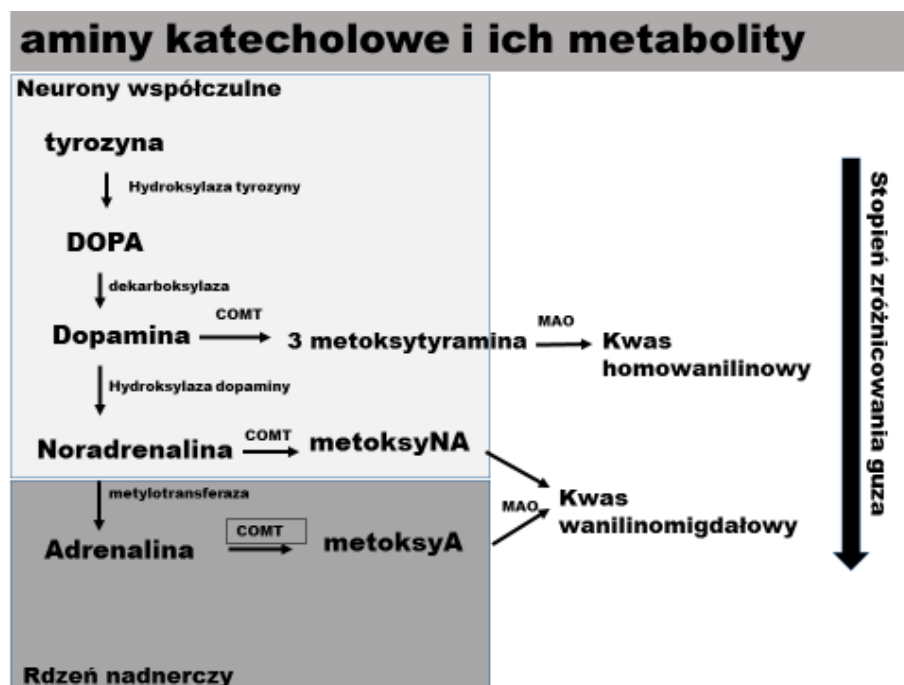
Europejsko-amerykańskie rekomendacje dotyczące chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami, które ukazały się w 2014 roku, zaproponowały algorytm decyzyjny (jego zmodyfikowaną wersję przedstawiono na rycinie 1), w którym wyboru dokonuje się na podstawie następujących danych:

- Dodatni wywiad osobniczy i rodzinny w kierunku zespołu uwarunkowanego dziedzicznie - determinuje badanie konkretnego genu
- W przypadku choroby złośliwej badanie DNA rozpoczyna się od badania genu SDHB, którego mutacje są uznanym czynnikiem ryzyka jej rozwoju i złego rokowania u chorych z obecnością przerzutów. Ocenia się, że mutacje SDHB leżą u podłoża choroby złośliwej u 30-36% chorych a ryzyko rozwoju guza złośliwego u nosicieli mutacji ocenia się na 17%. Dopiero w razie ujemnego wyniku badania SDHB ocenia się inne geny.
- U chorych po leczeniu operacyjnym guza chromochłonnego lub przyzwojaka jednym z elementów badania histopatologicznego powinno być badanie immunohistochemiczne w kierunku białka SDHB. Brak jego ekspresji jest przede wszystkim konsekwencją inaktywujących mutacji genu SDHB, ale może występować również u chorych z mutacjami genów SDHA oraz C-D. Gdy brak jest cech złośliwości guza (która determinuje wybór SDHB jako pierwszego genu do badania) w pierwszej kolejności rozpoczyna się diagnostykę DNA właśnie od nich. (Rycina 1).



Ryc. 1. Algorytm decyzyjny badań DNA u chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami.

- Profil biochemiczny guza - stwierdzono zależność pomiędzy typem mutacji prowadzącej do choroby a ekspresją enzymów biorących udział w syntezie i metabolizmie amin katecholowych, dlatego badanie dobowego wydalania frakcjonowanych metabolitów amin katecholowych z moczem (metoksykatecholamin) lub ich badanie w surowicy krwi jest podstawowym badaniem przedoperacyjnym u chorych z podejrzeniem guza chromochłonnego i przyzwojaka. I tak guzy chromochłonne w zespołach MEN2A i MEN2B i u nosicieli mutacji TMEM 127 wykazują nadekspresję n-metylotransferazy i produkują prawie wyłącznie adrenalinę, guzy chromochłonne w zespole NF1 i u nosicieli mutacji MAX mają zdolność do sekrecji zarówno adrenaliny jak i noradrenaliny, u chorych z zespołem vHL guzy zlokalizowane w nadnerczach produkują wyłącznie noradrenalinę. U chorych z mutacją genu SDHB, która predysponuje do choroby złośliwej, guzy, ze względu na swoje odróżnicowanie, są nieczynne hormonalnie lub produkują jedynie dopaminę. Podobny profil biochemiczny występuje u chorych z przyzwojakami przywspółczulnymi regionu głowy i szyi, choć tutaj nie wynika z odróżnicowania guza a z innego, przywspółczulnego pochodzenia. Zależność pomiędzy profilem biochemicznym guza a jego lokalizacją i zróżnicowaniem przedstawia rycina 2.



Ryc. 2. Metabolizm amin katecholowych oraz zależność pomiędzy profilem biochemicznym guza, jego lokalizacją i stopniem zróżnicowania.

Neurony współczulne autonomicznego układu nerwowego mają zdolność do syntezy dopaminy i noradrenaliny, podczas gdy komórki rdzenia nadnerczy ze względu na obecność n-metylotransferazy mają również zdolność do syntezy adrenaliny. Takie same właściwości biochemiczne mają wysokodojrzałe guzy wywodzące się z komórek progenitorowych autonomicznego układu nerwowego (przyzwojaki) lub guzy chromochłonne. Stopień zróżnicowania guza, który zależy od mutacji germinacyjnej, leżącej u podłoża jego rozwoju lub od mutacji somatycznych może zmieniać właściwości biochemiczne guza, poprzez zmniejszenie lub brak aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie amin katecholowych.

Lokalizacja guza – uważa się, że guzy położone pozanadnerczowo czterokrotnie częściej rozwijają się na podłożu predyspozycji dziedzicznej aniżeli guzy chromochłonne, zwykle na podłożu mutacji genów SDHx. I tak guzy regionu głowy i szyi z dodatnim wywiadem rodzinnym rozwijają się u nosicieli mutacji genu SDHD a nosiciele mutacji SDHB mają zwykle pojedyncze zmiany pozanadnerczowe bez dodatniego wywiadu rodzinnego. Guzy zlokalizowane w nadnerczach, szczególnie rozpoznane po 45 roku życia mogą być guzami sporadycznymi, jednak u osób młodych wymagają wykluczenia mutacji w genach RET, vHL, TMEM 127 i MAX.

Pamiętaj

1. Guzy chromochłonne i przyzwojaki są guzami czynnymi hormonalnie i nie leczone mogą stanowić zagrożenie dla życia ze względu na ostre powikłania ze strony układu krążenia.
2. Wymagają pilnej diagnostyki biochemicznej, radiologicznej i w niektórych przypadkach funkcjonalnej a potem leczenia operacyjnego po przygotowaniu farmakologicznym. W przypadku guzów nieoperacyjnych lub/i złośliwych stosowana jest terapia izotopowa – ¹³¹MIBG lub leczenie znakowanymi izotopowo analogami somatostatyny. W nisko zróżnicowanych i progresywnych nowotworach może być stosowana chemioterapia. W zespołach uwarunkowanych dziedzicznie, kiedy istnieje konieczność przeprowadzenia operacji guza chromochłonnego i innego nowotworu (np. raka rdzeniastego tarczycy w zespole MEN 2 lub raka nerki w zespole vHL) operację guza chromochłonnego zawsze przeprowadza się jako pierwszą.
3. Wysoka częstość postaci uwarunkowanych dziedzicznie u chorych z guzami chromochłonnymi/pryzwojakami nakłada na lekarza leczącego obowiązek przeprowadzenia diagnostyki różnicowej pomiędzy postaciami sporadycznymi a uwarunkowanymi

dziedzicznie, obejmującej dane z wywiadu osobniczego i rodzinnego, badanie fizykalne oraz diagnostykę DNA. Wybór i kolejność genów badanych zależy od lokalizacji guza, profilu biochemicznego guza oraz jego złośliwości.

4. Badanie DNA u nosicieli mutacji (lub stwierdzenie guza sporadycznego) pozwala na racjonalne zaplanowanie sposobu leczenia i monitorowania chorego oraz pozwala na ocenę nosicielstwa mutacji u członków jego rodziny.
5. Diagnostykę DNA guzów chromochłonnych i przyzwojaków przeprowadza się w Zakładzie Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej Centrum Onkologii w Gliwicach, ul Wybrzeże Armii Krajowej 15 (sekretariat tel.: 32 278 93 01, Laboratorium: 32 278 97 20)

PIŚMIENNICTWO:

1. Bausch B, Schiavi F, Ni Y et al.: Clinical Characterization of the Pheochromocytoma and Paraganglioma Susceptibility Genes SDHA, TMEM127, MAX, and SDHAF2 for Gene-Informed Prevention. *JAMA Oncol.* 2017 Sep 1;3(9):1204-1212.
2. Castinetti F, Qi XP, Waltz MK et al.: Outcomes of adrenal-sparing surgery or total adrenalectomy in pheochromocytoma associated with multiple endocrine neoplasia type 2: an international retrospective population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 May;15(6):648-55.
3. Fishbein L, Nathanson K. Pheochromocytoma and paraganglioma: understanding the complexities of the genetic background. *Cancer Genet.* 2012, 205(1-2), 1-11.
4. Gupta G, Pacak K.: Precision medicine: An update on genotype-biochemical phenotype relationships in pheochromocytoma/paraganglioma patients. *Endocr Pract.* 2017 Jun;23(6):690-704.
Januszewicz A, Januszewicz W, Jarzab B i wsp.: Wytyczne dotyczące diagnostyki i leczenia chorych z guzem chromochłonnym. *Nadciśnienie tętnicze*, 2006, 10 (1), 1-13.
5. Hasse-Lazar K, Szpak-Ulczok S, Jarzab B: Diagnostyka molekularna w rozpoznawaniu chorób nadnerczy. W „Diagnostyka i leczenie chorób nadnerczy” pod redakcją Macieja Otto, 2013, PZWL, 168-173.
6. Kotecka-Blicharz A, Hasse-Lazar K, Jurecka-Lubieniecka B et al.: Occurrence of pheochromocytoma tumours in RET mutation carriers - a single-centre study. *Endokrynol Pol.* 2016;67(1):54-8.
7. Lenders J, Duh Q, Eisenhofer et al.: Pheochromocytoma and paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014, 99(6):1915-1942.
8. Pillai S, Gopalan V, Smith R et al.: updates on the genetics and the clinical impacts on pheochromocytoma and paraganglioma in the new era. *Clin Rev in Oncol and Hematol*, 2016, 100, 190-208.
9. Morin A, Gimenez-Roqueplo A, Favier J: Oncometabolites-driven tumorigenesis: from genetics to targeted therapy. *Int.J. Cancer*: 2014, 135, 2237-2248.
10. Welander J, Söderkvist P, Gimm O. Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer.* 2011 Dec 1;18(6), 253-76.

Cezary Cybulski, Karol Krzystolik, Jan Lubiński



Choroba von Hippel-Lindau

Von Hippel-Lindau disease

Streszczenie

Choroba von Hippel-Lindau (VHL) jest zespołem zwiększonej genetycznej predyspozycji do nowotworów wykazującym rodowodowe cechy dziedziczenia autosomalnego dominującego. Schorzenie jest wywołane mutacjami germinalnymi genu *VHL*. Częstość występowania choroby ocenia się na 1/36 000 osób. Szacuje się, że w Polsce żyje około 1000 pacjentów z chorobą VHL. Nosiciele mutacji genu *VHL* obarczeni są ryzykiem występowania różnych nowotworów. Do istotnych z klinicznego punktu widzenia oraz charakterystycznych dla schorzenia zmian narządowych zaliczamy: naczyniaki zarodkowe (*hemangioblastoma*) mózdzku i rdzenia kręgowego (OUN-HB), naczyniaki zarodkowe siatkówki (R-HB), raka jasnokomórkowego nerki (CC-RCC), guzy chromochłonne nadnerczy (*pheochromocytoma*), guzy neuroendokrynne (PNET) oraz guzy worka endolimfatycznego (ELST). Zmiany takie jak torbiele i torbielakogruzołaki (*cystadenoma*) nerek, trzustki, najądrza i więzadła szerokiego macicy, również często występują w przebiegu VHL, lecz zwykle są bezobjawowe i nie stanowią znaczącego problemu klinicznego (1). Nowotwory u pacjentów z chorobą VHL, rozwijają się wielogniskowo, obustronnie oraz w młodym wieku. Rozpoznanie choroby VHL stawia się w oparciu o kryteria rodowodowo-kliniczne i/lub analizę nosicielstwa mutacji genu *VHL*. Opieka nad rodzinami z VHL polega na zastosowaniu programu badań profilaktyczno-diagnostycznych u osób z grupy ryzyka, który ma na celu wczesne wykrywanie i leczenie zmian nowotworowych. Ma to kluczowe znaczenie kliniczne, dlatego też wszystkie przypadki ze zmianami narządowymi charakterystycznymi dla VHL, również te, które nie spełniają klinicznych kryteriów rozpoznania VHL, powinny być poddane konsultacji genetycznej. Od 1997 roku istnieje Polski Rejestr VHL przy Międzynarodowym Ośrodku Nowotworów Dziedzicznych w Szczecinie. W ramach Rejestru prowadzona jest analiza molekularna mutacji genu *VHL*, badania profilaktyczno-diagnostyczne oraz leczenie pacjentów z VHL.

Słowa kluczowe: VHL

Summary

Von Hippel-Lindau (VHL) disease is a rare autosomal dominant disorder. It occurs with a frequency 1/36 000 live births. We estimate that there are approximately 1000 VHL patients in Poland. VHL disease is caused by germline mutations in the VHL tumour suppressor gene. Carriers of germline mutations in VHL gene develop hemangioblastomas of the central nervous system and retina, renal cell carcinomas and pheochromocytomas, islet cell tumours of the pancreas, endolymphatic sac tumours, cysts and cystadenoma in the kidney, pancreas, epididymis and broad ligament. Tumors in VHL patients are often multifocal, bilateral and of early onset. The diagnosis of VHL is based on clinical criteria and analysis of mutations in the VHL gene. The management with VHL individuals involves clinical screening according to carefully planned surveillance schedule and early treatment of VHL tumours. The appropriate management may reduce morbidity and mortality. VHL gene testing and clinical evaluation should be performed, and family history should be obtained in all patients affected by VHL-associated lesions, also those with apparently sporadic tumours. In 1997, we established the Polish VHL Registry at the International Hereditary Cancer Center in Szczecin. The Registry provides appropriate management of patients affected with VHL disease in the Polish population, including DNA testing, surveillance and early treatment of VHL individuals.

Key words: VHL

MUTACJE GERMINALNE GENU *VHL*

Za rozwój VHL odpowiedzialne są mutacje konstytucyjne genu supresorowego *VHL* zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 3p25-26 (2). Sekwencja kodująca genu zawarta w 3 eksonach koduje białko o długości 213 aminokwasów. U większości osób z VHL mutacja konstytucyjna genu *VHL* jest dziedziczona od dotkniętego chorobą rodzica. U ok. 20% przypadków choroba rozwija się w następstwie nowej mutacji (mutacje *de novo*), a wywiad rodzinny odnośnie występowania choroby VHL w tych przypadkach jest ujemny. Rzadko (<1%) mutacja *de novo* rozwija się na etapie rozwoju zarodka i wówczas występuje jedynie w niektórych komórkach organizmu, a jej nosiciela nazywa się mozaiką (3).

Około 2/3 mutacji genu *VHL* stanowią małe zmiany występujące wewnątrz eksonów: substytucje pojedynczych zasad, małe delecje i małe insercje. Duże delecje wykrywa się u blisko 1/3 pacjentów z VHL. Za pomocą sekwencjonowania regionu kodującego połączonego z analizą dużych delecji ilościową techniką Southerna, mutacje germinalne *VHL* stwierdza się u blisko 100% rodzin z chorobą VHL (4). W naszym Ośrodku wykonujemy analizy (sekwencjonowanie, „long-range PCR” oraz „multiplex PCR”) umożliwiające identyfikację wszystkich typów mutacji genu *VHL*. Dotychczas wykryliśmy mutacje germinalne genu *VHL* w 34 polskich rodzinach dotkniętych chorobą: w tym duże delecje części lub całego genu *VHL* u 13/34 rodzin, a małe mutacje wewnątrzgenowe u 21/34 niespokrewnionych polskich rodzin z VHL (5-7). Analiza genu *VHL* jest rutynowo przeprowadzana u pacjentów z chorobą VHL rozpoznaną definitywnie oraz u osób z podejrzeniem choroby VHL. Szczególne znaczenie należy przypisać badaniu DNA w przypadkach podejrzanych o VHL, lecz niespełniających klinicznych kryteriów VHL. W takich trudnych diagnostycznie przypadkach wynik badania molekularnego często przesądza o rozpoznaniu.

PODZIAŁ KLINICZNY VHL

Zaobserwowano, że rodziny z chorobą VHL różnią się pod względem manifestacji narządowych choroby, co zależy od charakteru uszkodzenia genu *VHL*. W pewnych rodzinach (około 90% ogółu rodzin z VHL) występują naczyniaki zarodkowe ośrodkowego układu nerwowego i siatkówki, rak nerki, lecz nie stwierdza się występowania *pheochromocytoma*. Rodziny, w których nie występuje *pheochromocytoma* określa się jako VHL typu 1. W około 10% rodzin stwierdza się zmiany w obrębie siatkówki, układu nerwowego, nerek oraz dodatkowo występowanie guza nadnerczy. Rodziny, w których występuje *pheochromocytoma* określa się jako VHL typu 2 i dzieli się na 3 podtypy w zależności od częstości występowania raka nerki: typ 2A - niewielkie ryzyko raka nerki, typ 2B - częste występowanie raka nerki.

Rzadko stwierdza się przypadki, w których obserwuje się rodzinne występowanie *pheochromocytoma*, bez innych manifestacji narządowych VHL. Takie przypadki określane są jako VHL typu 2C.

Analiza genu *VHL* ujawniła, że prawie wszystkie przypadki choroby VHL typu 2 wywołane są poprzez niewielkie uszkodzenie genu *VHL* (uszkodzenie pojedynczych nukleotydów w DNA powodujące zaburzenie jednego aminokwasu w białku VHL, które są określane mianem mutacji typu „missense”), a większość pacjentów z VHL typu 1 posiada rozległe uszkodzenie genu *VHL* (o charakterze delecji lub insercji) (8).

Podział kliniczny choroby VHL jest niezwykle istotny z praktycznego punktu widzenia, gdyż członkowie rodzin typu 2 obciążeni są znacznym ryzykiem guza nadnerczy i powinni być bardzo starannie badani w kierunku występowania *pheochromocytoma*, bowiem guz nadnerczy jest często pierwszym objawem choroby u tych pacjentów (8).

KLINICZNE KRYTERIA ROZPOZNANIA VHL

Rozpoznanie choroby VHL stawiane jest na podstawie spełnienia następujących kryteriów rodowodowo-klinicznych:

- 1) u członka rodziny obciążonej chorobą VHL, u którego występuje co najmniej jedna ze zmian typu R-HB, OUN-HB, *pheochromocytoma*, mnogie torbiele nerek lub trzustki, brodawczak najądrza, CC-RCC;
- 2) u osoby z negatywnym wywiadem rodzinnym w przypadku stwierdzenia 2 lub więcej zmian charakterystycznych dla VHL (co najmniej dwa guzy typu OUN-HB lub R-HB, lub pojedynczy *haemangioblastoma* w połączeniu ze zmianą trzewną charakterystyczną dla VHL (9, 10).

CHARAKTERYSTYKA ZMIAN NARZĄDOWYCH

Nowotwory związane z VHL w odróżnieniu od niedziedzicznych często rozwijają się obustronnie, wieloogniskowo oraz w młodszym wieku. Około 67% pacjentów z VHL rozwija co najmniej jedną charakterystyczną zmianę narządową przed 30 rokiem życia, a aż 99% pacjentów w wieku 65 lat. Choroba może ujawniać się występowaniem zmian w jednym lub kilku narządach (tabela 1). Pierwszą rozpoznawaną zmianą jest: *haemangioblastoma* ośrodkowego układu nerwowego lub siatkówki u około 85% pacjentów, rak nerki u około 10% chorych oraz guz chromochłonny nadnerczy u około 5% pacjentów (10).

Nowotworami najwcześniej stwierdzanymi w przebiegu choroby są naczyniaki zarodkowe siatkówki. Nielezione guzy siatkówki prowadzą najczęściej do postępującego upośle-

dzenia wzroku. Zaleca się leczenie bezobjawowych naczynek za pomocą laseroterapii lub kriokoagulacji (11).

Naczyniaki zarodkowe OUN w przebiegu VHL mogą występować w każdej części OUN, choć najczęściej, w ok. 75% przypadków, lokalizują się w mózdku. W początkowej fazie rozwoju guzy te są bezobjawowe. Objawy zależą od lokalizacji guza, jego wielkości, a także ewentualnych zmian ciśnienia śródczaszkowego. W przypadku lokalizacji mózdkowej najczęściej pojawiają się bóle i/lub zawroty głowy, nudności i wymioty, zaburzenia chodu, splątana mowa, oczopląs i inne objawy mózdkowe oraz dysmetria i porażenie n. IX. Objawy mogą pojawiać się nagle po stosunkowo niewielkim urazie głowy lub kręgosłupa. W wyniku produkcji erytropoetyny przez guz może występować czerwienica. Jest to ważny wskaźnik, ponieważ ponowne pojawienie się poliglobulii po leczeniu operacyjnym może wskazywać na wznowę.

W *haemangioblastoma* rdzenia przedłużonego główne objawy to bóle głowy, nudności i wymioty, ataksja, ubytki w zakresie czucia i motoryki, zaburzenia połykania i oddychania, nadmierne ślinienie.

Tab. 1. Występowanie poszczególnych rodzajów zmian narządowych u pacjentów z VHL oraz prawdopodobieństwo występowania choroby VHL wśród ogółu osób, u których stwierdzono jedną ze zmian charakterystycznych dla tej choroby (wartości przybliżone) (1)

Rodzaj zmiany	Ryzyko pojawienia się zmiany u osób z VHL w wieku 30 lat	Ryzyko pojawienia się zmiany u osób z VHL w wieku 60 lat	Średni wiek rozpoznania	Najwcześniejszy wiek rozpoznania	Prawdopodobieństwo choroby VHL wśród ogółu pacjentów z daną zmianą
OUN-HB	44%	84%	30 lat	11 lat	Guz mózdku 20% Guz rdzenia 80%
R-HB	38%	70%	25 lat	<1 roku życia	85%
CC-RCC	5%	69%	37-44 lat	15 lat	<1%
Pheochromocytoma	VHL typu 2 40%	VHL typu 2 65%	20-27 lat	8 lat	7% (23% Niemcy)
	VHL typu 1 0%	VHL typu 1 0%			

Torbiele lub guzy trzustki	?	?	41 lat	15 lat	?
ELST	?	?	?	?	blisko 100%
Brodawczaki najądrza	?	?	?	17 lat	blisko 100%

Objawy mogące sugerować występowanie *haemangioblastoma* rdzenia kręgowego są bardzo niespecyficzne. Mogą to być bóle, niedowłady, zaniki mięśniowe, zaburzenia czucia powierzchniowego i/lub głębokiego. Zarówno w obrębie rdzenia kręgowego jak i przedłużonego może występować jamistość rdzenia (*syringomyelia*). Guzy OUN bezobjawowe wymagają monitorowania, natomiast zmiany powodujące objawy neurologiczne usuwa się za pomocą zabiegów neurochirurgicznych (1).

Torbiele nerek, częste w przebiegu VHL, nie powodują dolegliwości. CC-RCC zwykle rozwija się w obrębie torbieli. Objawy, przebieg kliniczny i powikłania CC-RCC są w zasadzie podobne jak w sporadycznych przypadkach raka nerki. Rak nerki w przebiegu VHL występuje jednak około 20 lat wcześniej, występuje obustronnie i wieloogniskowo. Ponieważ przerzuty CC-RCC w przebiegu choroby VHL pojawiają się stosunkowo późno, zmiany torbielowato-lite należy obserwować i usuwać dopiero, gdy osiągną wielkość powyżej 3 cm. Zaleca się zabieg oszczędzający nerkę – „nephronsparing burgery” (12, 13).

Większość zmian w trzustce ma charakter bezobjawowych pojedynczych lub częściowej mnogich torbieli. Guzy lite w obrębie tego narządu występują rzadziej, a wśród nich dominują guzy neuroendokrynne (PNET) tzw. wyspiaki trzustki (14).

Worek i przewód endolimfatyczny są ektodermalnymi wypustkami części błoniastej labiryntu ucha wewnętrznego. Guzy worka endolimfatycznego (ELST; *endolymphatic sac tumor*) wzrastając niszczą struktury ucha wewnętrznego i w następstwie powodują różnego stopnia upośledzenie słuchu. Nowotwory ELST wykrywane są u około 10% pacjentów z VHL. Leczeniem z wyboru jest operacyjne usunięcie guza (15).

Częste u mężczyzn z VHL są brodawczaki najądrza (1). Zmiany te nie wymagają leczenia.

Guz chromochłonny zwykle rozwija się w jednym lub obu nadnerczach, lecz może lokalizować się wzdłuż całego pnia współczulnego w obrębie jamy brzusznej, klatki piersiowej, szyi i głowy. W VHL *pheochromocytoma* złośliwieje wyjątkowo rzadko. *Pheochromocytoma* może powodować okresowe lub utrwalone nadciśnienie. Do innych objawów należą

napady potów, bólów głowy, niepokoju, kołatania serca, nudności, bóle brzucha, hipotonia ortostatyczna, hiperglikemia. W rzadkich przypadkach komórki guza chromochłonnego wydzielają dopaminę mogącą być powodem hipotonii oraz ACTH dając obraz zespołu Cushinga. Objawy, często bardzo gwałtowne, mogą być wywołane przez badanie palpacyjne jamy brzusznej, zmianę pozycji pacjenta, środki znieczulające, beta-blokery. Często *pheochromocytoma* nie wywołuje żadnych dolegliwości. Leczenie objawowych i/lub czynnych hormonalnie guzów jest operacyjne. Optymalnym zabiegiem jest „tumorektomia” (adrenal sparing surgery). W niektórych ośrodkach wykonuje się leczenie laparoskopowe. Małe, hormonalnie nieczynne guzy można obserwować. Właściwe postępowanie obejmuje alfa-adrenergiczną blokadę przed operacją, nawet, jeśli u pacjenta nie stwierdzono nadciśnienia. Diagnostyka kliniczna *pheochromocytoma* obejmuje pomiar wydalania amin katecholowych z moczem, badanie obrazowe KT lub MRI nadnerczy, opcjonalnie scyntyografię nadnerczy z MIBG. W przypadku braku zmian patologicznych w nadnerczach należy pamiętać o możliwym umiejscowieniu pozanadnerczowym guza chromochłonnego. Około 5% pacjentów z VHL umiera z powodu przełomu nadnerczowego. Dlatego przed każdym zabiegiem operacyjnym osoby z VHL należy wykluczyć obecność guza nadnerczy lub przyzwojaków (16-19).

SCHEMAT BADAŃ DIAGNOSTYCZNYCH PACJENTÓW Z VHL

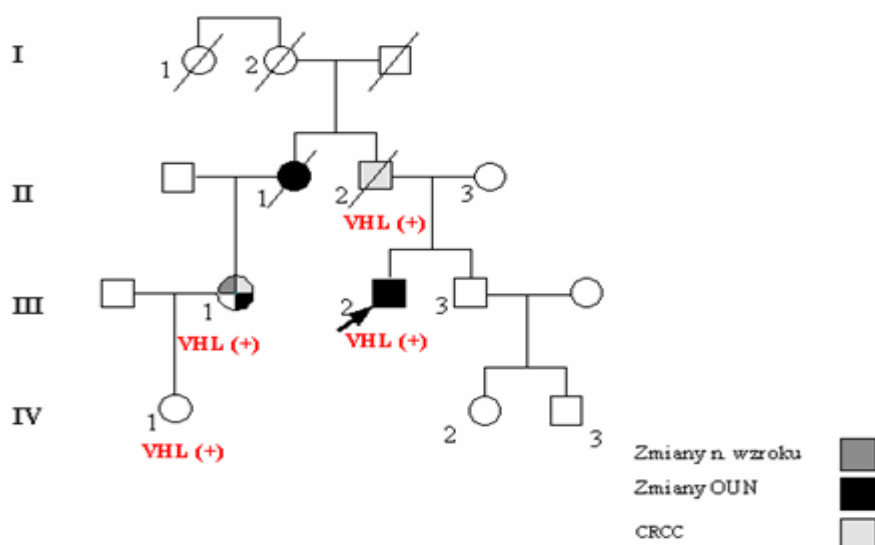
Opieka nad rodzinami z VHL powinna opierać się na zastosowaniu programu badań profilaktyczno-diagnostycznych u osób z grupy ryzyka, również u dzieci, mającego na celu wczesne wykrywanie i leczenie nowotworów związanych z VHL. Program badań diagnostyczno-profilaktycznych (tabela 2) powinien być koordynowany przez zespół lekarzy mających doświadczenie w opiece nad rodzinami z VHL.

W zaleceniach należy też pamiętać o konieczności:

1) konsultacji laryngologicznej w każdym przypadku pojawienia się objawów ze strony narządu słuchu i równowagi; 2) konsultacji neurologicznej zawsze w przypadku pojawienia się objawów neurologicznych; 3) ścisłej kontroli w czasie ciąży; 4) obowiązku wykluczenia obecności guza chromochłonnego przed każdym znieczuleniem ogólnym i zabiegiem operacyjnym. Wczesne wykrycie nowotworów umożliwia zastosowanie skutecznego leczenia, łagodzi przebieg choroby i wydłuża okres przeżycia pacjentów z VHL (20). Poniżej przedstawiono przypadek ilustrujący znaczenie zastosowania programu badań okresowych we wczesnym rozpoznaniu zmian narządowych u członków rodziny z VHL (ryc. 1).

Tab. 2. Program badań profilaktyczno-diagnostycznych w rodzinach z VHL

Badanie	Wiek rozpoczęcia i częstość
Katecholaminy w moczu	noradrenalina (ew. kw. wanilinomigdałowy) - co 1-3 lata w zależności od typu VHL i objawów
Oftalmoskopia	od wieku niemowlęcego - co rok (w lustrze Goldmanna od 6 r. ż.) po leczeniu - co 6 miesięcy
Angioskopia lub angiografia fluoresceinowa	przy rozpoznaniu choroby i następnie co 2-3 lata
MRI mózgowia i rdzenia kręgowego (gadolinium-DTPA)	od 11 r.ż. co 2 lata po 60 r.ż. co 3-5 lat
KT, MRI i USG jamy brzusznej	od 11 r.ż. - USG co rok od 20 r.ż. KT lub MRI co 2 lata dokładna ocena zmian w czasie ciąży



Ryc. 1. Opis przypadku.

U pacjenta lat 14 (III-2) z objawami zawrotów i bólów głowy po stwierdzeniu w badaniu KT guza mózdzku wykonano zabieg neurochirurgiczny - w badaniu histopatologicznym rozpoznano *haemangioblastoma*. Wykonane badanie molekularno-genetyczne z krwi obwodowej pacjenta wykazało obecność mutacji konstytucyjnej genu *VHL*, co skłoniło do wnikliwej analizy rodowodowo-klinicznej rodziny. Ojciec probanta (II-2) zmarł w wieku

lat 56 w 3 dobie po operacji z powodu perforującego wrzodu żołądka. Według informacji uzyskanych od jego żony (III-3) miesiąc przed operacją „oddawał skrzepy w moczu”. W badaniu RTG klatki piersiowej wykonanym przed operacją stwierdzono guza płuc. Sekcja zwłok nie była wykonywana. Z informacji uzyskanych od rodziny dowiedziano się również, iż siostra ojca probanta (II-1) zmarła w 3 tygodniu po porodzie - autopsja wykazała guza mózdzku.

Telefonicznie udało się skontaktować z kuzynką probanta (III-1). Osoba ta skarżyła się na silne zawroty głowy; w wywiadzie przed 29 laty zaniewidziała na jedno oko, przed 23 laty przebyła operację guza mózdzku - rozpoznano wówczas *astrocytoma*. U pacjentki wykonano KT, które wykazało bardzo duży guz mózdzku, oraz guz w obrębie kąta mostowo-mózdzkowego, środkowej części piramidy kości skroniowej i otworu prawej żyły szyjnej. W badaniu USG jamy brzusznej stwierdzono obustronne guzy lito-torbielowate nerek. Początkowo wysunięto podejrzenie: 1) wznowy *astrocytoma* mózdzku - kwalifikując chorą do zabiegu operacyjnego i radioterapii; 2) *chemodectoma* opuszki żyły szyjnej - kwalifikując do obserwacji guza; 3) naczyniaków nerek. Po konsultacji chorej w ramach PRVHL przy cechach rodowodowo klinicznych silnie wskazujących na VHL u pacjentki za najbardziej prawdopodobne uznano odpowiednio: 1) rozwój nowego ogniska *haemangioblastoma* mózdzku - kwalifikując chorą do zabiegu neurochirurgicznego bez radioterapii, 2) obecność guza typu ELST - zalecając obserwację guza; 3) podejrzenie obustronnego raka nerek - kwalifikując chorą do zabiegu. Wykonane zabiegi neurochirurgiczny i urologiczny i badania histopatologiczne potwierdziły te podejrzenia. Operację nerek przeprowadzono stosując technikę „nephron sparing burgery” - po zabiegu nerki chorej pozostały wydolne. Badania molekularno-genetyczne potwierdziły rozpoznanie VHL. Z wywiadu uzyskanego od pacjentki uzyskano informację, iż babcia jej i probanta oraz siostra babci (I-1 i I-2) zmarły podobnie jak jej matka kilka tygodni po porodzie. Jest prawdopodobne, iż zgony te również spowodowane były przez powikłania narządowe VHL. Z danych rodowodowo-klinicznych wynika również, iż ojciec probanta (II-2) był nosicielem obligatoryjnym mutacji genu *VHL*, a obraz kliniczny przemawiał za obecnością u niego CC-RCC z prawdopodobnym przerzutem do płuc.

Wykonane badania molekularno-genetyczne umożliwiły w tej rodzinie wykrycie jednej osoby (IV-1) będącej bezobjawowym nosicielem mutacji *VHL*, bez zmian narządowych i zalecenie u niej programu badań okresowych oraz wykluczenie VHL u 4 innych członków rodziny (II-3, III-3, IV-2, IV-3).

KTÓRYCH PACJENTÓW NALEŻY DIAGNOZOWAĆ W KIERUNKU VHL?

Każdy przypadek guza mózdzku typu *hemangioblastoma*, naczyneków siatkówki, *pheochromocytoma*, CC-RCC przed 50 rokiem życia nawet, jeżeli u pacjenta i w rodzinie jest to pojedyncza zmiana powinien być skierowany na konsultację genetyczną w kierunku choroby VHL. Uważamy, że najbardziej właściwe jest diagnozowanie i prowadzenie rodzin z VHL w stałej współpracy z Polskim Rejestrem VHL działającym przy naszym Ośrodku.

PIŚMIENNICTWO

1. Krzystolik K, et al.: Choroba Hippel-Lindau. *Neur i Neurochir Pol* 1998, 32 (XLVIII), 5.
2. Latif F, et al.: Identification of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Science* 1993, 260: 1317-20.
3. Sgambati MT, et al.: Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: lessons from kindreds with germline mutations identified in offspring with mosaic parents. *Am J Hum Genet* 2000, 66: 84-91.
4. Stolle C, et al.: Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat* 1998, 12: 417-23.
5. Cybulski C, et al.: Long polymerase chain reaction in detection of germline deletions in the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene. *Hum Genet* 1999, 105: 333-6.
6. Cybulski C, et al.: Germline mutations in von Hippel-Lindau (VHL) gene in patients from Poland: disease presentation in patients with deletions of the entire *VHL* gene. *J Med Genet* 2002, 39: E38.
7. Cybulski C, et al.: Gene symbol *VHL*, Disease: von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Genet* 1999, 104: 194.
8. Chen F, et al.: Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* 1995, 5: 66-75.
9. Maher ER, et al.: Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet* 1991, 28: 443-7.
10. Maher ER, et al.: Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med* 1990, 77: 1151-63.
11. Krzystolik K, et al.: Choroba von Hippel-Lindau, *Okulistyka* 2000, 1: 60-5.
12. Krzystolik K, et al.: Wczesna diagnostyka bezobjawowych raków nerek w rodzinach z zespołem von Hippel-Lindau w Polsce. *Urologia Polska* 1998, 51: 171-81.
13. Słojewski M, et al.: Zastosowanie techniki nephron-sparing burglary (NSS) w leczeniu nowotworów nerek w przebiegu zespołu von Hippel-Lindau. *Urol Pol* 1998, 51: 182-90.
14. Bickler S, et al.: Pancreatic involvement in Hippel-Lindau disease. *West J Med* 1984, 140: 280-2.
15. Manski TJ, et al.: Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA* 1997, 277: 1461-6.
16. Manger T, et al.: Bilateral laparoscopic transperitoneal adrenalectomy in pheochromocytoma. *Langenbecks Arch Chir* 1997, 382: 37-42.
17. Walther MM, et al.: Management of hereditary pheochromocytoma in von Hippel-Lindau kindreds with partial adrenalectomy. *Urol* 1999, 161: 395-8.
18. Walther MM, et al.: Von Hippel-Lindau disease and pheochromocytoma. *JAMA* 1996, 275: 839-40.
19. Walther MM, et al.: Clinical and genetic characterization of pheochromocytoma in von Hippel-Lindau families: comparison with sporadic pheochromocytoma gives insight into natural history of pheochromocytoma. *J Urol* 1999, 162: 659-64.
20. Maddock IR, et al.: A genetic register for von Hippel-Lindau disease. *J Med Genet* 1996, 33:

Tadeusz Dębniak, Jan Lubiński



Genetyka kliniczna czerniaka

Clinical genetics of malignant melanoma

Streszczenie

Czerniak złośliwy jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów, jego częstość wzrasta gwałtownie w ostatnich latach. Zwiększone ryzyko zachorowania na czerniaka u potomstwa osób chorych na ten nowotwór jak również rodzinne agregacje tego nowotworu sugerują, że predyspozycja genetyczna jest istotnym czynnikiem uczestniczącym w patogenezie czerniaka. Rodzinny czerniak stanowi najprawdopodobniej heterogenną grupę przypadków o różnym typie dziedziczenia, w większości przypadków wielogenowym. Nierzadko obserwuje się jednak rodzinne agregacje wykazujące cechy autosomalnie dominującego typu dziedziczenia, charakterystycznego dla chorób jednogenowych o wysokiej penetracji. Podłoże genetyczne czerniaka jest złożone i zależne od wielu genów. Głównym genem ryzyka jest *CDKN2A*. Częsta konstytucyjna zmiana tego genu - A148T, zwiększa ryzyko zachorowania na czerniaka niezależnie od nowotworowego wywiadu rodzinnego. Mutacje genów *ARF* oraz *CDK4*, związane z wysokim ryzykiem zachorowania na MM, są niezwykle rzadkie i nie mają istotnego znaczenia w praktyce klinicznej. W większości rodzinnych czerniaków mutacje genu *CDKN2A* nie występują, co wskazuje na potrzebę identyfikacji nowych genów związanych z predyspozycją do tego nowotworu. Poznano kilka genów/mutacji umiarkowanie modyfikujących ryzyko MM. Ich lista obejmuje *XPD*, *MC1R*, *BRCA2*. Wdrożenie odpowiednich programów diagnostyczno-profilaktycznych oraz leczniczych może zmniejszyć zachorowalność i śmiertelność. Testy genetyczne oraz analizy danych rodowodowo-klinicznych powinny być wykonywane u wszystkich pacjentów z rozpoznaniem czerniakiem, także w przypadkach z ujemnym wywiadem rodzinnym.

Słowa kluczowe: czerniak (MM), *CDKN2A*

Summary

Malignant melanoma (MM) represents one of the most aggressive neoplasms and its frequency is increasing rapidly. Increased melanoma risk among relatives of MM patients and familial aggregations of this malignancy point at genetic predisposition as an important factor of MM pathogenesis. Familial MM constitutes most probably a heterogenous group of disorders characterized by occurrence of MM among relatives. The mode of inheritance is controversial and most likely polygenic, however not infrequently, within large families aggregations of MM is consistent with autosomal dominant inheritance.

The genetic basis of MM is complex and appears to involve multiple genes. CDKN2A is regarded as the major MM susceptibility gene. In the Polish population common CDKN2A variant (A148T) increases significantly melanoma risk regardless of the cancer family history. Mutations of other high risk genes, ARF and CDK4 are extremely rare and thus clinically insignificant. In majority of MM cases CDKN2A mutations are not found. It is thus necessary to perform association studies focused on identifying genetic markers that could be used in identifying patients with a high risk of MM. List of other genes that carry mutations, which are believed to be associated with moderate MM risk include XPD, MC1R, BRCA2. The management with individuals being at increased MM risk involves clinical screening according to carefully planned surveillance schedule and early treatment of MM tumour. The appropriate management may reduce morbidity and mortality. Genetic testing and clinical evaluation should be performed, and family history should be obtained in all patients affected with MM, also in those with apparently sporadic tumours.

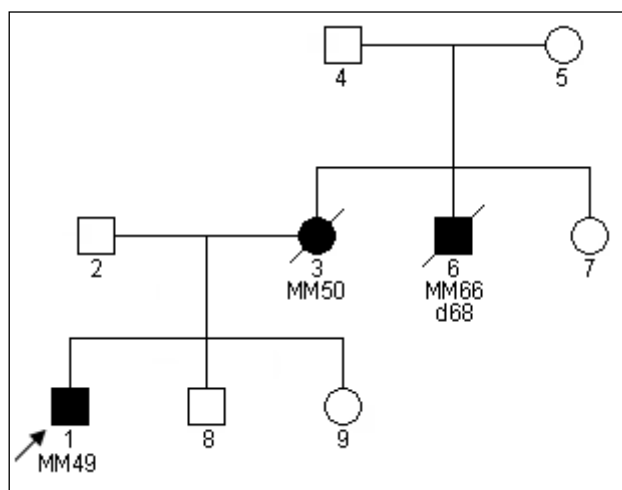
Key words: malignant melanoma (MM), CDKN2

Czerniak złośliwy (MM) jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych. Każdego roku w Polsce jest odnotowywanych niemal 2 tys. nowych zachorowań na czerniaka (1).

Liczba zachorowań na ten nowotwór wśród ludzi rasy białej dramatycznie wzrosła w ostatnich latach - niemal 10-krotnie w ciągu ostatnich 50 lat (2). Uważa się, że jednym z głównych czynników sprawczych wystąpienia czerniaka jest promieniowanie ultrafioletowe (3). Szczególnie niebezpieczne wydają się być oparzenia słoneczne w dzieciństwie (4). Kolejnymi czynnikami ryzyka są: 1) dysplastyczne znamiona barwnikowe; 2) duża liczba (>100) znamion barwnikowych; 3) jasna karnacja skóry (typ I i II skóry) (5, 6).

Zwiększone ryzyko zachorowania na czerniaka u potomstwa osób chorych na ten nowotwór (7, 8) jak również rodzinne agregacje tego nowotworu sugerują, że predyspozycja genetyczna jest kolejnym istotnym czynnikiem uczestniczącym w patogenezie czerniaka. Rodzinną agregację czerniaka można zdefiniować jako: 1) wystąpienie czerniaka złośliwego u przynajmniej dwóch krewnych I°; lub 2) wystąpienie czerniaka u przynajmniej dwóch krewnych I° lub II°. Stwierdza się ją w około 3-15% wszystkich zdiagnozowanych przypadków czerniaka (9). W naszym ośrodku wśród 665 nieselekcjonowanych pacjentów rodzinna agregacja u krewnych I° występowała w 24 przypadkach (3,6%).

W części rodzin opisano współistnienie czerniaka skóry oraz gałki ocznej (10). Jak dotąd nie wiadomo jednak czy czerniak gałki ocznej jest częścią zespołu rodzinnego czerniaka skóry (rycina 1).



Ryc. 1. Rodzinne występowanie czerniaka u krewnych I° probanta z rozpoznany czerniakiem złośliwym.

W części rodzin występuje zwiększone ryzyko MM oraz nowotworów złośliwych innych narządów, takich jak rak trzustki, piersi czy guzy ośrodkowego układu nerwowego (11-

14). Podjęte w naszym Ośrodku badania rodzin z silną rodzinną agregacją nowotworów różnych narządów (CFA) sugerują trzykrotnie zwiększone ryzyko wystąpienia raka piersi w młodym wieku (przed 50 r.ż.) wśród krewnych I° pacjentów z MM rozpoznany do 55. roku życia. Rodzinny czerniak stanowi najprawdopodobniej heterogenną grupę przypadków o różnym typie dziedziczenia, w większości przypadków wielogenowym (15). Nierzadko obserwuje się jednak rodzinne agregacje wykazujące cechy autosomalnie dominującego typu dziedziczenia, charakterystycznego dla chorób jednogenowych o wysokiej penetracji.

CZERNIAK ZŁOŚLIWY SPOWODOWANY MUTACJAMI KONSTYTUCYJNYMI GENU *CDKN2A*

Czerniak złośliwy występuje ze zwiększoną częstością u nosicieli mutacji genu *CDKN2A* (16, 17). Penetracja tego genu jest zmienna i zależna od wieku jak również położenia geograficznego (18). Mutacje germinalne genu *CDKN2A* wykryto w 46% rodzinnych czerniaków we Francji, 18% rodzinnych przypadków w Stanach Zjednoczonych, 8% w Szwecji i mniej niż 6% w Polsce (19, 20, 21, 22, 23). Szacuje się, że mutacje genu *CDKN2A* są obecne w około 20% rodzin zagregacjami czerniaka (24), zaś w przypadkach sporadycznych prawdopodobieństwo wystąpienia tych mutacji nie przekracza 1% (25)

Przypuszcza się, że częstość występowania zmian w *CDKN2A* koreluje z liczbą zachorowań na MM w rodzinie oraz młodym wiekiem (<50 r.ż.) (26). Uzasadnione wydaje się poszukiwanie mutacji genu *CDKN2A* u pacjentów z rodzinną agregacją czerniaka w przypadkach: 1) występowania trzech lub więcej pierwotnych ognisk czerniaka u pacjenta; 2) rozpoznania czerniaka u przynajmniej trzech krewnych 1 lub 2-go stopnia ; 3) występowania czerniaka i raka trzustki u przynajmniej 3 lub więcej krewnych po tej samej stronie rodziny (27).

BADANIA DNA W DIAGNOSTYCE MM

Mutacje genów ARF oraz CDK4, związane z wysokim ryzykiem zachorowania na MM, wykryto jak dotąd jedynie w kilku rodzinach na świecie, nie mają więc istotnego znaczenia w praktyce klinicznej. Niedawno zidentyfikowano inne geny wysokiego ryzyka czerniaka, takie jak BAP1, TERT, ACD, TERF2IP czy POT1 – ich mutacje są również obecne w bardzo małym odsetku rodzin z agregacjami czerniaka (28). Za wyjątkiem genu *CDKN2A* właściwe geny wysokiego ryzyka MM nie zostały jeszcze zidentyfikowane. W większości rodzinnych czerniaków mutacje genu *CDKN2A* nie występują, co wskazuje na potrzebę identyfikacji nowych genów związanych z predyspozycją do tego nowotworu. Wyniki najnowszych badań wielośrodkowych analiz sprzężeń genomu (GWAS) wykazały silny związek z czer-

niakiem trzech regionów: 16q24, 11q14-q21, 9p21, trwają obecnie prace nad identyfikacją potencjalnych genów-kandydatów znajdujących się w tych regionach (29). Poznano kilka genów/mutacji umiarkowanie modyfikujących ryzyko MM. Współdziałanie średniego ryzyka mutacji w wielu genach oraz dodatkowo wpływ czynników środowiskowych może znacząco zwiększać ryzyko MM. Wydaje się, że uszkodzenia DNA umiarkowanie modyfikujące ryzyko zachorowania odpowiadają za mało nasilone rodzinne agregacje zachorowań.

Przeprowadzone w naszym Ośrodku badania genu *CDKN2A* u pacjentów z MM wykazały, że częsty wariant A148T ponad dwukrotnie zwiększa ryzyko czerniaka niezależnie od wywiadu rodzinnego, zwłaszcza w młodym (<50 roku życia) wieku (30). Testy DNA można również wykonywać dla takich genów jak *MC1R*, *XPD* czy *BRCA2*. Poziom zwiększenia ryzyka MM dla mutacji/ /polimorfizmów tych genów jest umiarkowany, w granicach 1,5-3 razy (31, 32, 33). W chwili obecnej w 72% kolejnych nieselekcjonowanych czerniaków badanych w naszym Ośrodku stwierdza się obecność co najmniej jednej z wyżej wymienionych zmian.

BADANIA SKRYNINGOWE W RODZINACH Z CZERNIAKIEM

Wszyscy pacjenci z czerniakiem i ich krewni I° oraz II° co 6 miesięcy powinni zgłaszać się na dokładne badanie dermatologiczne. W przypadku obecności znamion dysplastycznych konsultacje powinny odbywać się co 3 miesiące. Zaleca się usuwanie jedynie tych znamion, które wykazują cechy transformacji nowotworowej (powiększanie się zmian, obecność obwódki zapalnej, krwawienie, świąd itp.) oraz są zlokalizowane w miejscach narażonych na urazy mechaniczne.

U pacjentów ze stwierdzoną mutacją w genie *CDKN2A* lub z rodzinną agregacją czerniaka lub z agregacją czerniaka i raka trzustki wskazane jest wdrożenie odpowiednich programów profilaktyczno-diagnostycznych dla raka trzustki.

Wykonywanie badań kontrolnych piersi od 35-40 roku życia należy przedstawić jako opcję dla kobiet z rodzin z przynajmniej trzema zachorowaniami na nowotwory złośliwe różnych narządów wśród krewnych I° - w tym na czerniaka złośliwego rozpoznanego poniżej 56. roku życia - nie spełniających rodowodowo-klinicznych kryteriów żadnego ze znanych zespołów wysokiej dziedzicznej predyspozycji do nowotworów (CFA).

PIŚMIENNICTWO

1. Zatoński W, Tyczyński J: Cancer in Poland in 2003. The Maria-Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center, Department of Epidemiology and cancer Prevention, National Cancer Registry, Warsaw 2004.
2. Weinstock MA: Issues in the epidemiology of melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998, 12: 681-98.
3. English DR, et al.: Sunlight and cancer. Review. *Cancer Causes Control* 1997, 8: 271-83.

4. Whiteman DC, Whiteman AC, Green AC: Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma - a systematic review of epidemiological studies. *Cancer causes control* 2001, 12: 69-82.
5. Wachsmuth RC, Harland M, Bishop JA: The atypical-mole syndrome and predisposition to melanoma. *N Engl J Med* 1998, 339: 348-9.
6. Grange F, et al.: Comparison between familial and nonfamilial melanoma in France. *Arch Dermatol* 1995, 131: 1154-9.
7. Hemminki K, et al.: The nation-wide Swedish family-cancer database-updated structure and familial rates. *Acta Oncol* 2001, 40: 772-7.
8. Goldgar DE, et al.: Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86: 1600-8.
9. Berwick M, Wiggins C: The current epidemiology of cutaneous malignant melanoma. *Front Biosci.* 2006; 11: 1244-54.
10. de Snoo FA, Bergman W, Gruis NA: Familial melanoma: a complex disorder leading to controversy on DNA testing. *Fam Cancer* 2003, 2: 109-16.
11. Whelan AJ, Bartsch D, Goodfellow PJ: Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the *CDKN2* tumor-suppressor gene. *New Eng J Med* 1995, 33: 975-7.
12. Parker JF, et al.: Pancreatic carcinoma surveillance in patients with familial melanoma. *Arch Dermatol* 2003, 139: 1019-25.
13. Borg A, et al.: High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in *CDKN2A* mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92: 1260-6.
14. Kaufman DK, et al.: A familial syndrome with cutaneous malignant melanoma and cerebral astrocytoma. *Neurology* 1993, 43: 1728-31.
15. Tsao H: Update on familial cancer syndromes and the skin. *J Am Acad Dermatol* 2000, 42: 939-71.
16. Hussussian CJ, et al.: Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994, 8: 15-21.
17. Kamb A, et al.: Analysis of the p16 gene (*CDKN2*) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994, 8: 22-6.
18. Bishop DT, et al.: Melanoma Genetics Consortium. Geographical variation in the penetrance of *CDKN2A* mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94: 894-903.
19. Soufir N, et al.: Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 1998, 7: 941.
20. FitzGerald MG, et al.: Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 8541-5.
21. Platz A, Hansson J, Ringborg U: Screening of germline mutations in the CDK4, *CDKN2C* and TP53 genes in familial melanoma: a clinic-based population study. *Int J Cancer* 1998, 25: 13-5.
22. Platz A, et al.: Screening of germline mutations in the *CDKN2A* and *CDKN2B* genes in Swedish families with hereditary cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89: 697-702.
23. Dębniak T, et al.: Germline mutation and large deletion analysis of the *CDKN2A* and ARF genes in families with multiple melanoma or an aggregation of malignant melanoma and breast cancer. *Int J Cancer* 2004, 110: 558-62.
24. Aoude LG, Wadt KA, Pritchard AL, Hayward NK. Genetics of familial melanoma: 20years after *CDKN2A*. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 Mar;28(2):148-60.
25. Harland M, Cust AE, Badenas C, Chang YM, Holland EA, Aguilera P, Aitken JF, Armstrong BK, Barrett JH, Carrera C, Chan M, Gascoyne J, Giles GG, Agha-Hamilton C, Hopper JL, Jenkins MA, Kanetsky PA, Kefford RF, Kolm I, Lowery J, Malvey J, Ogbah Z, Puig-Butille JA, Orihuela-Segalés J, Randerson-Moor JA, Schmid H, Taylor CF, Whitaker L, Bishop DT, Mann GJ, Newton-Bishop JA, Puig S. Prevalence and predictors of germline *CDKN2A* mutations for melanoma cases from Australia, Spain and the United Kingdom. *Hered Cancer Clin Pract.* 2014 Nov 20;12(1):20.
26. Bressac-de-Paillerets B, et al.: Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie* 2002, 84: 67-74.
27. Leachman SA, et al. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Oct;61(4):677.e1-14.
28. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-Butille JA, Carrera C, Malvey J, Puig S. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann Transl Med.* 2015 Sep;3(15):210.
29. Bishop DT et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):920-5.
30. Dębniak T, et al.: The *CDKN2A* common variants and their association with melanoma risk: a population based study. *Cancer Res* 2005, 65: 835-9.
31. Tomescu D, et al.: Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. *Carcinogenesis* 2001, 22: 403-8.

32. Dębniak T, et al. *MC1R* common variants, *CDKN2A* and their association with melanoma and breast cancer risk. *Int J Cancer* 2006, 119: 2597-602.
33. Scott RJ, et al.: *BRCA2* mutations in a population-based series of patients with ocular melanoma. *Int J Cancer* 2002, 102: 188-91.



Siatkówczak

Retinoblastoma

Streszczenie

Siatkówczak jest modelowym nowotworem o podłożu genetycznym. Warunkowany jest dominującymi mutacjami jednej kopii genu RB1, które mogą mieć charakter somatyczny (S. sporadyczny, zwykle jednostronny) lub konstytucyjny (często obustronny i/lub wieloogniskowy). Do powstania guza konieczne jest jeszcze „drugie trafienie”, które ma już charakter mutacji somatycznej. Unieczynnienie obu kopii genu odblokowuje cykl komorkowy w fazie G1-S i inicjuje nowotwór. Gen RB1 składa się z 27 eksonów, mutacje nie wykazują preferencji lokalizacyjnych typu hot spot (co utrudnia diagnostykę), jednak ostatnio opisano pewne preferencje lokalizacyjne i etniczne w charakterystyce mutacji. Omówiono uwarunkowania genetyczne i charakterystykę rodowodowo-kliniczną siatkówczaka. Podano zasady diagnostyki genetycznej siatkówczaka a także zasady opieki nad rodzinami obciążonymi zmutowanym genem. Z uwagi na występowanie nosicieli mutacji konstytucyjnych również w grupie pacjentów z guzami jednostronnymi sporadycznymi, wszyscy chorzy z siatkówczakiem, jak i ich rodzeństwo powinni być poddawani badaniom profilaktycznym do chwili potwierdzenia/wykluczenia mutacji. Nosicielstwo mutacji konstytucyjnej powoduje także w późniejszym życiu pacjenta podwyższone ryzyko innych pierwotnych nowotworów, zwłaszcza mięsaków.

Słowa kluczowe: siatkówczak, mutacje RB1, diagnostyka genetyczna, opieka i poradnictwo

Summary

Retinoblastoma genetics is modelling system for knowledge of basic features of all hereditary cancers. Tumour is caused by inactivating mutations of both copies of RB1 gene. They are transmitted as “one hit” in dominant manner, but inactivation of second gene copy is needed for initiation. In hereditary form (frequently bilateral / multifocal) first “hit” is as constitutional and inherited but a second hit is a somatic mutations. In sporadic form (mostly unilateral and unifocal) both “hits” are somatic mutations. Inactivation of both RB1 gene copies abolish cell cycle block between G1 and S phase initialize carcinogenesis. RB1 gene consists of 27 eksons, mutations do not exhibit hot spots, but some spatial and ethnic regularities were detected in last years. Hereditary determinations, clinical value of pedigree and molecular analyses of RB1 gene are described, as well as basic rules of familial care. Due to detection of constitutional mutations carrier status in some patients with non-familial, unilateral tumours (*de novo* and germ- line or low penetrant mutations) prophylactic investigations of all first degree relatives must be performed, until their molecular verification is done. Patients with constitutional mutations have also higher risk of secondary primary tumours, particularly sarcomas.

Key words: retinoblastoma, RB1 mutations, genetic diagnosis, familial care and counselling

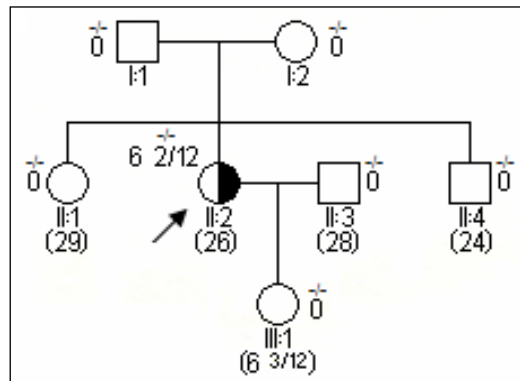
Siatkówczak (S) zajmuje szczególne miejsce wśród nowotworów - jest to pierwszy nowotwór o udowodnionej dziedzicznej etiologii, na którego przykładzie kształtowały się idee „dwu trafień” i genów supresorowych (1-3).

S pojawia się z częstością 1: 25 000 żywych urodzeń. Mimo swojej rzadkości S jest najczęstszym nowotworem wewnątrz gałkowym u dzieci a większość przypadków rozpoznawanych jest przed 5 r.ż. U dorosłych S jest wielką rzadkością. 60% przypadków S ma charakter sporadyczny w ścisłym znaczeniu tego słowa; są one wywołane mutacjami somatycznymi w komórkach siatkówki. Pozostałe 40% pacjentów to dzieci obciążone mutacjami konstytucyjnymi - wśród nich 10-15% to przypadki rodzinne a pozostałych 25-30% to przypadki rodowodowo sporadyczne, powstałe jednak w wyniku konstytucyjnej mutacji germinalnej *de novo*. Mutacja konstytucyjna ma penetrację sięgającą 90%. Do powstania nowotworu konieczne jest unieczynnienie białka pRB; które ma miejsce dopiero po utracie funkcji obu kopii genu (4).

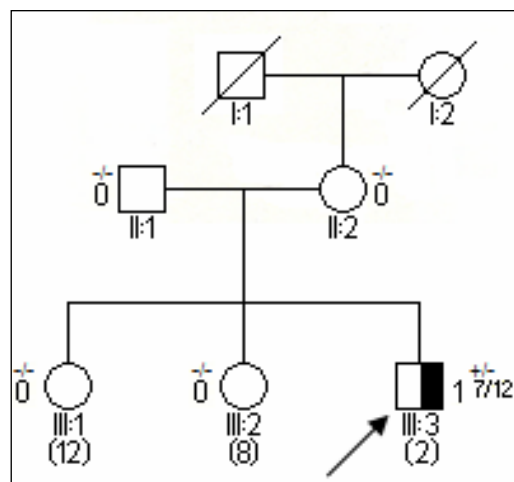
Prawdopodobieństwo powstania kolejnych dwu mutacji somatycznych genu RB1, następujących kolejno w tej samej komórce siatkówki - jak się to dzieje w S sporadycznym - (rycina 1) jest wprost proporcjonalne do długości życia komórki; tłumaczy to fakt pojawiania się takich guzów w późniejszym wieku aniżeli S wywołanych mutacją konstytucyjną, zwykle także jednostronnie i jednoogniskowo. Zgodnie z mechanizmem „dwu trafień” w guzach powstałych u osób z mutacją konstytucyjną, wobec jej istnienia już od urodzenia, do ostatecznego powstania nowotworu konieczna jest w komórce siatkówki już tylko pojedyncza mutacja somatyczna. Zdarzenie takie ma szansę zaistnieć wcześniej - stąd młodszy wiek chorych z S dziedzicznym. Druga mutacja - somatyczna, u nosiciela zmiany konstytucyjnej zdarzyć się może w większej liczbie komórek - stąd częsta wieloogniskowość i obustronność tych guzów (1, 3).

S obustronne i jednostronne wieloogniskowe są zatem praktycznie zawsze związane z istnieniem mutacji konstytucyjnej, przekazanej rodzinie lub nabytej *de novo*. Pojawiają się one w większości przypadków przed 3 r.ż. (rycina 2). Mutacje konstytucyjne mogą jednak powstawać również jako zmiany germinalne *de novo* (rycina 4); związane z nimi guzy, pomimo iż rodowodowo sporadyczne, wykazują inne cechy kliniczne - w tym zwłaszcza wcześniejsze wystąpienie - podobne jak w nowotworach rodzinnych. Pewien odsetek chorych - jak wynika z naszych badań sięgający 20% - jest mimo jednostronności w chwili rozpoznania obciążony mutacją konstytucyjną (3, 5). Przypadki takie charakteryzują się (w stosunku do innych S jednostronnych) wcześniejszym wystąpieniem guza, wieloogniskowością i wysokim

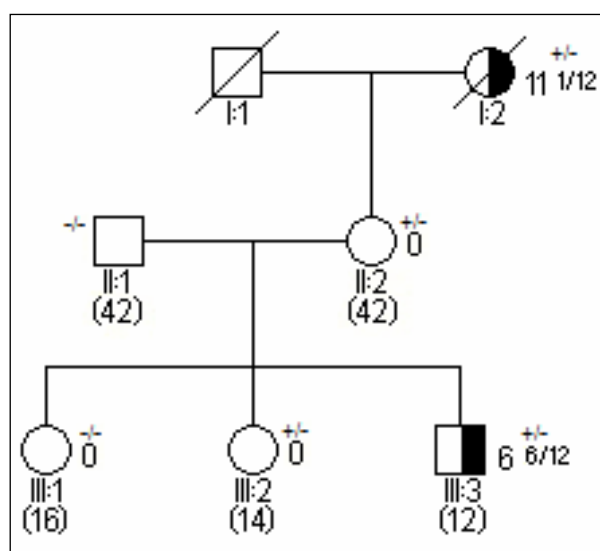
ryzykiem późniejszego pojawienia się nowego pierwotnego guza w tym samym lub drugim oku.



Ryc. 1. Rodowód w typowych uwarunkowaniach genetycznych, siatkówczak sporadyczny bez mutacji konstytucyjnej.



Ryc. 2. Rodowód w typowych uwarunkowaniach genetycznych, siatkówczak dziedziczny w wyniku mutacji konstytucyjnej o niepełnej penetracji.



Ryc. 3. Rodowód w typowych uwarunkowaniach genetycznych, siatkówczak dziedziczny w wyniku mutacji konstytucyjnej o wysokiej penetracji.

GEN I BIAŁKO RETINOBLASTOMA

Gen RB1 o genowo średnich rozmiarach (200 kB), zlokalizowany w prążku 13q14 składa się z promotora i 27 eksonów, znany jest jeden transkrypt RNA o rozmiarach 4,8 kB; zjawisko alternatywnego składania RNA nie dotyczy więc zapewne genu RB1.

Kodowane przez ten gen białko p105RB1 należy do grupy tzw. białek kieszeniowych i jest jądrową fosfoproteiną, wielkości 105-110 kDa. Uczestniczy ono w złożonych kaskadach regulacyjnych, decydujących o przejściu komórek w cyklu komórkowym z fazy G1 do fazy S a więc jest jednym z głównych regulatorów proliferacji. Dotyczy to wszystkich komórek ustroju a gen wykazuje znaczny konserwatyzm ewolucyjny. Białko oddziałuje na funkcję wielu innych genów przez unieczynnienie (sekwestrację) jednego z głównych regulatorów transkrypcji - czynnika E2F. Zdolność ta realizowana jest poprzez wiązanie E2F w „kieszeni” białka pRB1, uniemożliwiając czynnikowi E2F transaktywację innych podległych genów, co jest równoznaczne z utrzymaniem komórek w spoczynkowej fazie Go. Tylko białko pRB1 z hipofosforylowanymi resztami serynowymi posiada zdolność wiązania E2F; hiperfosforylacja białka uwalnia czynnik transkrypcyjny i umożliwia przejście G1 - S i progresję cyklu komórkowego. Do kieszeni białka pRB1 wiążą się kompetencyjnie również niektóre białka takich wirusów onkogennych jak białko E7 papillomawirusa, białko E1A adenowirusa, antygen T wirusa SV40 i inne. Zjawisko to pozwala powiązać w sposób niesprzeczny procesy ontogenezy wirusowej z istnieniem nowotworów genetycznie uwarunkowanych. Kieszeń białka pRB1 może wiązać również wiele innych białek zawierających motyw -Leu-x-Cys-x-Glu- (1, 4, 6-8). Rozpoznane u chorych z S mutacje sekwencji zlokalizowane są najczęściej w kieszeni białkowej i jej najbliższej okolicy i wpływają na powinowactwo do czynników transkrypcyjnych, ale niekiedy nie blokują całkowicie ich wiązania – mają wtedy cechy mutacji o niskiej penetracji (p. niżej).

Uniwersalne mechanizmy regulacyjne realizowane przez białko pRB1 mogą tłumaczyć udział jego mutacji w powstawaniu także innych niż S nowotworów, jak kostniakomięsak, rak pęcherza, rak drobnokomórkowy płuc i in., współwystępujących niekiedy rodzinnie z siatkówczakiem (9).

Aktywność genu RB1 jest regulowana na poziomie promotora przez przypisane mu regulatory transkrypcji; nieliczne poznane dotąd mutacje promotora upośledzają tą regulację i mają kliniczne cechy mutacji o niskiej penetracji (p. niżej). Jedną z nich - i pierwszą znaną *de novo* - opisaliśmy w naszym Ośrodku (10). Dla prawidłowej funkcji komórek wystarczająca jest aktywność pojedynczej kopii genu; nosiciele mutacji konstytucyjnych poza predyspozycją do S nie różnią się w uchwytny sposób od posiadaczy dwu prawidłowych kopii genu.

PRZEBIEG I CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA

Szczyt zachorowań na S występuje ok. 42 miesiąca życia, ponad 90% przypadków rozpoznawanych jest po raz pierwszy przed 5 r.ż. Znane są sytuacje, w których guz ten wykrywano tuż po urodzeniu. Wczesnymi objawami klinicznymi nasuwającymi podejrzenie S są: zez, przekrwienie i stan zapalny gałki ocznej. Zazwyczaj rozpoznanie guza następuje jednak na podstawie objawów później występujących; są nimi *exophthalmos* i zaobserwowane przez rodziców tzw. „kocie oko” - przeświecanie umiejscowionych na siatkówce serowatych mas guza przez soczewkę. Identyfikacja nowotworu w okresie wczesnym pozwala często na wyleczenie z ubytkami pola widzenia i zachowaniem gałki ocznej. Identyfikacja późniejsza, niestety najczęstsza, oparta o stwierdzenie „kocięgo oka” wiąże się zwykle z koniecznością usunięcia gałki ocznej oraz nierzadko uzupełniającej radio- i chemioterapii (3, 4).

Stosunkowo rzadko S daje klasyczne przerzuty a szerzy się głównie przez ciągłość drogą n. wzrokowego. Rokowanie zależy w znacznym stopniu od standardu diagnostyki i opieki medycznej; w krajach rozwiniętych o dobrej tradycji medycznej śmiertelność rzadko przekracza 8% a konieczność usunięcia gałki ocznej ma miejsce w ok. 10% przypadków. W krajach słabo rozwiniętych obserwowano śmiertelność 100%.

PODŁOŻE MOLEKULARNE DZIEDZICZNEGO SIATKÓWCZAKA

Predyspozycja dziedziczna do siatkówczaka wiąże się z istnieniem konstytucyjnych mutacji genu RB1. Pełny zakres badań molekularnych tego genu dostępny jest w naszym Ośrodku (8, 10-14). Diagnostyka sekwencji genu obciążona jest znacznymi kosztami. Wykazano jednak, że koszty te, ze względu na wyłączenie nosicielstwa u wielu potencjalnie predysponowanych członków rodzin, są niższe aniżeli koszty pełnej opieki profilaktycznej koniecznej u wszystkich dzieci w rodzinie, jeśli nie dokonaliśmy wyłączeń (15). Pełne sekwencjonowanie genu RB1 identyfikuje mutację w ok. 80% rodzin, w których S ma ewidentnie dziedziczny charakter. Pewnym ułatwieniem może być wstępne stosowanie metod preselekcyjnych jak SSC, DGGE, PTT; mają one jednak niższą czułość aniżeli sekwencjonowanie. Identyfikacja mutacji u osoby chorej pozwala następnie na weryfikację tylko wybranego fragmentu genu o pozostałych członków rodziny (4, 16). W diagnostyce wykorzystać można także analizy sprzężeń z wykorzystaniem molekularnych markerów wewnątrzgenowych; są one pomocne zwłaszcza w diagnostyce większych liczebnie rodzin (4, 10, 13, 17). Do diagnostyki S wdrożono nie tylko klasyczne PCR - sekwencjonowanie „ekson po eksonie” (17-20), ale także techniki takie jak multipliet i jakościowy multiplex -PCR (umożliwiający jedno-

czesną ocenę kilku eksonów „pakiecie”), jak i nowe techniki końcowej detekcji mutacji wywodzące się z biochemii np. HPLC (13, 14, 19, 21).

Źródłem diagnostyki DNA konstytucyjnego jest zwykle krew obwodowa a analizie podlega pozyskany z niej DNA. Materiał ten zawiera zarówno kodujące (eksony) jak i niekodujące (introny) części genu. Stosowanie jako materiału badanego RNA i przygotowanego *in vitro* na jego matrycy cDNA, zawierającego jedynie kodujące fragmenty DNA, ułatwia zarówno technikę badania jak i jego późniejszą interpretację (16). Diagnostyka DNA samego guza nie jest konieczna do identyfikacji mutacji konstytucyjnych, może jednak być potwierdzeniem prawidłowości procedur i źródłem cennych informacji o mutacjach somatycznych („drugich trafieniach” i „sporadycznych”).

Informacje o zaobserwowanych mutacjach gromadzone są w dwu bazach danych z wolnym dostępem on-line (18, 21). Baza danych Dr Lohmanna obejmuje mniejszą liczbę mutacji i jest obecnie rzadziej aktualizowana, umożliwia natomiast łatwe różnicowanie mutacji konstytucyjnych od somatycznych „drugich trafień”; w bazie Valverde i wsp., zawierającej więcej nowszych danych (932 mutacje), nie zawsze takie rozróżnienie jest możliwe. Jednakże właśnie analizy materiału tej drugiej bazy danych radykalnie zmieniły naszą wiedzę o charakterystyce konstytucyjnych mutacji genu RB1.

Uważano do niedawna, że mutacje te zlokalizowane są bez wyraźnych prawidłowości (16). Jak się jednak okazało w genie RB1 występują „gorące miejsca” nagromadzenia mutacji, odpowiadające czynnościowo ważnym okolicom białka pRB1 a zwłaszcza jego „kieszeni,, - 79% powtarzających się mutacji to tranzycje C/T w 11 trypletach kodonów argininowych CGA z czego aż 40% jest zawartych w eksonach 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18 i 23 (22). Obserwacje te znacząco modyfikują taktykę sekwencjonowania diagnostycznego, jego szybkość i koszty (21).

Przeważająca większość mutacji to, jak się spodziewano, zmiany uniemożliwiające skuteczną syntezę białka, bądź to unieczynniające je funkcjonalnie; są to zwłaszcza mutacje typu „stop” (42% obserwowanych), ale także dodatkowo niektóre mutacje typu delecji i „splicing site”.

W odróżnieniu od mutacji „inaktywujących”, mutacje modyfikujące funkcjonalność cząsteczki, ale nieblokujące całkowicie syntezy białka pRB są rozmieszczone losowo.

Do grupy tej zaliczane są mutacje „błędneho sensu” oraz niektóre mutacje „splicing site”. Przeważają mutacje tworzące „stop kodony”. Mutacje promotorowe, a także niektóre mutacje miejsc wpływających na składanie RNA (tzw. „splice sites”) charakteryzuje niższa penetracja, rzędu 60%-70% (10, 11, 17, 23). W rodzinach obciążonych takimi mutacjami wy-

stępuje tzw. przeskakiwanie pokoleń (nie chorują obligatoryjni nosiciele) a cechy kliniczne guza są podobne do obserwowanych w S pochodzącym z mutacji somatycznych (8, 22). Określenie ryzyka zachorowania w takich rodzinach może być trudne. Mutacje o niskiej penetracji stanowią jednak prawdopodobnie stosunkowo niewielki odsetek wszystkich obserwowanych w genie RB1 (16, 18, 21, 23).

Wykazano istnienie etnicznych różnic w charakterystyce występowania mutacji (21).

Nie znamy jeszcze rzeczywistego odsetka mutacji germinalnych *de novo* wśród chorych z S; wiadomo jednak, że przyszłe potomstwo takich pacjentów obciążone będzie typowym, dużym ryzykiem S rzędu 45%. Mutacje punktowe pochodzą zazwyczaj z gamety ojcowskiej, delecje z matczynej (17). Inaczej niż w wielu innych chorobach dominujących, wiek rodziców wydaje się nie wpływać na częstość pojawiania się mutacji *de novo*.

Mutacje genu RB1 predysponują nie tylko do S; w późniejszym wieku pojawiają się u obciążonych osób również inne nowotwory. Szczególne miejsce wśród nich zajmuje „siatkówczak trójstronny”, w którym zespół chorobowy tworzą obuoczny S i szyszyniak; jest to związane ze wspólnym dla komórek siatkówki i szyszynki pochodzeniem embrionalnym. Inne typowe dla konstelacji z S nowotwory w rodzinach obciążonych to mięsaki kostne - najczęściej pojawiające się w kości udowej – i mięsaki tkanek miękkich, guzy urotelialne, drobno komórkowy rak płuca, białaczki, czerniaki, rak sutka (9). Ich znaczenie praktyczne stało się jasne w wyniku poprawy technik leczenia i znaczącego wydłużenia życia u chorych z S; jak okazało się w analizach retrospektywnych dużych grup chorych z czołowych ośrodków amerykańskich (9) u wyleczonych chorych z S wywołanym mutacją konstytucyjną średnia długość życia wynosi zaledwie 50 lat.

Szczególną podgrupę chorych z S stanowią pacjenci, u których duża delecja obejmuje nie tylko gen RB1, ale także większy odcinek chromosomu. Delecja taka jest wykrywalna cytogenetycznie w badaniu kariotypu techniką wysokiej rozdzielczości lub technikami hybrydizacyjnymi. Chorzy z delecją 13q-, obok obecności samego guza, wykazują charakterystyczny zespół objawów: opóźnienie psychoneurologiczne i dysmorfie - zwłaszcza w zakresie twarzy. Tylko u chorych z takimi objawami wskazane jest badanie kariotypu; stanowią oni mniej niż 5% wszystkich pacjentów ze zmianami konstytucyjnymi genu RB1 (3).

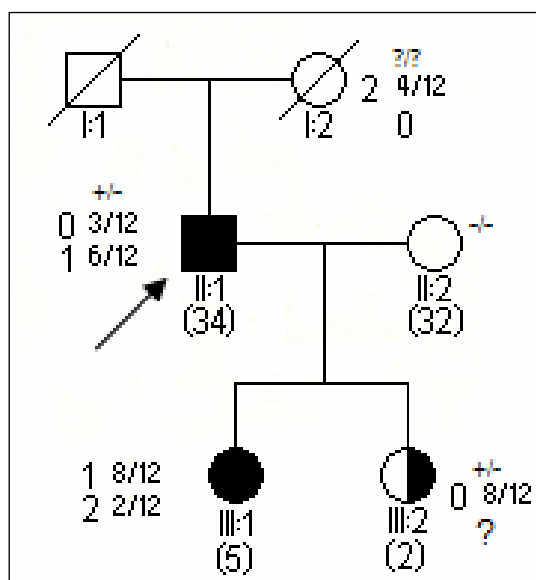
Nie wiemy, jakie czynniki odpowiedzialne są bezpośrednio za mutacje somatyczne stwierdzane jako „drugie trafienie” w komórkach siatkówki. Wiadomo jednak, że w przebiegu życia tych komórek występuje „okienko czasowe”, w którym mutacja taka indukuje nowotwór złośliwy. „Drugie trafienie” po tym okresie życia wywołuje u nosiciela mutacji konstytucyjnej jedynie guz o charakterze łagodnym tzw. *retinoma*. Swoim obrazem makroskopo-

wym przypomina on nowotwór złośliwy a jego odróżnienie na dnie oka może być bardzo trudne. Obecność *retinoma* u jednego z rodziców chorego dziecka stanowi jednoznaczny dowód istnienia w rodzinie (2).

ODRĘBNOŚCI GENETYCZNO-KLINICZNE NIEKTÓRYCH ZMIAN GENU RB1

Większości mutacji o charakterze kodonów stop, towarzyszy klasyczny obraz rodowodowo-kliniczny S; nowotwór manifestuje się stosunkowo wcześnie, obustronnie/wielogniskowo w każdym kolejnym pokoleniu a więc sposób taki jak przy dziedziczeniu autosomalnie dominującym (rycina 3).

Opisano jednak rodziny, w których rodowodach zachorowania występowały tylko w niektórych pokoleniach, guzy pojawiały się w stosunkowo późnym wieku i często były tylko jednostronne/jednogniskowe. W tego rodzaju rodzinach, określanych jako „**late onset phenotype**”, istnieje niebezpieczeństwo błędnego rozpoznania S sporadycznego i odstąpienia od monitorowania młodszego rodzeństwa chorych – zwłaszcza w przypadku wywiadu ograniczonego tylko do najbliższych krewnych. Jak się okazało w rodzinach takich występuje nosicielstwo mutacji konstytucyjnych, mają one jednak charakter **mutacji o niskiej penetracji** (ryc. 2). Istnienie tej grupy mutacji w S postulowane było po raz pierwszy w 1989 r. przez Scheffera i wsp. na podstawie dowodów pośrednich (24). Jak się okazało mutacje o niskiej penetracji stanowią znaczący odsetek wszystkich mutacji konstytucyjnych RB1 (20, 21, 23). Ich molekularnym podłożem mogą być bardzo rzadkie mutacje promotorowe, zmieniające regulacje genu RB1 ale nie sam jego kod (10) lub – częściej – mutacje eksonów nie powodujące całkowitej utraty aktywności genu (np. skracające okres półtrwania białka, zwiększające jego termowrażliwość itp.) (11, 20, 23, 25). Są to więc zwykle zmiany o typie błędnego sensu lub też nie-kodujące ale bliskie eksonom substytucje okolic intronowych, wpływające na prawidłowość wycinania eksonów i tworzenia ostatecznego transkryptu. Istnienie mutacji o niskiej penetracji znacznie skomplikowało i utrudniło poradnictwo rodzinne w S.



Ryc. 4. Rodowód w typowych uwarunkowaniach genetycznych, siatkówczak sporadyczny w wyniku mutacji konstytucyjnej *de novo*.

Mozaikowość mutacji polega na ich występowaniu tylko w części komórek somatycznych i/lub gamet. Zjawisko to dotyczy również genu RB1 i może powodować - podobnie jak nierzadkie nie mozaikowe mutacje *de novo* - pojawianie się S u dzieci rodziców, którzy we krwi obwodowej a nawet części gamet mutacji konstytucyjnych nie wykazują. Rozpoznanie mozaikowości jest bardzo trudne, obecnie możliwe tylko u ojców, a częstość występowania nieznana (5, 17, 21, 24).

W 1998 r. wykazaliśmy, że wśród pacjentów z S jednostronnym, sporadycznym, zwłaszcza rozpoznanym przed 3 r.ż. znaczący klinicznie odsetek stanowią nosiciele **mutacji konstytucyjnych *de novo***. Są oni wysoce zagrożeni (mimo „sporadyczności”) ponownym pojawieniem się S (obustronność, wieloogniskowość) a ich rodzeństwo wymaga weryfikacji mutacji, zazwyczaj jednak z wynikiem ujemnym (12). Nasze wyniki zostały uwzględnione w obowiązujących zaleceniach National Cancer Institute (27, 28).

Jak wykazał Lohmann, metylacja niektórych okolic genu RB1, określana jako **zmiany epigenetyczne**, może prowadzić do „wyciszenia” genu i pojawienia się S przy dalszych skutkach klinicznych identycznych jak mutacji o niskiej penetracji, pomimo, że sama zmiana kodu nie ma wtedy miejsca (18). Mechanizm taki postulowała jeszcze w latach 70-tych Sapienza; jego częstość, przekazywanie dziedziczne i możliwy związek z tzw. rodzicielskim piętnem genomowym nie zostały poznane, natomiast samo zjawisko jest możliwe do diagnostyki molekularnej.

POSTĘPOWANIE DIAGNOSTYCZNO-PROFILAKTYCZNE U CHORYCH I ICH RODZIN

Najbardziej skuteczny schemat postępowania profilaktycznego, stosowany obecnie w większości ośrodków, opracowała w Toronto Brenda Gallie. Obejmuje on zasady postępowania obowiązujące również u dalszych krewnych chorego i jest dostępny w wyspecjalizowanych ośrodkach (3, 4, 18). Identyfikacja mutacji genu RB1 technikami molekularnymi pozwala na potwierdzenie/wykluczenie jej istnienia u pozostałych krewnych i wyłączenie znacznego odsetka członków rodzin - posiadaczy prawidłowego haplotypu z algorytmu postępowania profilaktycznego. Ma to duże znaczenie nie tylko ze względu na koszty, ale także obciążenie psychiczne i możliwości powikłań, jakie związane są z takim powtarzanym cyklem badań (4, 15).

Dobre wyniki leczenia, nierzadko z zachowaniem gałki ocznej możliwe są w przypadku wczesnego wykrycia S. Większą niż dotąd rolę powinny w tym zakresie odgrywać rutynowe kontrole dna oka dokonywane u małych dzieci i noworodków, należy jednak podkreślić, że w pełni wartościowa jest tylko kontrola całości siatkówki, możliwa u dziecka do 2-3 r.ż. tylko w znieczuleniu ogólnym (13, 14).

Do chwili wykluczenia predyspozycji genetycznej, wszystkich członków najbliższej rodziny chorego powinniśmy traktować jako potencjalnych nosicieli mutacji. Wiąże się to z koniecznością powtarzania badań dna oka, które u chorego i rodzeństwa powinny być wykonywane, co 3 miesiące do 2 r.ż., co 6 m-cy do 5-6 r.ż. a następnie corocznie do 15 r.ż. U obojga rodziców chorego i rodzeństwa starszego niż 15 lat, obowiązkowa jest przynajmniej jednorazowa kontrola dna oka w poszukiwaniu *retinoma* (4, 13, 14).

Nie opracowano niestety do chwili obecnej skutecznych zasad postępowania diagnostyczno-profilaktycznego umożliwiającego ukierunkowane, skuteczne przeciwdziałanie innym nowotworom, towarzyszącym S w wieku późniejszym (9).

PIŚMIENNICTWO

1. DiCiomino D, et al.: Retinoblastoma: The disease, Gene and Protein Provide Critical Lead to Understand Cancer. *Cancer Biol* 2000, 10: 255-69.
2. Gallie BL, et al.: Retinoma: Spontaneous Regression of Retinoblastoma or Benign Manifestation of Mutation? *Br J Cancer* 1982, 45: 513-21.
3. Murphee AL, et al.: Retinoblastoma. In: Emery's and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. D.L.Rimoin, J.M.Connor, R.E.Pyeritz, B.R. Korf (eds), Churchill - Livingstone, London 2002, 3: 3604-36.
4. Gallie B, et al.: The Genetics of the Retinoblastoma: Relevance to the Patient. *Paed Clin North Am* 1991, 38: 299-315.
5. Munier FL, et al.: Evidence of Somatic and Germinal Mosaicism in Pseudo-Low Penetrant Hereditary Retinoblastoma, by Constitutional and Single Sperm Mutation Analysis. *Am J Hum Genet* 1998, 63: 1903-8.

6. Gutkind JS (Ed.) Signalling Networks and Cell Cycle Control: The Molecular Basis of Cancer and other Diseases. Humana Press, Champaign, IL, 2000.
7. Xiao B, et al.: Crystal Structure of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein Bound to E2f and the Molecular Basis of its Regulation. Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100.
8. Zajączek S: Ocena konstytucyjnych mutacji genu Rb-1 i niestabilności chromosomów w diagnostyce dziedzicznych postaci i badaniach patogenezy siatkówczaka jednostronnego. Praca habilitacyjna. Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie 1999, 1-80.
9. Abramson DH: Second Non-Ocular Cancers in Retinoblastoma: A Unified Hypothesis, Ophth Genet 1999, 20: 193- 203.
10. Zajączek S, et al.: Frequency and Nature of germline RB-1 Gene Mutations In a Series of Patients with Sporadic Unilateral Retinoblastoma. Eur J Cancer 1999, 35: 1824-7.
11. Jakubowska A, et al.: Novel RB1 Gene Constitutional Mutations Found In Polish patients with familial and/or Bilateral Retinoblastoma, Hum Mutat 2001, 18: 459. Online Mutations in Brief #456.
12. Zajączek S, et al.: Age At Diagnosis to Discriminate those Patients for whom Constitutional DNA Sequencing is appropriate in Sporadic Unilateral Retinoblastoma. Eur J Cancer 1998, 34: 1919-21.
13. Zajączek S: Genetics of Retinoblastoma in Clinical Practice. Ann Diagn Paed Pathol 2003, 3: 35-9.
14. Zajączek S: Genetyka siatkówczaka w praktyce klinicznej - przegląd nowych zagadnień. Okulistyka 2007, 10: 7-13.
15. Noorani HZ, et al.: Cost Comparison of Molecular vs Conventional Screening of Relatives at Risk for Retinoblastoma. Am J Hum Genet 1996, 59: 301-7.
16. Harbour WJ: Overview of RB Gene Mutations in Patients with Retinoblastoma. Implications for Clinical Genetics. Ophthalmology 1998, 105: 1442-7.
17. Lohmann DR, et al.: The Spectrum of RB1 Germline Mutations in Hereditary Retinoblastoma, Am J Hum Genet 1996, 58: 940-9.
18. Lohmann DR, et al.: Retinoblastoma Gene Clinics 2003: <http://www.geneclinics.org/profiles/retinoblastoma/details.html>
19. Richter S, et al.: Sensitive and Efficient Detection of RB1 Gene Mutations Enhances Care for Families with Retinoblastoma. Am J Hum Genet 2003, 72: 253-69.
20. Otterson G, et al.: Temperature Sensitive RB Mutations Linked to Incomplete Penetrance of Familial Retinoblastoma in 12 Families. Am J Hum Genet 1999, 65: 1040-6.
21. Valverde JR, et al.: RB1 Gene Mutation Up-to-Date: a Meta-Analysis Based on 932 Reported Mutations Available in a Searchable Database. BMC Genetics 2005, 6: 1-9. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/6/53>
22. Lohmann DR, et al.: Constitutional RB1 Gene Mutations in Patients with Isolated Unilateral Retinoblastoma. Am J Hum Genet 1997, 61: 282-94.
23. Schubert EL, et al.: A Splicing Mutation in RB1 in Low Penetrance Retinoblastoma. Hum Genet 1997, 100: 557-63.
24. Scheffer H, et al.: Linkage Analysis of Families with Hereditary Retinoblastoma: Nonpenetrance of Mutation. Am J Hum Genet 1989, 45: 252-60.
25. Klutz M, et al.: A Parent-of -Origin Effect in Two Families with Retinoblastoma is Associated with a Distinct Splice Mutation in the RB1 Gene. Am J Hum Genet 2002, 71: 174-9.
26. Munier FL, et al.: Evidence of Somatic and Germinal Mosaicism in Pseudo-Low Penetrant Hereditary Retinoblastoma, by Constitutional and Single Sperm Mutation Analysis. Am J Hum Genet 1998, 63: 1903-8.
27. Cowell JK, et al.: Which Retinoblastoma Patients Should be Screened for RB1 Mutations? Eur J Cancer 1998, 34: 1825-6.
28. National Cancer Institute, 2006. Retinoblastoma Treatment: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/retinoblastoma/healthprofessional>

Legenda do rodowodów przedstawionych na rycinach 1-4:

- /- wykluczenie mutacji konstytucyjnej
- +/- obecność mutacji konstytucyjnej jednego z alleli
- 3 2/12 wiek rozpoznania S w latach i miesiącach
- (12) aktualny wiek w latach

Stanisław Zajaczek, Thierry van de Wetering



Nerwiakowłóknikowatość typu 1

(NF1, choroba von Recklinghausena)

Neurofibromatosis I
(NF1, von Recklinghausen Disease)

Streszczenie

Neurofibromatoza 1 jest częstą chorobą autosomalną dominującą (1:3500 ż.u.), ekspresja jest indywidualnie zmienna i zależna od wieku. Około połowa przypadków jest sporadyczna i wynika z mutacji *de novo*; jednak ryzyko u ich potomstwa wynosi 50 %. Znaczna wielkość genu neurofibrominy uniemożliwia rutynową diagnostykę molekularną, która jest zarezerwowana dla przypadków diagnostycznie trudnych (n. segmentowa, mozaiki, fenotypy z niepełną penetracją lub ekspresją). Rozpoznanie ustala się w oparciu o kryteria kliniczne ujęte w NF1 „NIH Consensus Conference Criteria”. Ekspresja objawów jest indywidualnie i rodzinnie zmienna.

Przedstawiono zasady diagnostyki, opieki i oceny ryzyka nowotworowego. Poza zmianami skórnymi rozwijają się także glejaki okolicy n. wzrokowego (astrocytoma pilocyticum) i rozlane hiperintensywne ogniska T2 w MRI OUN. Towarzyszyć im może padaczka, zaburzenia hormonalne i widzenia, deficyty psychospołeczne. Częste są dysplazje i wady szkieletu.

Mutacje NF1 zwiększają ryzyko nowotworów, jednak nie są znane dokładne wartości ryzyka. Wysokie ryzyko dotyczy guzów wywodzących się z otoczki nerwów obwodowych (MPST) i białaczek. Te ostatnie opisywane są jako postaci białaczki nie - limfocytowej o wczesnym początku; przebiega ona ze złym rokowaniem.

Przedstawiono rzadkie zespoły chorobowe skojarzone z NF1 i ich różnicowanie. Mutacje opisanego niedawno genu SPRED są odpowiedzialne za zespół łączący objawy zespołu Noonan i NF1, klasyfikowane poprzednio jako forma kliniczna typowej NF1.

Słowa kluczowe: choroba v. Recklinghausena, neurofibromina, kryteria diagnostyczne, opieka i poradnictwo

Summary

Neurofibromatosis 1 is a relatively frequent autosomal dominant disease (1:3500 live births), its expression depends on the and on an individual. 50% of the cases results from de novo mutations and are non-familial, but NF1 manifests in following generations with a 50% risk. Due to the great size of the neurofibromin gene, molecular analysis is not routinely employed and is reserved primarily for cases difficult to diagnose (e.g. segmental form, mosaics, not fully penetrating and expressing phenotypes). The disease is diagnosed based on the analysis of defining clinical features, summarized in 1997 in NF1 NIH Consensus Conference Criteria expression of the symptoms individually and familial varies. The following section presents the principles of diagnosis, familia care and neoplasia risk determination. In addition to distinguishable skin lesions, patients develop gliomas near the optic pathways, and diffuse hyperintensive foci of the MRI T2 signal in CNS. Gliomas are morphologically presented as astrocytoma pilocyticum. NF1 may be associated with epilepsy, visual and hormonal disorders and psychosocial deficits. Skeletal dysplasias and deformations occur frequently.

NF1 mutations increase the risk of neoplasia however, risk profiles remain unknown. High risk is linked with MPNST - Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors and leukemia, described as Juvenile Onset Non-Lymphocytic Leukemia (refractory and with a poor prognosis).

Additionally presented are rare similar syndromes difficult to diagnose. Mutations of the newly discovered gene SPRED are responsible for a different syndrome, combining signs of Noonan Syndrome and NF1, previously classified as the clinical form of NF1.

Key words: von Recklinghausen disease, neurofibromin, criteria of diagnosis, familial care, risk of neoplasia

NF1 należy do stosunkowo częstych chorób autosomalnych dominujących; notowana jest z częstością ok. 1:3000 urodzeń. Choroba zaliczana jest do grupy fakomatoz; (greckie *phakos* „naznaczony przy urodzeniu”). Zaliczane są do tej grupy rozmaitej natury choroby, obejmujące równocześnie różne listki zarodkowe, których złożona symptomatologia dotyczy skóry, układu nerwowego i narządu wzroku. Zmiany patologiczne w NF1 są głównie pochodzenia neuroektodermalnego (1-4).

W znaczącej liczbie przypadków choroba pozostaje nierozpoznana. Przyczynia się do tego jej tradycyjne prezentowanie w podręcznikach, w których zazwyczaj opisywani są pacjenci wykazujący krańcowe nasilenie objawów skórnych; w rzeczywistości w większości przypadków NF1 ma dyskretny przebieg a nasilenie objawów wykazuje bardzo dużą rozpiętość tak w obrębie danej rodziny jak i w zależności od wieku u tego samego pacjenta (2).

OBJAWY I ROZPOZNANIE

Rozpoznanie NF1 jest oparte zazwyczaj o badanie klinicznie oceniające występowanie tzw. dużych i małych objawów. Ich listę przedstawiono w tabeli 1. Przeprowadzenie diagnostyki molekularnej nie jest konieczne do rozpoznania NF1. Zarówno duże jak i małe objawy wykazują znaczną zmienność zarówno konstelacji jak i dynamiki; dotyczy to także poszczególnych chorych w tej samej rodzinie. Zależność charakterystyki klinicznej od wieku jest szczególnie widoczna u dzieci. Wraz z faktem, iż w NF1 prawdopodobnie nie występują jednoznaczne korelacje genotypowo-fenotypowe, powoduje to, że indywidualne prognozowanie przebiegu choroby jest niemożliwe.

Obowiązujące kryteria rozpoznawania NF1 zostały sprecyzowane w 1997 r. jako tzw. *NF1 NIH Consensus Conference Criteria* (5). Zgodnie z tym ustaleniem NF1 rozpoznajemy u pacjenta, u którego spełnione są przynajmniej dwa z poniższych warunków:

- 1) sześć lub więcej plam *café-au-lait*, przekraczających 5 mm przed okresem dojrzewania i 15 mm po okresie dojrzewania;

Tab. 1. Zmiana w eksonach w genie NF1 oraz ich skutek

	Mutacja	Skutek
Ekson 2	168C>T	Ser 56 Ser
Ekson 3	239C>A	Tyr 80 Ser
Ekson 4	342 C>T	Leu 114 Leu
Intron 4	C>T	Polimorfizm

Ekson 5	492delACTT	Frame-shift
	499delTGTT	Frame-shift
	574C>T	Arg 192 Stop
Ekson 18	2022 C>T	Ser 674 Ser
	2034 G>A	Pro 678 Pro

- 2) dwa lub więcej nerwiakowłókniaki jakiegokolwiek typu lub jeden nerwiak splotowaty;
- 3) piegi i/lub przebarwienia w niedostępnych dla światła okolicach ciała (ok. pachowe, wznórek łonowy);
- 4) glejak narządu wzrokowego;
- 5) dwa lub więcej guzki Lisha;
- 6) charakterystyczne objawy kostne;
- 7) krewny I° spełniający powyższe kryteria.

[Wg Huson i Korfa (2)].

Pojedyncze plamy *café-au-lait* występują u ok. 10-15% zdrowych dzieci, nie zawsze u chorych z NF1 i są widoczne zaraz po urodzeniu; ich brak w okresie dojrzewania wyklucza z niemal całkowitą pewnością NF1 (2-4).

Włókniaki skórne pojawiają się niemal u każdego pacjenta z NF1; leżą w obrębie skóry i naskórka, wykazują „gumowatą” konsystencję i dają się pasywnie w niewielkim stopniu przemieszczać. Są zwykle niebolesne, niekiedy swędzą. U części pacjentów włókniaki mogą z wiekiem ewoluować do form brodawkowatych powodujących dramatyczne deformacje znane z klasycznych opisów choroby. Włókniaki guzowate u 5% pacjentów mogą lokalizować się na przebiegu pni nerwowych stając się powodem powikłań neurologicznych; są wówczas zwykle bolesne (2-4).

Guzki Lisha są to *hamartomata* tęczówki; nie są zagrożeniem dla wzroku, stanowią natomiast cenną cechę diagnostyczną. Powinny być oceniane w lampie szczelinowej (2, 3). Włókniaki splotowate mogą obejmować pochewki wielu nerwów i ich odgałęzień.

Duże guzki podskórne osiągające niekiedy rozmiar kilku i więcej cm, rosną szybko w pierwszych latach życia, potem zwykle ulegają stabilizacji. Skóra nad nimi jest zwykle znacznie zmieniona, mogą wywoływać silny ból, świąd i szeroki zakres objawów wynikających z ucisku na nerwy i kości. Mogą one ulegać transformacji złośliwej, chociaż większość

opisywanych w NF1 mięsaków powstaje w okolicach niewykazujących typowych dla tej choroby zmian (2).

Glejaki narządu wzrokowego i mózgu oraz tzw. ogniska zwiększonej intensywności sygnału T2 w badaniu MRI występują już w wieku dziecięcym u 15% pacjentów, a glejaki zwykle wykazują strukturę *astrocytoma pilocyticum*. Mogą być zlokalizowane na całym przebiegu drogi wzrokowej, co wiąże się z pojawianiem się objawów takich jak proptosis, obniżenie ostrości wzroku, ubytki pola widzenia. Stosunkowo częsta jest także ich podwzgórzowa lokalizacja, powodując endokrynopatie, takie jak niedobór hormonu wzrostu (stosowanie lecznicze rh-GH u pacjentów z dysfunkcjami podwzgórza w przebiegu NF1 jest nadal przedmiotem dyskusji), czy przedwczesne pokwitanie. Manifestacją niektórych lokalizacji glejaków bywa trudna w leczeniu padaczka.

W przebiegu glejaków nierzadko obserwuje się ich samoistną regresję lub stabilizację; są to jednak zdarzenia nieprzewidywalne a decyzje o podjęciu lub zaniechaniu leczenia należą w takich przypadkach do bardzo trudnych (2).

Znaczny odsetek chorych z NF1 wykazuje dysplazje i deformacje kostne, na których czoło wysuwa się zwykle skolioza w odcinku piersiowym kręgosłupa (6). We własnych badaniach stwierdziliśmy, że zmianom tym z reguły towarzyszy obniżenie masy kostnej.

Ok. 1/3 chorych wykazuje deficyty psychospołeczne; znacznego i średniego stopnia opóźnienie umysłowe dotyczy zazwyczaj jednak mniej niż 1% chorych. U 30-60% pacjentów występują mikropatologie orientacji wzrokowo-przestrzennej, dysleksje, gorsza pamięć krótkoterminowa, gorsze wyniki testów werbalnych w badaniu IQ (1, 2, 4, 7-10).

MOLEKULARNE PODŁOŻE NF1

NF1 wykazuje rodowodowe cechy choroby autosomalnej dominującej z penetracją sięgającą 100% i bardzo zmienną ekspresją mutacji genu NF1 (białka neurofibrominy) (2, 9).

Połowa przypadków jest wynikiem nowych mutacji i nie ma charakteru rodzinnego; dzieci takich osób dziedziczą chorobę z typowym ryzykiem 50% (2).

Gen neurofibrominy wykazuje znaczne rozmiary (ponad 350 kbp) i składa się z 60 kodujących białko Eksonów. DNA genu NF1 ulega w różnych tkankach odmiennej, charakterystycznej alternatywnej transkrypcji; istnieją przynajmniej cztery różne jego transkrypty. W obrębie genu NF1 opisano u chorych z NF1 wszystkie znane rodzaje mutacji, przytłaczająca ich większość powoduje przedwczesną terminację syntezy białka; nadzieje diagnostyczne budzi zatem test PTT. Lokalizacja mutacji nie wykazuje typowych „hot spots”; zaznaczają się

jedynie preferencje lokalizacji w okolicach sekwencji metylowanych i wysoko powtarzalnych.

Obecnie diagnostyka molekularna nie jest stosowana rutynowo w rozpoznawaniu NF1 (2).

Produkt genu NF1 - białko neurofibromina – posiada domenę homologiczną z rodziną białek aktywujących GTP-azę; warunkuje ona jego rolę jako regulatora aktywności onkogenu p21ras i syntezy niektórych czynników wzrostowych np. z rodziny NGF (11). Na poziomie komórkowym gen NF1 wykazuje także szereg cech typowych dla genów supresorów; opisano m.in. występowanie typowych „dwu trafień” mutacyjnych w nowotworach i neurofibromatach u chorych z NF1. Utrata heterozygotyczności w nerwiakowłókniakach dotyczy zazwyczaj komórek Schwanna (9).

NOWOTWORY ZŁOŚLIWE A NF1

U chorych z NF1 ze zwiększoną częstością występują nowotwory złośliwe. Są to zwykle mięsaki prążkowanokomórkowe, złośliwe guzy otoczki nn. obwodowych (MPNST - *Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumours*) i białaczki. Większość zmian OUN to gwiaździaki.

Różnicowanie w MRI łagodnych ognisk T2 zagęszczeń z glejakami wymaga powtarzanych obserwacji ocenianych przez doświadczonego neuroradiologa. MPST są wysoce agresywnymi mięsakami powstałymi zwykle w obszarze włókników splotowatych (1, 2, 4).

U chorych z NF1 podwyższone jest ryzyko względne wystąpienia białaczki. Dotyczy to zwłaszcza wczesnodziecięcej białaczki nie-limfocytowej wykazującej pewne odmienności przebiegu (12-14). Bywa ona poprzedzona zmianami barwnikowymi o typie *juvenile xantho-granuloma*, występującymi zazwyczaj na granicy linii włosów - nie wiadomo jednak, czy te zmiany skórne można traktować jako zapowiadające białaczkę (15). Białaczka opisywana zwykle jako *Juvenile Onset Non Lymphocytic Leukemia* w NF1 przebiega zwykle ciężiej aniżeli podobne białaczki bez NF1 i wykazuje oporność na leczenie (13, 14).

Wartości liczbowe ryzyka nowotworowego u chorych z NF1 są przedmiotem badań i dyskusji; jest ono przynajmniej o 5% wyższe aniżeli dla porównywalnej standardowej populacji; wartości te w świetle ostatnich obserwacji wydają się zaniżone (2). Wartości ryzyka poszczególnych rodzajów nowotworów dla członków rodzin chorych z NF1 nie są znane.

NF1 jest przekazywana potomkom chorego z prawdopodobieństwem 50%.

OPIEKA NAD CHORYMI I RODZINAMI Z NF1

Nie opracowano dotąd powszechnie przyjętego u chorych schematu postępowania, a w większości ośrodków zaleca się (1-3, 5, 7):

- stałą kontrolę ambulatoryjną przynajmniej 1 x rocznie, kontrola MRI mózgowia i rdzenia przedłużonego 1 x 2 lata;
- przy pierwszym badaniu i zawsze w przypadku nowych ukierunkowanych skarg:
 - a) pełne badanie neurologiczne;
 - b) pełne badanie okulistyczne z oceną liczby guzów Lisha w lampie szczelinowej, dokładna ocena pola widzenia, ERG;
 - c) pełna ocena dermatologiczna z dokumentacją charakterystyki zmian;
 - d) pełne badanie ortopedyczne; celowa wydaje się ocena gęstości kości;
 - e) metodą klasyczną u dorosłych a sondą ultra-dźwiękową u dzieci;
 - f) pomiar RR (i we własnym zakresie z dokumentacją 1x w miesiącu).

Ze względu na związaną z wiekiem dynamikę zmian chorobowych w pierwszych dwu latach życia należy położyć szczególny nacisk na monitorowanie włókniaków spłotowatych, zmian sugerujących możliwość pojawienia się białaczki, dysplazję kości klinowej i kości długich kończyn dolnych. Możliwie wcześnie należy wdrożyć kontrolę ogólnorozwojową z dokumentacją wzrostu - istnieją specjalne nomogramy dla NF1 (8), ocenę i korekcję logopedyczną (10). U dzieci starszych i dorosłych istotne znacznie ma monitorowanie i korekcja innych zmian w kośćcu - zwłaszcza w kręgosłupie (6).

NF1 jest chorobą nieuleczalną a postępowanie ma charakter objawowy. Decyzja o zastosowaniu radioterapii lub leczenia operacyjnego glejaków zawsze była dyskusyjna i wysoce zindywidualizowana, zwłaszcza wobec nieprzewidywalności ich dalszej ewolucji; ostatnio pierwszeństwo wydaje się zdobywać chemioterapia (2).

Niektóre ośrodki zaproponowały stałe stosowanie u chorych Ketotifenu (Zaditen) w dawkach dziennych 2-4 mg; postępowanie ma zmniejszać szybkość przyrostu masy nerwiakowłókniaków. Jednym z potencjalnych mechanizmów jego działania ma być wpływ na komórki tuczne zawarte w nerwiakowłókniakach. Terapia taka, propagowana w niektórych krajach, zdaniem innych znawców NF1 ma jedynie efekt placebo. Zwraca jednak uwagę, że lek ten jest wolny w stosowaniu długoterminowym od istotnych skutków ubocznych i wywiera u chorych z NF1 niekwestionowane, dodatkowe pozytywne efekty jak działanie uspokajające, synergizm z lekami przeciw padaczkowymi łatwiejsze opanowywanie napadów padaczkowych, działanie przeciwświądowe. Wobec braku innych metod farmakoterapii stanowi to argument za dalszym gromadzeniem doświadczeń w tym zakresie (4).

Niedobór wzrostu u dzieci z NF1 wynikający w znacznym stopniu z podwzgórzowej lokalizacji zmian wymaga stałego monitorowania i jest uważany za wskazanie do stosowania re-ombinowanego hormonu wzrostu w wyspecjalizowanym ośrodku pediatrycznym. Informa-

cje o możliwym wpływie takiego leczenia na rozrost nerwiakowłókniaków i możliwość ich dalszego złośliwienia są jednak niezwykle skąpe; zwraca uwagę fakt, że szereg mediatorów istotnych dla ewolucji guzków neurofibromatycznych - jak np. IGF - to jednocześnie mediatorzy hormonu wzrostu.

Leczenie chirurgiczne szpecących obwodowych zmian skórnych powinno być podejmowane ostrożnie ze względu na często nadspodziewanie duże ich ukrwienie a niekiedy zle gojenie się rany. W naszym Ośrodku rezerwujemy je dla zmian szczególnie szpecących lub upośledzających funkcje życiowe (2, 3). Leczenie operacyjne nerwiaków splotowatych i zmian podejrzanych o MPNST jest domeną ośrodków neurochirurgicznych dobrze zaznajomionych z NF1 (2).

U wszystkich krewnych I^o probantów wykonujemy jednorazowo pełne badanie okulistyczne i ocenę dermatologiczną a w razie wątpliwości badanie neurologiczne z oceną MRI. W przypadku braku objawów przy pierwszym badaniu młodszego rodzeństwa chorych dzieci ich ocenę powtarzamy w 3, 5 i 7 roku życia (1, 2, 7).

ATYPOWE FORMY NF-1

NF1 segmentowa: objawy NF1 zlokalizowane asymetrycznie i tylko w niektórych okolicach ciała, pacjenci często wolni są od zmian w OUN i nie stwierdza się u nich guzków Lisha. Lokalizacja zmian koncentruje się zwykle na ektodermie i może odpowiadać tzw. liniom wzrostowym Blaschko. Mutacje neurofibrominy nie są wtedy wykrywane w leukocytach krwi obwodowej lub fibroblastach okolic wolnych od zmian, mają typowy charakter w DNA pozyskanym z patologicznego „segmentu”. Forma ta z reguły nie występuje rodowodo, jest uważana na skutek łącznego działania mutagenezy *de novo* i mozaikowości postzygotycznej. NF1 segmentowa stanowi najtrudniejszą diagnostycznie postać tej choroby.

Zespół NF1 - Noonan: Od dawna obserwowano u dzieci trudne diagnostycznie fenotypy złożone wykazujące większość (ale nie wszystkie) cechy NF1 jak i zespołu Noonan (warunkowany zwykle przez gen PTPN). U pacjentów takich tylko wyjątkowo odnajdywano mutacje neurofibrominy.

W 2007 r. wieloośrodkowy zespół na podstawie analizy pięciu wielopokoleniowych rodzin o takim fenotypie przypisał jednoznacznie powyższy fenotyp do mutacyjnej inaktywacji genu SPRED1. Gen ten jest negatywnym regulatorem w kaskadzie RAS, co tłumaczy zespół objawowy wspólny z NF1 gen składa się z zaledwie 8 eksonów i jest stosunkowo łatwy w sekwencjonowaniu (1). Analiza genu będzie w najbliższym czasie dostępna w naszym Ośrodku.

W ubiegłych latach opisano również pojedynczych pacjentów z mutacjami genu PTPN, częścią objawów NF1, niewykazujących natomiast typowych dla mutacji tego genu cech zespołu Noonan lub ekspresjonujących je w niewielkim stopniu. Podobne spostrzeżenia dotyczą również genów KRAS i SOS1. Wszystkie te geny kodują różne białka regulatorowe kaskady RAS; sugeruje to zależność poszczególnych objawów NF1 od funkcji różnych innych elementów tej kaskady a nie tylko samej neurofibrominy (1, 2).

Zespół NPDC (Neurofibromatosis, Pheochromocytoma, Duodenal Carcinoma, OMIM 1622400), opisany przez Griffithsa i wsp. w 1983 r., znany dotąd w trzech rodzinach o nieustalonym podłożu genetycznym. Pierwszą wyraźną manifestacją kliniczną jest zazwyczaj żółtaczka (3).

Zespół NF1 - HNPCC: współwystępowanie obu patologii opisano dotąd w kilku niezależnych rodzinach; w niektórych z nich przeprowadzono pełne sekwencjonowanie genu neurofibrominy i nie odnotowano mutacji; w rodzinach tych stwierdzono natomiast mutacje genu hMLH1 (4, 5).

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA NF1 W MIĘDZYNARODOWYM CENTRUM NOWOTWORÓW DZIEDZICZNYCH W SZCZECINIE

Ponieważ gen neurofibrominy charakteryzuje się znacznymi rozmiarami (promotor + 60 eksonów) jego sekwencjonowanie jest długotrwałe i kosztowne. Dotąd nie znaleziono hot spots ani preferencji etnicznych w występowaniu mutacji, które mogłyby ułatwić diagnostykę. W diagnostyce klinicznej pacjentów spełniających kryteria diagnostyczne NIH sekwencjonowanie nie jest rutynowo stosowane. Metodę tą rezerwuje się zwykle dla pacjentów o niepełnej manifestacji klinicznej, nasuwających wątpliwości diagnostyczne, postaci segmentowej NF1 itp.

Technikę sekwencjonowania wdrożono w naszym Ośrodku - jak dotąd dla promotora i pierwszych dziesięciu eksonów. W trakcie przygotowania metodycznego znajduje się diagnostyka pozostałych eksonów. Przeprowadzono sekwencjonowanie u 80 pacjentów. Odnalezione mutacje przedstawia tabela 1.

Do analizy genu neurofibrominy wdrożono również technikę MLPA. Jest ona nieco prostsza, szybsza i tańsza, co umożliwiło badanie całego genu. Techniką tą przeanalizowano całą sekwencję genu u 45 kolejnych pacjentów, stwierdzając odpowiednio mutacje u 8 z nich - były to zmiany w eksonach 3, 4, 16, 18, 21, 31, 34 i 44. Ponadto dużą delecję obejmującą cały gen NF1 stwierdzono u innych 2 pacjentów pochodzących z tej samej rodziny (matka i córka).

W ciągu najbliższych tygodni dostępna będzie diagnostyka molekularna genu SPRED1.

PIŚMIENNICTWO

1. Friedmann JM. Neurofibromatosis type 1 Gene Clinics, <http://www.geneclinics.org/profiles/nf1/details.html>
2. Huson SM, et al.: Phakomatoses In: Emery's and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, Churchill-Livingstone, London 2002, 3: 3162-202.
3. Riccardi VM. Von Recklinghausen Neurofibromatosis, N Engl J Med 1981, 305: 1617-27.
4. Riccardi VM. Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis, 2nd Ed J Hopkins Univ Press, Baltimore 1986.
5. Gutmann DH, Consensus Group. The diagnostic Evaluation and Multidisciplinary Management of Neurofibromatosis 1 and Neurofibromatosis 2, J Am Med Ass 1997, 278: 51-7.
6. Goldberg MJ.: The Dysmorphic Children - An Orthopedic Perspective: VI. Neurofibromatosis and the Historical Phakomatoses, Raven Press NY, 1987, 225-46.
7. Benjamin CM, et al.: NF1: Knowledge, Experience and Reproductive Decisions of affected Patients and Families. J Med Genet 1993, 30: 567-94.
8. Friedmann JM, et al.: NNF International Database Participants: National Neurofibromatosis Foundation International Database. Am J Med Genet 1993, 45: 88-91.
9. Gusella J. Neurofibromatosis at the Millenium, The National Neurofibromatosis Foundation Millenium Lecture, 2000, <http://www.nf.org>
10. North K, et al.: Specific Learning Disability in Children with Neurofibromatosis type 1: Significance of MRI Abnormalities, Neurology 1994, 44: 878-83.
11. Bernardis A. Neurofibromatosis type 1 and Ras - Mediated Signalling: Fitting in the GAP's, Bioch Bioph Acta 1995, 1242: 43-59.
12. Maris JM, et al.: Monosomy 7 Myelodysplastic Syndrome and Other Second Malignant Neoplasms in Children with NF type 1. Cancer 1997, 79: 1438-46.
13. Shannon KM, et al.: Monosomy 7 Myeloproliferative Disease in Children with NF Type 1: Epidemiology and Molecular Analyses. Blood 1992, 79: 1311-8.
14. Zajączek S, et al.: Juvenile Onset Chronic Myeloid Laekemia in a Girl with the Familial Form of NF-1. Clin Genet 1999, 11: 477.
15. Zvulunov A, et al.: Juvenile Xanthogranuloma, Neurofibromatosis and Juvenile Chronic Myelogenous Leukemia. Arch Dermatol 1995, 131: 904-8.
16. Brems H, et al.: Germline Loss of Function Mutations In SPRED1 Cause Neurofiromatosis 1 Like Phenotype. Nat Genet 2007, 39: 1120-6.
17. Tartaglia M. Gain of Function SOS1 Mutations Cause a Distictive Form of Noonan Syndrome. Nat Genet 2007, 39: 75-9.
18. Griffiths DF, et al.: Multiple Endocrine Neoplasia Associated with von Recklinghausen Disease. Br Med J 1983, 287: 1341-3.
19. Ricciardone M, et al.: Human *MLH1* deficiency Predisposes to Hematological Malignancy and NF Type I. Cancer Res 1999, 59: 290-3.
20. Wang Q, et al.: Neurofibromatosis and Early Onset of Cancers in hMLH1-Deficient Childrens. Cancer Res 1999, 59: 294-7.

Stanisław Zajaczek



Nerwiakowłókniakowatość typu 2 (NF2)

Neurofibromatosis II (NF2)

Streszczenie

NF2 jest rzadką chorobą autosomalnie dominującą, ze złym rokowaniem, wynikającą z mutacji genu merliny. Gen zlokalizowany jest w chromosomie 22q12.2. Merlina jest białkiem, uczestniczącym w szlaku sygnałowym onkogenu RAS. Ryzyko przekazania choroby potomstwu wynosi 50 % a penetracja sięga 100 %. Zmiany skórne są zbliżone do obserwowanych w NF1 lecz słabiej ekspresjonowane. Mimo podobnej nazwy i objawów NF2 jest chorobą całkowicie odmienną od NF1. Charakteryzuje się ona obustronnie synchronicznie lub metachronicznie pojawiającymi się guzami typu schwannoma n. słuchowego ale także o innych lokalizacjach obrębie układu nerwowego. Niemal zawsze rozwijają się one przed 30 r.ż. Pierwszymi objawami mogą być: motoneuropatia i zaćma. Plamy *café-au-lait* występują zwykle w liczbie mniejszej niż 6 i są mniejsze, aniżeli w NF1. Również zmiany oczne mają inny charakter i powodują tylko dyskretne objawy. Wczesne objawy są wywołane przez guzy przedsionkowe i mogą się ograniczać do dyskretnych, asymetrycznych, postępujących deficytów słuchu. Guzy znacznych rozmiarów mogą pozostawać nierozpoznane.

Około połowa przypadków ma charakter rodzinny, pozostałe wynikają z mutacji *de novo*. 20 – 30 % przypadków sporadycznych ma charakter mozaikowy.

Rozpoznanie, podobnie jak w NF1 ustalane jest w oparciu o objawy kliniczne i kryteria NIH. Diagnostyka mutacji jest możliwa a jej efektywność w ostatnich latach znacznie wzrosła; możliwa jest także diagnostyka prenatalna.

Przedstawiono zasady poradnictwa genetycznego i opieki medycznej w rodzinach z NF2.

Słowa kluczowe: neurofibromatosis II, schwannoma n. słuchowego, opieka i poradnictwo rodzinne

Summary

NF2 is a rare autosomal dominant disorder, with poor prognosis, due to merlin gene mutations. The gene was localized to chromosome 22q12.2. Merlin is a protein probably involved in oncogene RAS signaling pathway. Risk of inheritance is ~ 50 %. The penetrance reaches up to almost 100%. Skin lesions are similar to those observed in NF1 but usually of lower expression. Despite the similar name and some clinical signs NF2 is completely different from NF1. NF2 is characterized by the high risk of bilateral vestibular schwannomas and other tumors of nerve tissue. Almost all affected people develop tumors by the age of 30. VS tumors develop bilaterally either synchronically or metachronically. Motoneuropathy and cataracts may be the first signs and occur, in some cases, in childhood. *Café-au-lait* spots hardly ever reach the number of six which is typical for NF1. They are smaller and never associated with pigmented skin lesions. Eye lesions are different compare to NF1 and cause only subtle vision defects Early symptoms are usually caused by VS. Generally it takes many years to develop a clinically noticeable progressive, asymmetric hearing deficit. Even huge VS may be not diagnosed.

About 50% of the cases are familial, the rest occur due to de novo mutations. 25-30% of non-familial cases are mosaic for an NF2 mutation. Large submicroscopic deletions are present in 10-15% of families. Clinical diagnosis can be made, similar to NF1, by employing NIH clinical consensus criteria. Mutation scanning is used and in recent years its effectiveness grows. Prenatal diagnosis is also possible.

The chapter presents the principles of the genetic counseling and medical care for families with NF2.

Key words: neurofibromatosis 2, merlin, vestibular schwannoma, familial care and counselling

NF2 wykazuje rodowodowe cechy choroby o uwarunkowaniu autosomalnym dominującym, z niemal 100% penetracją, a w jej przebiegu obserwuje się zmiany skórne przypominające NF1; jest ona jednak całkowicie odrębną jednostką chorobową, warunkowaną przez inny gen merliny, zawarty w chromosomie 22q12.2. NF2 występuje rzadko - rozpoznawana jest w populacjach europejskich z częstością 1:210 000, ale jest niedoszacowana, rzeczywista częstość żywych urodzeń oceniana jest na 1:25-45000. Połowa pacjentów to osoby, u których choroba powstała w związku z mutacją germinálną *de novo* (1-4).

ROZPOZNANIE I PRZEBIEG KLINICZNY

Charakterystyczne dla NF2 są trzy grupy objawów: nowotwory - zazwyczaj „schwannoma” gałęzi przedsionkowej narządu słuchowego, zmiany skórne o charakterze *café-au-lait* (CAL) a niekiedy guzkowatym – ich liczba i wielkość z reguły jest mniejsza aniżeli w NF1 oraz zmiany oczne, takie jak zaćma, zmętnienia soczewki, zmiany barwnikowe i *hamartomata* siatkówki. Najczęściej występujące w NF2 nowotwory, określane poprzednio jako *acoustic neurinoma* są obecnie, zgodnie z NIH Consensus Conference of Acoustic Neuroma - 1992 (5) definiowane jako *schwannoma* narządu przedsionkowego (*vestibular schwannoma* - VS). Cechy kliniczne NF2 i częstość ich występowania przedstawiono w tabeli 1.

Kryteria upoważniające do rozpoznania NF2, zmodyfikowane w stosunku do *NIH Consensus* ze względu na dogodność w stosowaniu (2) przedstawiają się następująco:

- 1) Obustronne VS potwierdzone histopatologicznie lub widoczne w MRI przy użyciu gadolinium,

lub:

- 2) Krewny I° z wykrytym NF2 i wystąpienie u badanego
 - a) jednostronnego VS
lub:
 - b) współwystępowania przynajmniej dwu z niżej wymienionych cech: *meningioma*, *glioma*, *schwannoma*, podtorebkowego zmętnienia soczewki, zwapnień śródmózgowych,
- 3) Jednostronny VS i współwystępowanie przynajmniej dwu z cech niżej wymienionych: *meningioma*, *glioma*, *schwannoma*, podtorebkowego zmętnienia soczewki, zwapnień śródmózgowych,

lub:

- 4) Dwa lub więcej *meningioma* i współwystępowanie przynajmniej jednej z wymienionych zmian: *glioma*, *schwannoma*, podtorebkowe zmętnienia soczewki, zwapnienia śródmózgowe.

Guzy VS pojawiają się obustronnie, synchronicznie lub metachronicznie u 85-95% chorych; w przypadku manifestacji asynchronicznej odstęp czasu pomiędzy ich pojawianiem się wynosi średnio 7,5 roku (~20 lat). Pierwszymi, niecharakterystycznymi objawami VS są szum w uszach, zawroty głowy, stopniowa i trudno uchwytana utrata słyszenia (3, 6, 7).

Tab. 1. Główne objawy NF2 i odsetkowa częstość ich występowania

Objaw	Odsetek chorych z manifestacją
Guzy - większość bezobjawowa!!!	
VS obustronne	85
VS jednostronne	6
Meningioma mózgowia	45
Meningioma rdzenia przedłużonego	26
Astrocytoma	4
Ependymoma	2,5
Neuropatia obwodowa	3
Schwannoma obwodowe	68
CAL	
1 - 6	43
3 - 6	8
Zaćma	81
Hamartoma i zmiany barwnikowe siatkówki	9

Schwannoma z inną niż narząd słuchowy lokalizacją występują również często i są obserwowane u 75-90% pacjentów. Mogą być zlokalizowane również w rdzeniu przedłużonym. Tylko 26% z nich powoduje u pacjenta dolegliwości zgłaszane w chwili wykrywania choroby. Radiologicznie a także w ocenie śródoperacyjnej *in situ* są one nieodróżnialne od nerwiakowłókniaków rdzenia występujących w NF1; rozstrzyga różnicowanie histopatologiczne (3).

Zmiany *café-au-lait* wyjątkowo tylko osiągają charakterystyczną dla NF1 liczbę sześciu, są mniejsze aniżeli w NF1, nigdy nie towarzyszą im zmiany barwnikowe okolic pachowych.

Guzy nerwów obwodowych manifestują się klinicznie jako (3, 7):

- guzki skórne – „NF2 plaques” - widoczne u ok. połowy chorych, dobrze odgraniczone wygórowania o szorstkiej powierzchni, otoczone zwykle owłosieniem, nieprzekraczające średnicy 2 cm;
- „guzki NF1 podobne” - widoczne u ok. 40% pacjentów.

Zmiany nerwów obwodowych wykazują zawsze strukturę *schwannoma*.

Objawy oczne (zmętnienia podtorebkowe, różne formy zaćmy, przerost barwnikowy siatkówki i jej *hamartomaty*) tylko wyjątkowo zgłaszane są jako uchwytnie dla pacjenta zaburzenia widzenia (3, 6, 7).

Pierwsze zgłaszane przez chorych objawy NF1 pojawiają się zazwyczaj ok. 20 r.ż. (2-52 lat), średni wiek rozpoznania w wyspecjalizowanych ośrodkach oceniano na 27-28 lat jednak aż u 10% chorych rozpoznanie można postawić ok. 10 r.ż. w okresie bezobjawowym (3, 6).

Wczesnymi objawami są zwykle dolegliwości wywołane przez VS. Rozwój klinicznie uchwytnego inwalidztwa słuchu trwa zwykle wiele lat i nawet duże VS mogą pozostawać bezobjawowe. Ponieważ interwencja operacyjna wiąże się z reguły z utratą słuchu, utrudnia to decyzję o jej podjęciu (3).

Klinicznie NF2 wykazuje znaczną heterogenność objawów, jednak zazwyczaj występuje w jednej z dwóch form:

- **umiarkowanej (typ Gardnera 1A)** z początkiem zwykle ok. 25 r.ż, dominującym zespołem objawowym związanym z VS i stosunkowo słabą ekspresją innych guzów i zmian skórnych;
- **ciężkiej (typ Wishart 2B)** z początkiem przed 25 r.ż., VS stwierdzanymi tylko u połowy chorych; częstymi, dużymi, mnogimi guzami o innych lokalizacjach; szybkim przebiegiem i zgonem zwykle przed okresem prokreacji (1, 3, 7, 8).

Ostatecznie choroba pozostaje zawsze nieuleczalna i prognoza jest zła; średnie przeżycie od chwili rozpoznania u pacjentów wyspecjalizowanych ośrodków brytyjskich wynosi ok. 15 lat, a średnia długość życia ok. 36 lat (3).

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA NF2

Zlokalizowany w chromosomie 22 i o znanej sekwencji gen NF2 składa się z 16 konstitutywnie 1 alternatywnie wycinanego eksonu. Na skutek alternatywnego odczytywania sekwencji gen koduje przynajmniej 2 formy białka - merliny o odrębnej ekspresji tkankowej. Sekwencja genu NF2 wykazuje homologię z genami rodziny określanej jako „białka 4,1”; ich funkcja w komórce - podobnie jak samej merliny - polega na pośredniczeniu w interakcjach pomiędzy środowiskiem zewnętrznym komórek a cytoszkieletem.

Charakterystyka mutacji w guzach typu *schwannoma*, zwłaszcza utrata heterozygotyczności mutacji konstytucyjnych, kwalifikuje gen NF 1 do grupy supresorów. Obserwowane mutacje konstytucyjne to zwykle utraty znacznych obszarów lub całego genu oraz mutacje typu „stop”, powodujące znaczne skrócenie cząsteczki białka - merliny i utratę jego funkcji. Fenotypy „łagodne” typu Gardnera 1A, obserwuje się u nosicieli mutacji uszkodzających część kar-

boksylową merliny. Fenotypy „ciężkie” typu Wishart 2B pojawiają się zwykle u nosicieli mutacji typu „stop” ze znacznym skróceniem białka lub u nosicieli dużych delecji (6, 7).

W praktyce diagnostycznej skuteczność osiąga się po wykorzystaniu wszystkich dostępnych metod analiz uzyskuje się u 90% pacjentów z uwarunkowaniem rodzinnym i ~70% osób spełniających w pełni kryteria diagnostyczne, ale rodowodowo izolowanych.

Stosunkowo znaczny odsetek, wśród pacjentów z NF2 stanowią nosiciele dużych delecji w obszarze genu NF2. Mogą one być wykryte technikami cytogenetycznymi o wysokiej rozdzielczości lub FISH i często pojawiają się w formie takich aberracji chromosomu 22 jak inwersja/delecja, chromosom pierścieniowy, translokacja/delecja itp. Mniejsze delecje i mutacje punktowe diagnozuje się zwykle techniką MLPA i/lub sekwencjonowaniem. Na szczególne podkreślenie zasługuje stosunkowo wysoki odsetek osób z postacią mozaikową mutacji konstytucyjnej; sięga on prawdopodobnie 30% wszystkich chorych - u osób takich analizy DNA z leukocytów nie wykazują zwykle mutacji konstytucyjnej a w jej poszukiwaniu konieczne jest odwołanie się do DNA guza z pomniejszym poszukiwaniem w różnych tkankach obwodowych. W szczególności dotyczy to pacjentów rodowodowo izolowanych (1). Pacjenci ci mogą również sprawić trudności diagnostyczne z powodu łagodniejszego przebiegu choroby i jej jednostronności.

W przeciwieństwie do genu NF1, właściwości genu NF2, a zwłaszcza mniejsza długość genu, zatem krótszy czas i mniejsze koszty badania, czynią realnym stosowanie jego diagnostyki molekularnej w praktycznym postępowaniu klinicznym; dotyczy to zarówno sekwencjonowania, jak i diagnostyki rodzin poprzez badanie wewnątrz- i zewnątrzgenowych markerów sprzężonych. Szczególną rolę odgrywa diagnostyka molekularna w wykrywaniu/wykluczaniu nosicielstwa mutacji u bezobjawowych jeszcze członków obciążonych rodzin; postępowanie takie budzi jednak nierzadko wątpliwości natury etyczno-psychologicznej (3, 7).

Znaczny, prawdopodobnie przekraczający 15% odsetek przypadków NF2 to chorzy z mozaikową formą nosicielstwa mutacji konstytucyjnych. U chorych tych nie tylko choroba przebiegać może łagodniej, również ryzyko przekazania jej potomstwu jest znacznie niższe od typowego ryzyka 50%, prawdopodobnie nie przekraczając kilku procent (7).

RÓŻNICOWANIE I ZESPOŁY POKREWNE (1)

- a) **NF1:** pokrywanie się niektórych manifestacji, liberalizm zastosowanych kryteriów rozpoznania i niemal identyczne - z powodów historycznych - nazwy tych dwu chorób łątwo powodować mogą omyłki diagnostyczne.

- b) **Jednostronny schwannoma nerwa przedślonkowego:** jest stosunkowo częstym guzem w populacji ogólnej i nie wykazuje konstytucyjnego związku z NF2 (co nie zwalnia od konieczności odpowiedniego monitorowania). Tylko ok. 6% takich pacjentów jest uwarunkowanych mozaikową formą NF2, pozostali są wolni od ryzyka. Dotyczy to szczególnie osób z pierwszymi objawami po 55 r.ż. Natomiast rozpoznanie NF2 jest szczególnie prawdopodobne, jeśli jednostronny, izolowany guz pojawił się przed 30 r.ż.
- c) **Schwannomatosis:** jest wystąpieniem tych guzów w formie mnogiej, jednak zawsze bez lokalizacji w narządzie przedślonkowym. Lokalizują się one wewnątrzczaszkowo, w korzeniach rdzeniowych i narządzie obwodowych. Transformacja złośliwa jest rzadka. Odpowiadający locus znajduje się również w chromosomie 22, ale jest na pewno różny od genu merliny.
- d) **Meningiomatosis:** Mnogie *meningioma* pojawiające się zwykle po 25-30 r.ż. z reguły bez umiejscowienia w narządzie przedślonkowym o z pewnością odrębnym od NF2, ale nieznanym uwarunkowaniu genetycznym. Natomiast nawet pojedynczy *meningioma* u dziecka powinien być traktowany jako możliwy sygnał NF2.

OPIEKA NAD CHORYMI I RODZINAMI OBCIĄŻONYMI (1, 3, 6, 8, 9)

Diagnostyka u pacjentów z podejrzeniem NF2 obejmuje ukierunkowaną ocenę dermatologiczną z dokumentacją zmian, ukierunkowane badanie okulistyczne, pełną ocenę neurologiczną, badanie laryngologiczne z obiektywną oceną słuchu. Obowiązuje wstępne wykonanie badania MRI mózgowia i rdzenia - zawsze z użyciem gadolinium. Badania te powtarzamy raz na rok (również w przypadkach wątpliwych) i dodatkowo w przypadku nowych dolegliwości. Podobnie, celem potwierdzenia/wykluczenia rozpoznania postępujemy jednorazowo i zawsze dodatkowo w przypadku nowych, istotnych objawów u wszystkich krewnych I° dla chorych z potwierdzonym rozpoznaniem.

Do weryfikacji rozpoznania można posłużyć się - jeśli są dostępne - technikami molekularnymi analizy genu NF2. Brak dostępności technik molekularnych nie zwalnia od postawienia rozpoznania (3, 9). Diagnostyka nosicieli mutacji w bezobjawowym wieku dziecięcym budzi liczne wątpliwości i wydaje się uzasadniona tylko w przypadku, gdy wynik wpłynie znacząco na planowanie przyszłego życia pacjenta np. wybór edukacji i zawodu; jednak i w takich przypadkach możliwość niekorzystnych efektów psychologicznych nakazuje szczególną sumienność postępowania (1).

Z uwagi na wczesne pojawianie się u znacznej liczby obciążonych mutacją dzieci subklinicznych zmian ocznych, wyspecjalizowane ośrodki zalecają podjęcie monitorowania okuli-

stycznego już ok. 10 r.ż. (7). Zalecamy także wykonanie u wszystkich członków rodziny obiektywnego badania słuchu i przechowania jego dokumentacji - w przyszłości dane te stanowią cenny punkt odniesienia i są istotne dla oceny dynamiki zmian.

Leczenie operacyjne zmian, zwłaszcza typu VS, powinno być podejmowane tylko w ośrodkach neurochirurgiczno-laryngologicznych dobrze zaznajomionych z tą jednostką chorobową.

Wobec związanego z operacją inwalidztwa słuchu i braku w literaturze szerokich danych prognostycznych, przy generalnie złym przebiegu choroby decyzje o postępowaniu inwazyjnym muszą być bardzo rozważne (7).

PIŚMIENNICTWO

1. Evans DGR, et al.: A Genetic Study of Type 2 Neurofibromatosis. II. Guidelines for Genetical Counseling. *J Med Genet* 1992, 29: 847-52.
2. Gusella J. Neurofibromatosis at the Millennium, The National Neurofibromatosis Foundation Millennium Lecture, 2000, <http://www.nf.org>
3. Huson SM, et al.: Phakomatoses, In: Emery's and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, Churchill-Livingstone, London 2002, 3: 3162-202.
4. Narod SA, et al.: Neurofibromatosis Type 2 Appears to be a Genetically Heterogenous Disease. *Am J Hum Genet* 1992, 51: 486-96.
5. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Acoustic Neuroma. *Neurofibromatosis Res Newsl* 1992, 8: 1-7.
6. Evans DG, et al.: Neurofibromatosis type 2. *J Med Genet*, 2000, 37, 12, 897-904.
7. Evans DGR, et al.: A Clinical Study of Type 2 Neurofibromatosis. *Quart J Med* 1992, 304: 603-18.
8. Riccardi VM. Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis, 2nd Ed J Hopkins Univ Press, Baltimore 1986.
9. Gutmann DH, Consensus Group: The Diagnostic Evaluation and Multidisciplinary Management of Neurofibromatosis 1 and Neurofibromatosis 2, *J Am Med Assoc* 1997, 278: 51-7

Aleksandra Tołoczko-Grabarek, Joanna Trubicka, Dorota Jurkiewicz, Jan Lubiński



Genetyka kliniczna nowotworów nerek

Clinical genetics of kidney cancer

Streszczenie

Wśród nowotworów nerki można wyodrębnić 2 główne grupy:

1. guz Wilmsa – nephroblastoma
2. raki nerki – adenocarcinoma (carcinoma clarcellulare, carcinoma papillare, colecting duct carcinoma, chromophobic cell carcinoma), carcinoma urotheliale.

Postać rodzinna guza Wilmsa stanowi 1-2% przypadków tych guzów.

Dotychczas opisano 14 genetycznie uwarunkowanych zespołów związanych ze zwiększonym ryzykiem guza Wilmsa. Mutacje konstytucyjne będące przyczyną powstawania dziedzicznego nephroblastoma dotyczą najczęściej jednego z czterech locus: *WT1*, *WT2*, *FWT1*, *FWT2*. Ryzyko zachorowania na guza Wilmsa u nosicieli tych mutacji wynosi 5% - 90% w zależności od zmutowanego locus.

Opisano 19 zespołów dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, w przebiegu, których w nerkach mogą powstać rak jasnokomórkowy (CCRC), rak brodawkowy (PRCC) lub rak z nabłonka przejściowego. Najczęściej rozpoznawanym zespołem jest rodzinny rak jasnokomórkowy nerki (F-CCRC). Wśród wszystkich rodzin CCRC 5% stanowią rodziny spełniające kryteria definitywne F-CCRC, zaś 13% stanowią rodziny CCRC-u kolejnych osób.

W większości przypadków F-CCRC opisanych w literaturze nie znaleziono mutacji będących przyczyną agregacji CCRC w rodzinach. W naszym Ośrodku wykazaliśmy, że istotną przyczyną powstawania CCRC jest konstytucyjna zmiana w genie *CHEK2*. Nadal jednak kluczową rolę w rozpoznawaniu F-CCRC odgrywa analiza rodowodowo-kliniczna. W naszym Ośrodku w rodzinach z pojedynczym CCRC wysuwamy podejrzenie F-CCRC stosując jako kryteria:

- a. zdiagnozowanie CCRC poniżej 55 r.ż. lub
- b. wystąpienie raka żołądka lub płuca u krewnych I stopnia pacjenta z CCRC.

U osób z rodzin z rozpoznaniem F-CCRC stosujemy schemat badań kontrolnych pozwalający na wczesne wykrycie raka nerki, jednak postępowanie lecznicze nie jest ściśle określone.

Ewentualne schematy leczenia będą mogły być ustalone po analizie przebiegu klinicznego leczonych w różny sposób dużych grup raków z rodzin z F-CCRC.

Słowa kluczowe: rak nerek, rak jasnokomórkowy nerki, guz Wilms'a, nefroblastoma

Summary

Among kidney malignancies two main groups can be distinguished:

1. Wilm's tumor - nephroblastoma
2. Kidney cancer - adenocarcinoma (carcinoma clarocellulare - CCRC, carcinoma papillare - PRCC, collecting duct carcinoma, chromophobic cell carcinoma), carcinoma urotheliale.

Wilm's tumor and kidney cancer can develop as result of strong hereditary predisposition.

Familial Wilm's tumor constitutes 1-2% of all.

Fourteen different syndromes with increased risk of Wilm's tumor have been reported. Hereditary Wilm's tumor is caused by constitutional mutation in *WT1*, *WT2*, *FWT1* or *FWT2* loci. Depending on mutated gene, the risk of Wilm's tumor varies between 5% and 90%.

Kidney cancer can appear in 19 different hereditary cancer syndromes. One of the most often diagnosed is familial clear cell renal cancer syndrome (F-CCRC). Based on our results, in 5% we can diagnose F-CCRC, and 13% are families with only one affected by CCRC but with high probability of CCRC in the relatives.

We found that mutations in *CHEK2* are associated with increased risk of CCRC, however in most cases genes causing CCRC and F-CCRC syndrome have been not identified and still the pedigree and clinical data are crucial for appropriate diagnosis.

Results of our study of CCRC patients revealed that F-CCRC syndrome could be recognize if:

- a. CCRC was diagnosed before the age 55 y.
- b. I^o relatives of CCRC patient were affected by stomach or lung cancers.

In all individuals with recognized F-CCRC syndrome, specific surveillance is recommended.

Medical treatment for CCRC patients with F-CCRC is not defined yet, and should be determined.

Key words: renal cancer, clear cell carcinoma, Wilm's tumor, nephroblastoma

GUZ WILMSA

Guz Wilmsa (*nephroblastoma*) jest najczęstszym złośliwym guzem nerek wieku dziecięcego. Występuje u ok. 1:10 tys. dzieci poniżej 15 roku życia (1). Większość przypadków występuje sporadycznie tj. jako pojedyncze zachorowanie w rodzinie. Postać rodzinna guza Wilmsa stanowi ok. 1-2% przypadków tych guzów.

GENETYCZNE UWARUNKOWANIA GUZA WILMSA

Mutacje konstytucyjne będące przyczyną powstawania dziedzicznego *nephroblastoma* dotyczą najczęściej jednego z czterech loci: *WT1*, *WT2*, *FWT1*, *FWT2* (2, 3). W ok. 10% przypadków u pacjentów z *nephroblastoma* występują wnetrostwo, spodziectwo, dysmorfie twarzy lub zespoły wad rozwojowych: BWS, WAGR, DDS (tab. 1).

Sposób dziedziczenia odpowiada dziedziczeniu autosomalnemu dominującemu z niepełną penetracją.

W przypadkach *nephroblastoma* na bazie powyższych mutacji guzy występują częściej obustronnie niż w przypadkach bez uchwytnych predyspozycji genetycznych do nowotworów (ok. 20% *versus* ok. 5%) (1).

ZASADY DIAGNOSTYKI GENETYCZNYCH UWARUNKOWAŃ GUZA WILMSA

Genetyczne uwarunkowania guzów Wilmsa rozpoznawane są rzadko, co wynika m.in. z tego, że nie jest doceniane znaczenie:

- 1) zbierania wśród dalszych krewnych danych rodowodowych niezbędnych dla rozpoznania rodzinnych postaci *nephroblastoma*;
- 2) kojarzenia występowania *nephroblastoma* z silną agregacją innych nowotworów np. raka sutka i jajnika lub nerwiaków, mięsaków w rodzinach z mutacją NF1;
- 3) pełnej oceny zmian dysmorficznych pozwalającej na wykrycie genetycznych uwarunkowań guza Wilmsa, którym towarzyszą wady rozwojowe.

Podobnie jak w innych zespołach dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, w rozpoznawaniu guza Wilmsa należy uwzględnić następujące etapy:

- wnikliwą ocenę danych rodowodowo-klinicznych:
 - a) występowanie guza Wilmsa nie tylko wśród krewnych I° i II°, ale także wśród krewnych III° i IV°;
 - b) występowanie w rodzinie agregacji innych nowotworów;
- badanie przedmiotowe;
- badanie cytogenetyczne;
- badanie molekularne DNA (4).

Badanie cytogenetyczne jest przydatne szczególnie w diagnostyce dziedzicznych postaci guza Wilmsa powstałych *de novo*. Badanie to jest stosunkowo tanie i bardziej dostępne

niż badanie molekularne. Wykazano, że ocena kariotypu jest efektywna w ujawnianiu przemieszczenia w obrębie *locus WT2* u pacjentów z BWS, natomiast hybrydyzacja *in situ* jest czułą metodą w ocenie występowania dużych delecji *WT1* u osób z zespołem WAGR.

W pracowniach molekularnych wykonujących badania naukowe możliwa jest analiza pełnej sekwencji genów *WT1*, *p53*, *GPC3*, dzięki której można wykryć obecność mutacji punktowych. Obecnie dostępne są badania diagnostyczne *locus WT2*, które obejmuje region 11p15. W tym regionie znajdują się dwie domeny (IC1 oraz IC2), zawierające kilka genów będących regulatorami wzrostu i związanych z procesem piętnowania. W domenie IC1 zlokalizowane są geny *IGF2* oraz *H19*, natomiast w domenie IC2 znajdują się geny *KCNQ1OT1* (*LIT1*) oraz *CDKN1C*.

Epigenetyczne i genetyczne defekty regionu 11p15 występują u około 3% pacjentów z izolowanym guzem Wilmsa (Scott i wsp. 2008, Segers i wsp. 2012). Nieprawidłowości w tym regionie są też identyfikowane u większości pacjentów z zespołem Beckwitha i Wiedemanna (BWS), w którym występuje zwiększone ryzyko powstawania nowotworów embrionalnych, najczęściej guza Wilmsa (Cooper i wsp. 2005). Nowotwory embrionalne wykrywa się u około 5-13% pacjentów z BWS (Weksberg i wsp. 2001, Cooper i wsp. 2005). Defekty regionu 11p15 związane z obecnością guza Wilmsa obejmują ojcowską disomię jednorodzielską (UPD), hipermetylację IC1 lub hipometylację IC2. Pacjenci z ojcowską UPD lub hipermetylacją IC1 mają większe ryzyko powstawania guza Wilmsa ($\pm 25\%$) w porównaniu z pacjentami z hipometylacją IC2 ($\pm 5\%$) (Cooper i wsp. 2005, Cardoso i wsp. 2012, Segers i wsp. 2012). Defekty epigenetyczne (nieprawidłowa metylacja) oraz UPD występują najczęściej sporadycznie. U około 20-35% pacjentów z hipermetylacją IC1 identyfikuje się w obszarze domeny IC1 delecje oraz mutacje punktowe na allelu matczynym lub duplikacje na allelu ojcowskim, natomiast u około 2% pacjentów z hipometylacją IC2 są obecne delecje na allelu matczynym w obszarze domeny IC2 (Baskin i wsp. 2014). Powyższe zmiany genetyczne mogą być dziedziczne i wiążą się ze zwiększonym ryzykiem rodzinnego występowania guza Wilmsa.

Niestety pozostałe loci odpowiedzialne za powstawanie dziedzicznego *nephroblastoma* (FWT1, FWT2) nie zostały dotąd sklonowane.

BADANIA KONTROLNE W RODZINACH Z WYSOKIM RYZYKIEM GUZA WILMSA

W rodzinach z predyspozycją do guza Wilmsa należy stosować USG jamy brzusznej co 3 miesiące od urodzenia do 8 rok życia, a następnie co 6 miesięcy do 12 rok życia (po 12 roku życia rzadziej) (1, 5). W przypadkach wykrycia w USG zmian o niejasnym charak-

terze lub stwierdzenia pozostałości zarodkowej tkanki nefrogennej (istnieje pogląd, że *ne-phroblastoma* wywodzi się z tkanki nefrogennej) zaleca się wykonanie rezonansu magnetycznego lub tomografii komputerowej (1, 6). Ponadto w zespole Beckwitha i Wiedemanna (BWS), z powodu zwiększonego ryzyka innych nowotworów, w pierwszych latach życia schemat badań powinien być uzupełniony o oznaczanie a-fetoproteiny w celu wykrycia ewentualnego *hepatoblastoma*. Niektórzy autorzy zalecają również wykonanie okresowych badań RTG klatki piersiowej i oceny wydalania VMA (kwasu wanilino-migdałowego) w celu wczesnego wykrycia neuroblastoma (1).

RAK NERKI (RCC)

Rak nerki stanowi ok. 3% nowotworów złośliwych osób dorosłych. W Polsce rozpoznawanych jest corocznie ponad 2000 nowych przypadków (7). Spośród wszystkich RCC najczęściej występującym jest rak jasnokomórkowy (CCRC) – stanowi on ok. 80% wszystkich rozpoznawanych raków nerki (7). Częstość występowania RCC związanego z wysokim genetycznym ryzykiem wielu autorów określa na 1-2% wszystkich RCC (8).

Dotychczas opisano 19 zespołów dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, w przebiegu których w nerkach mogą powstać: CCRC, rak brodawkowaty (PRCC) lub rak z nabłonka przejściowego.

RAK JASNOKOMÓRKOWY (CCRC)

Najlepiej poznany zespół genetycznej predyspozycji do nowotworów, w przebiegu którego może rozwinąć się CCRC jest zespół VHL opisany w innym rozdziale niniejszego opracowania (7, 9, 10, 11, 12).

Tab. 1. Genetycznie uwarunkowane zespoły związane ze zwiększonym ryzykiem guza Wilmsa.

Zespół	Fenotyp	Gen/locus	Dziedziczenie	Ryzyko guza Wilmsa
Rodzinna agregacja guzów Wilmsa bez towarzyszących zmian klinicznych	Agregacja rodzinna guzów Wilmsa; guzy częściowej jednostronne	WT1(11p13) WT2 (11p15) FWT1(17q) FWT2(19q)	AD	Mutacje genów WT1, WT2- ~25%; mutacje genu FWT1- 30%; mutacje genu FWT2- 70%

Denysa-Drasha (DDS)	Guz Wilmsa, glomerulopatia, obojnactwo rzekome	Mutacja punktowa WT1 (11p13)	Mutacje germinalne <i>de novo</i> , rzadko agregacja rodzinna, AD	90%
WAGR	Guz Wilmsa, <i>aniridia</i> , wady układu moczowo-płciowego, upośledzenie umysłowe	Delecja genu WT1(11p13)	Mutacje germinalne <i>de novo</i> , rzadko agregacja rodzinna, AD	30%
Beckwith-Wiedemanna (BWS)	<i>Macrosomia</i> , przerost języka, wady przedniej ściany jamy brzusznej <u>Zmienne objawy:</u> <i>visceromegalia</i> , hipoglikemia, przerost połowicy, wady układu moczowo-płciowego, nowotwory embrionalne	<i>Locus</i> WT2 (11p15)	Mutacje germinalne <i>de novo</i> , w 15% rodzinny BWS, AD	5%
Simpsona-Golaba-Behmela (SGB)	Gigantyzm, wady rozwojowe, guzy zarodkowe	GPC3 (Xq26)	XR	Wysokie u chłopców, bliżej nieokreślone
HPT-JT (zespół guzów przytarczyc i guzów szczęki)	Gruczolaki rzadziej raki przytarczyc w młodym wieku, włóknisto-kostne guzy szczęki, guz Wilmsa	HRPT2 (1q21-q31)	AD	Wysokie, bliżej nieokreślone
Perlmana	<i>Macrosomia</i> , <i>visceromegalia</i> , dysmorfie twarzy, wnetrostwo	?	AR	<25% wśród rodzeństwa
Trisomia18	Liczne wady wielu narządów, upośledzenie umysłowe, guz Wilmsa			Niskie, bliżej nieokreślone
Izolowany przerost połowicy	Połowiczy przerost ciała	?	?	<5%
<i>Aniridia</i>	<i>Aniridia</i>	PAX6	?	1,5%
Raka sutka-jajnika	Raki sutka i jajnika	<i>BRCA1</i> (17q11), <i>BRCAX</i>	AD	Niskie
Li-Fraumeni	<i>Sarcoma</i> , białaczki, guzy mózgu, raki sutka	p53 (17p13)	AD	Niskie

<i>Neurofibromatosis</i> -typ1	Nerwiakowłókniaki, plamy typu „café-au-lait”, guzki Lischa, guzki nerwu wzrokowego	NF1 (17q11)	AD	Niskie
<i>Blooma</i>	Niski wzrost, „erytemata” skóry, białaczki, chłoniaki, raki jelita grubego i inne nowotwory	BLM (15q26)		Niskie

Najczęściej jednak rozpoznawanym zespołem jest rodzinny rak jasnokomórkowy nerki (F-CCRC) specyficzny narządowo, w przebiegu którego stwierdza się co najmniej 2 przypadki CCRC, a brak cech zespołu VHL (8, 13, 14, 15).

Według naszych danych wśród wszystkich CCRC 5% stanowią rodziny spełniające kryteria definitywne F-CCRC zaś 13% stanowią przypadki z rodzin z pojedynczym zachorowaniem na CCRC jednak z wysokim prawdopodobieństwem rozwoju kolejnych CCRC.

Dziedziczną predyspozycję do nowotworów najbardziej precyzyjnie można rozpoznać, gdy stwierdzi się mutację konstytucyjną w jednym z genów odpowiedzialnych za ich powstawanie. Dzięki możliwości oceny mutacji w genach *BRCA1*, *BRCA2*, *MSH2*, czy *MLH1* niezwykłą skuteczność diagnozowania osiągnięto w przypadku wysokiej predyspozycji do raków piersi, jajnika, jelita grubego i trzonu macicy.

W przypadku F-CCRC nie znaleziono dotychczas genu odpowiedzialnego za jego powstawanie. W diagnostyce niektórych rodzin z F-CCRC przydatne jest badanie cytogenetyczne.

W dotychczasowej literaturze opisano 3 rodziny z F-CCRC, w których stwierdzono związek powstawania CCRC z występowaniem konstytucyjnych translokacji. W 1979 roku Cohen i jego współpracownicy opisali rodzinną translokację zrównoważoną pomiędzy chromosomami 3 i 8 [t(3;8)(p14,q24,1)] będącą przyczyną powstawania obustronnych CCRC w młodym wieku - w przedziale wiekowym 37 r.ż.-59 r.ż. (16). U jednej nosicielki tej translokacji wystąpił wielogniskowy brodawkowaty i anaplastyczny rak tarczycy. Gemmill i współpracownicy w 1998 roku wysnuli teorię, że t(3;8) prowadzi do fuzji genów FHIT i TRC8, z których być może powstaje gen powodujący zwiększone ryzyko wystąpienia raka nerki. W 1988 roku Kovacs opisał rodzinę z konstytucyjną translokacją t(3;6)(p13;q25,1). U nosiciela tej translokacji w 53 roku życia wystąpił obustronny, wielogniskowy rak jasnokomórkowy nerki (17, 18).

Kolejny odnotowany w piśmiennictwie przypadek rodziny z rodzinnym rakiem nerki, którego przyczyną była translokacja został opisany w 1998 roku przez zespół Koolen i Bodmera (19, 20). W rodzinie tej u 4 nosicieli translokacji zrównoważonej $t(2;3)(q35;q21)$ wystąpiły raki nerki w wieku 40, 53, 54, 68 lat, w tym 3 raki jasnokomórkowe. Ponadto u jednego z nosicieli rozpoznano raka płaskonabłonkowego pęcherza moczowego.

Taką samą translokację stwierdzono w 1996 roku w naszym Ośrodku u dwóch braci z obustronnym rakiem jasnokomórkowym nerki, u których w rodzinie 5 dalszych osób zmarło również z powodu raka nerki (21).

Van Kessel ze współpracownikami przebadali 57 nosicieli różnych translokacji zrównoważonych chromosomu 3 z 10 rodzin. U czterech badanych stwierdzono raka nerki. Na podstawie swych obserwacji wyciągnęli wniosek, że u nosicieli translokacji chromosomu 3 jest zwiększone ryzyko raka nerki, szczególnie, jeśli miejsce złamania znajduje się blisko centromeru (22). Raki te występują w młodym wieku (ok. 45 lat), są wieloogniskowe i obustronne.

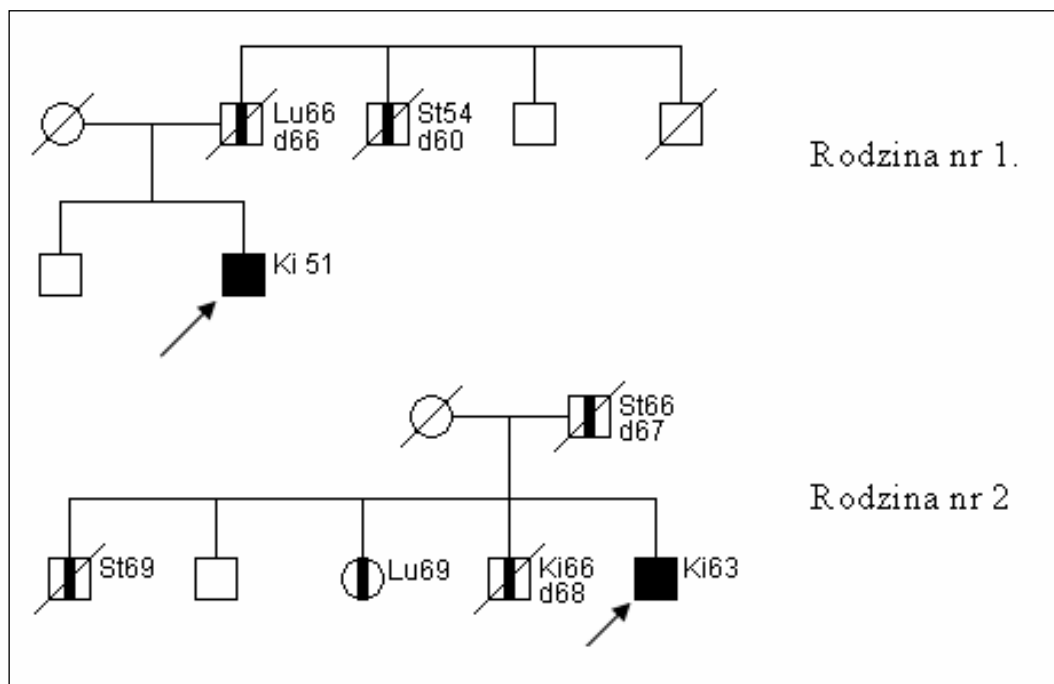
W większości przypadków F-CCRC opisanych w literaturze nie znaleziono mutacji będących przyczyną agregacji CCRC w rodzinach (23, 24, 25, 26). Ostatnio w naszym Ośrodku wykazano, że istotną przyczyną powstawania raka jasnokomórkowego nerki jest konstytucyjna zmiana I157T w genie *CHEK2* (27).

Nadal jednak podstawową metodą rozpoznawania F-CCRC jest ocena danych rodowodowo-klinicznych.

Zdefiniowane przez nasz zespół kryteria rodowodowo - kliniczne oparte są o ocenę krewnych I° chorego z CCRC („nuclear pedigree” kryteria), pozwalające na rozpoznawanie z dużym prawdopodobieństwem rodzin z F-CCRC pomimo tego, że wśród najbliższych krewnych (tj. krewnych I°) nie stwierdzono przypadków CCRC.

Na podstawie naszych analiz stwierdziliśmy, że w rodzinach z pojedynczym CCRC można wysunąć podejrzenie F-CCRC stosując jako kryterium (ryc. 1):

- zdiagnozowanie CCRC poniżej 55 roku życia, lub
- wystąpienie raka żołądka lub raka płuca u krewnych I° pacjenta z CCRC.



Ryc.1. Rodowody rodzin z F-CCRC.

BADANIA KONTROLNE W RODZINACH Z F-CCRC

Cechą charakterystyczną CCRC jest bezobjawowy początek choroby. Dolegliwości kliniczne pojawiają się dopiero w stadium znacznego zaawansowania nowotworu. W świetle danych literaturowych wydaje się, że właściwe postępowanie lekarskie w rodzinach z F-CCRC rzeczywiście może zwiększać szansę wczesnego wykrywania nowotworu, a w związku z tym skutecznego leczenia (25, 28, 29).

Jak dotąd brak jednakże zweryfikowanych programów badań kontrolnych wykrywania wczesnych F-CCRC.

Levinson sugeruje, że członkowie rodzin z F-CCRC powinni mieć wykonywane jedynie USG nerek, co 2-3 lata począwszy od 30 roku życia (22). Ten schemat akceptują również inni autorzy (2, 30). Jest to jednak program badań przyjęty arbitralnie.

Na podstawie naszych analiz wydaje się, że początek badań kontrolnych nerek u osób z rodzin z rozpoznaniem F-CCRC powinien być zależny od wieku zachorowania na CCRC w danej rodzinie - badania należy rozpocząć o 15-20 lat wcześniej niż najmłodsze zachorowanie na raka nerki w rodzinie i nie później niż w wieku 40 lat.

Ze względu na brak dokładnej wiedzy na temat dynamiki rozwoju CCRC u pacjentów z rodzin z F-CCRC nie można obecnie określić jakie rodzaje badań kontrolnych i z jaką częstością powinny być wykonywane.

W przypadku, jeżeli raki w rodzinach z F-CCRC należą do guzów o powolnej progresji i późnym dawaniu przerzutów, badania kontrolne można wykonywać z mniejszą czę-

ścią i za pomocą technik o mniejszej czułości wykrywania niewielkich guzów. Technika taką jest USG jamy brzusznej.

W przypadku, jeżeli raki w rodzinach z F-CCRC są od początku bardzo agresywne - rozwijają się szybko i już w momencie diagnozowania wykazują wysoki stopień zaawansowania klinicznego, schemat badań kontrolnych powinien dążyć do jak najwcześniejszego wykrycia guzów już w początkowej fazie ich rozwoju tj. guzów o niewielkiej średnicy. Do badań o niewątpliwie wyższej czułości od USG należą tomografia komputerowa (KT) zwłaszcza z kontrastem i w geometrii spiralnej oraz rezonans magnetyczny (MRI) (31, 32, 33, 34, 35).

W związku z brakiem bliższych danych na temat biologii raków z F-CCRC w naszym Ośrodku przyjęto, chociaż arbitralnie, schemat badań kontrolnych mający na celu wczesne wykrycie guzów nerki stosowany w rodzinach z zespołem VHL.

Schemat ten polega na wykonywaniu USG nerek raz w roku oraz KT lub MRI 1 raz na 3 lata (20).

LECZENIE

Postępowanie lecznicze w stosunku do raków z rodzin z F-CCRC nie jest dotychczas określone. Ewentualne schematy leczenia będzie można ustalić dopiero w oparciu o wyniki badań opisujących przebieg kliniczny dużych grup i w różny sposób leczonych raków z rodzin z F-CCRC.

W przypadku, gdyby okazało się, że raki z rodzin z F-CCRC są bardziej agresywne, być może nie będzie miało uzasadnienia leczenie chirurgiczne i w przypadkach tych będzie musiała być zastosowana radio- lub chemioterapia albo też leczenie chirurgiczne będzie musiało być zawsze radykalne.

W przypadku, gdy raki z rodzin z F-CCRC będzie charakteryzował powolny przebieg i późne dawanie przerzutów, być może najbardziej właściwym leczeniem tych nowotworów będzie tzw. „nephron sparing burglary”, które może pacjentów uchronić przed dializowaniem.

Skuteczność takiego schematu postępowania wykazano w grupie pacjentów z zespołem VHL. W zespole tym nie jest wskazana nefrektomia, a tylko resekcja guzów, jeżeli zostały one wychwycone odpowiednio wcześniej (30, 36, 37).

RAK BRODAWKOWATY NERKI (PRCC)

PRCC jest nowotworem rzadszym aniżeli CCRC. Wśród PRCC wyodrębniono 2 podgrupy: typ I – bardziej agresywny, zbudowany z komórek zasadochłonnych ze skąpą cytoplazmą i małymi jądrami tworzący struktury cewkowe i brodawkowe z licznymi makrofagami

w zrębie brodawek oraz typ II - tworzący guzy kwasochłonne zbudowane z dużych komórek z obfitą cytoplazmą i dużym jądrem.

W tzw. dziedzicznym PRCC (HPRCC) rozpoznawanym wówczas, jeśli PRCC występuje u członków danej rodziny w dwóch kolejnych pokoleniach częściej stwierdza się typ I PRCC (38, 39, 40). W dotychczas opisanych rodzinach z HPRCC stwierdzono mutacje germinalne w obrębie genu MET (29, 41). W części tych przypadków opisano współwystępowanie raków pozanerkowych: sutka, płuc, trzustki, skóry i żołądka.

RAK Z NABŁONKA PRZEJŚCIOWEGO

Rak z nabłonka przejściowego jest jedną z charakterystycznych cech zespołu Lyncha, w przebiegu którego rozwijają się raki: jelita grubego, jelita cienkiego, trzonu macicy i dróg moczowych. Zespół ten jest dokładniej opisany w innym rozdziale niniejszego opracowania.

W dotychczasowej literaturze poza wyżej przedstawionymi zespołami opisano jeszcze 7 innych uwarunkowanych genetycznie zespołów, w przebiegu których może wystąpić rak nerki.

Wszystkie dotychczas opisane zespoły predyspozycji do nowotworów, w przebiegu których może rozwinąć się rak nerki przedstawia tabela 2.

Tab. 2. Zespoły dziedzicznej predyspozycji do nowotworów, w przebiegu których może rozwinąć się rak nerki (wg Familia Cancer Database FACD, <http://facd.uicc.org>).

Nazwa zespołu	Cechy zespołu	Typ histologiczny raka nerki	Gen	Typ dziedziczenia	Szacunkowa częstość rozpoznawania zespołu
Zespół von Hippel-Lindau (VHL)	Opisane w rozdziale o zespole VHL	Rak jasnokomórkowy	<i>VHL</i>	AD	1:36000
Rodzinny rak jasnokomórkowy nerki specyficzny narządowo	Rodzinna agregacja raków jasnokomórkowych nerki związana z translokacją chromosomu	Rak jasnokomórkowy	T(2:3) T(3:12) T(3:6) T(3:8) FHIT TRC8	AD	Kilka rodzin
	Rodzinna agregacja raków jasnokomórkowych nerki niezwiązana z translokacjami chromosomu	Rak jasnokomórkowy	<i>CHEK2</i>	Wieloczynnikowe	Nieznana

Rodzinny rak brodawkowy nerki specyficzny narządowo (HPRCC)	Rodzinna agregacja raków brodawkowych nerki	Rak brodawkowy typ I	MET	AD	Kilka rodzin
Rodzinna mięśniakowatość i rak brodawkowy nerki (HLRCC)	Wielogniskowe guzy typu „leiomyoma” skóry i macicy	Rak brodawkowy typ II	FH	AD	Nieznana
Zespół Lyncha (HNPCC)	Opisane w rozdziale o zespole Lyncha	Rak z nabłonka przejściowego	<i>MSH2</i> <i>MLH1</i> <i>MSH6</i> <i>PMS1</i> <i>PMS2</i>	AD	1:400
Stwardnienie Guzowate	Liczne zmiany typu „hamartoma” w skórze, błonach śluzowych, ośrodkowym układzie nerwowym, wątrobie, nerkach, płucach, siatkówce oka	Rak jasnokomórkowy Rak brodawkowy	TSC1 TSC2	AD	1:10000
Zespół Bean’a	Liczne, wielogniskowe naczyniaki jamiste w skórze, jelicie śledzionie, płucach, torebkach stawowych	Rak nerki bez określonego typu	?	AD	Około 150 przypadków
Zespół Cowdena	Liczne zmiany typu „hamartoma”, rak sutka	Rak nerki bez określonego typu	PTEN	AD	Około 300 przypadków
Zespół Gorlina	Wielogniskowe raki podstawnokomórkowe	Rak nerki bez określonego typu	PTCH	AD	1:50000
Anemia Fanconiego	Mała waga urodzeniowa, niski wzrost, plamy typu „café-au-lait” w skórze, zmiany w układzie kostnym	Rak nerki bez określonego typu	FANCA FANCC FANCD FANCG/XR CC9 FANCE FANCF	AR	1:100000
Zespół MEN1	Wielogniskowe guzy endokrynne	Onkocytoza, rak bez określonego typu	MEN1	AD	
„Familial non-medullary thyroid cancer (FNMTc)”	Rak brodawkowy tarczycy	Rak brodawkowy typ I, onkocytoza	TCO FPTC-PRN	AD?	Jedna rodzina

Dziedziczny rak prostaty	Rak prostaty	Rak nerki bez określonego typu	HPC1/HPT1 HPCX ELAC2/HP2 PCAP CAPB HPC20	AD	Nieznana
Zespół Bardeta-Bidla (BBS)	Otyłość, retinopatia, utrata wzroku, brachydaktylia, opóźnienie umysłowe, astma, niewydolność nerek	Rak jasnokomórkowy	BBS1 BBS2 BBS3 BBS4 BBS5	AR	3 przypadki raka nerki wśród 180 chorych z BBS
Zespół Wernera	Niski wzrost, przedwczesne starzenie się organizmu, zmiany skóry typu „scleroderma”	Rak nerki bez określonego typu	WRN	AR	1:200000
Zespół Birt-Hogg-Dube	Wielogniskowe zmiany typu „fibrofolliculoma”, „trichodiscoma”, „acrochordoma” w skórze	Raki: chromofobowy, jasnokomórkowy, brodawkowaty	BHD	AD	Kilka rodzin
„Diffuse tubulocystic renal hyperplasia with RCC”	Zmiany cewkowo-torbielowe w nerkach	Rak cewkowo-brodawkowaty	?	De novo	Dwa przypadki w świecie
Zespół gruczolaków i raków jelita grubego	Gruczolaki i raki jelita grubego	Rak nerki bez określonego typu	CRAC1	AD	Jedna rodzina

PIŚMIENNICTWO

1. Cybulski C, et al.: Nowotwory dziedziczne u dzieci . guz Wilmsa. Wsp Onk 2002, 6: 300-7.
2. Dome JS, Coppes MJ: Recent advances in Wilms tumor genetics. Current opinion in pediatrics 2002, 14: 5-11.
3. Ruteshouser EC, Huff V: Familial Wilms Tumor. Am J Med Genet 2004, 129: 29-34.
4. Zajączek S, Lubiński J: Zasady poradnictwa genetycznego u rodziny podwyższonym ryzyku choroby nowotworowej. Nowotwory 1999, 49: 71-2.
5. Little M, Wells C: A clinical overview of WT1 gene mutations. Human Mutat 1997, 9: 209-25.
6. Borer JG, et al.: Renal findings on radiological followup of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. J Urol 1999, 161: 235-9.
7. Borkowski A, Czaplicki M: Nowotwory i torbiele nerek. Wyd 1. PZWL, 2002.
8. Goldman SM, et al.: Renal cell carcinoma diagnosed in three generations of a single family. South Med J 1979, 72: 1457-9.
9. Krzystolik K i wsp.: Wczesna diagnostyka bezobjawowych raków nerek w rodzinach z zespołem von Hippel-Lindau w Polsce. Urol Pol 1998, 51: 171-81.
10. Neumann HP: Basic criteria for clinical diagnosis and genetic counseling in von Hippel-Lindau syndrome. J Vasc Dis 1987, 16: 220-6.
11. Neumann HPH, et al.: Prevalence, morphology and biology of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. J Urol 1998, 160: 1248-54.
12. Neumann HPH, Zbar B: Renal cysts, renal cancer and von Hippel-Lindau disease. Kidney Int 1997, 51: 16-26.
13. Erlandsson R, et al.: Do human renal cell carcinomas arise by a double-loss mechanism? Cancer Genet Cytogenet 1988, 36: 197- 202.
14. Franksson C, et al.: Renal carcinoma (hypernephroma) occurring in 5 siblings. J Urol 1972, 108: 58-61.

15. Reddy ER: Bilateral renal cell carcinoma - unusual occurrence in three members of one family. *Br J Radiol* 1981, 54: 8-11.
16. Cohen AJ, et al.: Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N Engl J Med* 1979, 301: 592-5.
17. van Kessel G, et al.: Renal cell cancer: chromosome 3 translocations as risk factor. *J Nat Cancer Inst* 1999, 91: 1159-60.
18. Maher ER, Yates JRW: Familial renal cell carcinoma: clinical and molecular genetic aspects. *Br J Cancer* 1991, 63: 176-9.
19. Bodmer D, et al.: An alternative route for multistep tumorigenesis in a novel case of hereditary renal cell cancer and t(2;3)(q35;q21) chromosome translocation. *Am J Hum Genet* 1998, 62: 1475-83.
20. Koolen MI, et al.: A familial case of renal cell carcinoma and a t(2;3) chromosome translocation. *Kidney Int* 1998, 53: 273-5.
21. Borówka A, Zajączek S: Rodzinne występowanie raka jasnokomórkowego nerki. Doniesienie zjazdowe: 26 Kongres PTU, Poznań 1996.
22. Kovacs G, Brusa P, De Ririse W: Tissue-specific expression of a constitutional 3;6 translocation: development of multiple bilateral renal-cell carcinomas. *Int J Cancer* 1989, 43: 422-7.
23. Levinson AK, et al.: Familial renal carcinoma: hereditary or coincidental? *J Urol* 1990, 144: 849-51.
24. Li FP, Marchetto DJ, Brown RS: Familial renal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1982, 7: 271-5.
25. Teh B, Giraud S, Sari F: Familial non-*VHL* non-papillary clear-cell renal cancer. *Lancet* 1997, 349: 848-9.
26. Woodward ER, et al.: Familial clear cell renal carcinoma (FCRC): clinical features and mutation analysis of the *VHL*, *MET*, and *CUL2* candidate genes. *J Med Genet* 2000, 37: 348-53.
27. Cybulski C, et al.: *CHEK2* is the multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004, 75: 1131-5.
28. Herring JC, et al.: Parenchymal sparing surgery in patients with hereditary renal cell carcinoma: a 10-years experience. *J Urol* 2001, 165: 777-81.
29. Schmidt L, et al.: Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the *MET* proto-oncogene. *Cancer Res* 1998, 58: 1719-22.
30. Walther MM, et al.: Renal cancer in families with hereditary renal cancer: prospective analysis of a tumor size threshold for renal parenchymal sparing surgery. *J Urol* 1999, 161: 1475-9.
31. Bosniak MA, Rofsky NM: Problems in the detection and characterization of small renal masses. *Radiology* 1996, 198: 638-41.
32. Choyke PL, et al.: Linehan WM. von Hippel-lindau disease: radiologic screening for visceral manifestation. *Radiology* 1990, 174: 815-20.
33. Curry NS: Small renal masses (lesions smaller than 3 cm): imaging evaluation and management. *Am J Radiol* 1995, 164: 355-62.
34. Jamis Dow CA, et al.: Small (<or= 3 cm) renal masses; detection with CT versus US and pathologic correlation. *Radiology* 1996, 198: 785-8.
35. Lightfoot N, et al.: Impact of noninvasive imaging on increased incidental detection of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2000, 37: 521-7.
36. Shinohara N, et al.: Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma in *VHL* disease. *J Urol* 1995, 154: 2016-9.
37. Walther MM, Linehan WM: Nephron sparing surgery for renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease. *J Urol* 1996, 156: 480-1.
38. Zbar B, Lerman M: Inherited carcinomas of the kidney. *Adv Cancer Res* 1998, 75: 163-201.
39. Zbar B, et al.: Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families. *J Urol* 1995, 53: 907-12.
40. Zbar B, et al.: Hereditary papillary renal cell carcinoma. *J Urol* 1994, 151: 561-6.
41. Schmidt L, et al.: Germline and somatic mutations in tyrosine kinase domain of *MET* proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Gen* 1997, 16: 68-73.



Genetyka kliniczna raka żołądka

Clinical genetics of stomach cancer

Streszczenie

Rak żołądka jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego. W około 20% wszystkich diagnozowanych przypadków raka żołądka stwierdza się rodzinną agregację nowotworów, co sugeruje, że przyczyną zachorowania na raka żołądka w tych rodzinach może być predyspozycja genetyczna. Opisano szereg zespołów dziedzicznej predyspozycji do nowotworów w przebiegu, których rak żołądka występuje ze zwiększoną częstością, są to zespoły: dziedzicznego niezwiązanego z polipowatością raka jelita grubego (zespół Lyncha), dziedzicznego raka piersi lub/i jajnika, rodzinnej polipowatości gruczolakowatej jelita grubego oraz Cowden'a, Peutz-Jeghers'a, Li-Fraumeni i Bloom'a (4-13). Jedynym opisanym jak dotychczas zespołem predysponującym do dziedzicznego raka żołądka specyficznego narządowo o ustalonym podłożu genetycznym jest zespół spowodowany nosicielstwem mutacji genu E-kadheryny (CDH1) (14, 15), charakteryzujący się występowaniem „rozlanego” raka żołądka w bardzo wczesnym wieku. Oprócz raka żołądka, u nosicieli mutacji w CDH1, opisano również występowanie raka piersi typu zrazikowatego, raka jelita grubego oraz raka prostaty. W przypadku osób z konstytucyjną mutacją genu E-kadheryny jest w pełni uzasadnione i zalecane wykonanie operacji profilaktycznego usunięcia żołądka. Innymi genami najprawdopodobniej związanymi z rakiem żołądka są CHEK2 i NOD2. Ostatnie wyniki badań przeprowadzonych w naszym oraz kilku innych ośrodkach wskazują, że mutacje tych genów mogą powodować umiarkowanie podwyższone ryzyko raka żołądka. Analiza danych literaturowych sugeruje ponadto istnienie zmian w wielu innych genach, które mogą mieć związek z umiarkowanie wysokim lub niskim ryzykiem raka żołądka. Większość z tych zmian była badana w grupach ograniczonych populacyjnie, dlatego niezbędna jest ich weryfikacja, a także określenie ich związku z ryzykiem w innych populacjach.

Z wyjątkiem opisanego powyżej zespołu E-kadheryny, brak dotychczas zweryfikowanych, co do skuteczności zasad postępowania w rodzinach z dziedzicznym rakiem żołądka. Wiele ośrodków zaleca wykonywanie gastrokopii raz w roku rozpoczynając je od wieku 5-10 lat niższego od najmłodszego zachorowania na raka żołądka wśród krewnych. Jednakże optymalne postępowanie profilaktyczno-lecznicze może zostać określone dopiero na podstawie badań przeprowadzonych na dużych grupach pacjentów.

Słowa kluczowe: rak żołądka, mutacje genu E-kadheryny (CDH1)

Summary

Gastric cancer (GC) is one of the most frequently diagnosed malignancies of the gastrointestinal tract. Familial aggregation of stomach cancer in about 20% of all diagnosed cases suggests that in these families stomach cancer is caused by genetic predisposition. Stomach cancer has been shown to be a part of the tumour spectrum in other inherited syndromes, including hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC), familial adenomatous polyposis (FAP), Cowden's syndrome, Peutz-Jeghers syndrome, Li-Fraumeni syndrome and Bloom's syndrome.

The only syndrome of genetic predisposition to familial gastric cancer is characterized by detection of E-cadherin (CDH1) gene mutations in early onset cases diagnosed with diffuse gastric cancer. Along with substantially increased risk of diffuse gastric cancer, in families with detected CDH1 mutation, lobular breast cancer, colon cancer and prostate cancer have been reported. Because of the very high penetrance of CDH1 mutations and lack of effective methods in detection of early gastric cancer, prophylactic gastrectomy is recommended to all CDH1 carriers. Other genes most probably related to gastric cancer are CHEK2 and NOD2. Recently it has been shown in our and several other centers that mutations in these gene may be associated with moderate increase in gastric cancer risk. Analysis of the literature data suggests the existence of alterations in many other genes that may be associated with moderate or low risk of gastric cancer. Most of these changes were studied in specific populations, so it is necessary to verify them, and to determine their association with gastric cancer risk in other populations.

Up to now it is not known how to deal with patients from families with gastric cancer aggregation. Except of families with detected CDH1 mutations there is a lack of surveillance protocols for patients with recognized hereditary gastric cancer. In most centers is recommended annual gastroscopy in all relatives starting 5-10 years earlier than the youngest age of diagnosis of family with aggregation of GCs. However, the most appropriate prophylactic and medical treatment for GC patients from families with recognized genetic predisposition can be determined after extended analyses on large patients group.

Key words: gastric cancer, E-cadherin mutations

KRYTERIA RODOWODOWO-KLINICZNE DZIEDZICZNEGO RAKA ŻOŁĄDKA

W 1999 roku w Cambridge międzynarodowa grupa ekspertów (International Gastric Cancer Linkage Consortium - IGCLC) opierając się na wynikach dotychczas przeprowadzonych badań rodzin z agregacją raków żołądka, w tym zwłaszcza rodzin z konstytucyjną mutacją E-kadheryny, zaproponowała kryteria rodowodowo-kliniczne rozpoznawania dziedzicznego raka żołądka (4).

Dziedzicznego **rozlanego** raka żołądka (Hereditary Diffuse Gastric Cancer - HDGC) wg zaproponowanych przez IGCLC kryteriów można rozpoznać, gdy:

- 1) w rodzinie występują przynajmniej dwa zweryfikowane histopatologicznie zachorowania na rozlany typ raka żołądka u krewnych I° lub II° i chociaż jeden z raków żołądka został rozpoznany przed 50 rokiem życia;

lub

- 2) w rodzinie wystąpiły przynajmniej trzy zweryfikowane histopatologicznie zachorowania na rozlanego raka żołądka wśród krewnych I° lub II° niezależnie od wieku rozpoznania.

Dziedzicznego **jelitowego** raka żołądka (Familial Intestinal Gastric Cancer - FIGC) IGCLC zdecydowała się uzależnić od zapadalności na raka żołądka w danej populacji.

Kraje o wysokiej zapadalności na raka żołądka, takie jak np. Japonia, Chiny, Korea, Portugalia, powinny stosować następujące kryteria:

- 1) u co najmniej 3 członków danej rodziny wykryto zweryfikowanego histopatologicznie raka żołądka typu jelitowego; jeden z nich jest krewnym I° dla pozostałych dwóch;
- 2) co najmniej dwie z tych osób to krewni I° w dwóch różnych pokoleniach;
- 3) przynajmniej u jednej spośród tych osób rozpoznano jelitowego raka żołądka przed 50 rokiem życia.

W krajach o niskiej zapadalności na raka żołądka (takich jak Stany Zjednoczone, Wielka Brytania, Norwegia, Polska) FIGC można rozpoznawać, gdy spełnione są następujące kryteria:

- 1) przynajmniej dwa zweryfikowane histopatologicznie zachorowania na jelitowego raka żołądka wśród krewnych I° lub II°; przynajmniej u jednego z nich rozpoznano raka żołądka przed 50 rokiem życia;

lub

- 2) przynajmniej trzy zachorowania na jelitowego raka żołądka wśród krewnych I° lub II° niezależnie od wieku rozpoznania raka.

KRYTERIA RODOWODOWO-KLINICZNE ROZPOZNAWANIA DZIEDZICZNEGO RAKA ŻOŁĄDKA Z WYSOKIM PRAWDOPODOBIENSTWEM

Na podstawie badań przeprowadzonych w naszym Ośrodku udało się zdefiniować kryteria rozpoznawania rodzin podejrzanych o dziedzicznego raka żołądka. Z pracy tej wynika, że dziedzicznego raka żołądka można rozpoznać z dużym prawdopodobieństwem w przypadkach, gdy:

- 1) 2 raki żołądka rozpoznane powyżej 50 roku życia stwierdzono wśród krewnych I°;
lub
- 2) raka żołądka rozpoznano w wieku 45 lat lub młodszym;
lub
- 3) wśród krewnych I° rozpoznano w dowolnym wieku 1 raka żołądka oraz nowotwór pozażołądkowy.

PROWADZENIE RODZIN Z DZIEDZICZNYM RAKIEM ŻOŁĄDKA

Z wyjątkiem opisanego poniżej zespołu E-kadheryny, brak dotychczas zweryfikowanych, co do skuteczności zasad postępowania w rodzinach z dziedzicznym rakiem żołądka. W praktyce wiele ośrodków wykonuje gastroskopie raz na rok rozpoczynając je od wieku 5-10 lat niższego od najmłodszego wieku, w którym wśród krewnych rozpoznano raka żołądka. Jest to jednak najprawdopodobniej działanie, które być może pozwoli na wczesne wykrycie jedynie raków typu jelitowego.

Dane epidemiologiczno-kliniczne sugerują, że znaczącą rolę w przyszłości odegra najprawdopodobniej profilaktyka dziedzicznego raka żołądka poprzez eradykację *Helicobacter pylori* i optymalizację diety. Doświadczenia z nosicielami mutacji E-kadheryny wskazują, że w części przypadków z dziedzicznym rakiem żołądka jedyną alternatywą będzie profilaktyczna gastrektomia (19).

ZESPÓŁ E-KADHERYNY

Rak żołądka typu rozlanego jest rozpoznawany w około 30% przypadków tych nowotworów. Wśród pacjentów z rozpoznaniem histopatologicznym raka tego typu odsetki wyleczeń i przeżywalności są bardzo niskie.

Dziedziczny rozlany rak żołądka jest spowodowany w części przypadków mutacjami genu E-kadheryny (9, 16, 17, 18). Mutacje CDH1 są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący, a osoba będąca nosicielem mutacji ma ok. 70-80% ryzyko zachorowania na rozlanego raka żołądka (15, 20).

Oprócz raka żołądka, u nosicieli mutacji w *CDH1*, opisano również występowanie raka piersi typu zrazikowego (39-52% ryzyko wystąpienia tego raka u kobiet), raka jelita grubego oraz raka prostaty (15, 20, 21). W obrębie *CDH1* wykrywane są mutacje różnego rodzaju, zarówno małe mutacje punktowe typu substytucji nukleotydu (ok. 70% wszystkich mutacji) jak i insercje oraz delecje. W przypadku osób z konstytucyjną mutacją genu *E-kadheryny*, ze względu na wysokie ryzyko raka oraz trudności związane z wykryciem raka we wczesnym stadium, jest w pełni uzasadnione i zalecane wykonanie operacji profilaktycznego usunięcia żołądka (22, 23, 57, 58).

Ostatnie publikacje donoszą, że w 30-40% rodzin z dziedzicznym rakiem żołądka (HDGC) oraz 50% rodzin z rakiem żołądka rozpoznany u dwóch krewnych przed 50 rokiem życia wykrywa się mutacje w obrębie genu *CDH1* (15, 19, 20). W naszym Ośrodku, wśród 86 pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem żołądka z rodzin z dziedziczną postacią rozlanego raka żołądka (HDGC) nie wykryto żadnej mutacji genu *CDH1* (59). Dlatego też wydaje się, że mutacje genu *E-kadheryny* nie odgrywają istotnej roli w etiologii dziedzicznego raka żołądka w populacji polskiej.

RAK ŻOŁĄDKA SPOWODOWANY MUTACJAMI GENU *BRCA2*

Wyniki badań pokazały, że rak żołądka występuje z kilkakrotnie zwiększoną częstością u nosicieli mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* (24, 25, 26, 27). Dane te uzyskano w badaniach rodzin, w których rodowodowo stwierdzono zdecydowaną przewagę raków piersi i jajnika. W oparciu o powyższe informacje, w naszym Ośrodku przeprowadzono badanie, w którym analizowano sekwencję genu *BRCA2* w rodzinach, w których jednym z krewnych była osoba z rozpoznany rakiem żołądka. Wykazano, że mutacje konstytucyjne genu *BRCA2* wśród rodzin z fenotypem rak żołądka-rak piersi występują z częstością ok. 20%, wśród rodzin z fenotypem rak żołądka-rak jajnika z częstością ok. 40% (28, 29). Ponadto stwierdzono, że mutacje te w *BRCA2* zlokalizowane są niemal wyłącznie we fragmencie genu od eksonu 2 do eksonu 11. Powyższe wyniki sugerują, że niektóre mutacje w obrębie genu *BRCA2* mogą mieć związek nie tylko z zwiększonym ryzykiem raka piersi czy jajnika, ale również raka żołądka, jednak dane te powinny zostać zweryfikowane na większym materiale oraz najlepiej w badaniach prospektywnych.

MUTACJE I POLIMORFIZMY GENÓW UMIARKOWANIE ZWIĘKSZONEGO I NISKIEGO RYZYKA ZACHOROWANIA NA RAKA ŻOŁĄDKA.

Wyniki licznych badań prowadzonych w naszym Ośrodku pozwoliły zidentyfikować mutacje oraz polimorfizmy genów związane z umiarkowanie zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwory. Dane pokazują, że współdziałanie „słabych” mutacji i polimorfizmów w wielu genach oraz dodatkowo wpływ czynników środowiskowych może znacząco zwiększać ryzyko nowotworów złośliwych różnych narządów.

Wyniki badań przeprowadzonych w naszym Ośrodku wskazują, że u osób z mutacjami genów CHEK2 (30-33) i NOD2 (34-37) występuje umiarkowanie podwyższone ryzyko raka żołądka.

Gen CHEK2 koduje ludzki analog kinazy drożdży Cds1 i Rad53, działa jako gen supresorowy: aktywowany w odpowiedzi na uszkodzenia DNA powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego (31-33). W populacji polskiej opisane zostały 4 częste mutacje genu CHEK2: 3 mutacje skracające białko (IVS2+1G>A, 1100delC, del5395) oraz jedna mutacja zmiany sensu (I157T) (31, 32). Wyniki badań obejmujące 658 nieselekcjonowanych przypadków raka żołądka i 8302 osoby z grupy kontrolnej pokazują, że mutacje skracające białko wiążą się 2-krotnym zwiększeniem ryzyka raka żołądka (OR=2,1; p=0,02) w przypadku mutacji typu „missense” ryzyko raka jest zwiększone ok. 1,5 raza (OR=1,4; p=0,04). Analiza pokazała także różnice w ryzyku raka żołądka w zależności od wieku diagnozy: ryzyko było wyższe u osób z rakiem żołądka zdiagnozowanym przed 50 rokiem (OR=2,1; p=0,01) niż u chorych, którzy zachorowali po 50 roku życia (OR=1,4; p=0,005). Stwierdzono również, że mutacja I157T wiąże się z niemal 4-krotnym zwiększeniem ryzyka raka żołądka (OR=3.7, p=0.001) u osób poniżej 50 roku życia z wywiadem rodzinnym (33).

Gen NOD2/CARD15 koduje białko biorące udział w odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym. Stwierdzono, że występująca w tym genie mutacja 3020insC ma związek ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na przewlekłe choroby zapalne przewodu pokarmowego oraz występującego w ich przebiegu raka jelita grubego a także innych nowotworów, w tym raka płuc, piersi, jajnika, krtani (34-37).

Z badań przeprowadzonych w naszym Ośrodku w grupie 739 nieselekcjonowanych przypadków raka żołądka wynika, iż nie ma istotnych różnic, co do częstości NOD2 3020insC w tej grupie w porównaniu z 1910 osobową grupą kontrolną, natomiast wśród 177 chorych z wywiadem rodzinnym w kierunku raka żołądka zaobserwowaliśmy, iż u osób przed 50 r życia nosicielstwo NOD2 3020insC wiąże się z ponad 2.5-krotnym (OR=2.529 p=0.0212) zwiększeniem ryzyka zachorowania na raka żołądka. Ponadto, stwierdziliśmy związek zmiany

NOD2 R702W z niemal 3-krotnie wyższym ryzykiem raka (OR=2.816, p=0.0121) w grupie 241 kolejnych chorych zdiagnozowanych przed 50 rokiem życia oraz ponad 2-krotnie wyższym ryzykiem (OR=2.268, p=0.0371) u chorych na raka żołądka zakwalifikowanym histopatologicznie, jako typ jelitowy wg Laurena. (34, 35 oraz dane nieopublikowane).

Związek pomiędzy mutacjami w genie NOD2 a ryzykiem raka żołądka zaobserwowali także badacze włoscy i portugalscy (38, 39, 60).

Kolejnym genem, dla którego obserwowano związek z ryzykiem raka żołądka w Polsce jest XRCC1, kodujący białko wchodzące w skład złożonego kompleksu uczestniczącego w szlaku naprawy DNA. Popławski T. et al. (55) zaobserwował, że polimorfizm Arg399Gln w XRCC1 może mieć istotny związek ze zwiększeniem ryzyka raka żołądka (OR=2,04; 95%CI=1,27-3,29), szczególnie u osób z rodzinnym występowaniem tego nowotworu. Natomiast w populacji chińskiej (66-70, 72), koreańskiej (73) i brazylijskiej (71) nie wykazano związku polimorfizmu Arg399Gln z ryzykiem raka żołądka.

Istnieje duża liczba doniesień opisujących związek pomiędzy ryzykiem raka żołądka a zmianami w genach TP53, szczególnie polimorfizmem Arg72Pro (40-47,61-63), interleukiny 1 (IL1) (48-51) czy enzymu kodującego konwertazę (ACE) (52-53). W tym ostatnim przypadku, polimorfizm polegający na delecji/insercji 287 par zasad w intronie 16 genu ACE wykazywał znaczącą asocjację z ryzykiem raka żołądka w populacji niemieckiej (52), podczas gdy badania w populacji japońskiej (53, 54) i chińskiej (64,65) nie potwierdziły tej zależności.

Analiza danych literaturowych sugeruje istnienie zmian w wielu innych genach, które mogą mieć związek z ryzykiem raka żołądka. Najwięcej badań wykazujących pozytywne korelacje z ryzykiem raka żołądka przeprowadzono w Chinach. W jednym z tych badań zaobserwowano niemal 2-krotnie zwiększone ryzyko raka żołądka (OR=1,82; 95%CI 1,27–2,60) u osób z genotypem *1/2 *LAPTM4B* oraz ponad 2-krotnie zwiększone ryzyko u osób z genotypem *2/2 *LAPTM4B* (OR=2,39; 95%CI 1,19–4,77) w porównaniu z genotypem *1/1 *LAPTM4B* (56). Ponadto, chińscy badacze stwierdzili, że mutacja S3660L w genie *MLL3* może mieć związek z ok. 2,5-krotnym zwiększeniem ryzyka zachorowania na raka żołądka (74). Badania w populacji Północnych Chin wykazały, że mutacje genu *WWOX* odgrywają ważną rolę w rozwoju raka wpustu żołądka szczególnie u osób z historią rodzinną (76). Z kolei mutacja w genie *MLH1* 2101C>A została opisana w populacji chińskiej jako czynnik ryzyka raka żołądka szczególnie u mężczyzn (78). Ponadto, stwierdzono iż częstość alela *AluYb8MUTYH* w populacji chińskiej jest związana z rakiem żołądka rozwiniętym w młodszym wieku (79). Kolejne badania pokazały istotny związek wariantu zlokalizowanego w 5'-UTR genu *hOGG1*

(c.-53G>C) z ryzykiem raka żołądka (OR = 2.304) (80), podobnie jak polimorfizmu genu XPD w kodonie 312 (81) oraz polimorfizmu genu CTLA-4 (82). Badania przeprowadzone w innych populacjach są mniej liczne lecz również pokazują związek zmian w genach z ryzykiem raka żołądka. Wyniki badań hiszpańskich sugerują, że wariant H63D w genie HFE może być związany z ponad 1,5-krotnym zwiększeniem ryzyka raka żołądka (OR = 1.60, CI = 1.16-2.21) (75). Z kolei wg badań indyjskich, allel 1082 A IL-10 jest związany z niemal 2-krotnie zwiększonym ryzykiem raka żołądka (OR=1.873, 95%CI-1.285-2.73, P= 0.001048) w Południowych Indiach (77).

Z powyższych danych wynika, że istnieje szereg zmian w genach, które mogą mieć związek z umiarkowanie zwiększonym lub niskim ryzykiem raka żołądka. Większość z tych zmian była badana w grupach ograniczonych populacyjnie, dlatego niezbędne są badania weryfikujące i potwierdzające powyższe doniesienia, a także określające ich związek z ryzykiem w innych populacjach.

Badania nowo opisanych mutacji umiarkowanie zwiększonego i niskiego ryzyka zachorowania na raka żołądka w naszej populacji mogą pozwolić oszacować rzeczywiste ryzyko raka żołądka związane z tymi mutacjami.

W PODSUMOWANIU

Z wyjątkiem zespołu E-kadheryny, dziedziczny rak żołądka jest obecnie diagnozowany w celach poznawczych. Tworzenie rejestrów tych rodzin i ich badania zarówno kliniczne jak i molekularne są jednak bardzo ważne ze względu na realną perspektywę postępu w zwalczaniu tej choroby.

PIŚMIENNICTWO

1. Zatoński W, Tyczyński J: Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996 r. Warszawa, Centrum Onkologii-Inst. im. M. Skłodowskiej-Curie, 1999.
2. Munoz SE, Ferrearoni M, La Vecchia C, Decarli A: Gastric cancer factor in subjects with family history. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997, 6: 137-40.
3. Taal BG, et al.: The role of genetic factors in development of gastric cancer. *Ned Tijdschr Geneesk* 1995, 143: 342-6.
4. Caldas C, et al.: Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet* 1999, 36: 873-80.
5. Aarnio M, et al.: Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer* 1997, 74: 551-5.
6. Varley JM, et al.: An extended Li Fraumeni Kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation of TP53. *J Med Gen* 1995, 32: 942-5.
7. Sharma K, Iida M, Mathur P: Familial juvenile polyposis with adenomatouscarcinomatous change. *J Gastroenterol Hepatol* 1995, 10: 131-4.
8. Hizawa K, et al.: Gastrointestinal manifestation of Cowden.s disease. Report of four cases. *J Clin Gastroenterol* 1994, 18: 13-8.
9. Westerman AM, Wilson JH: Peutz-Jeghers syndrome: risks of a hereditary condition. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1999, 230: 64-70.

10. Hisada M, et al.: Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90: 606-11.
11. Marsh DJ, et al.: Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* 1998, 7: 507-15.
12. Subramony C, Scott-Conner CEH, Skelton D, Hall TJ: Familial juvenile polyposis . Study of a kindred: Evolution of polyps and relationship to gastrointestinal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1994, 102: 91-7.
13. Gylling A, et al.: Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut* 2007, 56: 926-33.
14. Kangelaris KN, Gruber SB: Clinical implications of founder and recurrent CDH1 mutations in hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA* 2007, 297: 2410-1.
15. Kaurah P, et al.: Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA* 2007, 297: 2360-72.
16. Guilford P, et al.: E-cadherine germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998, 392: 402-5.
17. Gayther SA, et al.: Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 1998, 58: 4086-9.
18. Richards FM, et al.: Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1999, 8: 607-10.
19. Norton JA, et al.: CDH1 truncating mutations in the E-cadherin gene: an indication for total gastrectomy to treat hereditary diffuse gastric cancer. *Ann Surg* 2007, 245: 873-9.
20. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C: Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001, 121: 1348-1353.
21. Keller G, et al.: Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* 1999, 155: 337-42.
22. Fitzgerald RC, Caldas C. E-cadherin mutations and hereditary gastric cancer: prevention by resection? *Dig Dis* 2002, 20: 23-31.
23. Huntsman DG, et al.: Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers o germ-line E-cadherin mutations. *N Engl J Med* 2001, 344: 1904-9.
24. Thompson D, Easton D: Breast Cancer Linkage Consortium. Variation in cancer risks, by mutation position, in *BRCA2* mutation carriers. *Am J Hum Genet* 2001, 68: 410-9.
25. Gayther SA, et al.: Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the *BRCA2* gene. *Nat Genet* 1997, 15: 103-5.
26. BCLC - The Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risk in *BRCA2* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91: 1310-6.
27. Johannsson O, et al.: Incidence of malignant tumours in relatives of *BRCA1* and *BRCA2* germline mutation carriers. *Eur J Cancer* 1999, 35: 1248-57.
28. Jakubowska A, et al.: *BRCA2* gene mutations in families with aggregations of breast and stomach cancers. *Br J Cancer* 2002, 87: 888-91.
29. Jakubowska A, et al.: A high frequency of *BRCA2* gene mutations in Polish families with ovarian and stomach cancer. *Eur J Hum Genet* 2003, 11: 955-8.
30. Kurzawski G, et al.: Testy DNA umiarkowanie zwiększonego ryzyka zachorowania na nowotwory złośliwe. *Genetyka Kliniczna Nowotworów 2008*. Monografia pod redakcją J.Lubińskiego, Print Group Sp zoo. Szczecin 2008.
31. Cybulski C, et al.: CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* 75:1131-1135, 2004.
32. Cybulski C, et al.: A large germline deletion in the Chek2 kinase gene is associated with an increased risk of prostate cancer. *J Med Genet.* 2006 Nov;43(11):863-6.
33. Teodorczyk U, et al.: The risk of gastric cancer in carriers of CHEK2 mutations. *Fam Cancer* 2013 Sep;12(3):473-8
34. Teodorczyk U, et al.: The NOD2 gene mutations and the risk of familial gastric cancer. Konferencja: Nowotwory dziedziczne - profilaktyka, diagnostyka, leczenie. Szczecin, 21-22.10.2004 r. Streszczenia.
35. Teodorczyk U, et al.: The NOD2 gene mutations and the risk of gastric cancer. 13th United European Gastroenterology Week "UEGW 2005", Copenhagen, Denmark, 15-19 October 2005, Abstracts, OP-G-303
36. Lubiński J, et al: The 3020insC allele of NOD2 predisposes to cancers of multiple organs. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2005; 3(2) pp. 59-63.
37. Lubiński J, et al: The 3020insC Allele of NOD2 Predisposes to Cancers of Multiple Organs. *Hered Cancer Clin Pract.* 2005;3(2):59-63.
38. Rigoli L, et al.: TLR4 and NOD2/CARD15 genetic polymorphisms and their possible role in gastric carcinogenesis. *Anticancer Res.* 2010;30(2):513-7.
39. Angeletti S, et al.: NOD2/CARD15 polymorphisms impair innate immunity and increase susceptibility to gastric cancer in an Italian population. *Hum Immunol.* 2009;70(9):729-32.

40. Ke-Xiang Z, Yu-Min L, Xun L, Wen-Ce Z, Yong S, Tao L. Study on the association of p53 codon 72 polymorphisms with risk of gastric cancer in high incidence Hexi area of Gansu Province in China. *Mol Biol Rep*. 2011 May 12.
41. Triantafyllou NG, Grosman IM, Verma RS. Genomania of p53 protein in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol*. 1996 Apr;22(3):170-3.
42. Cañas M, Morán Y, Camargo ME, Rivero MB, Bohórquez A, Villegas V, Ramírez E, Rendón Y, Suárez A, Morales L, Useche E, Salazar S, Zambrano A, Ramírez A, Valderrama E, Briceño Z, Chiurillo MA. TP53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk: a case-control study in individuals from the central-western region of Venezuela. *Invest Clin*. 2009 Jun;50(2):153-61. Spanish.
43. Zhang ZW, Newcomb P, Hollowood A, Feakins R, Moorghen M, Storey A, Farthing MJ, Alderson D, Holly J. Age-associated increase of codon 72 Arginine p53 frequency in gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Jun;9(6):2151-6
44. Zhou Y, Li N, Zhuang W, Wu X. p53 Codon 72 polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese Han population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Dec;14(6):829-33. Epub 2010 Oct 12.
45. Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, Du L, Wei ML, Wu XT. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Int J Cancer*. 2007 Oct 1;121(7):1481-6. Review
46. Shirai O, Ohmiya N, Taguchi A, Nakamura M, Kawashima H, Miyahara R, Itoh A, Hirooka Y, Watanabe O, Ando T, Goto Y, Hamajima N, Goto H. P53, p21, and p73 gene polymorphisms in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2010 Nov Dec;57 (104) :1595 -601
47. Shigeishi H, et al.: Increased expression of CHEK2 in human gastric carcinomas harboring p53 mutations. *Int J Cancer*. 2002 May 1;99(1):58-62.
48. Palli D, Saieva C, Luzzi I, Masala G, Topa S, Sera F, Gemma S, Zanna I, D'Errico M, Zini E, Guidotti S, Valeri A, Fabbrucci P, Moretti R, Testai E, del Giudice G, Ottini L, Matullo G, Dogliotti E, GomezMiguel MJ. Interleukin-1 gene polymorphisms and gastric cancer risk in a high-risk Italian population. *Am J Gastroenterol*. 2005 Sep;100(9):1941-8.
49. Troost E, Hold GL, Smith MG, Chow WH, Rabkin CS, McColl KE, El-Omar EM. The role of interleukin-1beta and other potential genetic markers as indicators of gastric cancer risk. *Can J Gastroenterol*. 2003 Jun;17 Suppl B:8B-12B. Review.
50. Kato S, Onda M, Yamada S, Matsuda N, Tokunaga A, Matsukura N. Association of the interleukin-1 beta genetic polymorphism and gastric cancer risk in Japanese. *J Gastroenterol*. 2001 Oct;36(10):696-9.
51. Starzyńska T, Ferenc K, Wex T, Kähne T, Lubiński J, Lawniczak M, Marlicz K, Malfertheiner P. The association between the interleukin-1 polymorphisms and gastric cancer risk depends on the family history of gastric carcinoma in the study population. *Am J Gastroenterol*. 2006 Feb;101(2):248-54.
52. Ebert MP, et al.: The angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism is linked to early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005, Dec; 14(12):2987-9.
53. Hibi S, Goto Y, Ando T, Matsuo K, Wakai K, Tajima K, Goto H, Hamajima N. No association between angiotensin I converting enzyme (ACE) I/D polymorphism and gastric cancer risk among Japanese. *J Med Sci*. 2011 Aug;73(3-4):169-75.
54. Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Ikuma M, Sugimura H, Hishida A. Influences of chymase and angiotensin I-converting enzyme gene polymorphisms on gastric cancer risks in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Oct;15(10):1929-34.
55. Popławski T, et al.: Związek między polimorfizmami genu XRCC1 a rodzinnym występowaniem raka żołądka. *Gastroenterologia Polska* 2008; 15(4):225-228
56. Y Liu, Q-Y Zhang, et al.: Relationship between *LAPTM4B* gene polymorphism and susceptibility of gastric cancer. *Annals of Oncology* 2007, 18(2):311-316;
57. Guiford P, et al.: A short guide to hereditary diffuse gastric cancer. *Hered Cancer Clin Pract*. 2007, 5 (4):183-194.
58. Blair V, et al.: Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006, 4(3): 262-275.
59. Jakubowska A, et al.: CDH1 gene mutations do not contribute in hereditary diffuse gastric cancer in Poland. *Fam Cancer*. 2010, Sep 15
60. Freire P et al.: Card15 mutations and gastric cancer in a Portuguese population. *Scand J Gastroenterol*. 2013 Oct;48(10):1188-97.
61. Xiang B, Mi YY, Li TF, Liu PF. Updated meta-analysis of the TP53 Arg72Pro polymorphism and gastric cancer risk. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(5):1787-91.
62. Tang W1, Zhou X, Nie S, Yang Z, Zhu H, Wu X, Zhao R, Luo Y. Association of p53 Arg72Pro polymorphism with gastric cancer: a meta-analysis. *Biomarkers*. 2012 Nov;17(7):597-603
63. Su XL1, Jin JJ. 3Pro variant of TP53 Arg72Pro contributes to gastric cancer risk in Asians: evidence from a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(3):915-21.
64. Gan L1, Liu X1, Wu Z1, Huang M1, Zhang X1, Guo W1. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Apr 15;8(4):5788-93.

65. Wei MT, Chen N, He YZ, Wang JR, Yang Y, Guo XJ, Wang ZQ. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015 Feb;39(1):136-44.
66. Zhao DY, Cheng L, Yu J, Shen H. XRCC1 genetic polymorphism Arg339Gln, Arg194Trp, Arg280His and gastric cancer risk: an evidence based decision. *Cancer Biomark*. 2014;14(6):449-56.
67. Liu BM, Liu TM, You BS, You HY, Yang J, Li L, He YC. Lack of an association between the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and gastric cancer based on a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2012 Nov 12;11(4):3852-60.
68. Xue H, Ni P, Lin B, Xu H, Huang G. X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and gastric cancer risk: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2011 Feb 15;173(4):363-75.
69. Yan L, Yanan D, Donglan S, Na W, Rongmiao Z, Zhifeng C. Polymorphisms of XRCC1 gene and risk of gastric cardiac adenocarcinoma. *Dis Esophagus*. 2009;22(5):396-401.
70. Geng J, Zhang YW, Huang GC, Chen LB. XRCC1 genetic polymorphism Arg399Gln and gastric cancer risk: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2008 Nov 21;14(43):6733-7.
71. Duarte MC1, Colombo J, Rossit AR, Caetano A, Borim AA, Wornrath D, Silva AE. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2005 Nov 14;11(42):6593-600.
72. Zhang Z, Miao XP, Tan W, Guo YL, Zhang XM, Lin DX. Correlation of genetic polymorphisms in DNA repair genes ADPRT and XRCC1 to risk of gastric cancer. *Ai Zheng*. 2006 Jan;25(1):7-10.
73. Lee SG, Kim B, Choi J, Kim C, Lee I, Song K. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. *Cancer Lett*. 2002 Dec 10;187(1-2):53-60.
74. Li B, Liu HY, Guo SH, Sun P, Gong FM, Jia BQ. A missense mutation (S3660L) in MLL3 gene influences risk of gastric cancer. *J BUON*. 2014 Apr-Jun;19(2):394-7.
75. Agudo A, et al.: Hemochromatosis (HFE) gene mutations and risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Carcinogenesis*. 2013 Jun;34(6):1244-50.
76. Guo W, et al.: Genetic and epigenetic alterations of WWOX in the development of gastric cardia adenocarcinoma. *Environ Mol Mutagen*. 2013 Mar;54(2):112-23.
77. Chand-Bhayal A, et al.: Association of interleukin-10 promoter polymorphism (-1082 g/a) and gastric cancer in andhra pradesh population of South India. *Iran J Cancer Prev*. 2012 Summer;5(3):117-23.
78. Zhi W, et al.: The MLH1 2101C>A (Q701K) variant increases the risk of gastric cancer in Chinese males. *BMC Gastroenterol*. 2011 Dec 3;11:133.
79. Zhu M, et al.: AluYb8 insertion in the MUTYH gene and risk of early-onset breast and gastric cancers in the Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(6):1451-5.
80. Liu X, et al.: The hOGG1 gene 5'-UTR variant c.-53G>C contributes to the risk of gastric cancer but not colorectal cancer in the Chinese population: the functional variation of hOGG1 for gastric cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Oct;137(10):1477-85.
81. Zhang CZ, et al.: Correlation of XPD gene with susceptibility to gastric cancer. *Ai Zheng*. 2009 Nov;28(11):1163-7.
82. Hou R, et al.: Association of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 gene haplotype with the susceptibility to gastric cancer. *Mol Biol Rep*. 2010 Jan;37(1):515-20.



Genetyka kliniczna raka płuc

Clinical genetics of lung cancer

Streszczenie

Każdego roku na świecie na raka płuc umiera ponad 1 milion ludzi. Poza paleniem tytoniu i innymi środowiskowymi czynnikami rakotwórczymi, wśród czynników odpowiedzialnych za wystąpienie choroby wymienia się zmiany DNA. Cechą charakterystyczną jak dotąd zidentyfikowanych markerów genetycznej predyspozycji do raka płuc, jest stosunkowo nieznacznie podwyższone ryzyko zachorowania na nowotwór złośliwy tego narządu w przypadku nosicielstwa zmian DNA. Duże nadzieje w identyfikacji markerów silnego ryzyka raka płuc budzą markery biochemiczne, jak. np. stężenie określonych mikroelementów. Badania przeprowadzone w naszym Ośrodku wyraźnie wskazują, że poziomy selenu w organizmie $>80 \mu\text{g/l}$ związane są z redukcją ryzyka zachorowań na raka płuc. Badanie poziomu selenu, żelaza, cynku i miedzi w surowicy krwi może być niezwykle użytecznym markerem w badaniach przesiewowych wczesnego wykrywania raka płuc do wstępnej preselekcji osób, u których zasadne jest wykonanie badania kontrolnego z wykorzystaniem tomografii komputerowej (CT). Bardzo ważne jest też poszukiwanie kolejnych markerów predykcyjnych w celu opracowania algorytmów postępowania charakteryzujących tzw. medycynę spersonalizowaną, gdzie schematy leczenia są dostosowane do statusu określonych markerów, np. obecności lub braku określonych mutacji.

Słowa kluczowe: markery ryzyka, mikroelementy, rak płuc

Summary

Every year more than 1 million people die from lung cancer all over the world. In addition to smoking and other environmental carcinogens among the factors responsible for the disease is mentioned DNA alterations. A characteristic feature of markers of a genetic predisposition to lung cancer, is relatively slightly increased risk of developing that cancer in the case of being a carrier of DNA alteration. High hopes of identifying markers of severe risk of lung cancer are biochemical markers like for example, the concentration of certain micro elements. Studies performed in our Center clearly indicate that selenium levels $> 80 \mu\text{g/l}$ are associated with reduced risk of lung cancer. The examination of selenium, iron, zinc, copper concentration in blood serum can be very useful marker in screening for early detection of lung cancer to the initial preselection individuals with appropriate control test is computed tomography (CT). Very important is also exploring further predictive markers for the development of algorithms characterized by the so-called personalized medicine where treatment regimens are adjusted to the status of specific markers, such as the presence or absence of specific mutations.

Key words: risk markers, microelements, lung cancer

Każdego roku w Polsce rejestrowanych jest ponad 15 tys. zachorowań na raka płuc u mężczyzn oraz około 5 tys. zachorowań u kobiet, co stanowi odpowiednio 24% i 8% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe. Ponad 16 tys. Polaków i ponad 5 tys. Polek umiera każdego roku w Polsce z powodu raka tego narządu [1]. Rejestr Międzynarodowej Agencji do Badań nad Rakiem (IARC) podaje, że biorąc pod uwagę cały świat, każdego roku na raka płuc umiera ponad 1 milion ludzi: 1376579, w tym 948993 mężczyzn oraz 427586 kobiet [2]. Poza paleniem tytoniu, wśród czynników odpowiedzialnych za występowanie choroby wymienia się narażenie na kilka zawodowych i środowiskowych czynników rakotwórczych, takich jak azbest, arsen, radon i węglowodory aromatyczne[3].

Identyfikacja grup ryzyka.

Markery DNA związane ze zwiększoną predyspozycją zachorowania na raka płuc.

Mimo tak wielkiego udziału raka płuc w zachorowalności i śmiertelności z powodu nowotworów złośliwych poszukiwanie markerów predyspozycji zachorowania do raka płuc stanowi wciąż problem do rozwiązania. O ile z powodzeniem udało się zidentyfikować markery wysokiej genetycznej predyspozycji do raka piersi, to genetyczne podłoże ryzyka zachorowania na raka płuc jest dosyć słabo poznane i nie identyfikuje markerów genetycznych wysokiego ryzyka zachorowania na raka płuc. Poniżej przedstawiono poznane dotąd zmiany w DNA opisane dla rasy kaukaskiej jako związane z podwyższoną genetyczną predyspozycją do zachorowania na raka płuc [opracowanie własne w oparciu o http://www.megabionet.org/bio/hlung/lung_cancer/SNP_list.jsp].

Tab.1. Zmiany w genach związane z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka płuc.

Symbol genu	Zmiana	Nazwa genu	SNP	OR	p
TNC	A1781T	tenascin C	rs2274750	1,32	0,025
CAMKK1	E375G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha	rs7214723	1,37	5,4x10 ⁻⁵
AKAP9	M463I	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	rs6964587	1,32	1,0x10 ⁻⁴
AKAP10	R249H	A kinase (PRKA) anchor protein 10	rs2108978	1,25	0,0085
GHR	P495T	Growth hormone receptor	rs6183	12.98	0.0019
GHRH	L75F	growth hormone releasing hormone	rs4988492	1,44	0,0453
BRCA2	K3326X	breast cancer 2, early onset	rs11571833	1.72	0.0075
XRCC4	I137T	X-ray repair complementing defective	rs28360135	1.31	0.0205

		repair in Chinese hamster cells 4			
IGFBP5	R138W	insulin-like growth factor binding protein 5	rs11575194	1,29	0,027
BAT4	R41L	HLA-B associated transcript 4	rs3130618	1,26	0,0005
NRIP1	R448G	nuclear receptor interacting protein 1	rs2229742	1,24	0,0052
<u>HIF1AN</u>	P41A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor	rs2295778	1,34	0,007
CDH12	V68M	cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2)	rs4371716	1,63	0,0001
ZNF24	N220S	zinc finger protein 24	rs2032729	1,24	0,0124
MSH4	S914N	mutS homolog 4 (E. coli)	rs5745549	1,27	0,0461
CFTR	R75Q	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)	rs1800076	1,27	0,0412
PLCD1	R257H	phospholipase C, delta 1	rs933135	1,45	0,0312
BARD1	R658C	BRCA1 associated RING domain 1	rs3738888	1,59	0,0329
GPR68	R63Q	G protein-coupled receptor 68	rs2230339	6,80	0,0213
FASN	R1694H	fatty acid synthase	rs2229424	6,79	0,0214
LOC123688	C/T intron	-	rs8034191	1,32	9×10^{-10}
CHRNA3	215 Y/Y	Acetylcholine receptor subunit 3	rs1051730	1,30	5×10^{-9}
CHRNA3	C/T Intron	Acetylcholine receptor subunit 3	rs12914385	1,29	$4,79 \times 10^{-16}$
CHRNA5	D398N	Acetylcholine receptor subunit 5	rs16969968	1,32	3×10^{-9}
TERT / CLPTM1L	C/T intron	Human telomerase reverse transcriptase	rs402710	1,21	7×10^{-5}
CLPTM1L (CRR9) / TERT	A/C intron	Cleft lip and palate transmembrane 1 like	rs2736100	1,15	0,016
TERT	305 A/A	Human telomerase reverse transcriptase	rs2736098	1,21	0,016
BAT3	G/T intron 1	HLA-B associated transcript 3	rs3117582	1,20	$4,9 \times 10^{-9}$
RAD52	C/T	yeast, homolog of <i>RAD52</i>	rs6489769	1,20	$2,3 \times 10^{-8}$
MSH5	G/A	mutS homolog 5 (E. coli)	rs3131379	1,52	0,001
MHC complex	A/G	Major histocompatibility complex	rs4324798	1,28	4×10^{-7}
TNXB	T/C , T302A	tenascin XB isoform 1	rs1150752	1,24	$1,93 \times 10^{-6}$
CYP1B1	432 V/L	Cytochrome P450 1B1	rs1056836	1,97	0,001
ERCC5	A/C Intron	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5 (xeroderma pigmentosum, complementation group G (Cockayne syndrome))	rs732321	2,39	<0,038
MLH3	C/T Intron	mutL homolog 3 (E. coli)	rs175057	1,52	<0,044
MLH3	G/A 844 P/L	mutL homolog 3 (E. coli)	rs175080	1,60	<0,039
POLD3	T/G	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	rs10857	1,84	<0,001
POLD3	C/A Intron	polymerase (DNA-directed), delta 3,	rs41541119	2,66	<0,03

		accessory subunit			
<u>RECQL4</u>	C/T, 44E/E	RecQ protein-like 4	rs2306386	1,35	<0,034
<u>RECQL4</u>	C/T	RecQ protein-like 4	ss70347238	1,35	0,034
MMP1	1831 C/T Intron	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	rs996999	1,3	0,0152
MMP1	12471 G/A, Intron	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	rs193008	1,5	0,04
MMP1	7229 C/T Intron	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	rs1938901	1,5	0,0534
FANCA	C/T	Fanconi anemia, complementation group A	rs7204478	1,66	0,004
RAD52	A/C Intron	RAD52 homolog isoform alpha	rs3748521	1,83	0,029
<u>DNA-PK</u> <u>PRKDC</u>	C/G Intron	protein kinase, DNA-activated, catalytic	rs1231204	2,20	0,041
LIG1	-7 C>T	ligase I, DNA, ATP-dependent	rs20579	1,73	<0,01
LIG3	IVS9-21 A>G	ligase III, DNA, ATP-dependent	rs3730931	1,73	0,01
CARD15/ NOD2	3020insC	NOD2 protein	rs5743293	1,7	0,03
CDKN2A	G/A, A148T	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	rs3731249	2,0	0.0052
MSH5	G/A intron	mutS homolog 5 isoform c	rs3131379	1,40	0,037
6q24.2 – STX11	T/C	syntaxin 11	rs4286803	1,25	0,012
7p21.2 – ETV1	C/T	ets variant gene 1	rs984468	1,20	0,033
12q24 – ALDH2	A/G intron	aldehyde dehydrogenase 2	rs4767364	1,12	2x10 ⁻⁷
4q21 – HEL308, FAM175 A	C/T I306V	DNA helicase HEL308	rs1494961	1,12	4x10 ⁻⁸
RPA1	A/G Intron	replication protein A1, 70kDa	rs2287321	1,87	0,012
MSH3	A/G Intron	mutS homolog 3	rs6151838	1,65	0,026
PMS2	A/C Intron	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 isoform	rs2286681	1,42	0,021
POLR2C	A/G Promotor	DNA directed RNA polymerase II polypeptide C	rs686402	1,47	0,039
FANCC	T/C Intron	Fanconi anemia, complementation group C	rs3737142	1,31	0,025
FANCC	C/T Intron	Fanconi anemia, complementation group C	rs3780564	1,29	0,017
RAD51	A/G Intron	RAD51 homolog protein isoform 1	rs2304579	1,72	0,037
DNA-PK	C/G Intron	protein kinase, DNA-activated, catalytic	rs1231204	2,86	0,036
XRCC4	G/A Intron	X-ray repair cross complementing protein 4	rs177297	1,53	0,042
XRCC4	T/C Intron	X-ray repair cross complementing protein 4	rs307316	1,86	0,004
XRCC3	722 C/T Thr/Met	X-ray repair cross complementing protein 3	rs861539	1,96	0,02

RAD23B	C/T Ala249Val	UV excision repair protein RAD23 homolog B	rs1805329	1,3	-
ERCC4	G/A Arg415Gln	excision repair cross-complementing rodent	rs1800067	1,5	-
ERCC5	G/C Asp1104His	XPG-complementing protein	rs17655	1,4	-
CCND1	G/A	Cyclin D1	rs9344	2,52	0,013
CYP1A1	A/G I/Val	cytochrome P450, family 1, subfamily A	rs1048943	2,3	0,027
ADH1C	C/T, Arg272Gln	class I alcohol dehydrogenase, gamma subunit	rs1693482	1,24	-

Można stwierdzić, że cechą charakterystyczną jak dotąd zidentyfikowanych markerów genetycznej predyspozycji do raka płuc, jest stosunkowo nieznacznie podwyższone ryzyko zachorowania na nowotwór złośliwy tego narządu w przypadku nosicielstwa zmian DNA.

Oprócz zmian związanych z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka płuc wykazano, że zmiana Ile157Thr (rs17879961) w obrębie genu CHEK2 związana jest z obniżonym ryzykiem zachorowania na raka płuc (OR = 0.3, P = 3 x 10⁽⁻⁸⁾) [4]. Asocjację tę, jako pierwsi wykazali badacze naszego Ośrodka, a w ostatnim czasie została ona potwierdzona w drugim niezależnym wieloośrodkowym badaniu (OR = 0.38, p= 1.27 × 10⁽⁻¹³⁾) [5].

Mikroelementy we wczesnym wykrywaniu raka płuc.

Najnowsze badania wskazują, że wybrane mikro- i makroelementy oraz witaminy mogą również istotnie wpływać na ryzyko rozwoju i przebiegu nowotworów złośliwych. Wiadomo, że określone ilości witamin oraz mikro- i makroelementów są konieczne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Mikro- i makroelementy mogą być wbudowywane do centrum aktywnego enzymów, warunkując ich aktywność w różnorodnych procesach biologicznych. Zarówno ich niedobór jak i nadmiar może być przyczyną dysfunkcji organizmu prowadząc do poważnych chorób, również nowotworowych. Jednym z takich mikroelementów jest selen. Badania przeprowadzone w naszym Ośrodku wyraźnie wskazują, że poziomy selenu w organizmie >80 µg/l związane są z obniżonym prawdopodobieństwem występowania raka płuc. W porównaniu z grupą osób, gdzie poziom selenu w organizmie osiągał wartość <60 µg/l różnica ta jest ok. 10-krotna (OR= 0.10; 95% CI 0.03–0.34; p = 0.0002) [6]. Ta obserwacja jest niezwykle istotna w kontekście racjonal-

nego planowania i wykonywania badań przesiewowych w grupie osób o podwyższonym ryzyku zachorowania na raka płuc.

Koszt wykrycia jednego raka płuc przy wykorzystaniu CT wynosi około 40 000 PLN. Badanie poziomu mikroelementów w surowicy krwi obwodowej może być niezwykle użytecznym markerem do wstępnej preselekcji osób, u których zasadne jest wykonanie badania kontrolnego z wykorzystaniem tomografii komputerowej (CT). Z naszych badań wynika, że u osób z określonym stężeniem 4 mikroelementów w surowicy krwi występuje niskie prawdopodobieństwo występowania raka płuca (Se >90 µg/l, Fe >1400 µg/l, Zn >1100 µg/l, Cu 800-1000 µg/l). Koszt wykrycia jednego raka płuca można obniżyć do kwoty około 25 000 PLN poprzez schemat badań przesiewowych, który powinien obejmować w pierwszej kolejności oznaczenie poziomu Se, Fe, Zn, Cu u osób znajdujących się w grupie podwyższonego ryzyka zachorowania na raka płuc (osoby obu płci w wieku powyżej 55 roku życia palące lub mające za sobą historię palenia tytoniu w ilości 20 paczkolet) a następnie wykonanie w pierwszej kolejności badania CT u osób z najniższymi poziomami tych mikroelementów w surowicy krwi. Wyniki badań amerykańskich wykazują, że niskodawkowa CT cechuje się zdecydowanie większą czułością wykrywania wczesnych stadiów raka płuc w porównaniu z tradycyjną radiografią. Zastosowanie tej techniki diagnostycznej w grupach ryzyka z częstością raz na dwa lata zwiększa liczbę diagnozowanych wczesnych stadiów raka płuc i w konsekwencji przyczynia się do zmniejszenia śmiertelności z powodu raka tego narządu [7-9]. Wydaje się, że połączenie tej obserwacji razem z algorytmem postępowania obejmującym pomiar stężenia mikroelementów w surowicy krwi osób z grupy podwyższonego ryzyka zachorowania na nowotwór złośliwy płuc stwarza realną perspektywę skuteczniejszej prewencji nowotworowej a jednocześnie ekonomicznie efektywniejszej w porównaniu z dotąd stosowanym postępowaniem. Takie działania prewencji nowotworowej podjęliśmy we współpracy z Regionalnym Szpitalem Leczenia Chorób Płuc w Szczecinie – Zdunowie.

Prognostyczne markery molekularne.

Innym praktycznym aspektem wykorzystania markerów jest ich przydatność prognostyczna. Wykorzystanie markerów do oceny rokowania co do przeżycia u chorych, w klasyfikacji stopnia zaawansowania klinicznego guza, możliwości powstawania przerzutów lub wznowy to najważniejsze prognostyczne zastosowania markerów. Badania wykazały, że obecność w komórkach guza mutacji genów KRAS wiąże się z krótszym czasem przeżycia pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc (Non-Small Cell Lung Cancer – NSCLC) [10]. Silną wartość prognostyczną mutacji somatycznych

KRAS wykazano także w odniesieniu do podwyższonego ryzyka nawrotu choroby i krótszego przeżycia niezależnie od stopnia zaawansowania klinicznego i typu histologicznego NSCLC [11]. Niezależnie od mutacji genu KRAS, także mutacje somatyczne genu p53 są negatywnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów z gruczolakorakiem. Takiej zależności nie stwierdza się dla pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym [12]. Wartość prognostyczną mają również całkowite stężenie krążącego we krwi obwodowej DNA oraz mikro RNA. Zwiększoną dynamikę wzrostu stężenia DNA u pacjentów z NSCLC po leczeniu operacyjnym zaobserwowano w przypadku wznowy lub niepełnej resekcji. Z kolei stężenie DNA w osoczu po radykalnej resekcji guza było ponad 3-krotnie niższe w porównaniu do nieudanego zabiegu lub nawrotu choroby [13-15]. Również hipermetylacja promotorów *CDKN2A/p16* i *FHIT* wiązała się z krótszym czasem wolnym od progresji oraz większym ryzykiem wznowy u pacjentów operowanych w I stadium NSCLC [14]. Pozytywnym czynnikiem prognostycznym jest natomiast ekspresja białek p21 i p16 w materiale resekcyjnym pacjentów operacyjnych w stadium N2 NSCLC [17].

Predykcyjne markery molekularne.

Zastosowanie w praktyce klinicznej leczenia raka płuc znajdują predykcyjne markery molekularne. Przykładowo, nadekspresja genu BRCA1 w raku płuc wiąże się ze zwiększoną podatnością na działanie winorelbiny i innych leków, które wiążą się z tubuliną. Natomiast metylacja genu BRCA1 (Breast Cancer 1, early onset 1) wiąże się z ze wzrostem podatności na cisplatynę i jej pochodne oraz ze spadkiem odpowiedzi na preparaty działające antymitotycznie [18]. Wysoka ekspresja genów ERCC1 (Excision Repair Cross-complementing rodent rep air deficiency, Complementation group 1) oraz RRM1 (Ribonucleoside-diphosphate Reductase M1) jest związana z krótszym czasem przeżycia a niski poziom ich ekspresji z dłuższym czasem przeżycia pacjentów z zaawansowaną postacią NSCLC leczonych cisplatyną i gemcytabiną [19]. Innymi słowy niski poziom ekspresji genów ERCC1 i RRM1 jest korzystnym czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na terapię związkami cisplatyny i gemcytabina i jednocześnie negatywnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów nie stosujących tej terapii [20]. Najważniejszym i chyba jedynym o uznanej wartości klinicznej molekularnym markerem predykcyjnym są mutacje somatyczne genu EGF. Obecność ich wiąże się z korzystną odpowiedzią na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej (TKI – Tyrosine Kinase Inhibitors) takimi jak, np. erlotynib, gefitinib chorych na NSCLC [21]. Należy jednak zaznaczyć, że mutacje te występują średnio u 10% pacjentów z NSCLC rasy kaukaskiej i u 30-

67% chorych pochodzenia azjatyckiego [22]. Metaanaliza 7 badań II fazy jednoznacznie wykazała, że zastosowanie mutacji domeny kinazowej genu EGFR jako głównego kryterium włączenia do leczenia TKI skutkowało zwiększeniem odsetka pozytywnych odpowiedzi na leczenie do 87% oraz wydłużeniem czasu przeżycia bez progresji z 7,7 do 14 m-cy. Dodatkowo korzystna odpowiedź na leczenie była niezależna od płci, rasy, oraz palenia tytoniu [23]. Badania wykazały również, że chorzy bez mutacji aktywujących EGFR w guzie pierwotnym odnoszą większe korzyści z zastosowania klasycznej chemioterapii niż z leczenia TKI [24]. Wdrożenie do praktyki klinicznej kolejnych wiarygodnych markerów predykcyjnych ma kluczowe znaczenie dla efektywnego leczenia raka płuc.

Podsumowanie.

Brak silnych genetycznych markerów predyspozycji do raka płuc wiąże się z koniecznością poszukiwania innych markerów, których zastosowanie mogłoby poprawić efektywność/skuteczność badań przesiewowych. Duże nadzieje budzą markery biochemiczne, jak np. stężenie określonych mikroelementów. Identyfikacja grup ryzyka o wyższym prawdopodobieństwie wykrycia raka powinna być przeprowadzana m.in. w oparciu o badania poziomu Se, Fe, Zn, Cu w surowicy krwi. Trwają dalsze prace nad kolejnymi markerami z grupy mikroelementów. Bardzo ważne jest też poszukiwanie kolejnych markerów predykcyjnych w celu opracowania algorytmów postępowania charakteryzujących tzw. medycynę spersonalizowaną, gdzie schematy leczenia są dostosowane do statusu określonych markerów, np. obecności lub braku określonych mutacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Didkowska J., Wojciechowska U., Tarkowski W., Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2005 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie. Warszawa 2007.
2. GLOBOCAN 2008. Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008. International Agency for Research on Cancer.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.
4. Cybulski C, Masojć B, Oszutowska D, Jaworowska E, Grodzki T, et al. [Constitutional CHEK2 mutations are associated with a decreased risk of lung and laryngeal cancers.](#) *Carcinogenesis.* 2008;29:762-5.
5. Wang Y, McKay JD, Rafnar T, Wang Z, Timofeeva MN, et al. [Rare variants of large effect in BRCA2 and CHEK2 affect risk of lung cancer.](#) *Nat Genet.* 2014;46:736-41.
6. Jaworska K, Gupta S, Durda K, Muszyńska M, Sukiennicki G, Jaworowska E, Grodzki T, Sulikowski M, Waloszczyk P, Wójcik J, Lubiński J, Cybulski C, Dębniak T, Lener M, Morawski AW, Krzystolik K, Narod SA, Sun P, Lubiński J, Jakubowska A. [A low selenium level is associated with lung and laryngeal cancers.](#) *PLoS One.* 2013;8:e59051.
7. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011;365:395-409.
8. National Lung Screening Trial Research Team, Church TR, Black WC, Aberle DR, Berg CD, Clingan KL, Duan F, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gierada DS, Jones GC, Mahon I, Marcus PM, Sicks JD, Jain

- A, Baum S. Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer. *N Engl J Med.* 2013;368:1980-91.
9. Aberle DR, DeMello S, Berg CD, Black WC, Brewer B, Church TR, Clingan KL, Duan F, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis CA, Gierada DS, Jain A, Jones GC, Mahon I, Marcus PM, Rathmell JM, Sicks J; National Lung Screening Trial Research Team. Results of the two incidence screenings in the National Lung Screening Trial. *N Engl J Med.* 2013;369:920-31.
10. [Mascaux C](#), [Iannino N](#), [Martin B](#), [Paesmans M](#), [Berghmans T](#), [Dusart M](#), [Haller A](#), [Lothaire P](#), [Meert AP](#), [Noel S](#), [Lafitte JJ](#), [Sculier JP](#). The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2005;92:131-9.
11. [Rosell R](#), [Monzó M](#), [Pifarré A](#), [Ariza A](#), [Sánchez JJ](#), [Moreno I](#), [Maurel J](#), [López MP](#), [Abad A](#), [de Anta JM](#). Molecular staging of non-small cell lung cancer according to K-ras genotypes. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1083-6.
12. [Fukuyama Y](#), [Mitsudomi T](#), [Sugio K](#), [Ishida T](#), [Akazawa K](#), [Sugimachi K](#). Kras and p53 mutations are an independent unfavourable prognostic indicator in patients with non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 1997;75:1125-30.
13. [Gautschi O](#), [Bigosch C](#), [Huegli B](#), [Jermann M](#), [Marx A](#), [Chassé E](#), [Ratschiller D](#), [Weder W](#), [Joerger M](#), [Betticher DC](#), [Stahel RA](#), [Ziegler A](#). Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2004;22:4157-64.
14. [Sozzi G](#), [Conte D](#), [Leon M](#), [Circione R](#), [Roz L](#), [Ratcliffe C](#), [Roz E](#), [Cirenei N](#), [Bellomi M](#), [Pelosi G](#), [Pierotti MA](#), [Pastorino U](#). Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3902-3908.
15. [Sozzi G](#), [Roz L](#), [Conte D](#), [Mariani L](#), [Andriani F](#), [Lo Vullo S](#), [Verri C](#), [Pastorino U](#). Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: five-year results of a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:69-74.
16. [Kim JS](#), [Kim JW](#), [Han J](#), [Shim YM](#), [Park J](#), [Kim DH](#). Cohypermethylation of p16 and FHIT promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:4049-4054.
17. [Mohamed S](#), [Yasufuku K](#), [Hiroshima K](#), [Nakajima T](#), [Yoshida S](#), [Suzuki M](#), [Sekine Y](#), [Shibuya K](#), [Iizasa T](#), [Farouk A](#), [Fujiisawa T](#). Prognostic implications of cell cycle-related proteins in primary resectable pathologic N2 non-small cell lung cancer. *Cancer* 2007;109:2506-2514.
18. [Taron M](#), [Rosell R](#), [Felip E](#), [Mendez P](#), [Souglakos J](#), [Ronco MS](#), [Queralt C](#), [Majo J](#), [Sanchez JM](#), [Sanchez JJ](#), [Maestre J](#). BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004;13:2443-2449.
19. [Su C](#), [Zhou S](#), [Zhang L](#), [Ren S](#), [Xu J](#), [Zhang J](#), [Lv M](#), [Zhang J](#), [Zhou C](#). ERCC1, RRM1 and BRCA1 mRNA expression levels and clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer. *Med Oncol.* 2011;28:1411-7.
20. [Singh N](#), [Aggarwal AN](#). ERCC1 and RRM1 Expression in non-small cell lung cancer—the good, the bad and the unknown. *J Thorac Oncol.* 2009;4:1042-3.
21. Chorostowska-Wynimko J., Skroński M., Szpechciński A. Molekularne markery prognostyczne i predykcyjne w diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuca. *Onkologia Info*, 2011, VIII, 3; 160-167.
22. Liang Z, Zhang J, Zeng X, Gao J, Wu S, Liu T. Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2010;10:376.
23. Zhang X., Chang A. Molecular predictors of EGFR-TKI sensitivity in advanced non-small cell lung cancer. *Int J Med Sci* 2008;5:209-217.
24. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. [Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma.](#) *N Engl J Med.* 2009;361:947-57.



Genetyka kliniczna raka trzustki

Clinical genetics of pancreas cancer

Streszczenie

Rak trzustki jest chorobą o agresywnym przebiegu i należy do nowotworów o wysokim wskaźniku śmiertelności. Rak trzustki znalazł się w pierwszej dziesiątce najczęściej występujących w Polsce nowotworów złośliwych. Średni czas przeżycia od rozpoznania choroby wynosi 6 miesięcy. Rak trzustki występuje częściej w starszym wieku. Wczesna diagnoza raka trzustki jest też trudna z uwagi na mało specyficzne objawy kliniczne w początkowym stadium choroby. Mimo rozwoju metod diagnostycznych rak trzustki należy do nowotworów późnowykrywalnych. Etiologia raka trzustki nie jest do końca poznana.

Genetyczne predyspozycje do raka trzustki przejawiają się w trzech formach. Po pierwsze ryzyko rozwoju raka trzustki zwiększone jest w wielu znanych zespołach genetycznych, takich jak np. Zespół Peutz-Jeghersa, FAMMM, zespół HBOC, zespół Lyncha, rodzinna polipowatość gruczolakowata, rodzinna polipowatość młodzieńcza, zespół ataksja-telangiektazja oraz zespół Wernera. Po drugie zespoły takie jak dziedziczne zapalenie trzustki (*hereditary pancreatitis*) oraz cystic fibrosis, znane z występujących już w młodym wieku zmian zapalnych w obrębie trzustki mogą predysponować do rozwoju raka tego narządu. I w końcu rodzinny rak trzustki (*familial pancreatic cancer*) odnosi się do rodzin, w których wystąpiły dwa lub więcej przypadki raka trzustki wśród krewnych pierwszego i/lub drugiego stopnia a rodziny takie nie spełniają kryteriów dla żadnego innego zespołu genetycznego.

Dotychczasowe algorytmy diagnostyczne raka trzustki dotyczą sytuacji, w której wskazaniem do ich stosowania jest wystąpienie objawów klinicznych. Nieznana jest natomiast ich przydatność w detekcji najwcześniejszych postaci raków u osób z wykrytą testami DNA zwiększoną predyspozycją do raka trzustki. Podobnie jak w przypadku innych nowotworów zakładamy, że poznanie podłoża genetycznego raka trzustki umożliwi również efektywną chemoprewencję oraz chemioterapię.

Słowa kluczowe: rak trzustki, zespoły dziedziczne, dziedziczne zapalenie trzustki, rodzinny rak trzustki, algorytmy diagnostyczne

Summary

Pancreatic cancer is an aggressive disease and the mortality rate is high. Pancreatic cancer is one of the 10 most frequent malignancies in Poland. The average time of pancreatic cancer patients' survival is 6 months. Pancreatic cancer is occurring in older age. Early diagnosis is difficult because of non-specific symptoms in the initial stage of the disease. Despite many efforts, little is known about etiology of pancreatic cancer.

There is no gene identified as specifically predisposing to pancreatic cancer yet. An inherited predisposition to pancreatic cancer is believed to occur in three distinct clinical settings. First, it occurs in hereditary tumour predisposition syndromes that are known to be associated with an increased risk of pancreatic cancer including Peutz-Jeghers syndrome, HBOC syndrome, FAMMM syndrome, Lynch syndrome, juvenile polyposis, familial adenomatous polyposis, ataxia-telangiectasia and Werner syndrome. The second setting is hereditary pancreatitis and cystic fibrosis, in which genetically determined early onset changes of the pancreas can predispose to the development of pancreatic cancer. The term familial pancreatic cancer refers to families with two or more first- or/and second-degree relatives with pancreatic cancer without fulfilling the criteria for another inherited tumour syndrome.

Diagnostic algorithms for pancreatic cancer refer to the situation when clinical symptoms occur. The usefulness of these algorithms in detecting early stages of pancreatic cancer in patients carrying DNA changes predisposing to this malignancy is unknown. It is possible that recognition of the genetic background of pancreatic cancer will enable effective chemoprevention and chemotherapy.

Key words: pancreatic cancer, hereditary syndromes, hereditary pancreatitis, familial pancreatic cancer, diagnostic algorithms

Rak trzustki jest chorobą o bardzo agresywnym przebiegu i należy do nowotworów o wysokim wskaźniku śmiertelności. Zapadalność i śmiertelność na raka trzustki stale wzrasta, obecnie wynosi ponad 300 tys. na rok w skali świata (1). Według Krajowego Rejestru Nowotworów w 2014 r. na raka trzustki w Polsce zachorowało ponad 3600 a zmarło ponad 4900 osób. Rak trzustki znalazł się w pierwszej dziesiątce najczęściej występujących w Polsce nowotworów złośliwych. Pomimo, że nie jest to bardzo częsty nowotwór jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów nowotworowych. W 2014 roku zanotowano 95 565 zgonów z powodu nowotworów złośliwych, z czego z powodu raka trzustki zmarło 2464 mężczyzn i 2519 kobiet, co daje szóste miejsce u mężczyzn i piąte u kobiet wśród najczęstszych powodów zgonów nowotworowych (2). Z uwagi na tak ekstremalnie dużą śmiertelność pacjentów z rakiem trzustki na całym świecie, nowotwór ten zajmuje w wielu krajach czwarte miejsce na liście najczęstszych przyczyn zgonów nowotworowych po raku płuc, sutka i jelita.

Analiza struktury umieralności na raki trzustki w Polsce w przeciągu kilkudziesięciu lat wykazuje tendencję wzrostową (3). Przebieg choroby jest bardzo szybki, a średni czas przeżycia od jej rozpoznania wynosi 6 miesięcy. Od momentu diagnozy <2% pacjentów przeżywa okres 5 lat, 8% przeżywa 2 lata i <50% przeżywa 3 miesiące lub więcej (4). Prawie każdy pacjent, u którego zdiagnozowano raka trzustki umiera właśnie z tego powodu.

Rak trzustki jest chorobą starszego wieku. Blisko 80% pacjentów z rakiem trzustki diagnozowanych jest w wieku między 60 a 80 rokiem życia (5, 6). Przypadki poniżej 40 roku życia są niezmiernie rzadkie. Średni wiek diagnozy wynosi 65 lat. Wiele prac dowodzi, iż na raka trzustki częściej chorują mężczyźni niż kobiety, choć różnica ta nie jest bardzo duża (7, 8, 9). Rozpoznanie raka trzustki pomimo postępu, jaki ostatnio dokonał się w zakresie metod diagnostycznych, jest wciąż bardzo trudne, co powoduje opóźnienie rozpoznania o 4-9 miesięcy. Wczesna diagnoza raka trzustki jest też trudna z uwagi na mało specyficzne objawy kliniczne w początkowym stadium choroby.

Nowotwory złośliwe trzustki to w 85-90% raki zewnątrzwydzielniczej części trzustkitypu gruczołowego, czyli gruczolakoraki (*adenocarcinoma*). Około 60-70% raków trzustki wywodzi się z głowy trzustki, 5-10% z trzonu i 10-15% z ogona. W 20% nowotwór jest rozprzestrzeniony i obejmuje cały gruczoł.

Etiologia raka trzustki nie jest do końca poznana, jednakże wiadomo, że na powstawanie tej choroby ma wpływ wiele czynników, zarówno środowiskowych jak i genetycznych. Środowiskowymi czynnikami ryzyka zachorowania na raka trzustki są przede wszystkim palenie tytoniu, wysokobiałkowa i wysokotłuszczowa dieta (otyłość), cukrzy-

ca, ekspozycja na węglowodory i pochodne ropy, przewlekłe stany zapalne, infekcje, pierwotnie stwardniejące zapalenie dróg żółciowych czy przebyta cholecystektomia.

Genetyczne predyspozycje do raka trzustki przejawiają się w trzech formach (10). Po pierwsze ryzyko rozwoju raka trzustki zwiększone jest w wielu znanych zespołach genetycznych. Po drugie zespoły takie jak dziedziczne zapalenie trzustki (*hereditary pancreatitis*) oraz *cysticfibrosis*, znane z wcześniej występujących zmian w obrębie trzustki mogą predysponować do rozwoju raka tego narządu. I w końcu rodzinny rak trzustki (*familial pancreatic cancer*) odnosi się do rodzin, w których wystąpiły dwa lub więcej przypadki raka trzustki wśród krewnych pierwszego i/lub drugiego stopnia a rodziny takie nie spełniają kryteriów dla żadnego innego zespołu genetycznego.

RAK TRZUSTKI W PRZEBIEGU ZNANYCH ZESPOŁÓW GENETYCZNYCH ZWIĄZANYCH Z WYSOKIM RYZYKIEM NOWOTWORÓW

W zespole Peutz-Jeghersa bardzo istotne jest zwiększone ryzyko wystąpienia różnych nowotworów w tym rak trzustki, piersi, płuc (11). Szacuje się, że u około 50% pacjentów z zespołem Peutz-Jeghersa rozwija się jakaś forma raka (12, 13, 14, 15). Rak trzustki jest jednym z najczęstszych nowotworów występujących w tym zespole genetycznym. Genetycznym podłożem tej choroby są germinalne mutacje w obrębie supresorowego genu *STK11/LKB1* (*serine/threonine kinase 11*).

Istnieje szereg doniesień wskazujących jednoznacznie na zwiększone ryzyko raka trzustki wśród rodzin z rozpoznaniem FAMMM (*familia atypical multiple mole melanoma syndrome*) (16, 17,54). U podłoża tego zespołu leżą germinalne mutacje supresorowego genu *CDKN2A*. Wydaje się, że wspólne występowanie raków trzustki i czerniaków w jednej rodzinie jest odrębnym zespołem genetycznym i obecnie zwane jest *melanoma-pancreatic cancer syndrome/familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome* (MPCS/FAMMM-PC; OMIM 606719).

Zespół HBOC (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) jest spowodowany germinalnymi mutacjami w genach *BRCA1* i *BRCA2*. Mutacje w obrębie tych genów wiążą się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nie tylko raka piersi i jajnika, ale również raka prostaty, jelita grubego, trzustki, żołądka i szyjki macicy (18). W wielu pracach wykazano istnienie ścisłego związku pomiędzy wystąpieniem mutacji genu *BRCA1* i *BRCA2* a zwiększonym ryzykiem rozwoju raka trzustki (19, 20, 21,55).

Zespół Lyncha (HNPCC - *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) stanowi przyczynę około 5% wszystkich raków jelita grubego (22, 23). Do spektrum nowotworów charakterystycznych dla tego zespołu zaliczany jest przede wszystkim rak jelita gru-

bego, rak trzonu macicy, jelita cienkiego, jajnika lub dróg moczowych, a według niektórych badaczy także rak jajnika, sutka i trzustki (24, 25). Najczęstszą przyczyną zespołu Lyncha są germinalne mutacje w genach naprawy DNA takich jak *MSH2* i *MLH1* a także genów *MSH6* i *PMS2* (25). Pomimo, że rak trzustki jest rzadki w przebiegu zespołu HNPCC, wykazano, że zespół ten może predysponować dotkniętych nim pacjentów do rozwoju raka trzustki (25, 28, 30, 56). U pacjentów z wykrytą mutacją w wyżej wymienionych genach skumulowane ryzyko wystąpienia raka trzustki wynosi odpowiednio 1,31% do 50 r.z. i 3,68% do 70 r.z. co zwiększa o 8,6 raza ryzyko w stosunku do populacji ogólnej (56).

Rodzinna polipowatość gruczolakowata (FAP, ang. *familial adenomatous polyposis*) stanowi przyczynę około 1% wszystkich raków jelita grubego. Rozwój FAP jest uwarunkowany głównie mutacją genu supresorowego *APC* (ang. *adenomatous polyposis coli*). Istnieją sporadyczne doniesienia o zwiększonym ryzyku rozwoju raka trzustki wśród pacjentów pochodzących z rodzin dotkniętych zespołem FAP (26, 30). Jednak z uwagi na to, że liczba takich przypadków jest stosunkowo mała, ostateczne ustalenie zależności między zespołem FAP a ryzykiem rozwoju raka trzustki jest trudne (26-28).

Zespół ataksja-telangiektazja (AT) należy do grupy wrodzonych zaburzeń immunologicznych, przebiegających z nadmierną łamliwością chromosomów. Zwiększone ryzyko raka trzustki, choć niskie, wydaje się być związane z przebiegiem tej choroby (33).

Zespół Wernera (WS, Werner syndrome) związany z występowaniem mutacji w genie supresorowym *WRN*, który koduje białko podobne do helikazy DNA. Zespół ten jest najczęstszą postacią progerii i dziedziczy się autosomalnie recesywnie. Według hipotezy, zweryfikowanej jedynie na badaniach linii komórkowych, utrata funkcji genu poprzez epigenetyczne wyciszenie lub utratę heterozygotyczności powoduje niestabilność genomu prowadzącą do transformacji nowotworowej komórek trzustki (57).

DZIEDZICZNE ZAPALENIE TRZUSTKI I *CYSTIC FIBROSIS*

U wielu pacjentów stwierdza się idiopatyczną, o nieustalonej etiologii, postać zapalenia trzustki. Brak jest oczywistych czynników predysponujących. W tej grupie chorych, dzięki badaniom molekularnym, coraz częściej udaje się zidentyfikować bezpośrednią przyczynę choroby. Wyłoniono w ten sposób zespół dziedzicznego zapalenia trzustki. Mutacje odpowiedzialne za rozwój tej choroby zlokalizowane są na chromosomie siódmym (7q35) (31) i powodują powstanie zmienionej formy genu *PRSS1* (ang. *Protease Serine 1*) (MIM 276000). W 1996 roku po raz pierwszy zidentyfikowano mutację (R122H) w genie *PRSS1*, której obecność korelowała z występowaniem dziedzicznej

postaci zapalenia trzustki. Mutacje tego genu identyfikuje się w około 70% takich przypadków (35). Jak dotąd zidentyfikowano 19 mutacji w genie *PRSSI*. Dwie z nich występują z większą częstością: R122H i N29I. Dziedziczna postać zapalenia trzustki związana z obecnością mutacji w genie *PRSSI* stanowi <1% wszystkich przypadków zapalenia trzustki (36).

Drugim genem związanym z tą jednostką chorobową jest gen *SPINK1* (ang. *Serine Protease Inhibitor Kazaltype 1*). Podobnie jak w przypadku mutacji w genie *PRSSI*, większość mutacji w genie *SPINK1* występuje rzadko. Tylko jedna mutacja występuje z większą częstością - N34S (34).

Trzecim zidentyfikowanym genem związanym z występowaniem chronicznego zapalenia trzustki jest gen *CFTR* (ang. *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) (36, 37). Mutacje genu *CFTR* prowadzą do rozwoju jednostki chorobowej zwanej *cystic fibrosis* (CF). Istnieje kilka doniesień wykazujących zwiększone ryzyko rozwoju raka trzustki wśród pacjentów z CF (38, 39). Jednakże liczba takich przypadków jest stosunkowo niewielka. Wiele doniesień wskazuje na związek pomiędzy zapaleniem trzustki a rozwojem raka trzustki (40,58,59). Ryzyko zachorowania na raka trzustki w przypadku pacjenta chorującego na dziedziczną przewlekłą postać zapalenia trzustki jest ponad 50 razy większe, niż w przypadku osób zdrowych (58,59). Szacuje się, że przed osiągnięciem 70. roku życia ok. 40% pacjentów chorujących na dziedziczną postać zapalenia trzustki, zachoruje także na raka trzustki (41, 42, 43). Badania te dowodzą wysokiego ryzyka rozwoju raka trzustki wśród pacjentów z dziedzicznym zapaleniem trzustki. Przy czym u palaczy ryzyko to jest wyższe niż u osób niepalących. Dotychczasowe wyniki mogą sugerować, że mutacje w genach *PRSSI*, *SPINK1* i *CFTR* nie są bezpośrednio związane z rozwojem raka trzustki, ale raczej zwiększają ryzyko wystąpienia stanu zapalnego, który z kolei może zwiększać ryzyko raka trzustki.

INNE ZMIANY GENETYCZNE ZWIĄZANE ZE ZWIĘKSZONYM RYZYKIEM ZACHOROWANIA NA RAKA TRZUSTKI.

W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia oparte o wyniki badań GWAS (Genome-Wide Association Studies). Analizy te polegają na „skanowaniu” bardzo dużej liczby znanych polimorfizmów w genomach osób należących do grupy badanej (chorych) i kontrolnej (zdrowych). Potencjalne różnice w częstościach analizowanych zmian mogą wskazywać na rolę danego polimorfizmu lub regionu w genomie w powstawaniu ryzyka zachorowania na raka. Wyniki badań GWAS w odniesieniu do raka trzustki wskazują na

kilka regionów potencjalnie związanych z zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka trzustki. Jak dotąd zidentyfikowano następujące lokalizacje i SNP znajdujące się w ich obrębie: 13q22.1 (rs9543325 - OR-1.26, rs9564966- OR-1.21), 5p15.33 (rs401681- OR-1.19) (62). Wyniki badań GWAS wskazują także na nosicielstwo wariantów w obrębie locus ABO jako związane z podwyższonym ryzykiem raka tego narządu (rs505922 – OR-1,42; rs495828 - OR-1.58; rs657152 – OR-1.51) (63,64). Cechą charakterystyczną badań GWAS w odniesieniu nie tylko do raka trzustki ale i innych nowotworów jest wykrywanie polimorfizmów, których nosicielstwo związane jest ze stosunkowo niewiele podwyższonym ryzykiem zachorowania na nowotwór złośliwy (OR około 1,2-1,5).

W ostatnim czasie przeprowadziliśmy badania celem określenia częstości 10 mutacji założycielskich: *BRCA1* (5382insC, 4153delA, C61G), *CHEK2* (1100delC, IVS2 + 1G>A del5395, I157T), *NBS1* (657del5) i *PALB2* (509_510delGA, 172_175delTTGT) wśród grupy 383 pacjentów z rakiem trzustki, 4000 osób grupy kontrolnej i oszacowania związku tych zmian z ryzykiem tej choroby w polskiej populacji. Po raz pierwszy wykazaliśmy asocjację pomiędzy nosicielstwem „słowiańskiej mutacji” 657delACAAA w genie *NBS1* a podwyższonym ryzykiem raka trzustki (8/383, 2,08%, OR-3,80, p=0,002) (66).

RODZINNY RAK TRZUSTKI

Pierwsze doniesienia opisujące rodziny z agregacją raka trzustki wśród krewnych (*Familial Pancreatic Cancer – FPC*) pojawiły się już we wczesnych latach siedemdziesiątych (44, 45, 46, 47, 48). Zespół rodzinnego raka trzustki definiuje rodziny, w których wystąpiły co najmniej 2 przypadki zachorowania na raka trzustki wśród krewnych pierwszego stopnia a jednocześnie rodziny te nie spełniają kryteriów dla innych znanych zespołów dziedzicznych związanych z podwyższonym ryzykiem wystąpienia raka trzustki, jak np. zespół Peutz-Jegersa, HNPCC, HBOC, czy FAMM. Do późnych lat 80-tych jedynie pojedyncze doniesienia sugerowały występowanie agregacji raka trzustki w niektórych rodzinach (49,59). Pierwsza praca na dużej grupie rodzin z agregacją raka trzustki ukazała się w 1989 roku (50). Po tym czasie utworzono kilka rejestrów takich rodzin, zarówno w Stanach Zjednoczonych jak i w Europie (51, 52, 53). Prospektywne badania Tersmette i wsp. wykazały, że ryzyko rozwoju raka trzustki wśród krewnych pierwszego stopnia pacjenta dotkniętego tym nowotworem jest 18-krotnie zwiększone w rodzinach, w których wystąpiły 2 przypadki raka trzustki i 57-krotnie w rodzinach, których 3 lub więcej członków dotkniętych jest rakiem trzustki. Takie wysokie ryzyko rozwoju raka trzustki zostało potwierdzone przez późniejsze badania tej samej grupy naukowców. Do

niedawna jedynym genem, którego konstytucyjne zmiany zostały jednoznacznie opisane jako związane z zespołem rodzinnego raka trzustki był gen *BRCA2* (*breast cancer 2 gene*) (MIM: 600185). Ostatnio odkryto nowy gen *PALB2* i jego związek z rodzinną postacią raka trzustki w populacji amerykańskiej i europejskiej, a także współwystępowanie w tych rodzinach raka piersi (60,61).

W naszych badaniach przeprowadzonych w grupie 398 osób pochodzących z rodzin z rodzinną agregacją raków trzustki wykazaliśmy, że ryzyko wystąpienia FPC może być związane z nosicielstwem zmiany w obrębie genu *PALB2* 172_175delTTGT (OR-10,05, $p=0,048$). Podwyższone ryzyko wystąpienia FPC zaobserwowaliśmy również (ale tylko wśród pacjentów z rakiem pochodzących z rodzin FPC, $n=105$) dla mutacji założycielskich genu *BRCA1* (5382insC, 4153delA, C61G) (OR-6,72, $p=0,026$). W tej samej grupie zaobserwowaliśmy także nową, nieopublikowaną dotychczas asocjację pomiędzy nosicielstwem mutacji a podwyższonym ryzykiem wystąpienia w rodzinie zespołu FPC dla zmian genu *CHEK2* ze szczególnym udziałem mutacji „*missence*” I157T (OR-2,17, $p=0,026$) (67).

Według najnowszych danych zdecydowana większość nowotworów powstaje na podłożu genetycznych predyspozycji. Dotychczas nie wykryto genu, którego defekty predysponowałyby specyficznym do raka trzustki. Molekularne podłoże raka trzustki jak wykazano powyżej może mieć bardzo heterogenny charakter, a wystąpienie tego typu nowotworu związane jest z szeregiem różnorodnych jednostek chorobowych. Zatem poszukiwania genetycznych predyspozycji muszą przebiegać wielotorowo.

DIAGNOSTYKA RADIOLOGICZNA RAKA TRZUSTKI

Dotychczasowe algorytmy diagnostyczne raka trzustki dotyczą sytuacji, w której wskazaniem do ich stosowania jest wystąpienie objawów klinicznych. W tym przypadku algorytm diagnostyczny obejmuje wykonywanie:

- ultrasonografii jamy brzusznej przeprowadzone przez doświadczonego i wyspecjalizowanego w tym badaniu radiologa;
- tomografii komputerowej jamy brzusznej;
- ultrasonografii endoskopowej, która jest badaniem przydatnym w wykrywaniu zmian niewielkich jednak mało dostępnych.

W diagnostyce wczesnych raków przydatne jest również oznaczanie markera CA19-9 i CA-125 u kobiet.

Powyższy schemat diagnostyczny nie został sprawdzony co do swojej przydatności w detekcji najwcześniejszych postaci raków u osób z wykrytą testami DNA związk-

szoną predyspozycją do raka trzustki. Określenie algorytmu diagnostycznego z wykorzystaniem technik obrazowania dla wykrycia wczesnych raków trzustki wymaga dopiero prospektywnych badań na dużych grupach pacjentów z określonymi konstytucyjnymi zmianami molekularnymi i ocenianych niezależnie różnymi technikami obrazowania guzów.

Podobnie jak w przypadku innych nowotworów zakładamy, że poznanie podłoża genetycznego raka trzustki umożliwi również efektywną chemoprewencję oraz chemioterapię.

INNE MARKERY O POTENCJALE DIAGNOSTYCZNYM DLA RAKA TRZUSTKI

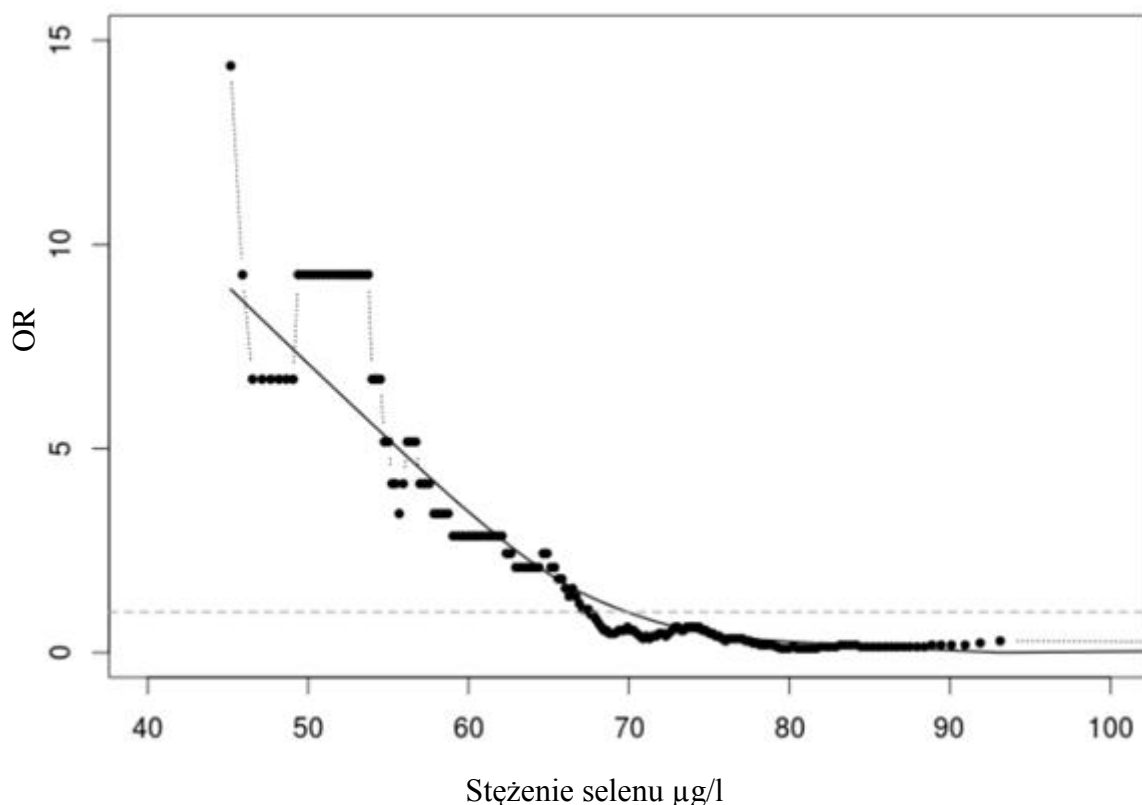
Realną nadzieję na zidentyfikowanie markerów użytecznych dla wczesnego wykrywania raka trzustki dają wyniki opublikowanych ostatnio badań badających potencjał diagnostyczny dla wykrywania raka trzustki w oparciu o poziomy różnych metabolitów. Wykazano, że markerem wczesnego raka trzustki może być określanie w osoczu krwi poziomu trzech aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach: Leucyny, Izoleucyny oraz Waliny. Wyniki badań prospektywnych wskazały, że podwyższone poziomy tych trzech aminokwasów związane były z ponad dwukrotnie podwyższonym ryzykiem ($p < 0,0006$). Asocjacja ta była niezależna od znanych czynników ryzyka raka trzustki, jak: cukrzyca, hiperglikemia, insulinooporność, przewlekłe, łagodne zapalenie trzustki. Ponadto zaobserwowano, że związek podwyższonego poziomu tych aminokwasów z ryzykiem raka trzustki był najsilniejszy wśród pacjentów, od których próbki krwi do analiz zostały pobrane od 2-5 lat przed diagnozą raka trzustki (OR ~10). Związek podwyższonych poziomów Leu, Ile, Val z wczesnym rakiem trzustki autorzy przypisują temu, że początkowy rozwój gruczolaka trzustki zwiększa rozkład białek tkanki mięśniowej powodując podwyższenie tych aminokwasów w osoczu. Być może podwyższony ich poziom będzie markerem przydatnym w wykrywaniu wczesnego wykrycia raka trzustki (65).

Mając na uwadze ostatecznie wyniki badań odnośnie roli mikroelementów w rozwoju raków wykazaliśmy, że również takie pierwiastki jak np. selen i miedź mogą okazać się przydatne we wczesnym wykrywaniu raka trzustki. W przeprowadzonych badaniach określono stężenie Se i Cu w surowicy krwi 100 pacjentów z rakiem trzustki w odniesieniu do grupy sparowanych co do płci, wieku, statusu palenia tytoniu, rodzinnej historii zachorowań na raki 100 zdrowych osób pochodzących z tego samego regionu geograficznego Polski. W grupie kontrolnej średnie stężenie Se w surowicy wyniosło 76 $\mu\text{g/l}$, a Cu 1098 $\mu\text{g/l}$. Natomiast średnie stężenie Se w grupie pacjentów z rakiem trzustki wyniosło 60 $\mu\text{g/l}$ a średnie stężenie Cu, 1432 $\mu\text{g/l}$. Otrzymane wyniki stężeń badanych mikro-

elementów podzielono na kwartyle celem porównania liczby pacjentów z rakiem trzustki i zdrowych w każdym z kwartyli w odniesieniu do stężeń Se i Cu. Porównując stężenia selenu w poszczególnych ćwiartkach zaobserwowano związek niskich stężeń selenu ze wzrostem liczby występujących raków trzustki (68, Tab.1.).

Tab. 1. Stężenie selenu (Se) w surowicy i występowanie raka trzustki.						
Ćwiartka	Stężenie Se (µg/l)	Liczba raków	Liczba kontroli	OR	p	95% CI
I	29,87-56,20	45	5	41	<0,0001	12,693-132,44
II	56,52 - 69,12	32	18	8,099	<0,0001	3,214-20,411
III	69,26 - 79,36	14	36	1,772	0,3421	0,6853-4,580
IV	79,43 -122,46	9	41	1	-	-

Wysoce istotne statystycznie różnice w stężeniu Se zaobserwowano porównując kwartyle z najniższym stężeniem selenu w surowicy (I, II) do ćwiartki z największą liczbą osób zdrowych (IV) (odpowiednio OR-41, $p<0,0001$; OR-8,099; $p<0,0001$, Tab.1.). Przeprowadzona analiza wykazała, że punkt odcięcia stężenia Se poniżej którego obserwowano wzrost występowania raków trzustki wyniósł 67,45 µg/l. Niższe stężenia selenu w surowicy były związane z większym prawdopodobieństwem zdiagnozowania raka trzustki (68, Ryc.1.).



Ryc.1. Stężenie selenu w surowicy krwi a występowanie raka trzustki.

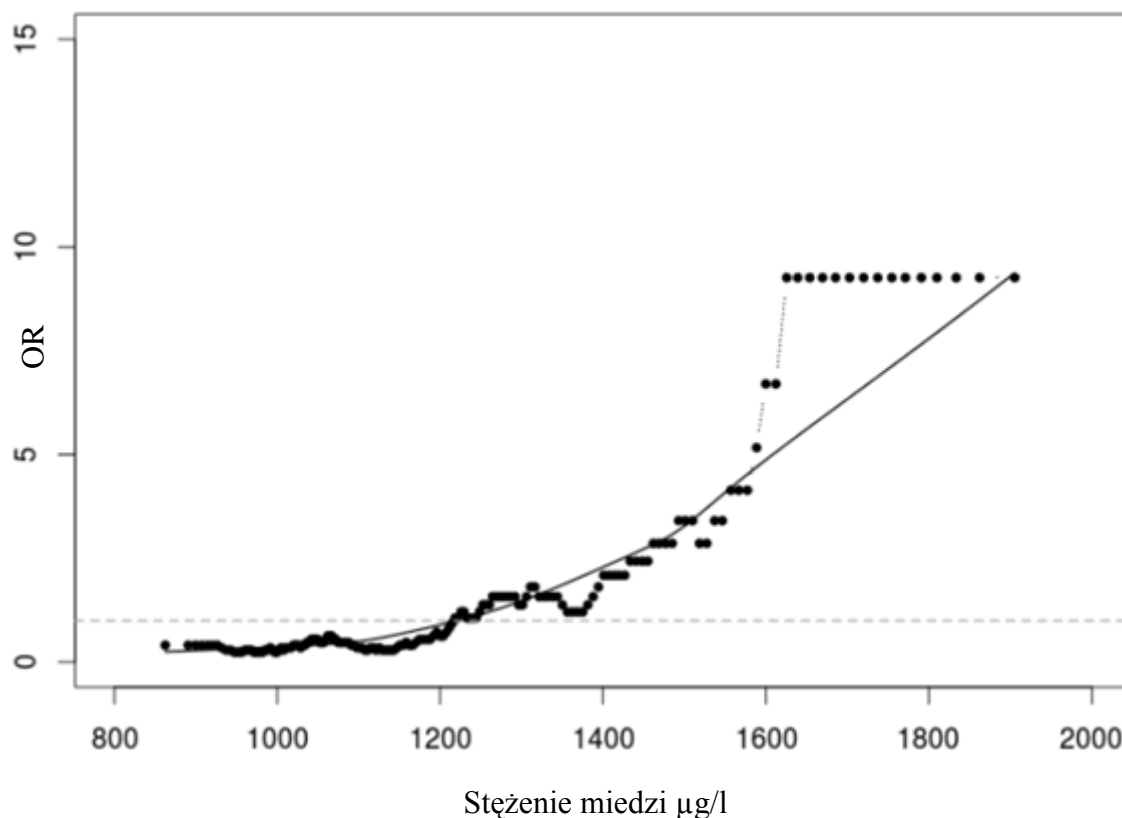
W podziale na kwartyle, zaobserwowano jednoznaczną zależność pomiędzy wysokim stężeniem Cu i wzrostem liczby występujących raków trzustki, a także niewielką liczbą pacjentów z rakiem trzustki i niskimi wartościami stężenia Cu w surowicy (68, Tab.2).

Tab.2. Występowanie raków trzustki a stężenie Cu w surowicy.

Ćwiartka	Stężenie Cu (µg/l)	Liczba raków	Liczba kontroli	OR	p- value	95 % CI
I	101,97-1025,88	11	39	1	-	-
II	1027,88 -1182,28	16	34	1,668	0,3678	0,681-4,084
III	1187,60 - 1448,68	29	21	4,896	0,0004	2,043-11,731
IV	1453,79 - 2901,35	44	6	26	<0,0001	8,791-76,897

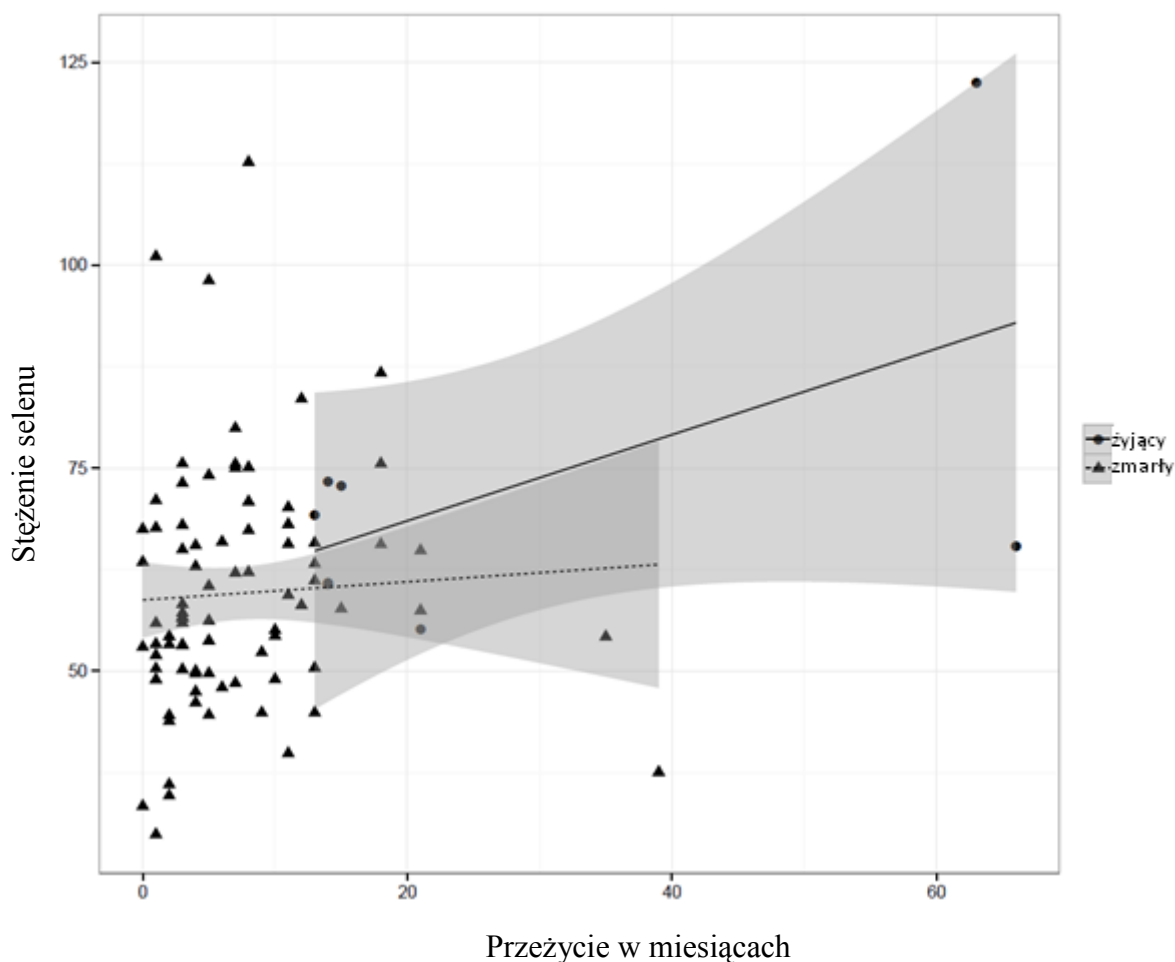
Porównując kwartyle o wysokich zakresach stężenia Cu (III, IV) z ćwiartką o niskich wartościach stężenia Cu (I), zaobserwowano istotny wzrost liczby raków trzustki (wraz ze wzrostem stężenia mikroelementu) (odpowiednio OR-4,896, p=0,0004; OR-26, p<0,0001, Tab.2). Punkt odcięcia stężenia Cu, powyżej którego obserwowano wzrost występowania raków trzustki wyniósł 1214,58 µg/l. Wyższe stężenia miedzi w su-

rowicy były związane ze wzrostem prawdopodobieństwa zdiagnozowania raka trzustki (68, Ryc.2.).



Ryc.2. Stężenie miedzi w surowicy krwi a występowanie raka trzustki.

Ponadto u pacjentów z rakiem trzustki będących w zakresie niskich stężeń selenu (średnia $<63,67 \mu\text{g/l}$), średni czas przeżycia wynosił 6 miesięcy, podczas gdy u pacjentów z wyższym poziomem selenu we krwi (średnia $>63,67 \mu\text{g/l}$), średni czas przeżycia wynosił 11 miesięcy. Wydaje się, że istnieje pozytywna zależność pomiędzy czasem przeżycia i wysokim stężeniem Se, chociaż obserwacja ta nie była statystycznie istotna na podstawie wyników naszych dotychczasowych badań ($p = 0,0820$, Ryc.3.).



Ryc.3. Zależność między czasem przeżycia i stężeniem selenu w surowicy (Se) pacjentów z rakiem trzustki.

Legenda. Linie regresji przedstawiono oddzielnie dla pacjentów żyjących i zmarłych. Przedział ufności pokazano w szarych obszarach.

Obserwowane w naszym badaniu retrospektywnym niskie zakresy stężenia Se i wysokie zakresy stężenia miedzi wśród próbek pacjentów z rakiem trzustki nie mogą być traktowane jako marker ryzyka raka trzustki. Gdy poziom Se w surowicy badany jest u nowo diagnozowanych pacjentów, obecność samego guza może mieć wpływ na badany parametr. Dlatego też schemat retrospektywnych badań kliniczno-kontrolnych nie nadaje się do wnioskowania, że niskie stężenia Se są przyczyną choroby. Badania te jednak mogą być cenne w określeniu, czy stężenie Se może być używane jako użyteczny marker selekcji do badań kontrolnych. Wyniki przeprowadzonych badań mogą sugerować, że niskie stężenie Se/ wysokie Cu u pacjentów z rakiem trzustki może być rozpatrywane jako potencjalny marker diagnostyczny wskazujący na trwający proces nowotworowy,

a nie jako marker ryzyka lub bezpośrednią przyczynę raka. Jednak nie można wykluczyć, że badane stężenia Se i Cu mogą rzeczywiście wpływać na rozwój raka trzustki. Mając na uwadze wykazaną w badaniach silną asocjację pomiędzy stężeniem badanych pierwiastków a częstością występowania raków trzustki, zasadne jest przeprowadzenie badania prospektywnego rozstrzygającego wpływ poziomów selenu i miedzi na ryzyko raka trzustki.

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano dłuższy czas przeżycia (na granicy istotności statystycznej) pacjentów z rakiem trzustki z wyższym stężeniem selenu w porównaniu do pacjentów z rakiem trzustki i niskim stężeniem Se w surowicy krwi (średnio, 11 miesięcy w porównaniu do 6 miesięcy). Dlatego nie można wykluczyć, że stężenie Se może być markerem prognostycznym w raku trzustki. Obserwowane stężenie selenu u pacjentów z rakiem trzustki było dalekie od optymalnego (wg naszych obserwacji jest to ~100 µg/l), jednakże czas przeżycia u pacjentów z rakiem trzustki i wyższym poziomem selenu był dłuższy w porównaniu do pacjentów z najniższymi zakresami stężenia Se. Ta obserwacja wymaga weryfikacji w dalszych badaniach, ale w odniesieniu do istniejących obserwacji z badań prospektywnych może być prawdziwa. Dane z metaanaliz 49 badań prospektywnych potwierdzają nawet 45% obniżenie śmiertelności z powodu raków (nie tylko trzustki) u osób z optymalnym stężeniem Se (69). W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano dłuższy czas przeżycia u pacjentów z rakiem trzustki i wyższymi stężeniami Se w surowicy. Dane te mogą sugerować też potencjalnie korzystne znaczenie suplementacji selenem w odniesieniu do leczenia raka trzustki (68).

Podsumowując, przeprowadzone przez nas retrospektywne badanie sugeruje, że niskie stężenie selenu i wysokie stężenie miedzi w surowicy krwi może wpływać na rozwój raka trzustki. Oznaczenie stężenia selenu i miedzi w surowicy krwi może uzupełniać konwencjonalne procedury diagnostyki raka trzustki jako dodatkowy marker laboratoryjny. Ponadto, wydaje się, że wyższe stężenie selenu wiąże się z dłuższym czasem przeżycia u pacjentów z rakiem trzustki. Nie ulega wątpliwości, że prospektywne badania kohortowe są niezbędne dla rozstrzygnięcia kwestii wykorzystania pomiarów selenu i miedzi jako markerów ryzyka raka trzustki. W tej chwili wydaje się, że określenie stężenia selenu i miedzi może być markerem selekcji do badań kontrolnych, jako uzupełnienie istniejących procedur diagnostycznych oraz markerem prognostycznym co do przeżycia.

PIŚMIENNICTWO

1. Ferlay J, et. al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359-86.

2. Wojciechowska U, et al.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2014 roku. Warszawa 2016.
3. National Institutes of Health: National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1973-1990. NIH publication 93-2789. Bethesda, MD, 1993.
4. Gold EB: Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg Clin North Am* 1995, 75: 819-43.
5. Watanabe Y, et al.: Mortality in the JACC study till 1999. *J Epidemiol* 2005, 15: 74-9.
6. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC: Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am* 2000, 84: 565-73.
7. McCracken GI, et al.: Efficacy of a prototype brush head for a powered toothbrush. A multicentre study. *J Clin Periodontol* 2002, 29: 889-95.
8. Habbe N, et al.: Familial pancreatic cancer syndromes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2006, 35: 417-30, XI.
9. Boardman LA, et al.: Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann Intern Med* 1998, 128: 896-9.
10. Hizawa K, et al.: Cancer in Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer* 1993, 72: 2777-81.
11. Giardiello FM, et al.: Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 1987, 316: 1511-4.
12. Su GH, et al.: Germline and somatic mutations of the *STK11/LKB1* Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol* 1999, 154: 1835-40.
13. Lynch HT, et al.: Family studies of malignant melanoma and associated cancer. *Surg Gynecol Obstet* 1975, 141: 517-22.
14. Bergman W, Gruis N: Familial melanoma and pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1996, 334: 471-472.
15. Ford D, et al.: Risks of cancer in *BRCA1*-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 1994, 343: 692-5.
16. Tonin P, et al.: A large multisite cancer family is linked to *BRCA2*. *J Med Genet* 1995, 32: 982-4.
17. Simard J, et al.: Common origins of *BRCA1* mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet.* 1994, 8: 392-8.
18. Thompson D, Easton DF, Breast Cancer Linkage Consortium: Cancer Incidence in *BRCA1* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002, 94: 1358-65.
19. Goldstein AM: Familial melanoma, pancreatic cancer and germline *CDKN2A* mutations. *Hum Mutat.* 2004, 23: 630.
20. Lynch HT, et al.: Update on familial pancreatic cancer. *Curr Gastroenterol Rep.* 2001, 3: 121-8.
21. Vasen HF, et al.: The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991, 34: 424-5.
22. Vasen HF, et al.: New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999, 116: 1453-6.
23. Fishel R, et al.: The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993, 75: 1027-38.
24. Lynch HT, et al.: Hereditary pancreatic cancer. *Pancreatology* 2001, 1: 466-71.
25. Lynch HT, et al.: Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993, 104: 1535-49.
26. Stewart CJ, Imrie CW, Foulis AK: Pancreatic islet cell tumour in a patient with familial adenomatous polyposis. *J Clin Pathol* 1994, 47: 860-1.
27. Maire F, et al.: Intraductal papillary and mucinous pancreatic tumour: a new extracolonic tumour in familial adenomatous polyposis. *Gut* 2002, 51: 446-9.
28. Yashima K, et al.: Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in the mutation cluster region: comparison of human pancreatic and colorectal cancers. *Int J Cancer* 1994, 59: 43-7.
29. Miyaki M, Kuroki T: Role of Smad4 (*DPC4*) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 306: 799-804.
30. Lynch HT: Genetics and pancreatic cancer. *Arch Surg* 1994, 129: 266-8.
31. Whitcomb DC, et al.: A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 1996, 110: 1975-80.
32. Seket B, Saurin JC, Scoazec JY, Partensky C. Pancreatic acinar cell carcinoma in a patient with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Clin Biol.* 2003; 27:818-20.
33. Slavin TP, et al. The spectrum of genetic variants in hereditary pancreatic cancer includes Fanconi anemia genes. *Fam Cancer.* 2017 Jul 8.
34. Lempinen M, et al.: Mutations N34S and P55S of the *SPINK1* gene in patients with chronic pancreatitis or pancreatic cancer and in healthy subjects: a report from Finland. *Scand J Gastroenterol.* 2005 Feb;40(2):225-30.

35. Whitcomb DC, et al.: Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996, 14: 141-5.
36. Cheng Hu, et al. The Differential Role of Human Cationic Trypsinogen (*PRSSI*) p.R122H Mutation in Hereditary and Nonhereditary Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract.* 2017: 9505460.
37. Tsongalis GJ, et al.: Association of pancreatic adenocarcinoma, mild lung disease, and delta F508 mutation in a cystic fibrosis patient. *Clin Chem* 1994, 40: 1972-4.
38. Whitcomb DC, Pogue-Geile K: Pancreatitis as a risk for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2002, 31: 663-78.
39. Lowenfels AB, et al.: Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89: 442-6.
40. Howes N, et al.: European Registry of Hereditary Pancreatitis and Pancreatic Cancer (EUROPAC). Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004, 2: 252-61.
41. Lowenfels AB, et al.: Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. *JAMA* 2001, 286: 169-70.
42. Reimer RR, et al.: Pancreatic cancer in father and son. *Lancet* 1977, 1: 911.
43. Lynch HT, et al.: Familial pancreatic cancer: clinicopathologic study of 18 nuclear families. *Am J Gastroenterol* 1990, 85: 54-60.
44. Ghadirian P, Simard A, Baillargeon J: Cancer of the pancreas in two brothers and one sister. *Int J Pancreatol* 1987, 2 (5-6): 383-91.
45. Dat NM, Sontag SJ: Pancreatic carcinoma in brothers. *Ann Intern Med* 1982, 97: 282.
46. MacDermott RP, Kramer P: Adenocarcinoma of the pancreas in four siblings. *Gastroenterology* 1973, 65: 137-9.
47. Ehrental D, et al.: Familial pancreatic adenocarcinoma in three generations. A case report and a review of the literature. *Cancer* 1987, 59: 1661-4.
48. Lynch HT, et al.: Familial pancreatic cancer (Part 1): Genetic pathology review. *Nebr Med J* 1989, 74: 109-12.
49. Hruban RH, et al.: Genetics of pancreatic cancer. From genes to families. *Surg Oncol Clin N Am* 1998, 7: 1-23.
50. Applebaum SE, et al.: Genetic testing. Counseling, laboratory, and regulatory issues and the EUROPAC protocol for ethical research in multicenter studies of inherited pancreatic diseases. *Med Clin North Am* 2000, 84: 575-588, VIII.
51. Bartsch DK, et al.: Update of familial pancreatic cancer in Germany. *Pancreatology* 2001, 1: 510-6.
52. Tersmette AC, et al.: Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001, 7: 738-44.
53. Klein AP, Brune KA, et al.: Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res* 2004, 64: 2634-8.
54. Hansson J.: Familial cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 685:134-45.
55. Lowery M.,Shah MA. et al.: A 67-year-old woman with BRCA1 mutation associated with pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2010, Aug; 14.
56. Kastros F, Mukherjee B. et al.: Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* 2009, Oct 28; 302(16):1790-5.
57. Chun SG., Yee NS.: Werner syndrome as a hereditary risk factor for exocrine pancreatic cancer: Potential role of WRN in pancreatic tumorigenesis and patient-tailored therapy. *Cancer Biol Ther.* 2010, Sep; 10(5): 430-7.
58. Lal A., Lal DR.: Hereditary pancreatitis. *Pediatr Surg Int.* 2010, Aug 10.
59. Krejs GJ.: Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. *Dis Dig.* 2010, 28(2): 355-8.
60. Jones S.,Hruban RH et al.: Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science.* 2009, Apr 10; 324(5924):217.
61. Slater EP., Langer P. et al.: PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet.* 2010, Nov; 78(5): 490-4.
62. Petersen GM, Amundadottir L, et al. A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat Genet.* 2010 Mar;42(3):224-8.
63. Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, Fuchs CS, et al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet.* 2009 Sep;41(9):986-90. doi: 10.1038/ng.429. Epub 2009 Aug 2.
64. Xu HL, Cheng JR, Zhang W, Wang J, Yu H, et al. Re-evaluation of ABO gene polymorphisms detected in a genome-wide association study and risk of pancreatic ductal adenocarcinoma in a Chinese population. *Chin J Cancer.* 2013 Jul 2. doi: 10.5732/cjc.013.10060.

65. Mayers JR, Wu C, Clish CB, Kraft P, Torrence ME, et al. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Med.* 2014;20:1193-8.
66. Lener MR, Scott RJ, Kluźniak W, Baszuk P, Cybulski C, Wiechowska-Kozłowska A, Huzarski T, Byrski T, Kładny J, Pietrzak S, Soluch A, Jakubowska A, Lubiński J. Do founder mutations characteristic of some cancer sites also predispose to pancreatic cancer? *Int J Cancer.* 2016 Aug 1;139(3):601-6.
67. Lener MR, Kashyap A, Kluźniak W, Cybulski C, Soluch A, Pietrzak S, Huzarski T, Gronwald J, Lubiński J. The Prevalence of Founder Mutations Among Individuals from Families with Familial Pancreatic Cancer Syndrome. *Cancer Res Treat.* 2016 Jul 28. doi: 10.4143/crt.2016.217.
68. Lener MR, Scott RJ, Wiechowska-Kozłowska A, Serrano-Fernández P, Baszuk P, Jaworska-Bieniek K, Sukiennicki G, Marciniak W, Muszyńska M, Kładny J, Gromowski T, Kaczmarek K, Jakubowska A, Lubiński J. Serum Concentrations of Selenium and Copper in Patients Diagnosed with Pancreatic Cancer. *Cancer Res Treat.* 2016 Jul;48(3):1056-64.
69. Vinceti M, Dennert G, Crespi CM, Zwahlen M, Brinkman M, Zeegers MP, Horneber M, D'Amico R, Del Giovane C. Selenium for preventing cancer. *ochrane Database Syst Rev.* 2014 Mar 30;(3):CD005195

*Marta Kaczmarek-Ryś, Katarzyna Ziemnicka, Szymon Hryhorowicz, Paweł Boruń,
Bartłomiej Budny, Andrzej Pławski*



Rzadkie predyspozycje genetyczne zwiększające ryzyko występowania nowotworów

**Rare genetic predisposition increasing the risk of
cancers**

Streszczenie

Rzadkie dziedziczne zespoły predyspozycji do nowotworów wieloukładowych często charakteryzują się heterogennym przebiegiem i różnorodnością objawów klinicznych. Objawy te nie zawsze są cechą typową dla jednego schorzenia, co może znacznie utrudniać ich właściwe zdiagnozowanie, a tym samym powodować niedoszacowanie faktycznej częstości ich występowania. W przebiegu zespołu CMMRDS, zespołu nabłoniaków znamionowych, zespołu Blooma, Triady Carney'a i Zespołu Carney'a-Stratakisa oraz zespołu MEN1 często występują objawy charakterystyczne dla innych chorób, a wystąpienie wszystkich symptomów rozciągnięte jest w czasie, nie dając pełnego obrazu choroby. Prawidłowa diagnoza pozwala na wdrożenie odpowiedniej opieki medycznej a tym samym umożliwia wykrywanie kolejnych zmian nowotworowych we wczesnym stadium rozwoju, co przy zastosowaniu odpowiedniego leczenia znacznie wydłuża czas życia chorych.

Słowa kluczowe: rzadkie zespoły predyspozycji do występowania nowotworów, Zespół konstytuwne niedoboru naprawy DNA typu „mismatch”, Zespół nabłoniaków znamionowych, Zespół Blooma, Zespół MEN1, Triada Carney'a, Zespół Carney'a-Stratakisa

Summary

Rare hereditary predisposition to multiorgan cancers are often characterized by heterogeneous course and variety of clinical symptoms, which are not always the hallmark of a disease and thus greatly impede their proper diagnosis. This could result in underestimation of their actual frequency. In the course of mismatch repair cancer syndrome (CMMRDS), basal cell nevus syndrome, Bloom syndrome, Carney Triad, Carney-Stratakis syndrome and multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), often present with ~~symptoms~~ features characteristic of other diseases, the occurrence of all symptoms are spread over time, resulting usually in an incomplete picture of the disease. The correct diagnosis allows for the implementation of the appropriate medical care and enables the detection of subsequent neoplastic lesions at an early stage of development what in consequence lead to the appropriate treatment significantly prolonging patients lifespan.

Keywords: rare syndromes with predisposition to cancers, constitutional mismatch repair cancer syndrome, basal cell nevus syndrome, Bloom syndrome, MEN1 syndrome, Carney Triad, Carney-Stratakis syndrome

Podłoże molekularne większości silnych dziedzicznych predyspozycji do występowania chorób nowotworowych jest znane, a dynamiczny rozwój technik analizy DNA pozwala na identyfikację mutacji prowadzących do ich wystąpienia oraz objęcie chorych i ich rodzin odpowiednią opieką medyczną. Jednak w przypadkach rzadkich dziedzicznych chorób nowotworowych ekspresja przebiegu klinicznego może być zmienna i nie jest dobrze poznana, prowadząc często do błędów w diagnozowaniu tych chorób. Ścisła współpraca między lekarzami klinicystami i genetykami może ułatwić zarówno wczesną identyfikację chorych lub krewnych z grupy ryzyka jak i planowanie kompleksowej opieki medycznej dla pacjentów.

W opracowaniu tym przedstawiono rzadkie dziedziczne zespoły z predyspozycjami do nowotworów wieloukładowych.

Zespół konstytutywnego niedoboru naprawy DNA typu „mismatch” (CMMRDS)

Zespół konstytutywnego niedoboru naprawy DNA typu „*mismatch*” (ang. *constitutional mismatch repair cancer syndrome*, CMMRDS, OMIM: 276300) jest dziedziczny autosomalnie recesywnie i związany z występowaniem w okresie dziecięcym nowotworów hematologicznych – chłoniaków nieziarniczych i różnego typów białaczek, a także rdzeniaków zarodkowych (*medulloblastoma*), glejaków wielopostaciowych mózgu (*glioblastoma multiforme*) i innych guzów w centralnym układzie nerwowym. W drugiej dekadzie życia, u chorych pojawiają się również nowotwory charakterystyczne dla zespołu Lyncha (OMIM: 120435), w którym najwcześniej występują one dopiero w czwartej dekadzie życia. U chorych mogą występować także zmiany typu *cafe-au-lait maculae* (CALM), które mogą sugerować błędną diagnozę nerwiakowłókniakowatości typu I [1]. Częstość występowania tego zespołu nie została określona, jednak ze względu na trudności w zdiagnozowaniu może być wyższa, niż wynika to z piśmiennictwa [2].

Za występowanie CMMRDS odpowiedzialne są homozygotyczne lub złożone heterozygotyczne mutacje w genach naprawy DNA (ang. *mismatch repair genes*, MMR): *MLH1* (3p22.2, OMIM:120436), *MSH2* (2p21, OMIM: 609309), *MSH6* (2p16.3, OMIM: 600678) lub *PMS2* (7p22.1, OMIM: 600259) [3].

Zaobserwowano, że niższy wiek diagnozy pierwszego nowotworu oraz większe nasilenie objawów występuje częściej u chorych z mutacjami w genach *MLH1* i *MHS2*, niż u pacjentów z mutacjami obu alleli genu *MSH6* oraz *PMS2*. Guzy mózgu pojawiają się jako pierwsze objawy u nosicieli mutacji w genach *PMS2* i *MSH6* częściej niż u pacjentów z mutacjami w genach *MLH1/MSH2*, u których z kolei częściej występującym pierwszym objawem są nowotwory hematologiczne. Stwierdzono też, że dwualleliczne

mutacje genu *PMS2* występują u 50% pacjentów z CMMRDS [4]. W diagnostyce mutacji genu *PMS2* należy zachować szczególną uwagę, ze względu na istnienie pseudogenu *PMS2CL* [5, 6, 7].

Chorzy powinni być objęci programem wieloaspektowej opieki z uwzględnieniem poradnictwa genetycznego i stałej opieki psychologicznej. Rodzina chorego powinna być poinformowana o wysokim ryzyku wystąpienia u niego kolejnych nowotworów. Porada genetyczna musi również zawierać informacje na temat potencjalnego ryzyka choroby u 25% rodzeństwa oraz ryzyka wystąpienia nowotworów związanych z zespołem Lyncha u heterozygotycznych nosicieli mutacji, zwłaszcza rodziców [4].

Zespół nabłoniaków znamionowych

Zespół nabłoniaków znamionowych (zespół Gorlina, ang. *Gorlin syndrome*, *basal cell nevus syndrom*, BCNS, OMIM: 109400) charakteryzuje się szerokim spektrum zaburzeń rozwojowych i predyspozycją do różnych nowotworów. Częstość występowania tego schorzenia jest różna w zależności od populacji i waha się od 1/30000 wśród mieszkańców Wielkiej Brytanii [8] do 1/256000 w populacji włoskiej [9].

Objawy kliniczne zespołu Gorlina są bardzo zróżnicowane i obejmują występowanie licznych ognisk raka podstawnokomórkowego skóry (ang. *basal cell carcinoma*, BCC), który może pojawić się już we wczesnym okresie dziecięcym, obecność rogowaciejących torbieli szczęki i żuchwy o pochodzeniu nabłonkowym (OKCs, ang. *odontogenic keratocysts*), które najczęściej rozwijają się w pierwszej i drugiej dekadzie życia [10, 11]; obecność zagłębień, tłuszczaków i torbieli epidermalnych na skórze rąk i stóp oraz zwapnienie opony twardej. Objawy te przyjęto jako główne kryteria diagnozowania zespołu nabłoniaków znamionowych [12]. Ponadto istnieje szereg objawów dodatkowych, jak wrodzone nieprawidłowości w obrębie układu kostnego, zrosnięte żebra, makrocefalia z czołowymi uwypukleniami, rozszczep wargi i podniebienia czy hipertelorizm [10].

Chorzy z BCNS mają podwyższone ryzyko rozwoju nowotworów układowych. Opisano występowanie rdzeniaków zarodkowych, oponiaków, włókniaków jajnika oraz serca a także obecność wielokrotnych lub pojedynczych torbieli limfatycznych lub krezkowych oraz hamartomatycznych polipów żołądka [13]. Torbiele i polipy mogą występować jako bezbolesne guzy jamy brzusznej, ale także mogą być przyczyną bolesnego ciśnienia w jamie brzusznej, powodować nudności i wymioty, a w stanach zaawansowanych mogą powodować ciężkie powikłania, jak kompresja narządów lub niedrożność przewodu pokarmowego [8].

Dla rozpoznania zespołu BCNS zebrano objawy w dwie grupy: kryteria duże (ang. *major criteria*) oraz kryteria małe (ang. *minor criteria*). Rozpoznanie zespołu opiera na stwierdzeniu 2 objawów dużych lub jednego dużego i dwóch małych (Tabela 1).

Tab. 1. Kryteria rozpoznania BCNS.

Kryteria duże	Kryteria małe
<ul style="list-style-type: none"> • dwa lub więcej ognisk raka podstawnokomórkowego lub jedno ognisko u chorego przed 20 r.ż. • torbiel rogowaciejąca (keratocysta) szczęki lub żuchwy • trzy lub więcej zmiany skórne dłoni lub stóp • zwapnienia sierpa mózgu • anomalie żeber 	<ul style="list-style-type: none"> • wady wrodzone, np. rozszczep wargi i/lub podniebienia, hipertelorizm różnego stopnia, zaćma lub małowocność • torbiele epidermalne obwodowych części ciała • makrocefalia • wydatne guzy czołowe • syndaktylia • włókniaki jajnika • wady kręgosłupa • rdzeniak zarodkowy

Zespół nabłoniaków znamionowych jest dziedziczony w sposób autosomalny dominujący i związany z mutacjami w genie *PTCH1* (OMIM: 601309), o wielkości 34 kb i złożonym z 23 eksonów położonym w pozycji 9q22.32. Gen *PTCH1* należy do genów supresorowych nowotworów, a jego mutacje o charakterze inaktywującym charakteryzują się pełną penetracją lecz zmienną ekspresją zarówno między chorymi niespokrewnionymi, jak i w obrębie jednej rodziny [14, 15]. Dotychczas opisano około ponad 100 różnych mutacji tego genu [16]. Gen *PTCH1* koduje międzybłonową glikoproteinę, która działa jako ligand receptora błonowego należącego do rodziny białek Hedgehog – SHH (ang. *sonic hedgehog*). Białko PTCH1 tłumi transkrypcję genów szlaku SHH biorących udział w regulacji organogenezy.

Opisano także mutacje innego negatywnego regulatora tego samego szlaku – genu *SUFU* (10q24.32, OMIM: 607035), jako związane z BCNS, a zwłaszcza z ryzykiem wystąpienia dziecięcego rdzeniaka zarodkowego [17]. Mutacje w genach *PTCH1* i *SUFU* identyfikowane są u 87% chorych z BCNS [18]. Fan i wsp. opisali przypadek chińskiej rodziny z BCNS, wśród członków której występowała mutacja p.R719Q genu *PTCH2* (1p34.1, OMIM: 603673). Przeprowadzone przez nich badania funkcjonalne wykazały,

że zmutowane białko utraciło funkcję hamowania ścieżki sygnałowej SHH i blokowania podziałów komórkowych [19].

Leczenie zespołu Gorlina jest w większości przypadków uwarunkowane nasileniem występujących zaburzeń. Chorzy powinni być objęci opieką dermatologiczną i stomatologiczną. Pewne znaczenie profilaktyczne może mieć zalecenie unikania ekspozycji na promieniowanie UV, czy profilaktyka z zastosowaniem doustnych retinoidów. Stosowanie radioterapii jest przeciwwskazane ze względu na możliwość indukcji powstawania zmian mnogich [20].

Zespół Blooma

Zespół Blooma (ang. *Bloom syndrome*, BLS, OMIM: 210900) jest dziedziczony w sposób autosomalny recesywny i związany z homozygotycznymi i złożonymi heterozygotycznymi mutacjami w genie *BLM* (15q26.1, OMIM: 604610), kodującym helikazę DNA. Białko BLM (RECQ3) należy do rodziny helikaz RecQ, enzymów odpowiedzialnych za procesy naprawy DNA typu MMR, BER i NER [21]. Gen *BLM* jest genem supresorowym i jego inaktywacja związana jest z obniżoną zdolnością naprawy błędów replikacji i niestabilnością genomową związaną z podwyższoną częstością rekombinacji w komórkach osób chorych, co powoduje zwiększoną predyspozycję do zachorowania na nowotwory. Jedną z funkcji białka BLM jest udział w prawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu różnych typów limfocytów B [22]. Utrata tej funkcji może mieć związek z faktem, że pacjenci z zespołem Blooma rozwijają głównie nowotwory hematologiczne, które występować mogą już w okresie dzieciństwa. Gruczolakoraki, jak rak przełyku i gruczołu piersiowego, częściej pojawiają się w okresie dojrzałym, podobnie jak rak jelita grubego, który stwierdzany jest u 12% pacjentów. Opisano także wczesne występowanie rzadkich nowotworów, jak nerczak zarodkowy (guz Wilmsa) czy kostniakomięsak. W sumie u 45% chorych z BLS stwierdza się występowanie co najmniej jednego nowotworu, a u części chorych obecność kilku guzów pierwotnych [23]. Ponadto chorzy przejawiają szereg objawów klinicznych, jak: opóźnienie wzrastania jeszcze w okresie przedurodzeniowym, a w efekcie niski wzrost końcowy nie przekraczający 150 cm; wrażliwość na infekcje układu oddechowego i przewodu pokarmowego powiązana z niedoborem odporności; rumień teleangiektatyczny na twarzy i grzbietach rąk pojawiający się w już w pierwszym roku życia oraz występowanie na skórze obszarów z niedoborem i nadmiarem pigmentacji. Obserwuje się również cechy dysmorficzne, niepłodność u mężczyzn oraz przedwczesną menopauzę u kobiet [24].

Dotychczas opisano ponad 80 różnych mutacji genu *BLM*, które w układzie homo-, lub heterozygotycznym złożonym odpowiadają za wystąpienie zespołu Blooma [16]. Badanie częstości występowania mutacji genu *BLM* wśród zdrowych wykazało ich obecność u 0,11% badanych [25]. W populacji Żydów aszkenazyjskich częstość ta jest dziesięciokrotnie wyższa i dotyczy tylko mutacji założycielskiej c.2207–2212delATCTGA-insTAGATTC (*BLM^{Asht}*), powodującej przedwczesną terminację translacji, której nosicielstwo nie zostało powiązane z podwyższonym ryzykiem występowania nowotworów [26]. Związek mutacji genu *BLM* z podatnością na nowotwory pozostaje niewyjaśniony, jednak w najnowszych badaniach rodzin o pochodzeniu kaukaskim z wczesnie rozwijającym się rakiem jelita grubego zidentyfikowano nosicieli zmutowanego allelu genu *BLM*. Podobnie wyniki uzyskano w badaniach rodzin z dziedzicznym rakiem piersi [23, 27, 28]. Badania na myszach wykazały, że tło genetyczne i stężenie białka BLM mogą mieć wpływ na stopień podatności na nowotwory, jednak zasugerowały także wpływ innych czynników genetycznych i/lub środowiskowych na penetrację zmutowanych alleli genu *BLM* [29, 30].

Zespół MEN1

Zespół mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej typu I (ang. *multiple endocrine neoplasia type 1*, MEN1, OMIM: 131100), określane także jako zespół Wermera, jest dziedziczny w sposób autosomalny recesywny i związany z mutacjami genu *MEN1* (11q13.1, OMIM: 613733), kodującego meninę – białko jądrowe, regulujące transkrypcję, stabilność genomową, podziały i proliferację komórek [31].

U osób chorych występują najczęściej prowadzące do hiperkalcemii guzy przytarczyc (ponad 90% chorych), różnego typu nowotwory wysp trzustkowych, głównie guzy typu *gastrinoma* i *insulinoma* (u 10-40% chorych) oraz guzy przysadki u 5-20% badanych. Mutacje genu *MEN1* charakteryzują się wysoką penetracją – u ponad 90% pacjentów w 5 dekadzie życia występuje większość głównych objawów[32].

W tkance guzów nowotworów występujących w przebiegu zespołu MEN1 w *locus* MEN1 obserwowana jest utrata heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*, LOH), co wskazuje na supresorowy charakter genu meniny. Mutacje genu *MEN1* obserwowane są także w guzach neuroendokrynych nie związanych z zespołem Wermera [31].

Dotychczas opisano blisko 650 mutacji genu *MEN1*, z których 80% powoduje przedwczesną terminację translacji meniny [16]. Nie zaobserwowano gorących miejsc występowania mutacji, ani korelacji między genotypem a fenotypem. U 5-10% chorych z

objawami charakterystycznymi dla zespołu MEN1, nie znaleziono żadnych zmian w sekwencji genu *MEN1*, natomiast u części z nich zidentyfikowano mutacje w genie *CDKN1B* (12p13.1, OMIM: 600778) i opisano jako zespół MEN4 (OMIM: 610755) [Thakker, 33, 34].

Ze względu na różnorodność obrazu klinicznego, pojawianie się poszczególnych patologii w układzie dokrewnym i w innych tkankach w różnym czasie, wczesne rozpoznanie zespołu MEN1 pozostaje trudne, zwłaszcza, że najczęściej pierwsze objawy kliniczne związane są z produktami sekrecji guzów hormonalnie czynnych, a nie z miejscem rozpoczęcia procesu nowotworowego. Ponadto u 10% pacjentów występują mutacje *de novo*. Guzy neuroendokrynne w zespole MEN1 wydzielają mogą m.in. gastrynę, insulinę, prolaktynę, parathormon (PTH), hormon wzrostu, glukagon i hormon adrenokortykotropowy (ACTH) [35]. U 90% chorych z zespołem MEN1 występują naczynekowłókniaki twarzy, będące także cechą charakterystyczną dla stwardnienia guzowego (TSC), jednak w przebiegu zespołu Wermera występują mniej licznie i są mniejsze od tych związanych z TSC, a ich umiejscowienie ograniczone jest do okolic górnej wargi. U 70% chorych z zespołem MEN1 obserwuje się także włókniaki kolagenowe. Zmiany te mogą być subtelne, a diagnoza może wymagać konsultacji dermatologicznej i biopsji. Rzadziej u chorych obecne są inne nowotwory: guzy neuroendokrynne przewodu pokarmowego, tłuszczaki, gruczolaki kory nadnerczy (20-40% pacjentów), gruczolaki tarczycy (do 25%), naczynekomięśniakotłuszczaki nerek, mięśniaki macicy i wyściółczaki rdzenia kręgowego. Z wyjątkiem guzów neuroendokrynnych trzustki takich jak gastrinoma czy insulinoma, większość nowotworów wykazuje zdolności do przerzutowania, jednak ze względu na aktywność wydzielniczą powoduje objawy kliniczne [32, 34].

Ostatnie badania wykazały, że heterogenność w zakresie występujących objawów pomiędzy członkami jednej rodziny może być związana z dodatkowymi modyfikującymi czynnikami genetycznymi [36].

Dokładny wywiad rodzinny oraz długoterminowa obserwacja chorych, u których wystąpiła pierwotna nadczynność przytarczyc guzy przysadki czy guzy neuroendokrynne układu pokarmowego może przybliżyć ustalenie rozpoznania. Kluczowe jest także badanie genetyczne pod kątem występowania mutacji w genie *MEN1*, które pozwala na jednoznaczny identyfikację osób z grupy ryzyka i objęcie ich opieką medyczną ze szczególnym uwzględnieniem wczesnego leczenia chirurgicznego nowotworów zagrażających życiu – zwłaszcza neuroendokrynnych guzów trzustki (P-NET) [35, 37].

Triada Carney'a i zespół Carney'a-Stratakisa

Triada Carney'a, (ang. *Carney Triad*, CT, OMIM: 604287) opisana została po raz pierwszy w 1977 roku. Jest rzadkim zespołem predyspozycji do współwystępowania mnogich nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego (GIST, ang. *gastrointestinal stromal tumors*), przyzwojaków (PGL, ang. *paraganglioma*) i chrząstniaków płucnych (PCH, ang. *pulmonary chondroma*). U chorych opisano też występowanie szeregu innych zmian, w tym guzów chromochłonnych, mięśniaków przełyku i gruczolaków kory nadnerczy. Triada Carney'a jest uznawana za nową formę zespołu mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej (MEN). Zespół ten występuje znacznie częściej u kobiet i nie określono dotychczas jednoznacznie jego podłoża genetycznego [38, 39].

U osób ze sporadycznymi oraz rodzinnie występującymi rdzeniakami identyfikowane są germinalne mutacje inaktywujące w genach z rodziny SDH, kodujących podjednostki dehydrogenazy bursztynianowej: *SDHB* (1p36.13, OMIM: 185470), *SDHC* (1q23.3, OMIM: 602413) i *SDHD* (11q23.1, OMIM: 602690). Z kolei mutacje aktywujące onkogeny *KIT* i *PDGFRA* wykrywane są często u osób ze sporadycznymi i dziedzicznymi nowotworami typu GIST [40]. U pacjentów z triadą Carney'a nie znaleziono germinalnych mutacji w żadnym z powyższych genów, natomiast badania z zastosowaniem metody CGH (porównawcza hybrydyzacja genomów, ang. *comparative genomic hybridization*) wykazały obecność licznych zmian liczby kopii DNA. Najczęściej identyfikowana była duża delecja regionu centromerowego chromosomu 1 (1pcen13-q21), która obejmowała gen *SDHC*. Kolejną częstą zmianą była utrata całego ramienia krótkiego chromosomu 1. Chociaż guzy GIST wykazywały częściej utratę regionu 1p niż PGL, wzór zmian chromosomowych był podobny w obu przypadkach mimo różnego obrazu histologicznego i innego pochodzenia tkanek objętych procesem nowotworowym [39].

Z kolei współwystępowanie guzów GIST i PGL opisano jako zespół Carney'a-Stratakisa (ang. *Carney-Stratakis syndrome*, CSS, OMIM: 606864), który dziedziczony jest w sposób autosomalny dominujący i związany ściśle z mutacjami inaktywującymi w genach *SDHB*, *SDHC* i *SDHD* [41]. Badania ekspresyjne wykazały że guzy GIST, w których zidentyfikowano mutacje w genie *KIT* wykazują prawidłowy poziom ekspresji genu *SDHB*, podczas gdy guzy *KIT*- i *PDGFRA*-ujemne nie wykazują ekspresji żadnego z genów SDH [42].

Zhang i wsp. porównali guzy podścieliska układu pokarmowego występujące u pacjentów z triadą Carney'a ze sporadycznie występującymi guzami GIST i zaobserwowali kliniczne i histologiczne różnice między nimi. Zauważyli istotnie niższy wiek pacjentów z CT, wielogniskowy charakter guzów, które w obrazie histologicznym wyka-

zywały wyższy indeks mitotyczny, przewagę komórek nabłonkowych oraz znacznie częściej dawały przerzuty do węzłów chłonnych niż u chorych z guzami występującymi sporadycznie [43].

Dokładne rozpoznanie zespołów CT i CSS ma istotne znaczenie kliniczne dla pacjentów z nowotworami podścieliska układu pokarmowego, które są negatywne dla mutacji w genach *KIT* i *PDGFRA* – guzy te są zazwyczaj odporne na leczenie aktualnie dostępnymi inhibitorami kinazy tyrozynowej. U chorych z wrodzonymi przyzwojakami, niezwykle ważny jest wywiad rodzinny w kierunku obecności zmian endokrynologicznych i występowania nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem GIST. Pacjenci z tymi zespołami powinni być poddawani długofalowej obserwacji klinicznej [42].

PIŚMIENNICTWO:

1. Baas AF, Gabbett M, Rimac M, Kansikas M, Raphael M, Nievelstein RA, Nicholls W, Offerhaus J, Bodmer D, Wernstedt A, Krabichler B, Strasser U, Nyström M, Zschocke J, Robertson SP, van Haelst MM, Wimmer K. Agenesis of the corpus callosum and gray matter heterotopia in three patients with constitutional mismatch repair deficiency syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2013 Jan;21(1):55-61.
2. Ostergaard JR, Sunde L, Okkels H. Neurofibromatosis von Recklinghausen type I phenotype and early onset of cancers in siblings compound heterozygous for mutations in *MSH6*. *Am J Med Genet A.* 2005 Dec 1;139A(2):96-105
3. Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet.* 2008 Sep;124(2):105-22.
4. Wimmer K, Kratz CP, Vasen HF, Caron O, Colas C, Entz-Werle N, Gerdes AM, Goldberg Y, Ilencikova D, Muleris M, Duval A, Lavoine N, Ruiz-Ponte C, Slavic I, Burkhardt B, Brugieres L; EU-Consortium Care for CMMRD (C4CMMRD). Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD). *J Med Genet.* 2014 Jun;51(6):355-65
5. Ganster C, Wernstedt A, Kehrer-Sawatzki H, Messiaen L, Schmidt K, Rahner N, Heinemann K, Fonatsch C, Zschocke J, Wimmer K. Functional *PMS2* hybrid alleles containing a pseudogene-specific missense variant trace back to a single ancient intrachromosomal recombination event. *Hum Mutat* 2010;31:552–60.;
6. van der Klift HM, Tops CM, Bik EC, Boogaard MW, Borgstein AM, Hansson KB, Ausems MG, Gomez Garcia E, Green A, Hes FJ, Izatt L, van Hest LP, Alonso AM, Vriends AH, Wagner A, van Zelst-Stams WA, Vasen HF, Morreau H, Devilee P, Wijnen JT. Quantification of sequence exchange events between *PMS2* and *PMS2CL* provides a basis for improved mutation scanning of Lynch syndrome patients. *Hum Mutat* 2010;31:578–87.;
7. Wernstedt A, Valtorta E, Armelao F, Togni R, Girlando S, Baudis M, Heinemann K, Messiaen L, Staehli N, Zschocke J, Marra G, Wimmer K. Improved multiplex ligation-dependent probe amplification analysis identifies a deleterious *PMS2* allele generated by recombination with crossover between *PMS2* and *PMS2CL*. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:819–31.
8. Kimonis VE, Singh KE, Zhong R, Pastakia B, Digiovanna JJ, Bale SJ. Clinical and radiological features in young individuals with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Genet Med.* 2013 Jan;15(1):79-83.
9. Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:32.
10. Gorlin RJ: Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin* 1995, 13:113-125;
11. Pruvost-Balland C, Gorry P, Boutet N, Magnaldo T, Mamelle G, Margulis A, Kolb F, Duvillard P, Spatz A, Brugières L, Chompret A, Avril MF. Clinical and genetic study in 22 patients with basal cell nevus syndrome. *Ann Dermatol Venereol* 2006, 133:117-123.
12. Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA: Complications of the nevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet* 1993, 30:460-464.

13. Kimonis VE, Mehta SG, Digiovanna JJ, Bale SJ, Pastakia B. Radiological Features in 82 patients with nevoid basal cell carcinoma (NBCC or Gorlin) syndrome. *Genet Med* 2004; 6:495–502.
14. Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome. *Genet Med* 2004;6:530–539.
15. Veenstra-Knol HE, Scheewe JH, van der Vlist GJ, van Doorn ME, Ausems MG. Early recognition of basal cell naevus syndrome. *Eur J Pediatr* 2005;164:126–130.
16. HGMD® Professional 2015.3; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>
17. Amlashi SF, Riffaud L, Brassier G, Morandi X: Nevoid basal cell carcinoma syndrome: relation with desmoplastic medulloblastoma in infancy. A population-based study and review of the literature. *Cancer* 2003, 98:618-624.
18. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, Uden AB: Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* 2006, 208:17-25.
19. Fan Z, Li J, Du J, Zhang H, Shen Y, Wang CY, Wang S. A missense mutation in *PTCH2* underlies dominantly inherited NBCCS in a Chinese family. *J Med Genet*. 2008 May;45(5):303-8.
20. K. Osmola, M.T. Nowaczyk, A. Osmola, M. Bowszyc-Dmochowska. Nawracające torbiele żuchwy w zespole nabłoniaków znamionowych *Nowiny Lekarskie* 2006, 75, 1, 65–69.
21. Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocchi S, Proytcheva M, German J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*. 1995 Nov 17;83(4):655-66.
22. Babbe H, McMenamin J, Hobeika E, Wang J, Rodig SJ, Reth M, Leder P. Genomic instability resulting from BLM deficiency compromises development, maintenance, and function of the B cell lineage. *J Immunol*. 2009 Jan 1;182(1):347-60.
23. de Voer RM, Hahn MM, Mensenkamp AR, Hoischen A, Gilissen C, Henkes A, Spruijt L, van Zest-Stams WA, Marleen Kets C, Verwiel ET, Nagtegaal ID, Schackert HK, van Kessel AG, Hoogerbrugge N, Ligtenberg MJ, Kuiper RP. Deleterious Germline BLM Mutations and the Risk for Early-onset Colorectal Cancer. *Sci Rep*. 2015 Sep 11;5:14060.
24. Amor-Gu ret M. Bloom's syndrome. *Orphanet Encyclopedia*. Feb. 2004. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Bloomsyndrome.pdf>
25. Gruber SB, Ellis NA, Scott KK, Almog R, Kolachana P, Bonner JD, Kirchhoff T, Tomsho LP, Nafa K, Pierce H, Low M, Satagopan J, Rennert H, Huang H, Greenson JK, Groden J, Rapaport B, Shia J, Johnson S, Gregersen PK, Harris CC, Boyd J, Rennert G, Offit K. BLM heterozygosity and the risk of colorectal cancer. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2013.
26. Cleary SP, Zhang W, Di Nicola N, Aronson M, Aube J, Steinman A, Haddad R, Redston M, Gallinger S, Narod SA, Gryfe R. Heterozygosity for the BLM(Ash) mutation and cancer risk. *Cancer Res*. 2003 Apr 15;63(8):1769-71.
27. Suspitsin EN, Yanus GA, Sokolenko AP, Yatsuk OS, Zaitseva OA, Bessonov AA, Ivantsov AO, Heinstein VA, Klimashevskiy VF, Togo AV, Imyanitov EN. Development of breast tumors in CHEK2, NBN/NBS1 and BLM mutation carriers does not commonly involve somatic inactivation of the wild-type allele. *Med Oncol*. 2014 Feb;31(2):828.;
28. Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, Rowley SM, Choong DY, Tothill RW, Thorne H; kConFab, Barnes DR, Li J, Ellul J, Philip GK, Antill YC, James PA, Trainer AH, Mitchell G, Campbell IG. Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes FANCC and BLM as potential breast cancer susceptibility alleles. *PLoS Genet*. 2012 Sep;8(9):e1002894.
29. Goss KH, Risinger MA, Kordich JJ, Sanz MM, Straughen JE, Slovek LE, Capobianco AJ, German J, Boivin GP, Groden J. Enhanced tumor formation in mice heterozygous for BLM mutation. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2051-3.;
29. McDaniel LD, Chester N, Watson M, Borowsky AD, Leder P, Schultz RA. Chromosome instability and tumor predisposition inversely correlate with BLM protein levels. *DNA Repair (Amst)*. 2003 Dec 9;2(12):1387-404.
30. Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, Heppner C, Emmert-Buck MR, Skarulis MC, Doppman JL, Kim YS, Lubensky IA, Zhuang Z, Green JS, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Liotta LA, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Hum Mol Genet*. 1997 Jul;6(7):1169-75.
31. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinol* 2014, 386: 2-15
32. Tonelli F, Giudici F, Giusti F, Marini F, Cianferotti L, Nesi G, Brandi ML. A heterozygous frameshift mutation in exon 1 of CDKN1B gene in a patient affected by MEN4 syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2014 Aug;171(2):K7-K17.
33. Marini F, Giusti F, Brandi ML. Genetic test in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: An evolving story. *World J Exp Med*. 2015 May 20;5(2):124-9.

34. Lemos, M. C. and Thakker, R. V. (2008), Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum. Mutat.*, 29: 22–32.
35. Thevenon J, Bourredjem A, Faivre L, Bauters C, Calender A, Lebras M, Giraud S, Niccoli P, Odou MF, Borson-Chazot F, Barlier A, Lombard-Bohas C, Clauser E, Tabarin A, Pasmant E, Chabre O, Castermans E, Ruzniewski P, Bertherat J, Delemer B, Christin-Maitre S, Beckers A, Guilhem I, Rohmer V, Goichot B, Caron P, Baudin E, Chanson P, Groussin L, Du Boullay H, Weryha G, Lecomte P, Schillo F, Bihan H, Archambeaud F, Kerlan V, Bourcigaux N, Kuhn JM, Vergès B, Rodier M, Renard M, Sadoul JL, Binquet C, Goudet P. Unravelling the intra-familial correlations and heritability of tumor types in MEN1, a GTE study. *Eur J Endocrinol.* 2015 Sep 21. pii: EJE-15-0691. [Epub ahead of print];
36. Norton JA, Krampitz G, Jensen RT. Multiple Endocrine Neoplasia: Genetics and Clinical Management. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015 Oct;24(4):795-832.
37. Byrne CM, Daneshjoo R, Ma-Wyatt J, Cox M. Gastrointestinal haemorrhage as a presentation of Carney's triad. *ANZ J Surg.* 2007 Jan-Feb;77(1-2):88-90.
38. Stratakis CA, Carney JA. The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney–Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *Journal of internal medicine.* 2009;266(1):43-52.
39. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 2003 Jan 31;299(5607):708-10.
40. Pasini B, McWhinney SR, Bei T, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Muchow M, Boikos SA, Ferrando B, Pacak K, Assie G, Baudin E, Chompret A, Ellison JW, Briere JJ, Rustin P, Gimenez-Roqueplo AP, Eng C, Carney JA, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet.* 2008 Jan;16(1):79-88.
41. Janeway KA, Kim SY, Lodish M, Nosé V, Rustin P, Gaal J, Dahia PL, Liegl B, Ball ER, Raygada M, Lai AH, Kelly L, Hornick JL; NIH Pediatric and Wild-Type GIST Clinic, O'Sullivan M, de Krijger RR, Dinjens WN, Demetri GD, Antonescu CR, Fletcher JA, Helman L, Stratakis CA. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 4;108(1):314-8.
42. Zhang L, Smyrk TC, Young WF, Stratakis CA, Carney JA. Gastric Stromal Tumors in Carney Triad Are Different Clinically, Pathologically, and Behaviorally From Sporadic Gastric Gastrointestinal Stromal Tumors: Findings in 104 Cases. *The American journal of surgical pathology.* 2010;34(1):53-64.



Zespół ataksji-telangiektazji

Ataxia–telangiectasia syndrome

Streszczenie

Zespół ataksji-telangiektazji jest rzadką chorobą neurodegeneracyjną, o złym rokowaniu. Śmierć następuje zwykle około 20 - 30 roku życia. Główne objawy kliniczne ataksji-telangiektazji to postępująca ataksja mózdkowa, telangiektazje w obrębie gałki ocznej i skóry, upośledzenie mowy oraz oczopląs. Początkowe objawy pojawiają się około pierwszego roku życia, kiedy dziecko zaczyna chodzić. Ataksja-telangiektazja jest chorobą genetyczną, dziedziczną w sposób autosomalno-recesywny, warunkowaną mutacjami prowadzącymi do utraty funkcjonalności obu alleli genu *ATM*, położonego na chromosomie 11 (11q22.3). Gen obejmuje 184 000 par zasad, zawiera 66 eksonów i koduje białko o masie 350 kDa, pełniące funkcję kinazy serynowo-treoninowej. ATM uruchamia szereg procesów związanych z odpowiedzią komórki na uszkodzenia obu nici DNA.

Summary

Ataxia-telangiectasia is a rare neurodegenerative disease with a poor prognosis. Death usually occurs between 20 and 30 years of age. The main clinical symptoms of ataxia-telangiectasia are progressive cerebellar ataxia, ocular and skin telangiectasia, impaired speech, and nystagmus. The initial symptoms appear around the first year of life, when the child begins to walk. Ataxia telangiectasia is a genetic disease, inherited in an autosomal-recessive manner. It is conditioned by mutations in the *ATM* gene, located on chromosome 11 (11q22.3). The *ATM* gene mutations lead to the loss of function of both alleles. The gene encompasses 184 000 bp, contains 66 exons, and encodes a 350 kDa protein, acting as a serine-threonine kinase. ATM runs a number of processes associated with cell response to double-stranded DNA damages.

Ataksja-telangiectazja (MIM #208900, ang. ataxia telangiectasia AT) jest rzadką chorobą neurodegeneracyjną, charakteryzującą się postępującą ataksją mózdkową. AT występuje z częstością od 1 : 40 000 do 1 : 100 000 żywych urodzeń, a jej sposób dziedziczenia jest autosomalny recesywny [1-3]. Nie obserwuje się różnicy w częstości występowania choroby pomiędzy płciami. Początkowe objawy pojawiają się około pierwszego roku życia, kiedy dziecko zaczyna chodzić. Ataksja telangiectazja jest chorobą nieuleczalną, a śmierć następuje zwykle około 20 - 30 roku życia. Najczęstszymi powodami zgonu są zapalenia płuc lub choroba nowotworowa układu limforetikularnego. Za warunkowanie choroby odpowiedzialne są mutacje w genie *ATM* (ang. *ataxia-telangiectasia mutated*) [4]. Ataksję telangiectazję opisano po raz pierwszy w roku 1926 na podstawie przypadku rodzeństwa z postępującą choreoatetozą i telangiectazją gałki ocznej [5]. Następnie, Luis-Bar opisał przypadek dziewięcioletniej dziewczynki z postępującą ataksją mózdkową, Telangiectazją gałki ocznej i opóźnieniem umysłowym [6]. Ataksja telangiectazja w związku z tym opisem jest też nazywana zespołem Luis-Bar. Dopiero w 1958 roku Boder i Sedgwick wprowadzili określenie Ataksja Telangiectazja. Scharakteryzowali oni rodzinne występowanie choroby oraz podatność chorych na infekcje płucne [7].

Głównymi objawami klinicznymi AT są: postępująca ataksja mózdkowa, telangiectazje (poszerzone naczynia krwionośne) w obrębie gałki ocznej i skóry, upośledzenie mowy (dysartria) oraz oczopląs. Zaburzenia mózdkowe następują poprzez postępujący zanik włókien Purkinjego, a także w mniejszym stopniu, komórek ziarnistych i koszykowych w mózdku. U 90% chorych z AT występują zmiany o charakterze miopatii i/lub polineuropatii aksonalno-demielinizacyjnej, które prowadzą do osłabienia lub zniesienia odruchów głębokich, zwłaszcza w kończynach dolnych, niedowładów wiotkich i zaników mięśni. Przed trzecim rokiem życia u chorych obserwuje się występowanie tułowiowego bezładu (chaotycznych ruchów, ang. *truncal ataxia*), ruchów choreoatetotycznych i mio-klonii [7, 8]. Twarz staje się maskowata, dziecko robi wrażenie smutnego, zapłakanego i upośledzonego umysłowo. Jednak niedorozwój umysłowy nie jest cechą typową dla AT. Typowe objawy u chorych na ataksje telangiectazją w obrębie gałek ocznych to apraksja gałkoruchowa (tzw. objaw Cogana), trudności w odwodzeniu gałek do boków, zez i okresowy oczopląs spojrzeniowy. Objawy oczne u niemowląt mogą być czasem niezauważone [9]. Postępujący charakter choroby prowadzi do degradacji neurologicznej, co w konsekwencji powoduje utratę zdolności do samodzielnego poruszania się. Związane jest to ze zwolnieniem refleksu połączonym z częstymi upadkami, co wywołuje uszkodzenia ciała. Z reguły w wieku pokwitania chorzy nie mogą samodzielnie się poruszać. Telan-

gięktazje pojawiają się zwykle około 3–6 roku życia. Opisano przypadki wcześniejszego ich wystąpienia nawet w wieku niemowlęcym, jak również przypadki z AT, u których telangięktazje nie występują. Uwidaczniają się głównie na spojówkach gałek ocznych i małżowinach usznych, niekiedy występują na twarzy, nosie, na grzbietach rąk i stóp, w zgięciach łokciowych i podkolanowych. Z wiekiem telangięktazje na spojówkach są tak bardzo widoczne, że mogą być mylone z zapaleniem spojówki. Krwawienia z rozszerzonych naczyń krwionośnych u chorych z AT obserwuje się niezwykle rzadko [8].

Niedobór odporności prowadzi do występowania u chorych, obok objawów neurologicznych i telangięktazji, także przewlekłych infekcji między innymi układu oddechowego [10, 11]. Powtarzające się infekcje zatokowo-płucne występują nawet u około 80% pacjentów. Zapalenie płuc i oskrzeli stwierdza się u 67%, a przewlekłe zapalenie zatok u 1/3 chorych. Częste infekcje spowodowane są zaburzeniami układu odpornościowego. U ok. 80% chorych stwierdza się niedobór IgA, a 25% chorych ma niedobór IgG i/lub podklas IgG i wymaga substytucji immunoglobulinami. Obserwuje się zmniejszoną liczbę limfocytów T, co zwykle związane jest ze słabo rozwiniętą, niedojrzałą grasicą. Większość pacjentów produkuje przeciwciała w odpowiedzi na obce antygeny, ale część tych odpowiedzi może być upośledzona, szczególnie te skierowane przeciwko dużym cząsteczkom cukrów (lipopolisacharydom) znajdującym się na powierzchni bakterii powodujących zakażenia układu oddechowego. Prawie u wszystkich chorych z A-T stwierdza się podwyższone stężenie AFP, jest to badanie nieswoiste dla tej choroby, ale bardzo pomocne w postawieniu rozpoznania. Obserwowane jest również około 100-krotnie podwyższone ryzyko występowania chorób nowotworowych, najczęściej chłoniaków i białaczek. W populacji polskiej scharakteryzowano klinicznie liczną grupę 78 chorych z Rejestru Wrodzonych Niedoborów Odporności w Klinice Immunologii Instytutu Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka. Chorzy pochodzili z centralnej i wschodniej Polski. U polskich chorych średni wiek rozpoznania AT wynosił 7,3 lat. Ataksja mózdkowa występowała u wszystkich dzieci rozpoznawana była średnio w wieku 2,5 lat. Najwcześniej ataksja pojawiła się w wieku 10 miesięcy a najpóźniej w wieku 10 lat. U polskich chorych obserwowano dużą heterogenność pod względem wieku i zakresu występowania objawów, nie tylko ataksji, ale także telangięktazji na spojówkach, co zgodne jest z obserwacjami innych grup chorych [12]. U polskich chorych nawracające zakażenia układu oddechowego występowały w 80% przypadkach. Przyczyną zakażeń były bakterie i wirusy, w tym najczęściej *Streptococcus pneumoniae*. U chorych obserwowano objawy przedwczesnego starzenia się. Rozwój umysłowy mieścił się w normie, a znaczne upo-

śledzenie stwierdzono tylko u 3% chorych. W scharakteryzowanej grupie stwierdzono niedobór IgA (55%), IgG (23%), IgE (55%) [12].

Według zaleceń Europejskiego Towarzystwa Niedoborów Odporności (ang. *European Society for Immunodeficiencies*, ESID) z 2000 roku, rozpoznanie ataksji telangiektazji można sklasyfikować, jako pewne, prawdopodobne i możliwe. Rozpoznanie jest pewne, gdy u pacjenta płci męskiej lub żeńskiej stwierdzi się występowanie postępującej ataksji mózdkowej lub nadmierną łamliwość chromosomów pod wpływem promieniowania jonizującego oraz potwierdzi się obecność mutacji w obu allelach genu *ATM*.

Natomiast rozpoznanie jest prawdopodobne przy stwierdzeniu u pacjenta płci męskiej lub żeńskiej występowania postępującej ataksji mózdkowej i trzech z czterech poniższych objawów:

1. Telangiektazja na spojówkach i/lub twarzy
2. Stężenie IgA w surowicy poniżej 2SD dla wieku
3. Stężenie AFP w surowicy powyżej 2SD dla wieku
4. Zwiększona łamliwość chromosomów pod wpływem promieniowania jonizującego.

cego.

Rozpoznanie możliwe ma miejsce, gdy zostaną spełnione następujące warunki. Stwierdzi się u pacjenta płci męskiej lub żeńskiej występowanie postępującej ataksji mózdkowej i jednego z poniższych objawów:

1. Telangiektazja na spojówkach i/lub twarzy
2. Stężenie IgA w surowicy poniżej 2SD dla wieku
3. Stężenie AFP w surowicy powyżej 2SD dla wieku
4. Zwiększona łamliwość chromosomów pod wpływem promieniowania jonizującego.

cego.

Budowa i funkcje genu *ATM*

Gen *ATM* (ang. *ataxia-telangiectasia mutated*) zidentyfikowano w 1995 roku. Jest on zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 11 (11q22.3), obejmuje 184 000 par zasad i zawiera liczne sekwencje LINE i SINE (w tym elementy Alu) [4]. Składa się z 66 eksonów, w większości o długości od 100 do 200 nukleotydów, przy czym największy zawiera 3800 pz, z czego 3600 pz to sekwencja 3'UTR. Kodon start znajduje się w eksonie 4 [13]. Gen posiada dwa alternatywne eksony 1a i 1b. Transkrypt obejmuje 9200 pz sekwencji kodującej. Ekspresja genu zachodzi we wszystkich tkankach, niezależnie od fazy rozwoju. Białko *ATM* posiada lokalizację jądrową. U większości pacjentów utrata

całkowitej funkcji białka ATM spowodowana jest występowaniem dwóch różnych mutacji w genie. Białko ATM składa się z 3056 aminokwasów i ma masę 350 kDa. Na końcu karboksylowym białka, pomiędzy aminokwasami 2865–2900, znajduje się domena kinazowa, jak i konserwatywny region FATC (2138–3056 aminokwas). W części aminowej znajduje się bardzo ważny region, który uczestniczy w interakcji białka ATM z jego substratami. Między 1216 a 1241 aminokwasem znajduje się motyw zamka leucynowego (ang. leucine zipper, LZ). Motyw LZ posiada strukturę α -helikalną, w której co siódmą resztą aminokwasową jest leucyna. Motyw leucynowego zamka w ATM ma nietypową strukturę, zawiera prolinę pomiędzy trzecią a czwartą leucyną. Prolina zakłóca helikalną strukturę białka [14]. Białko ATM jest kinazą serynowo-treoninową (EC 2.7.11.1) i należy do rodziny kinaz fosfatydylo-3-inozytolu (ang. phosphoinositide 3-kinase related kinase – PIKK). Do tej rodziny białek należy również białko docelowe dla rapamycyny (mTOR), kinaza białkowa zależna od DNA (DNA-dependent protein kinase – DNA-PK) i ATR (ATM and Rad3-related) [15]. Białko ATM, podobnie jak inne białka z rodziny kinaz fosfatydyloinozytolu, fosforyluje serynę lub treoninę. Fosforylacja zachodzi w białkach docelowych tylko w przypadku wystąpienia przed seryną lub treoniną glutaminy [16]. Wiele z białek z rodziny kinaz fosfatydylo-3-inozytolu bierze udział w naprawie DNA poprzez niehomologiczne łączenie końców pękniętych nici. Na przykład, białko ATR, podobne do ATM, w większości jest aktywowane przez sygnały pochodzący z DNA uszkodzonego w wyniku promieniowania UV lub wyniku zatrzymania widełek replikacyjnych. Pomimo podobieństwa substratowego białek ATM i ATR są one jednak specyficzne dla poszczególnych czynników genotoksycznych [17, 18].

Białko ATM jest jednym z głównych mediatorów odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. DNA damage response DDR). Odgrywa istotną rolę w odpowiedzi na przerwania obu nici DNA (ang. double-strand breaks DBSs). Takie podwójnoniciowe uszkodzenia DNA mogą być wywoływane przez promieniowanie jonizujące, związki radiomimetyczne, aktywne formy tlenu oraz w wyniku zatrzymania widełek replikacyjnych. Przerwania obu nici DNA występują także w czasie normalnego funkcjonowania komórki, na przykład podczas rekombinacji mejozy czy przegrupowań V(D)J w czasie dojrzewania limfocytów [19, 20]. Komórki radzą sobie z przerwaniami nici DNA na dwa sposoby. Jednym z nich jest prowadzące do wielu błędów niehomologiczne łączenie łańcuchów DNA. Proces ten zachodzić może w czasie całego cyklu komórkowego. Kolejny sposób to system naprawy o wysokiej specyficzności, który oparty jest na rekombinacji chromatyd siostrzanych. Proces ten zachodzi w późnej fazie S i fazie G2 cyklu komórkowego [21]. Odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA zaczyna się znacznie wcześniej

niż sama naprawa DNA. Pojawienie się w komórce pięknice nici DNA uruchamia natychmiast sieć sygnałową związaną z wieloma komórkowymi systemami naprawy. Aktywacji ulegają punkty kontrolne cyklu komórkowego. Prowadzi to do zatrzymania zmiany fazy cyklu komórkowego do czasu zlokalizowania uszkodzeń i naprawy DNA lub ewentualnie „podjęcia” przez komórkę decyzji o dalszym losie w przypadku, gdy taka naprawa jest nie możliwa [22]. Nagłe zatrzymanie cyklu komórkowego niesie konsekwencje dla wielu procesów komórkowych. Zmianie ulega profil ekspresji genów, co jest jednoznaczne ze zmianami w syntezie, degradacji i redystrybucji białek. Dla prawidłowego przebiegu tych procesów bardzo ważne jest, aby sygnał o uszkodzeniu DNA był szybko i precyzyjnie przekazany do wielu szlaków kontrolnych i regulacyjnych w komórce [19, 22]. W komórkach występuje swoisty „detektor” dwuniciowych uszkodzeń DNA złożony z trzech białek MRE11, Rad50 i NBS1 (tzw. MRN). W skład kompleksu wchodzi nukleaza MRE1, białko strukturalne chromosomów RAD50 oraz białko NBS1. Białka przemieszczają się do miejsca uszkodzenia DNA, na końce przerwanych nici. Stanowi to inicjację procesu odpowiedzi komórki na pęknięcia DNA. Zaktywowany kompleks MRN inicjuje gromadzenie się kolejnych czynników odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA [23]. Pierwszym białkiem, które ulega aktywacji pod wpływem tego kompleksu jest białko ATM. ATM przechodzi z dimeru do formy monomeru, ulega acetylacji i jest aktywowane przez autofosforylację seryny w pozycji 1981 [24]. W acetylacji białka ATM uczestniczy acetylaza TIP60. Tymczasem z fosforylacją i defosforylacją białka ATM związane są odpowiednio fosfataza PP2A i fosfataza serynowo-treoninowa PP5 [25-27]. Białko ATM, w przypadku uszkodzenia DNA, fosforyluje serynę w pozycji 139 histonów H2AX, co zwiększa aktywność czynników naprawczych i dalsze aktywowanie oraz przyciąganie do miejsca pęknięcia białka ATM [18, 28]. Fosforylacji podlega białko NBS1 powodując wzrost aktywności kompleksu MRN w aktywowaniu białka ATM. Kinaza ATM po zaktywowaniu fosforyluje cały szereg białek, tym samym inicjując wiele systemów kontroli funkcjonowania komórki [29]. Jednym z białek fosforylowanych przez białko ATM jest białko TP53. W przypadku występowania uszkodzeń DNA w TP53 fosforylacji ulega seryna w pozycji 15. Znaczny wzrost szybkości fosforylowania obserwuje się po uszkodzeniach spowodowanych tylko przez promieniowanie jonizujące, nie obserwuje się wzrostu fosforylacji przy promieniowaniu ultrafioletowym [30, 31]. Białko TP53 jest czynnikiem transkrypcji odpowiedzialnym za aktywację genów, które blokują cykl komórkowy, indukują apoptozę i zmieniają metabolizm komórki. Białko TP53 może indukować apoptozę w sposób niewymagający transkrypcji jakichkolwiek genów [32]. ATM oddziałuje również na białko MDM2. Białko to, w warunkach

fizjologicznych, inaktywuje białko TP53 [33]. Białko TP53 jest chronione przed degradacją przez białko COP1. Po fosforylacji seryny 387 białka COP1 uwalnia ono białko TP53 z kompleksu i przechodzi do cytoplazmy gdzie ulega degradacji [34].

Aktywacja białka BRCA1 również odbywa się z udziałem kinazy ATM, dodatkowo, białko ATM tworzy kompleks z białkiem BRCA1[35]. W skład tego kompleksu zwanego BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex) wchodzi cały szereg różnych białek, do których należą między innymi białka BLM, MSH2, MSH6, MLH1, kompleks RMN oraz czynniki replikacji RFC1, RFC2, RFC4. BASC wykrywa nieprawidłowości struktury DNA i jest regulatorem poreplikacyjnej naprawy DNA [36]. Ponadto, oddziaływanie białka ATM z BRCA1 wyjaśnia rolę kinazy ATM w predyspozycji do wystąpienia nowotworu piersi [35]. Radiooporna synteza DNA obserwowana u chorych z ataksją telangiektazją związana jest z utratą przez białko ATM zdolności fosforylowania białka CDC25A. CDC25A ulega degradacji po napromieniowaniu w wyniku fosforylacji przez białka ATM i CHK2 (ang. checkpoint signaling kinase). Jednak, jeśli CDC25A nie zostanie ufosforylowane nie jest degradowane i w konsekwencji powoduje defosforylację białka CDK2. Dlatego u chorych z AT, mimo uszkodzeń DNA przez promieniowanie, nie jest zatrzymana synteza DNA. ATM, CDK2, CHK2 i CDC25A są związane z punktem kontrolnym fazy integralności genomu [37]. Białko ATM może także blokować transkrypcję przez bezpośrednią fosforylację CHK2 [38]. ATM uruchamia w fazie G2 punkt kontrolny cyklu komórkowego indukowany przez uszkodzenia DNA. Kolejnym procesem regulowanym przez ATM jest transkrypcja rybosomalnego DNA przez polimerazę RNA I (Pol I). Zatrzymanie transkrypcji nie jest wywołane w wyniku uszkodzenia DNA, ale jest kontrolowane poprzez aktywność fosforylacyjną białka ATM i białek, NBS1 i MDC1, będących czynnikami naprawy [39].

Mutacje genu *ATM*

Mutacje genu *ATM* mają heterogeny charakter i są rozmieszczone równomiernie w sekwencji genu. Onsrwuje się jednak regiony podwyższonej częstości występowania mutacji. Ponad 90% wszystkich wykrytych mutacji powoduje skrócenie produktu białkowego. Mutacje zmiany sensu nie mają dużego udziału w warunkowaniu choroby. Znaczną liczbę stanowią mutacje prowadzące do nieprawidłowego składania mRNA. Prawie w połowie przypadków, niewłaściwe składanie dotyczy eksonów od 32 do 62 [14]. Rola dużych zmian w genie *ATM* była dość długo marginalizowana. Po zastosowaniu metod pozwalających łatwo wykrywać zmiany obejmujące całe eksony lub nawet ca-

ły gen okazało się, że udział tych zmian w warunkowaniu choroby dotyczy ponad 20% chorych i stanowią one ponad 10% wszystkich wykrytych mutacji [40]. Badanie spektrów mutacji w populacjach Europy i Stanów Zjednoczonych pozwoliło na określenie mutacji występujących z podwyższonymi częstościami. Zmianę c.7630-2A>C obserwowano u 14,5% polskich chorych w badaniach wykonanych w 1998 roku [41]. Według badań z 2014 roku, częstość tej mutacji w naszej populacji to 5%, jednak mutacja ta występuje z podwyższoną częstością w grupach chorych z Niemiec i USA [42]. Również substytucja c.5932G>T występuje w naszej populacji z częstością odpowiednio 10% i 8%, według wyżej wspomnianych badań. Mutacja ta była również wykrywana z podwyższoną częstością w populacjach Niemiec i USA. Heterozygotyczni nosiciele substytucji c.5932G>T są obciążeni podwyższonym ryzykiem wystąpienia raka piersi [43]. Autorzy określili częstość tej mutacji w populacjach Europy Wschodniej. Wśród zdrowych kontroli z populacji mutacja ta była obserwowana u 1 na 2000, natomiast wśród chorych z rakiem piersi u 7 na 3910. Takie mutacje w układzie homozygotycznym, mimo że nie powodują fenotypu AT to obniżenie sprawności mechanizmu naprawy DNA nie może pozostać bez wpływu na zwiększenie ryzyka wystąpienia nowotworów.

PIŚMIENNICTWO

1. Swift, M., et al., *The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States*. Am J Hum Genet, 1986. **39**(5): p. 573-83.
2. Boder, E. and R.P. Sedgwick, *Ataxia-telangiectasia. (Clinical and immunological aspects)*. Psychiatr Neurol Med Psychol Beih, 1970. **13-14**: p. 8-16.
3. Woods, C.G., S.E. Bunday, and A.M. Taylor, *Unusual features in the inheritance of ataxia telangiectasia*. Hum Genet, 1990. **84**(6): p. 555-62.
4. Savitsky, K., et al., *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1749-53.
5. Syllaba, L., Henner, K., *Contribution a l'étude de l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique*. Revue neurologique, 1926. **1**: p. 541-560.
6. Louis-Bar, D., *Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, a disposition naevoide et des troubles cérébelleux*. Confinia Neurologica, 1941. **4**: p. 32-42.
7. Boder, E. and R.P. Sedgwick, *Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection*. Pediatrics, 1958. **21**(4): p. 526-54.
8. Perlman, S., S. Becker-Catania, and R.A. Gatti, *Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment*. Semin Pediatr Neurol, 2003. **10**(3): p. 173-82.
9. Farr, A.K., et al., *Ocular manifestations of ataxia-telangiectasia*. Am J Ophthalmol, 2002. **134**(6): p. 891-6.
10. Shiloh, Y., *ATM: ready, set, go*. Cell Cycle, 2003. **2**(2): p. 116-7.
11. Shiloh, R., et al., *Increased corneal temperature in drug-free male schizophrenia patients*. Eur Neuropsychopharmacol, 2003. **13**(1): p. 49-52.
12. Pietrucha, B., et al., *Ataxia-telangiectasia syndrome: clinical picture and immunological abnormalities*. Neurologia i Neurochirurgia Polska, 1994. **38**(1 (supl. 1)): p. 1-7.
13. Uziel, T., et al., *Genomic Organization of the ATM gene*. Genomics, 1996. **33**(2): p. 317-20.
14. Concannon, P. and R.A. Gatti, *Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia*. Hum Mutat, 1997. **10**(2): p. 100-7.

15. Goodarzi, A.A., W.D. Block, and S.P. Lees-Miller, *The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control*. Prog Cell Cycle Res, 2003. **5**: p. 393-411.
16. Kim, S.T., et al., *Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37538-43.
17. Shechter, D., V. Costanzo, and J. Gautier, *Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 901-8.
18. Helt, C.E., et al., *Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1186-92.
19. Shiloh, Y., *The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(7): p. 402-10.
20. Bassing, C.H. and F.W. Alt, *H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity*. Cell Cycle, 2004. **3**(2): p. 149-53.
21. Wyman, C., D. Ristic, and R. Kanaar, *Homologous recombination-mediated double-strand break repair*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 827-33.
22. Rashi-Elkeles, S., et al., *Parallel induction of ATM-dependent pro- and antiapoptotic signals in response to ionizing radiation in murine lymphoid tissue*. Oncogene, 2006. **25**(10): p. 1584-92.
23. Zhou, J., et al., *The role of NBS1 in the modulation of PIKK family proteins ATM and ATR in the cellular response to DNA damage*. Cancer Lett, 2006. **243**(1): p. 9-15.
24. Sun, Y., et al., *DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(24): p. 8502-9.
25. Jiang, X., et al., *The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15741-6.
26. Goodarzi, A.A., et al., *Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A*. Embo J, 2004. **23**(22): p. 4451-61.
27. Ali, A., et al., *Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation*. Genes Dev, 2004. **18**(3): p. 249-54.
28. Furuta, T., et al., *Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20303-12.
29. Lee, J.H. and T.T. Paull, *ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex*. Science, 2005. **308**(5721): p. 551-4.
30. Banin, S., et al., *Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1674-7.
31. Canman, C.E., et al., *Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1677-9.
32. Vousden, K.H. and D.P. Lane, *p53 in health and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 275-83.
33. Yin, Y., et al., *p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(6): p. 462-7.
34. Dornan, D., et al., *ATM engages autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1 after DNA damage*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1122-6.
35. Cortez, D., et al., *Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1162-6.
36. Wang, Y., et al., *BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures*. Genes Dev, 2000. **14**(8): p. 927-39.
37. Falck, J., et al., *The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis*. Nature, 2001. **410**(6830): p. 842-7.
38. Falck, J., et al., *The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways*. Nat Genet, 2002. **30**(3): p. 290-4.
39. Kruhlak, M., et al., *The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks*. Nature, 2007. **447**(7145): p. 730-4.
40. Cavalieri, S., et al., *Large genomic mutations within the ATM gene detected by MLPA, including a duplication of 41 kb from exon 4 to 20*. Ann Hum Genet, 2008. **72**(Pt 1): p. 10-8.
41. Telatar, M., et al., *Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(1): p. 86-97.
42. Podralska, M.J., et al., *Ten new ATM alterations in Polish patients with ataxia-telangiectasia*. Mol Genet Genomic Med, 2014. **2**(6): p. 504-11.
43. Bogdanova, N., et al., *A nonsense mutation (E1978X) in the ATM gene is associated with breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **118**(1): p. 207-11.

*Marcin Lener, Katarzyna Jaworska-Bieniek, Anna Jakubowska, Grzegorz Sukiennicki,
Wojciech Marciniak, Magdalena Muszyńska, Katarzyna Durda, Katarzyna Kaczmarek,
Jan Lubiński*



Selen w nowotworach.

Selenium (Se) in cancers.

Streszczenie

Wyniki badań prowadzonych w wielu ośrodkach na świecie wykazują bardzo znaczące ochronne działanie selenu przed zachorowaniami na raki o różnej lokalizacji narządowej. Wydaje się, że dla większości osób optymalne stężenie selenu w populacji polskiej wynosi około 90µg/l surowicy. W naszym kraju średnie stężenie selenu w surowicy wynosi około 70 µg/l w związku z czym populacja polska powinna być doselenowana.

Najbardziej właściwym wydaje się selenowanie dobrane do stężenia selenu w surowicy u suplementowanej osoby.

Słowa kluczowe: selen, rak płuca, rak jelita grubego, rak piersi

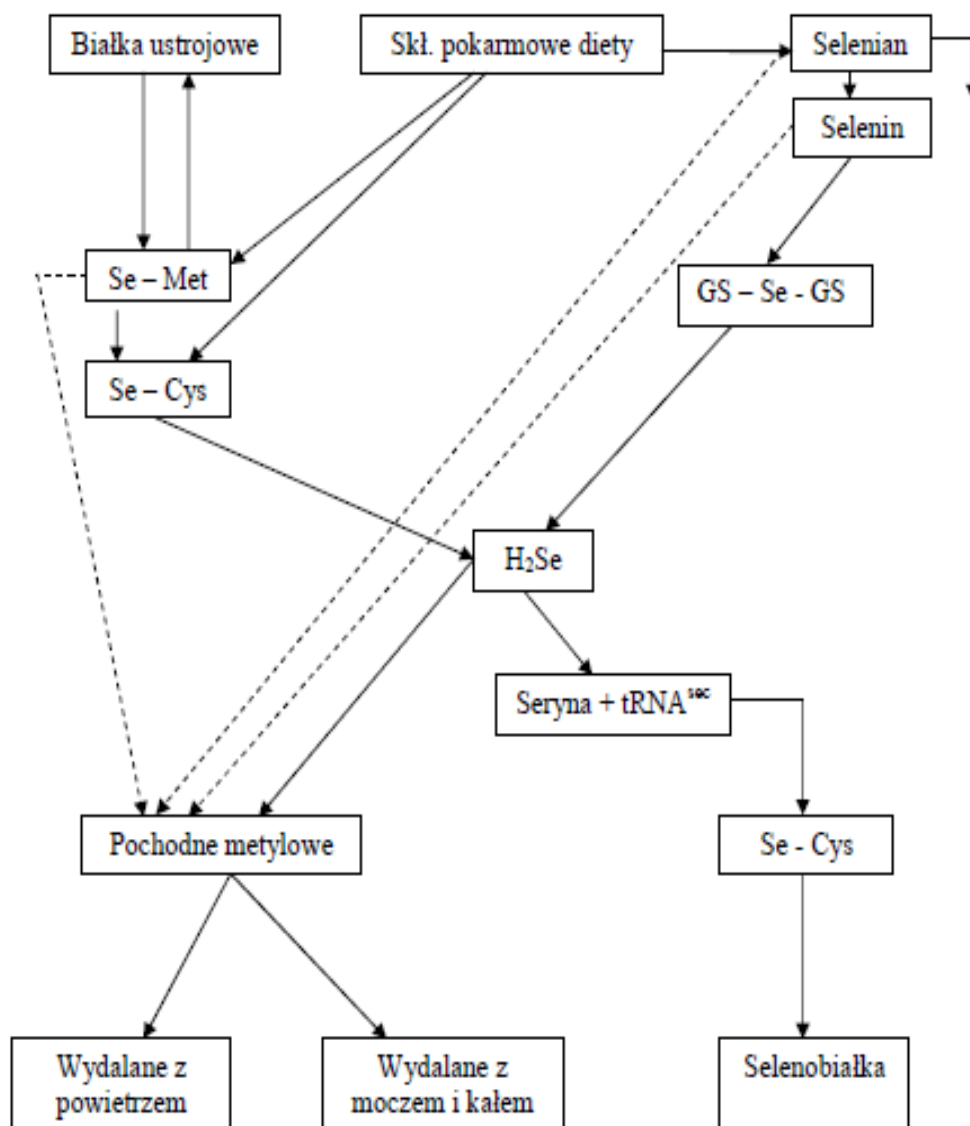
Summary

The results of studies performed in many centers around the world have shown a very significant protective effect of selenium against cancers. The success of supplementation is dependant on achievement of optimal selenium levels in organisms- it can not be neither too low nor too high. It seems that in Poland a level of selenium should be about 90 ug/l of serum. In our country, the average concentration of selenium in serum is ~70ug/l andtherefore our population should be supplemented by selenium.

Key words: selenium, lung cancer, corolectal cancer, breast cancer

Selen należy do mikroelementów niezbędnych do prawidłowego rozwoju i wzrostu organizmu. W organizmie selen działa poprzez białka, do których jest wbudowany w postaci selenocysteiny. Jako składnik selenobiałek selen odgrywa rolę enzymatyczną jak i strukturalną. Pobudza układ immunologiczny do wzrostu produkcji przeciwciał i powoduje zwiększoną aktywność komórek immunologicznych [1]. Badania sugerują, że selen może wpływać na ryzyko zachorowania na nowotwory na dwa sposoby. Jako przeciwutleniacz, selen pomaga chronić organizm przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. Ochronna rola tego pierwiastka przed prooksydantami wynika między innymi z obecności selenu w centrum aktywnym enzymów antyoksydacyjnych. Jednym z najlepiej poznanych białek jest enzym – peroksydaza glutationowa – GPX, którego główną funkcją jest ochrona składników komórkowych (DNA, lipidy) przed uszkadzającym działaniem H_2O_2 i różnych nadtlenków organicznych wytwarzanych w czasie przemian w organizmie [2, 3]. Stwierdzono również, że selen wpływa hamująco na proces proliferacji komórek nowotworowych poprzez oddziaływanie na ekspresję genu supresorowego nowotworzenia - p53 oraz genu supresorowego apoptozy - Bcl-2 [6, 7].

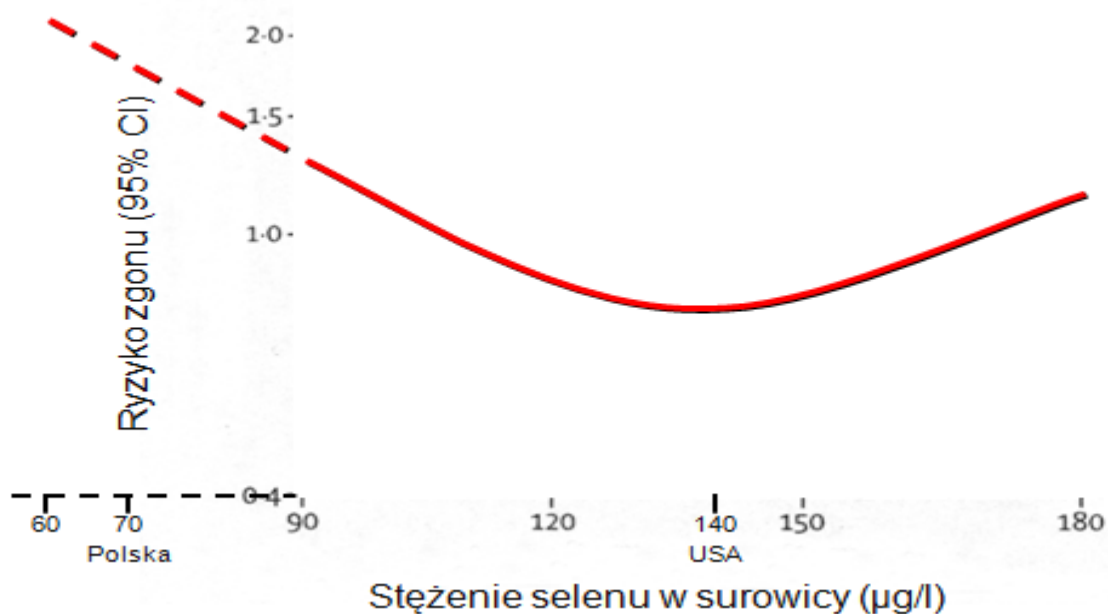
Badania eksperymentalne wykazały, że przyswajalność selenu jest ściśle zależna od chemicznej formy tego pierwiastka, która wpływa na jego wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie w organizmie. Selen, dostarczany do organizmu z żywnością lub suplementami diety, występuje zarówno w formach organicznych jak selenometionina (Se-Met) i selenocysteina (Se-Cys) oraz nieorganicznych - seleniny lub seleniany [4]. W organizmie przemiany organicznych i nieorganicznych form selenu przebiegają odmiennie, jednakże w obu przypadkach głównym końcowym produktem tych przemian są selenowodorki (H_2Se), które są bezpośrednim donorem selenu podczas syntezy selenobiałek. Selenowodorki, jak wspomniano powyżej, są donorem selenu dla aktywnej formy selenocysteiny. Biosynteza tego aminokwasu zachodzi przed jego specyficznym wbudowaniem w strukturę danego selenobiałka przy udziale unikalnego $tRNA^{Sec}$, który łączy się z seryną, do której dobudowywany jest selen pochodzący z selenowodorków. Dopiero w tej formie selen wbudowywany jest do białek. W badaniach nad metabolizmem selenu zaobserwowano ponadto, że jego pochodne metylowe usuwane z ustroju z moczem (w postaci jonu trimetyloselenowego), kałem (jako selenki metali) i wydychanym powietrzem w postaci lotnych form selenu o charakterystycznym zapachu czosnku (dimetyloselenki) [5, 6] (Rys.1)



Ryc.1. Schemat przemian metabolicznych selenu (opracowanie własne na podstawie Jacques, 2001):

Na podstawie powyższych danych o przemianach metabolicznych selenu wydaje się, że do ewentualnej suplementacji mało przydatne są metylowe związki selenu (ze względu na ich wydalanie), jak również selenometionina (ze względu na możliwość niespecyficznego wbudowywania się do białek). Spośród związków selenu formalnie dopuszczonych do stosowania jako suplementy szczególnie wartościowe są związki seleninów.

Selen jest jednym z mikroelementów, który od wielu lat jest przedmiotem zainteresowań naukowców i lekarzy a także pacjentów chorych na choroby nowotworowe. Zaobserwowano, że istnieje ścisła zależność między stężeniem selenu w surowicy a ryzykiem zgonu [7]:



Wyniki badań eksperymentalnych przeprowadzonych na modelach zwierzęcych [8, 9, 10] a także wielu badań analizujących wpływ selenu na organizm człowieka wskazują na związek między stężeniem tego pierwiastka a ryzykiem chorób nowotworowych [11-26]. Zależność pomiędzy stężeniem selenu a nowotworami badano w 49 obserwacjach prospektywnych. Dane z tej metaanalizy wykazały, że przy optymalizowanym stężeniu selenoredukcji o 31% ulega liczba nowych zachorowań na raki (OR 0,69; CI: 0,53-0,91) i o 45 % zmniejszeniu ulega śmiertelności z ich powodu (OR 0,55; CI:0,36-0,83) [27]. Metaanaliza 9 randomizowanych prób klinicznych z zastosowaniem suplementów selenu w prewencji raków także pokazała ochronne działanie suplementów selenowych na występowanie raków (RR 0,76; CI:0,58-0,99). Efekt prewencyjny widoczny był szczególnie w populacjach o niskim wyjściowym stężeniu selenu w surowicy (<125,6µg/l) i osiągnął wartość ponad 30% (RR 0,64; CI: 0,53-0,78) [28].

Kluczowe znaczenie dla stosowania suplementacji selenem w prewencji nowotworów mają wyniki dwóch randomizowanych badań klinicznych, NPC oraz SELECT.

Badanie NPC (ang. *Nutritional Prevention of Cancer Trial*) przeprowadzono w USA w latach 1983-1996. Badaniem objęto grupę 1312 osób, w którym część otrzymywała 200 µg selenu dziennie a część „placebo”. Otrzymane wyniki wykazały, że skuteczność prewencyjna selenu ma ścisły związek z wyjściowym poziomem tego pierwiastka we krwi osób suplementowanych. Stwierdzono, że w grupie osób przyjmujących selen zachorowalność na raki zmniejszyła się o 25% (HR 0,75; p=0,03) a śmiertelność z powodu nowotworów uległa redukcji o 41% (HR 0,59; p=0,008). Spadek zachorowalności

na raki był największy w grupie osób, u których wyjściowy poziom selenu wynosił w osoczu $<105 \mu\text{g/l}$ (HR 0,51; $p=0,005$), natomiast wyjściowo wysoki poziom pierwiastka w osoczu ($>121,6 \mu\text{g/l}$) wiązał się z zwiększeniem zachorowalności na nowotwory (HR1,20; $p=0,43$) [21 - 24]. Powyższe wyniki wskazują jednoznacznie, że wpływ suplementacji selenem na ryzyko raków zależy od wyjściowego poziomu tego pierwiastka w organizmie oraz lokalizacji narządowej.

Badanie SELECT (ang. *Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*), przeprowadzono w USA w latach 2001 - 2009. Celem tego badania była ocena wpływu suplementacji selenu i /lub witaminy E na ryzyko raka prostaty. W badaniu wzięło udział ponad 35 tysięcy mężczyzn powyżej 50 roku życia i z $\text{PSA} \leq 4 \text{ng/ml}$. Uczestników podzielono na 4 grupy, z których każda otrzymywała inną dawkę suplementów: preparat selenu w dawce $200 \mu\text{g}$ /dzień, witaminę E w dawce 400IU /dzień, selen w połączeniu z witaminą E lub „placebo”. W badaniu SELECT rozpoczętym w 2001 roku i zaplanowanym na maksimum 12 lat, nie udowodniono skuteczności suplementacji selenem w chemoprewencji raka prostaty, nie odnotowano także spadku zachorowalności na nowotwory w grupach suplementowanych w porównaniu do grupy przyjmującej „placebo” [25 - 26]. Brak skuteczności suplementacji selenem na obniżenie ryzyka raka prostaty przedstawiony w badaniu SELECT nie jest dowodem na brak prewencyjnego działania selenu. Wyniki badania NPC jednoznacznie pokazały, że wpływ suplementacji selenem na ryzyko raków ma związek z wyjściowym poziomem tego pierwiastka w organizmie. Wyjściowy poziom selenu u mężczyzn biorących udział w badaniu SELECT wynosił $136 \mu\text{g/l}$, a więc był zbyt wysoki aby, według wyników NPC, zaobserwować pozytywne działanie suplementacji selenem.

Powyższe wyniki światowe wymagały walidacji na populacji polskiej. W związku z czym w ostatnim czasie w naszym Ośrodku przeprowadzono badania nad związkiem pomiędzy stężeniem selenu a występowaniem raków: płuca, jelita grubego i piersi.

Analizy nad związkiem stężenia selenu a rakami płuca i jelita grubego zostały przeprowadzone w schemacie badań retrospektywnych, w których gdzie materiał biologiczny do pomiaru stężenia tego mikroelementu został pobrany w od osoby chorej w momencie diagnozy raka. Dla każdego chorego uczestnika badania wyselekcjonowano z istniejącego w naszym ośrodku rejestru i biobanku osobę zdrową, stanowiącą dla niego parę i dobraną pod względem kryteriów płci, wieku (± 3 lata), rodowodowej historii występowania raków wśród krewnych I stopnia oraz dodatkowo dla badania nad rakiem płuca, statusu palenia tytoniu wyrażonego w tzw. „paczkolatach”. Wyniki badania, w któ-

rym oceniano poziom selenu w surowicy u 86 chorych z rakiem płuc i 86 zdrowych wskazują na silny związek Se z występowaniem tego nowotworu: stężenie selenu wynosiło 63,2 $\mu\text{g/l}$ u chorych z rakiem płuca i 74,6 $\mu\text{g/l}$ u zdrowych ($p < 0,0001$). U osób ze stężeniem selenu $> 80 \mu\text{g/l}$ stwierdzono 10-krotnie obniżone prawdopodobieństwo występowania raka płuc (OR 0,10; 95% CI 0,03-0,34; $p = 0,0002$) [29].

Z kolei w polsko-estońskim badaniu oceniającym zależność selenu od występowania raka jelita grubego u 169 chorych na ten nowotwór oraz 169 zdrowych stwierdzono ponad 13-krotnie większe prawdopodobieństwo występowania raka jelita grubego u osób ze stężeniem Se $< 40 \mu\text{g/l}$ w porównaniu do tych, u których stężenie Se było $> 72 \mu\text{g/l}$ (OR - 13,78 95% CI 6,31-29,82; $p < 0,0001$) [30].

Inne nasze badanie przeprowadzone wśród 100 pacjentów z nowo zdiagnozowanym rakiem trzustki w odniesieniu do grupy kontrolnej 100 osób zdrowych sparowanych co do płci, wieku, statusu palenia tytoniu, rodzinnej historii zachorowań na raki, pochodzących z tego samego regionu geograficznego Polski wykazały związek niskich stężeń selenu ze wzrostem liczby występujących raków trzustki. Średnie stężenie Se w grupie pacjentów z rakiem trzustki wyniosło 60 $\mu\text{g/l}$, a grupie kontrolnej 76 $\mu\text{g/l}$. Przeprowadzona analiza wykazała, że punkt odcięcia stężenia Se poniżej którego obserwowano wzrost występowania raków trzustki wyniósł 67,45 $\mu\text{g/l}$. Niższe stężenia selenu w surowicy były związane z większym prawdopodobieństwem zdiagnozowania raka trzustki [32]. W tym samym badaniu zaobserwowano dłuższy czas przeżycia (na granicy istotności statystycznej) pacjentów z rakiem trzustki z wyższym stężeniem selenu w porównaniu do pacjentów z rakiem trzustki i niskim stężeniem Se w surowicy krwi (średnio, 11 miesięcy w porównaniu do 6 miesięcy) [32].

W świetle tych wyników wydaje się, że niskie stężenie selenu w surowicy krwi może być użytecznym markerem wskazującym na celowość jak najszybszego wykonywania TK klatki piersiowej i kolonoskopii w celu wczesnego wykrycia raków płuca i jelita grubego. Oznaczenie stężenia selenu w surowicy krwi może uzupełniać konwencjonalne procedury diagnostyki raka trzustki jako dodatkowy marker laboratoryjny. Nie można także wykluczyć, że stężenie Se może być markerem prognostycznym w raku trzustki.

Badania nad związkiem pomiędzy stężeniem selenu w surowicy krwi a ryzykiem raka piersi wykonano w schemacie analizy prospektywnej, w której próbkę krwi do oceny stężenia selenu pobrano co najmniej kilka miesięcy przed zachorowaniem. W biobanku naszego Ośrodka zgromadzono próbki od ponad 19500 kobiet, które przed pobraniem materiału biologicznego nigdy wcześniej nie chorowały na nowotwór. Następnie, sprawdzając w ciągu 5 lat dane na temat zachorowania na nowotwór wśród tej

grupy kobiet (wykluczając osoby z wykrytą konstytucyjną mutacją genu BRCA1), stwierdzono, że u 97 pacjentek wystąpiły raki o różnej lokalizacji narządowej. Do badanej grupy chorych kobiet dobrano 184 zdrowe osoby grupy kontrolnej dopasowane wg kryteriów płci, wieku (\pm 3 lata), liczby „paczkołat”, rodowodowej historii zachorowań na raka wśród krewnych I stopnia. Korelacja pomiędzy stężeniem selenu a ryzykiem raka nie wykazała zależności liniowej. Kobiety ze stężeniem selenu w surowicy 70,01-90 $\mu\text{g/l}$ miały 2,5 krotnie niższe ryzyko raka w porównaniu do pozostałych kobiet (OR = 0,4; 95% CI 0,26-0,74; $p = 0,003$). Zaobserwowano także tendencję do wzrostu ryzyka przy stężeniu $>90 \mu\text{g/l}$, chociaż nie była to zależność statystycznie istotna (OR = 1,63; 95%CI 0,63-4,19; $p = 0,31$) [31]. Analiza wyników tego badania prospektywnego sugeruje, że optymalne stężenie selenu w surowicy dla kobiet w Polsce powinno mieścić się w granicach 70-90 $\mu\text{g/l}$. Pacjentki z niższym stężeniem selenu powinny rozważyć opcję suplementacji.

Zaobserwowany wzrost ryzyka przy stężeniu $>90 \mu\text{g/l}$ sugeruje, iż należy zachować ostrożność w trakcie potencjalnej suplementacji i utrzymywać stężenie selenu w surowicy poniżej 90 $\mu\text{g/l}$.

Podsumowując, można stwierdzić, że stężenie selenu w populacji polskiej jest markerem diagnostycznym dla raków płuca, jelita grubego, trzustki i raka piersi. W odniesieniu do raków płuca i jelita grubego poziom selenu może mieć wartość diagnostyczną identyfikowania osób, u których z wyraźną skutecznością można wykryć wczesne raki płuca i jelita grubego. Natomiast w przypadku raka trzustki, określenie stężenia selenu w surowicy może uzupełniać konwencjonalne procedury diagnostyki raka trzustki jako dodatkowy marker laboratoryjny. Dla raka piersi stężenie tego mikroelementu jest markerem ryzyka.

W naszym kraju, średnie stężenie selenu w surowicy wynosi około 70 $\mu\text{g/l}$ w związku z czym duży odsetek mieszkańców naszego kraju, najprawdopodobniej powinno być doselenowanych. Najbardziej właściwym wydaje się selenowanie dobrane do stężenia selenu w surowicy u suplementowanej osoby.

PIŚMIENNICTWO

1. Combs GF, Clark LC, Turnbull BW. An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors* 14 2001; 153-9.
 2. Torun, M., Aldemir, H., Yardim, S.: Serum selenium levels in various cancer types. *Trace Elem. Electrol.* 1995,12,186-190.
 3. Zachara, B. A.: Mammalian selenoproteins. *J. Trace Elem. Electrol. Health Dis.* 1992, 6,137-151.
 4. Combs, G. F. Jr: Selenium and cancer prevention. In: *antioxidants and disease prevention*; H. S. Garewal (red), CRC Press, Boca Raton, New York, 1997, 97- 113.
- człowieka. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Lublin--Polonia Sec D* 2005; 60: 457-60.

5. Combs G.F., Gray W.P.: Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther.* 1998, 79, 179 – 192.
6. Kuczyńska J, et al.: Biogeochemia selenu i jego monitoring w materiałach biologicznych pochodzenia ludzkiego.: *Ecological Chemistry and Engineering* 200, 7; T. 14, Nr S1.
7. Raymann M.: Selenium and human health. *Lancet* 2012; 379(9822).
8. Ip C, et al.: New concepts in selenium chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 2002;21:
9. Combs GF, et al.: Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther.* 1998; 79, 179 – 192.
10. Ip C: Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr* 1998; 128:1845–54.
11. Borawska MH, et al.: The effects of diet on selenium concentration in serum in patients with cancer, *Nutr Cancer.* 2009 ;61 (5): 629-33.
12. Knekt P, et al.: Is low selenium status a risk factor for lung cancer?, *Am J Epidemiol.* 1998; 148 (10): 975-82.
13. Jaworska K, et al.: A low selenium level is associated with lung and laryngeal cancers. *PLoS One* (2013) 8(3):e59051.
14. Jablonska E, et al.: Lung cancer risk associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15 polymorphism. *Eur J Nutr.* 47(1):47-54, 2008
15. van den Brandt PA, et al.: A prospective cohort study on selenium status and the risk of lung cancer, *Cancer Res.* 1993; 53 (20): 4860-5.
16. Mark SD, et al.: Prospective study of serum selenium levels and incident esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1753-1763
17. Nomura A, et al. Serum Selenium and Subsequent Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:883-887.
18. Knekt P, et al.: Serum selenium and subsequent risk of cancer among Finnish men and women. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 864–868.
19. Glatte E, et al.: Prediagnostic serum selenium in a case-control study of thyroid cancer. *Int J Epidemiol.* 1989;18(1):45-9.
20. Steinbrecher A, et al.: Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:2958-2968.
21. Reid ME, et al.: Selenium supplementation and lung cancer incidence: an update of the nutritional prevention of cancer trial. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2002; 11: 1285–1291.
22. Duffield-Lillico AJ, et al.: Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11, 630.
23. Duffield-Lillico AJ, et al.: Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial, *BJU Int.* 2003; 91 (7): 608-12.
24. Reid ME, et al.: Selenium supplementation and colorectal adenomas: an analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *Int J Cancer* 2006; 118: 1777-81.
25. Lippman SM, et al.: Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT), *JAMA.* 2009; 301 (1): 39-51.
26. Klein EA, et al.: Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA.* 2011; 306: 1549-56.
27. Dennert G, et al.: Selenium for preventing cancer (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2011 (5):CD005195.
28. Lee EH, et al.: Effects of selenium supplements on cancer prevention: metaanalysis of randomized controlled trials. *Nutr Cancer.* 2011;63(8):1185-95.
29. Jaworska K, et al.: A low selenium level is associated with lung and laryngeal cancers. *PLoS One* (2013) 8(3):e59051.
30. Lener M, et al.: Can selenium levels act as a marker of colorectal cancer risk? *BMC Cancer.* 2013, 13:214
31. Narod SA, et al.: Serum Selenium Level and Cancer Risk: A Nested Case-Control Study (submitted).
32. Lener M, et al: Serum Concentrations of Selenium and Copper in Patients Diagnosed with Pancreatic Cancer. *Cancer Res Treat.* 2016;48:1056-64.

INDEKS AUTORÓW

- Banasiewicz T 135
- Borowczyk K 157
- Boruń P 135, 157,373,387
- Budny B 373
- Cichy W 157
- Cybulski C 67,73, 177, 253,
- Dębniak T 9, 73, 111,265
- Drews M 135
- Durda K 399
- Dymerska D 19,59
- Gliniewicz B 177
- Gołębiewska K 59,111
- Górski B 45, 73
- Grodzki T 341
- Gronwald J 85
- Hasse-Lazar K 237
- Huzarski T 73, 327, 353
- Hryhorowicz S 373
- Jakubowska A 19, 45, 327, 399
- Janicka A 73
- Jarząb B 191, 215, 219,237
- Jaworska-Bieniek K 399
- Jurkiewicz D 311
- Kashyap A 67
- Kaczmarek K 399
- Kaczmarek-Ryś M 373,387
- Kluźniak W 67
- Kładny J 111
- Krajewska J 191
- Krassowski J 219
- Krokowicz P 135
- Krzystolik K 253
- Kurzawski G 19,59, 73, 111, 127
- Lener M 73,341, 353, 399
- Lubiński J 9, 45, 59, 67, 73, 85, 111, 127, 135,177, 253, 265, 311,327,341,353,399
- Masojć B 19
- Marciniak W 399
- Muszyńska M 399
- Oczko-Wojciechowska M 191,237
- Paszkowski J 135
- Pietrucha B 387
- Pietrzak S 353
- Pławski A 135, 157,373,387
- Sałański K 157
- Scott R 19
- Serrano-Fernandez P 19
- Sikorski A 177
- Suchy J 73, 111, 127
- Sukiennicki G 399
- Szpak-Ulczoek S 219
- Szymańska-Pasternak J 73
- Teodorczyk U 327
- Tołoczko-Grabarek A 311
- Trubicka J 19, 73, 311
- van de Wetering T 289
- Włoch J 191

Wojnarska B 327

Ziemnicka K 373

Wokołorczyk D 67

Wygoda Z 191

Zajątek S 275, 289, 301

SKOROWIDZ

- algorytmy diagnostyczne 275
- BRCA1* 69
- BRCA1* mutacja 49
- choroba v. Recklinghausena 225
- CKDN2* 203
- czerniak (MM) 203
- diagnostyka 21, 189
- diagnostyka genetyczna 211
- dziedziczenia jednogenowe 11
- dziedziczenia wielogenowe 11
- dziedziczne zapalenie trzustki 275
- dziedziczny rak rdzeniasty tarczycy 155
- FAP 113
- gen APC 113
- genetyczna predyspozycja 21
- genetyka 69, 189
- guz Wilms'a 247
- hMSH6* 105
- HNPCC 93
- kryteria diagnostyczne 93, 105, 225
- leczenie 93
- markery ryzyka 279
- mutacje genu E-kadheryny (CDH1) 263
- mutacje RB1 211
- nefroblastoma 247
- neurofibromatosis II 237
- neurofibromina 225
- opieka i poradnictwo 211, 225
- opieka i poradnictwo rodzinne 237
- polipowatość hamartomatyczna 135
- polipowatość młodzieńcza 135
- poziom selenu 299
- predyspozycje do raka 113
- prewencja 93,299
- protoonkogen RET 155
- rak jasnokomórkowy nerki 247
- rak jelita grubego 113
- rak jelita grubego i trzonu macicy 105
- rak krtani 287
- rak nerek 247
- rak piersi 69
- rak płuc 287
- rak prostaty 189
- rak trzustki 275
- rak żołądka 263
- rodzinny rak trzustki 275
- ryzyko raka 299
- schwannoma n. słuchowego 237
- selen 287
- siatkówczak 211
- techniki 21
- test DNA 49, 57
- VHL 177
- zespoły dziedziczne 275
- zespół Cowdena 135
- zespół MEN 1 205
- zespół MEN 2 155
- Zespół ataksji-telangiektazji 367
- zespół Peutza i Jeghersa 135
- zmiany konstytucyjne 21
- zmiany umiarkowanie zwiększonego ryzyka 57
- rzadkie zespoły predyspozycji do występowania nowotworów, Zespół konstytucyjnego niedoboru naprawy DNA typu „mismatch”, Zespół nabłoniaków znamionowych, Zespół Blooma, Zespół MEN1, Triada Carney'a, Zespół Carney'a-Stratakisa353
- APC gene 113
- BRCA1* 69
- BRCA1* mutation 49
- breast cancer 69
- cancer predisposition 113
- cancer risk 299
- CDKN2* 203
- clear cell carcinoma 247
- colon cancer 113
- colorectal and endometrial cancer 105
- constitutional changes 21
- Cowden syndrome 135
- criteria of diagnosis 225
- diagnoses 21
- diagnostic algorithms 275
- diagnostic criteria 93, 105
- diagnostics 189
- DNA tests 49, 57
- E-cadherin mutations 263
- familial care 225
- familial care and counseling 211, 237
- familial pancreatic cancer 275
- FAP 113
- gastric cancer 263
- genetic diagnosis 211
- genetics 69, 189
- hamartomatous polyposis 135
- hereditary cancer 21
- hereditary medullary thyroid carcinoma 155
- hereditary pancreatitis 275
- hereditary syndromes 275
- hMSH6* 105
- HNPCC 93
- juvenile polyposis syndrome 135
- larynx cancer 287
- lung cancer 287
- malignant melanoma (MM) 203
- merlin 237
- moderate risk changes 57
- monogenic predisposition 11
- nefroblastoma 247
- neurofibromatosis 2 237
- neurofibromin 225
- pancreatic cancer 275
- Peutz-Jeghers syndrome 135
- polygenic predisposition 11

prevention 93,299
prostate cancer 189
RB1 mutations 211
renal cancer 247
RET protooncogene 155
retinoblastoma 211
risk of neoplasia 225
selenium 287
selenium level 299
syndrome MEN 2 155
techniques 21
treatment 93
vestibular schwannoma 237

VHL 177
von Recklinghausen disease 225
Wilm's tumor 247