

SLOVENIJA PROTI RAKU

DESETLETNI ZDRAVSTVENOVZGOJNI PROGRAM
ZA ZMANJŠANJE ZBOLEVNOSTI
IN UMRLJIVOSTI ZA RAKOM

VLOGA GENETIKE PRI NASTANKU, ZDRAVLJENJU IN PREPREČEVANJU RAKA

XXI. seminar "IN MEMORIAM DR. DUŠANA REJE"



ZVEZA SLOVENSkih DRUŠTEV
ZA BOJ PROTI RAKU



ONKOLOŠKI
INŠTITUT
LJUBLJANA



INŠTITUT ZA
VAROVANJE
ZDRAVJA RS

SLOVENIJA PROTI RAKU

DESETLETNI ZDRAVSTVENOVZGOJNI PROGRAM
ZA ZMANJŠANJE ZBOLEVNOSTI
IN UMRLJIVOSTI ZA RAKOM

VLOGA GENETIKE PRI NASTANKU, ZDRAVLJENJU IN PREPREČEVANJU RAKA

XXI. seminar "IN MEMORIAM DR. DUŠANA REJE"

V organizaciji:
Zveze slovenskih društev za boj proti raku
Onkološkega inštituta Ljubljana
Inštituta za varovanje zdravja

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

616-006-056.7(082)

SEMINAR In memoriam dr. Dušana Reje (21 ; 2013 ; Ljubljana)

Vloga genetike pri nastanku, zdravljenju in preprečevanju raka /
XXI. seminar In memoriam dr. Dušana Reje ; [uredniški odbor Maja
Primic Žakelj ... et al.]. - Ljubljana : Zveza slovenskih društev za boj
proti raku, 2013

ISBN 978-961-6377-30-0

1. Gl. stv. nasl. 2. Primic-Žakelj, Maja
269300224

Zbornik je pripravila in založila Zveza slovenskih društev za boj proti raku

Izdajo zbornika in izvedbo seminarja so omogočili:
FIHO, Ministrstvo za zdravje RS in sponzorji (gl. str. 70)

Zbornik je brezplačen. Namenjen je zdravnikom in drugim zdravstvenim
delavcem, profesorjem in predavateljem zdravstvene vzgoje in vsem
drugim, ki delajo na področju zdravstvene vzgoje

Odgovorna urednica: izr. prof. dr. Maja Primic Žakelj, dr. med.
Uredniški odbor: izr. prof. dr. Maja Primic Žakelj, dr. med.
dr. Srdjan Novaković, univ. dipl. biol., znanst. svet.
izr. prof. dr. Branko Zakotnik, dr. med.
mag. Mateja Krajc, dr. med.
Fani Čeh, VMS, pedagoška svetovalka
Amalija Zdešar, sekretarka
Recenzentka: doc. dr. Vesna Zadnik, dr. med.
Oblikovanje naslovnice: mag. Tjaša Žurga Žabkar
Lektor in tehnični urednik: Tone Žakelj
Tisk: Studio N, Ljubljana
Naklada: 1000 izvodov

Ljubljana, oktober 2013

KAZALO

UVODNIK

Maja Primic-Žakelj 5

POMEN GENETIKE IN VLOGA MOLEKULARNE DIAGNOSTIKE V ONKOLOGIJI

Srdjan Novaković 7

BIOLOŠKA ZDRAVILA V ONKOLOGIJI

Branko Zakotnik 17

OBRAVNAVA DEDNEGA RAKA DOJK IN JAJČNIKOV

Janez Žgajnar 26

OBRAVNAVA DEDNEGA RAKA PROSTATE

Boštjan Šeruga 31

OBRAVNAVA DEDNEGA RAKA DEBELEGA ČREVEESA IN DANKE

Janja Ocvirk 35

OBRAVNAVA DEDNEGA MELANOMA

Marko Hočevar 44

OBRAVNAVA DEDNEGA RAKA ŠČITNICE

Nikola Bešič, Damijan Bergant 51

GENETSKO SVETOVANJE – DELOVANJE AMBULANTE ZA GENETSKO SVETOVANJE NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA

Mateja Krajc 58

ETIČNI VIDIKI GENETSKE OBRAVNAVE DEDNIH RAKOV

Tone Žakelj, Jože Trontelj 64

SEZNAM AVTORJEV

..... 69

UVODNIK

Društvo za boj proti raku je bilo ustanovljeno 6. aprila 1970 na pobudo profesorice dr. Božene Ravnihar. Njegov namen je bil zmanjšati zbolewnost in umrljivost za rakom v Sloveniji ter gmotno pomagati pri opremljanju Onkološkega inštituta. V prvem desetletju delovanja so nastajala regijska društva, na njihovo pobudo pa je bila 1. marca 1984 ustanovljena Zveza slovenskih društev za boj proti raku. Danes povezuje 11 regijskih društev. Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije je Zvezi podelilo status humanitarne organizacije in status društva, ki deluje v javnem interesu. Vizija Zveze slovenskih društev za boj proti raku skupaj z regijskimi društvi je postati prepoznaven deležnik v celovitem programu obvladovanja raka v Sloveniji.

Naše osnovno poslanstvo je skupaj z regijskimi društvi prispevati k ustvarjanju take slovenske družbe, v kateri ne bi nihče zbolel ali umrl za rakom zaradi lastne nevednosti ali zaradi brezbržnosti države.

Naše delo se začne z najpomembnejšo nalogo – zdravstveno osveščati in izobraževati javnost –, pri čemer so v veliko pomoč kratka in jasna izhodiščna priporočila *Evropskega kodeksa proti raku*. Vsako od postavk *Kodeksa* ljudem pojasnujemo z dodatnimi informacijami in razlagami, ki jih podajamo v pisnih gradivih, posebej izdelanih za različne ciljne skupine, in organiziramo dodatna izobraževanja. Osnovnošolci so odlično sprejeli naš vsedržavni program, ki med njimi že dolgo vrsto let spodbuja zdrav življenjski slog, namreč življenje brez kajenja. Program se imenuje *Življenje je lepo – skrbim za svoje zdravje*. Učence vabi k podpisu slovesne obljube, da v tekočem šolskem letu ne bodo začeli kaditi. Med podpisniki vsako leto izžrebamo blizu 100 učencev, ki jih nagradimo z enodnevним izletom v zabavišni park Gardaland.

Druge naše naloge so zagovorništvo, zbiranje sredstev za akcije, s katerimi poskušamo doseči etapne cilje, zastavljene v letnih načrtih, povezovanje regijskih društev za boj proti raku, sodelovanje z drugimi sorodnimi društvi in organizacijami doma, v Evropi in v svetu.

Poleg zdravstvenovzgojnih akcij, ki jih prireja Zveza v tesnem sodelovanju z regijskimi društvi, si društva v svojem okolju prizadevajo za skupne cilje še z lokalnimi akcijami.

Pri zdravstvenem osveščanju laične javnosti imajo zelo pomembno vlogo vsi zdravstveni delavci na primarni ravni zdravstvenega varstva in zaposleni v šolstvu. Zato si Zveza že več let prizadeva s pomočjo uveljavljenih strokovnjakov dodatno približati znanje o vseh možnostih obvladovanja raka

družinskim zdravnikom, drugim zdravstvenim delavcem in učiteljem zdravstvene vzgoje, ki naj to znanje predajajo ljudem, za katere skrbijo. Letos zato že enaindvajsetič prirejamo seminar v spomin dr. Dušana Reje; tokrat je namenjen vlogi genetike pri nastanku, diagnostiki, zdravljenju in preprečevanju raka.

Rak je končna posledica medsebojnega delovanja nevarnostnih dejavnikov, ki se jim posameznik ne more izogniti – to so splošni dejavniki okolja (npr. geografsko in socialno poreklo) in dejavniki, ki jih določa človeku lastni genom (npr. rasa, spol, starost) –, dejavnikov tveganja, katerih škodljivost za zdravje je znana, a se jim zavestno izpostavljam (škodljive življenjske navade in razvade), in – seveda – naključja. Njihovo delovanje lahko povzroči tako spremembo v celičnem jedru, tako mutacijo, da ji organizem, ki sicer sam neprestano odpravlja številne napake v celici, ni kos in nastane rakava bolezen. Bistveno manjši delež, le okrog 10 % vseh rakov, je posledica dedne spremembe, mutacije, ki jo ima človek že ob rojstvu v vseh telesnih celicah in v polovici spolnih. Del letošnjega seminarja je namenjen tem dednim rakom in njihovi obravnavi, saj zahtevajo posebno pozornost, čeprav so redki. Danes je mogoče določiti že vrsto genetskih sprememb pri dednih oblikah raka, kar prispeva k pravočasejši in pravilnejši oceni ogroženosti nosilcev mutacij s kakšno od več vrst raka. Zanje je treba pripraviti primeren program obravnave, kako in na kakšen način jih spremljati, katere preventivne ukrepe jim svetovati ter kako jih zdraviti, če zbolijo.

Po drugi strani sodobna tehnologija omogoča, da spoznavamo, kakšne so genetske spremembe rakavih celic. Molekularna diagnostika in genetski označevalci so vse bolj nepogrešljivi za natančnejšo opredelitev in klasifikacijo tumorjev ter za izbiro najustreznejših zdravil in protokolov za zdravljenje, ki so prilagojeni posameznemu bolniku in njegovemu tumorju – t.i. personaliziranemu, naosebljenemu zdravljenju.

Onkologija v kombinaciji z genetiko je nedvomno medicinsko področje, kjer se še bolj kot na drugih zastavljajo številna etična vprašanja. Na nekatera od njih pričakujemo odgovore od Komisije RS za medicinsko etiko, s katero smo organizatorji seminarja v zadnjih letih vzpostavili dobro sodelovanje.

Zveza slovenskih društev za boj proti raku se zahvaljuje vsem predavateljem in sponzorjem, ki ste sodelovali pri pripravi in izvedbi 21. Rejevega seminarja, ter vsem, ki ste nam s svojo udeležbo dokazali, da naše delo sprejemate in cenite.

Izr. prof. dr. Maja Primic Žakelj, dr. med.,
predsednica

POMEN GENETIKE IN VLOGA MOLEKULARNE DIAGNOSTIKE V ONKOLOGIJI

Srdjan Novaković

Povzetek. Rakave celice se razlikujejo od normalnih na več ravneh in zato lahko kot biološke označevalce za rakave celice uporabljamo spremembe v morfologiji celic, njihovih biokemičnih procesih ali genetske spremembe. Genetske spremembe, ki večajo verjetnost za razvoj raka, ali tiste, ki so značilne za rakave celice, določamo v različnih bioloških vzorcih z metodami molekularne diagnostike. Dedne oblike raka opredeljujemo po ugotovljenih mutacijah ali epigenetskih spremembah v vseh celicah v organizmu in zato uporabljamo DNA, izolirano iz vzorcev krvi (iz levkocitov), medtem ko genetske spremembe pri sporadičnih oblikah raka ugotavljamo v DNA, izolirani iz tumorskega tkiva. Molekularna diagnostika in genetski označevalci so nepogrešljivi za natančnejšo opredelitev in klasifikacijo tumorjev ter za izbiro najustreznejših zdravil in protokolov za zdravljenje, ki so prilagojeni posameznemu bolniku in njegovemu tumorju – t.i. personaliziranemu (naosebljenemu) zdravljenju.

Pomen določanja genetskih sprememb pri dednih oblikah raka je predvsem pravočasna in pravilna ocena ogroženosti nosilcev mutacij, da zbolijo za določeno vrsto raka, da omogočajo pripravo programa spremljanja nosilcev mutacij ter pretehtano izvedbo profilaktičnih ukrepov. Pri sporadičnih oblikah raka pa je vloga molekularne diagnostike predvsem pri napovedovanju prognoze bolezni, napovedovanju ponovitve bolezni ali odziva na zdravljenje.

UVOD

Klasična klasifikacija in diagnostika raka temeljita na določanju izvora rakavih celic, njihovi morfologiji oziroma izražanju značilnih membranskih, citoplazemskih in jedrnih proteinov. Najosnovnejše metode tovrstne diagnostike so mikroskopsko morfološko pregledovanje celic ter imunohistokemično barvanje z različnimi protitelesi. Napredek pri razumevanju mehanizmov nastanka in biologije raka na molekularni ravni je prinesel nova dejstva, ki so narekovala spremembe na tem področju. Sam izvor rakavih celic je sicer še vedno pomemben dejavnik za klasifikacijo raka, ni pa povsem zadosten. Postalo je jasno, da maligni tumorji niso enostaven skupek povsem enako spremenjenih rakavih celic s povsem istimi lastnostmi, temveč tkiva, sestavljena iz različnih tipov malignih in nemalignih celic, ki medsebojno komunicirajo in regulirajo celične procese. Vsi ti neposredni vplivi na rakavo celico, ki je v osnovi izrazito genetsko nestabilna in zaradi tega dobro prilagodljiva, so vzrok za kopičenje raznih sprememb na molekularni ravni v različnih rakavih celicah v istem tumorju. Torej: ne glede na dejstvo, da maligni tumorji nastanejo iz ene same spremenjene celice, se njihova genetska zasnova zaradi selektivnih pritiskov in prilagajanja celic zelo hitro spremeni (1–3). Rezultat različnih sprememb pa je tudi povsem različno obnašanje navidezno istovrstnih tumorjev ter različen odziv na enako zdravljenje (4).

Zaradi vse večjega pomena ugotavljanja sprememb na molekularni ravni je sledil tudi razvoj molekularne diagnostike raka. Gre za relativno mlado vedo,

zaenkrat še brez komercialnih diagnostičnih kompletov in protokolov za preprosto rutinsko rabo. Zato je za pravilno tehnično izvedbo preiskav in interpretacijo rezultatov nujno dobro poznavanje delovanja celice, karcinogeneze, celične signalizacije, mehanizmov razvoja odpornosti na zdravila ipd. Molekularna diagnostika raka je torej sinteza teoretičnega znanja o celični biologiji in karcinogenezi ter praktičnega znanja o tehnični izvedbi molekularno-bioloških preiskav.

KARCINOGENEZA KOT VEČSTOPENJSKI PROCES

Ob predpostavki, da tumor nastaja iz ene same spremenjene celice, je jasno, da je prvi pogoj za kopičenje in izražanje nastalih sprememb v celici njihovo dedovanje v naslednjih generacijah celic. Ob tem govorimo o dveh vrstah karcinogenih dejavnikov: prva vrsta deluje kot **mutageni** impulz in neposredno spremenijo celični genetski zapis; druga vrsta vpliva na izražanje cele vrste genov ali delov kromosomov, s tem da spremenijo metilacijski status in vezavo DNA na histonske proteine. Spremenjeno izražanje genov spremeni razmerja med proteini in v končni fazi brez neposrednega vpliva na zaporedje DNA delujejo kot karcinogeni. Ta način delovanja imenujemo **epigenetsko** delovanje. Tako pri epigenetskih spremembah kot pri genetskih spremembah je potrebno, da se novi vzorec »vtisne v na novo zasnovani celični spomin« in se kot tak prenese v naslednje generacije celic (5).

V grobem lahko karcinogenezo razdelimo v tri stopnje – **iniciacijo**, **promocijo** in **progresijo**, ki vključujejo vrsto različnih podstopenj. Med procesom iniciacije se v celicah nabirajo mutacije, ki povzročijo nenadzorovano ekspresijo genov, odgovornih za spodbujanje proliferacije celice, in inaktivacijo supresorskih genov, ki (v normalno delujočem stanju) zavirajo proliferacijo, nadzorujejo kakovost pomnožene DNA in sprožajo celično smrt, če so poškodbe DNA nepopravljive. Na isti skupini genov delujejo tudi epigenetski dejavniki, ki s spremembami v promotorskih regijah večajo izražanje genov za proliferacijske signale in zmanjšujejo ali celo onemogočajo izražanje supresorskih genov. V fazi promocije celica nabira nove mutacije, katerih število raste proporcionalno s številom celičnih delitev. Po tej fazi nastanejo celice z malignim fenotipom – t.i. **maligna konverzija**. Zadnja faza v procesu karcinogeneze je progresija. V njej se izrazijo pridobljene lastnosti malignega fenotipa, rakave celice pa oblikujejo tumor (5).

Pridobljene in osnovne lastnosti rakavih celic

Da bi celica »zaživela« kot rakava, mora torej nakopičiti celo vrsto sprememb in si pridobiti lastnosti, ki jo naredijo relativno neodvisno od ustaljenih mehanizmov v normalnih celicah. Ker so ti mehanizmi odvisni od vrste celice

oz. tkiva, iz katerega celica izhaja, so kombinacije sprememb oz. lastnosti, ki jih rakava celica mora pridobiti, različne za različne vrste raka. Pridobivanje novih lastnosti omogočita predvsem dve spremembi: nastanek **genomske nestabilnosti** in **možnost aktivnega vpliva na imunski sistem** (6, 7).

Genomska nestabilnost je vsekakor najpomembnejša pridobitev rakavih celic. Je več kot samo značilnost – je stanje, ki omogoča nabiranje različnih sprememb in zato hitrejše in boljše prilagajanje na vplive iz okolja. Možnost vplivanja na imunski sistem pa je druga pomembna pridobitev, s katero si rakave celice pripravijo in zagotovijo okolje za nemoten razvoj tumorja. Imunski sistem sicer aktivno eliminira tumorske celice, po drugi strani pa s selekcijskim pritiskom omogoča preživetje najbolj prilagojenih klonov tumorskih celic, ki tudi same neposredno vplivajo na delovanje imunskega sistema. Proces imenujemo imunsko preurejanje (ang. *immunoediting*) (7).

Osnovne lastnosti rakave celice so:

- samozadostnost za lastno proliferacijo,
- neodzivnost na signale, ki uravnavajo število celičnih delitev,
- neodzivnost na signale, ki sprožajo apoptozo,
- preureditev tvorbe citokinov in izražanja celičnih antigenov,
- zmožnost prehoda v limfni in krvni obtok *ter*
- zmožnost pritrditve v drugih organih in ponovna klonalna rast.

VRSTE MOLEKULARNO-BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV

Področje molekularno-bioloških označevalcev je obsežno in vključuje dejanske spremembe na molekularni ravni kot tudi metodološke pristope za dokazovanje razlik med rakavimi in normalnimi celicami. Če se omejimo na molekularno-biološke označevalce v najožjem smislu (in izpustimo citogenetiko), potem jih lahko delimo na:

- označevalce, ki so produkt sprememb v strukturnih delih genoma – **polimorfizmi**, razne **mutacije**;
- označevalce, ki odsevajo raven izražanja genov brez poseganja v samo strukturo produktov, ki jih ti geni kodirajo. Pri slednjih imam v mislih najprej epigenetske vplive na **metilacijski status** in znotrajcelične regulacijske mehanizme v sistemu delovanja **mikroRNA** (miRNA). Gre za kratke nekodirajoče RNA-fragmente (18–25 nukleotidov), ki so zmožni regulacije izražanja raznih pomembnih genov – od tistih, ki uravnavajo delitev celice, razvoj in diferenciacijo, do tistih, ki so nujni za apoptozo. Odvisno od tega, na katero mRNA se veže, lahko miRNA deluje kot klasični tumorski supresor ali kot onkogen. Trenutno je v podatkovni bazi opisanih nekaj čez 1000 humanih miRNA-genov (8);

- označevalce, ki kažejo na izvor celic. Ponavadi gre za izražanje genov, ki kodirajo različne membranske proteine – npr. imunoglobuline ali T-celične receptorje. Označevalci iz te skupine so največkrat nepogrešljivi pri diagnostiki (diagnostični označevalci). Uporabljamo jih za določanje **klonalnega izvora** celic ali za sledenje **minimalnega ostanka bolezni** (ang. *minimal residual disease*, MRD) pri krvnih rakih. V zadnjih letih je bila na osnovi molekularnih označevalcev spremenjena tudi klasifikacija nekaterih solidnih tumorjev.

Naslednja razdelitev molekularno-bioloških označevalcev temelji na njihovi klinični uporabnosti. Pri tem razlikujemo štiri skupine molekularno-bioloških označevalcev:

- germinalne z znanim patološkim vplivom
Gre za dokazovanje germinalnih mutacij v posameznih genih, ki so dokazano povezani z nastankom raka. Dober primer so BRCA1/2 (ang. *breast cancer*) za raka dojke in jajčnikov, APC (ang. *adenomatous polyposis coli*) za raka debelega črevesa in danke in CDK4 (ang. *cyclin-dependent kinase 4*) za melanom.

- prognostične

Vloga teh označevalcev je prognoza poteka bolezni (»dobra« – »slaba«) ne glede na zdravljenje. Za označevalca najpogosteje uporabljamo izražanje posameznega gena ali t.i. profilov genov. Primer je test *MammaPrint* – na osnovi izraženosti 70 genov opredelimo verjetnost razvoja metastaz raka dojke po kirurški odstranitvi primarnega tumorja.

Nekoliko bolj zapletena je vloga genetskega profila pri difuznih velikoceličnih B-limfomih (DVCBL). Ta panel lahko označimo kot diagnostično-klasifikacijski panel, saj omogoča razlikovanje treh skupin DVCBL – GCB (ang. *germinal center B-cell-like*), ABC (ang. *activated B-cell-like*) in druge. Prav tako lahko rečemo, da je prognostičen, ker dejansko napoveduje razliko v preživetju med GCB in ABC. Hkrati pa je ta panel tudi napovedni označevalec, saj napoveduje odziv na kemoterapijo (boljši odziv na kemoterapijo pri GCB) (9, 10).

Kot prognostične označevalce lahko uporabimo tudi nekatere strukturne spremembe, kot je mikrosatelitska nestabilnost (ang. *microsatellite instability*, MSI). Močno izražanje (ang. *microsatellite instability-high*, MSI-H) pomeni za bolnika boljšo prognozo (11).

Za določene vrste tumorjev se je kot prognostični dejavnik izkazal tudi mutacijski status posameznih genov – npr. mutirani BRAF (gen za protein B-Raf) kot negativni prognostični dejavnik pri bolnikih z rakom debelega črevesa in danke, ki nimajo izrazite mikrosatelitske nestabilnosti v tumorju (12).

- napovedne

Gre za označevalce, ki napovedujejo verjetnost koristnosti ali sploh ustreznosti kakega zdravljenja za posameznega bolnika. Te označevalce imenujemo tudi farmakogenomske označevalce. Taki so, na primer, mutacijski status gena KRAS pri bolnikih z metastatskim rakom debelega črevesa in danke, zdravljenih z zaviralci receptorjev za epidermalni rastni dejavnik, in mutacija v genu BRAF na kodonu V600, ki je pogoj za zdravljenje bolnikov z metastatskim melanomom s specifičnimi zaviralci kinaz.

- farmakodinamske

Tudi tukaj kot označevalce najpogosteje uporabljamo izražanje panelov genov. Gre za gene, ki predvsem nakazujejo, kakšna je optimalni odmelek kakega zdravila za doseganje maksimalnega terapevtskega učinka ob minimalnih neželenih učinkih. Prav tako so vse bolj zanimivi genski paneli, ki napovedujejo možnost nastanka rezistence na kakšna zdravila.

Opredelitve in razdelitve molekularno-bioloških označevalcev niso povsem usklajene, saj v literaturi redko najdemo dorečeno in s konsenzom sprejeto klasifikacijo označevalcev. Vzrokov za nedorečenost je več – vsekakor sodijo med pomembnejše prav velika heterogenost teh označevalcev ter »mladost vede«, ker nimamo na voljo dovolj podatkov za standardizacijo metod. Prav tako je velikokrat težko opredeliti posamezni označevalec izključno na osnovi ene klasifikacije (npr. kot diagnostičnega), saj ima istočasno tudi elemente prognostičnega ali napovednega označevalca. To so bili razlogi, da sem se v tem prispevku odločil za dvojno klasifikacijo označevalcev.

DEDOVANJE IN RAK

Rak je genska bolezen, ki po danes veljavnih teorijah nastane iz ene same spremenjene celice. Pri tem razlikujemo **dedne oblike** raka, ki so posledica genetskih sprememb v zarodnih celicah, kar neposredno pomeni tudi v spolnih celicah, ter **sporadične oblike** raka, ki nastanejo zaradi genskih sprememb v somatskih celicah (različne celice tkiv in organov). Kot spremembe pojmuje tiste, ki neposredno spremenijo zapis v dednem materialu (na prvem mestu mutacije), in tiste, ki spremenijo izražanje nekaterih genov z vplivom na njihovo strukturo in vezavo na nosilne histonske proteine. Pri sporadičnih oblikah raka se te spremembe ne prenašajo (dedujejo) na potomce, medtem ko se spremembe v spolnih celicah dedujejo, t.j. prenašajo na potomce. Zaradi takšnega prenosa je pri nosilcih teh sprememb čas, potreben za nastanek raka, krajši, in ogroženost z rakom večja.

Dedne oblike raka

Med dedne oblike raka štejemo tiste, za katere obstajajo dokazi, da so neposredno povezane s spremembami v značilnih genih. Dedne oblike raka so bile klinično prepoznane v sklopu raznih dednih sindromov. Ponavadi so germinalne (dedne) mutacije v značilnih genih povezane z večjo verjetnostjo za nastanek raznih vrst raka. Osnovne značilnosti dednih oblik raka so, da je zbolenje zgodnejše, da je v družini več članov z isto ali kako drugo vrsto raka, ki sodi v sklop sindroma, več istovrstnih ali raznovrstnih rakov pri isti osebi. Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana določamo mutacije v genih, ki so povezani z različnimi dednimi sindromi (13).

Sindrom BRCA1/2. Tako kot je iz imena razvidno, gre za sindrom, ki prizadene osebe z mutacijami v genih BRCA1 in BRCA2. Mutacije v teh genih so najpogosteje vzrok za nastanek raka dojke in jajčnikov. Redkeje so povezane tudi z nastankom raka prostate, črevesa in trebušne slinavke. Primeri dednega raka dojke obsegajo 5–10 % vseh rakov dojke. Za več kot polovico od njih so odgovorne mutacije v genih BRCA1 in BRCA2. Nosilke in nosilci mutacij v teh genih v povprečju zbolijo celo desetletje prej, kot splošna populacija.

Čeprav **dedni melanom** ni sindrom, je več kot v 10 % vseh primerov melanoma podedovana bolezen. Nastane kot posledica mutacij v genih CDKN2A in CDK4, redko v genu MC1R. Dedna oblika malignega melanoma se značilno pojavi 10–20 let prej kot sporadičnih oblika, poleg tega pa so dedni melanomi pogosto multipli.

Cowdenov sindrom. Nastanek tega sindroma je povezan z mutacijami v genu PTEN. Osebe s Cowdenovim sindromom najpogosteje zbolevajo za rakom dojk, maternične sluznice, ščitnice, ledvic ter rakom debelega črevesa in danke. Verjetnost, da bodo nosilci mutacij v genu PTEN zboleli za katero koli vrsto raka je velika – do 85-odstotna –, kar po novejši literaturi velja predvsem za raka dojk. Rak dojk se pri nosilkah mutacij v genu PTEN pojavi zelo zgodaj, povprečno v starosti med 30 in 40 let.

Družinska adenomatozna polipoza (ang. *familial adenomatous polyposis*, FAP) nastane kot posledica mutacij primarno v genu APC in redkeje v genu MUTYH. Za bolezen je značilno zgodnje pojavljanje številnih polipov (adenomov) v debelem črevesu (lahko že pri starosti 15 let). Poznamo tudi blažjo, atenuirano obliko z manjšim številom polipov (AFAP). Bolniki z diagnozo družinske adenomatozne polipoze zbolijo za rakom debelega črevesa in danke v povprečju pred 40. letom starosti. Penetranca mutacij v genu APC je 100-odstotna.

Sindrom Li-Fraumeni je posledica germinalnih mutacij v genu Tp53, ki povzročajo zbolevanje za različnimi vrstami raka. Najpogostejši so rak dojk

in razni sarkomi – mehkih tkiv in osteosarkomi. Sledijo levkemije, možganski tumorji, rak želodca, debelega črevesa in danke, melanom, Wilmsovi tumorji ter limfomi. Za sindromom Li-Fraumeni ljudje običajno zbolijo zgodaj v življenju – pred 45. letom starosti – in imajo večkrat multiple primarne tumorje.

Lynchev sindrom ali **HNPCC** (ang. *hereditary non-polyposis colon cancer*). Lynchev sindrom nastane kot posledica mutacij v genih, ki so odgovorni za popraviljanje neujemanja pri podvojevanju DNA. Najpogosteje mutirani ali hipermetilirani geni MMR (ang. *mismatch repair*) so MLH1, MSH2, MSH6 in PMS2. Mutacije v genih MLH1 in MSH2 so vzrok za nastanek Lynchevega sindroma pri 80–90 % oseb, najpogosteje z rakom debelega črevesa in danke; kar 4–6 % bolnikov z rakom debelega črevesa in danke ima ta sindrom. Povprečna starost ob diagnozi raka debelega črevesa in danke pri osebah z Lynchevim sindromom je 45 let. Ostale vrste raka, ki se pojavljajo pri tem sindromu, so rak maternične sluznice, jajčnikov, urogenitalnega trakta, želodca, žolčnika, trebušne slinavke, tankega črevesa ali možganov.

Peutz-Jeghersov sindrom nastane kot posledica mutacij v genu STK11. Najpogosteje gre za raka debelega črevesa in danke, dojke, želodca, tankega črevesa in trebušne slinavke, redkeje pa za raka jajčnikov in materničnega vratu ter raka testisov.

Nosilci mutacij v genu STK11 zbolevajo za rakom zelo zgodaj – povprečno pri 42 letih.

Vzrok za **sindrom von Hippel-Lindau** so mutacije v genu VHL. V njegovem sklopu je slaba tretjina primerov hemangioblastoma osrednjega živčevja, več kot polovica angiomov mrežnice, polovica družinsko povezanih feokromocitomov in 1 % raka ledvičnih celic.

SPORADIČNE OBLIKE RAKA

Sporadične oblike raka so (zaenkrat) pogostejše od dednih. Zanimivo je, da so pogosto geni, ki so mutirani pri dednih rakih, nemutirani pri sporadičnih vrstah rakov. Zaradi tega se uporaba molekularno-bioloških označevalcev pri sporadičnih rakih nekoliko razlikuje od uporabe pri dednih rakih. Pri sporadičnih rakih trenutno uporabljamo molekularno-biološke označevalce predvsem za boljše opredeljevanje klasifikacije tumorjev in – pri hematoloških rakih – tudi za spremljanje minimalnega ostanka bolezni (minimalne rezidualne bolezni). Prav tako je pomembna uporaba teh označevalcev za prognozo bolezni in napoved uspešnosti zdravljenja z zdravili (farmakogenomika). V tem prispevku predstavljam uporabo molekularno-bioloških označevalcev, ki jih spremljamo na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana.

Maligni limfomi nastanejo iz različno diferenciranih celic limfatične vrste B, T ali naravnih celic ubijalk. So klonske bolezni, pri katerih delamo dve vrsti preiskav – določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifičnih genetskih sprememb (nekaterih kromosomskih translokacij, značilnih za posamezne vrste limfomov).

Določanje genotipa KRAS. Značilne mutacije v tem protoonkogenu so na kodonih 12, 13 in 61. Aktivacijske mutacije povzročijo nenehno signalizacijo znotraj t.i. signalne poti RAS-RAF-MAPK.

Genotip KRAS določamo pri bolnikih z metastatskim rakom debelega črevesa in danke pred uvedbo biološkega zdravljenja. Določanje genotipa KRAS omogoča ustrezno izbiro tarčnega zdravljenja.

Določanje genotipa BRAF. Značilne mutacije v tem protoonkogenu so na kodonu V600. Gre za aktivacijske mutacije, ki povzročijo nenehno signaliziranje po signalni poti RAS-RAF-MAPK. Mutacije v genu BRAF najdemo pri raznih vrstah raka, kot so melanom, rak debelega črevesa in danke, papilarni rak ščitnice, rak ledvic, rak jeter, nedrobnocelični rak pljuč in serozni rak jajčnikov.

Genotip BRAF določamo pri bolnikih z metastatskim melanomom in metastatskim rakom debelega črevesa in danke pred uvedbo biološkega zdravljenja. Po dogovoru z napotnim zdravnikom določamo genotip BRAF tudi pri bolnikih z drugimi vrstami raka (npr. papilarnim rakom ščitnice).

Določanje genotipa PIK3CA. Najpogosteje mutirana mesta v tem protoonkogenu sta kodona 542 in 545 v eksonu 9 ter kodon 1047 v eksonu 20. Mutacije v tem genu najdemo pri raznih vrstah raka: raku dojke, maternične sluznice, glave in vratu, debelega črevesa in danke, jajčnikov itd. Mutacijski status gena PIK3CA uporabimo kot prognostični in napovedni dejavnik.

Določanje genotipa c-KIT. Značilne mutacije v tem protoonkogenu so odvisne od vrste raka: gastrointestinalni stromalni tumorji (GIST) – mutacije v eksonih 9, 11, 13 in 17; sistemska mastocitoza – D816V v eksonu 17; mieloidna levkemija – eksona 8 in 17. Sicer so mutacije v tem genu najpogostejše pri GIST (80–90 % bolnikov ima mutacijo v tem genu). Rezultate določanja genotipa c-KIT uporabljamo kot prognostični in napovedni dejavnik za zdravljenje z zaviralci tirozinske kinaze.

Določanje genotipa PDGFRA. Značilne mutacije v tem protoonkogenu so v eksonih 18 (najpogosteje D842V), 12 (večinoma V561D) in (redko) 14 (večinoma N659X). Aktivacijske mutacije povzročijo stalno signalizacijo v signalni poti PDGFR/ERK (spodbujanje proliferacije, apoptoze, angiogeneze), ne da bi bil navzoč ligand. Mutacije v PDGFRA so dokazljive pri 5–10 % oseb z GIST. Rezultate določanja genotipa PDGFRA uporabljamo kot napovedni dejavnik za zdravljenje z zaviralci tirozinske kinaze.

Molekularno-diagnostične tehnike in biološki materiali, ki jih najpogosteje uporabljamo na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana

Navajam (po vrstnem redu poteka procesa) samo nazive molekularno-bioloških tehnik, ki jih uporabljamo:

- izolacija genomske DNA,
- verižna reakcija s polimerazo (ang. *polymerase chain reaction*, PCR),
- ločevanje molekul z gelsko elektroforezo,
- sekvenciranje,
- fragmentna analiza in od ligacije odvisno hkratno pomnoževanje sond (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA),
- alelna diskriminacija,
- kvantitativna PCR v realnem času (ang. *quantitative PCR*, Q-PCR),
- metoda ločevanja fluorescenčno označenih produktov PCR na osnovi analize talitvene krivulje z veliko ločljivostjo (ang. *high resolution melt*, HRM),
- spremljanje izražanja genov.

Najpogosteje uporabljeni biološki materiali:

- kri, plazma,
- tkivo, vklopljeno v parafin (FFPE),
- tkivo, pridobljeno z aspiracijsko biopsijo s tanko iglo,
- punktati kostnega mozga,
- drugi: sveže in zmrznjeno tkivo, celične suspenzije, eksudat, likvor ali kakršen koli biološki vir, iz katerega je mogoče izolirati DNA.

PRIHODNOST

Največji izzivi na področju molekularne diagnostike so: narediti to področje cenejše in dostopnejše za širšo uporabo, prilagoditi metode vzorčenja, tako da bi bile čim manj agresivne, standardizirati postopke v laboratorijih za dokazovanje specifičnih sprememb in – morda najpomembnejše – izpopolniti baze podatkov za vse genomske spremembe in jih opremiti z nedvoumnimi razlagami o njihovem vplivu. Verjamem, da nam bo v bodoče v veliko pomoč nova tehnologija sekvenciranja – *next generation sequencing*, novi pristopi k vzorčenju (jemanje vzorcev iz krožečih tumorskih celic, iz eksosomov – majhnih mikroveziklov, ki se sproščajo iz tumorja) ter seveda nova dejstva, ki nam bodo pomagala, da zapolnimo ogromne luknje v svojem mozaiku (ne)znanja.

LITERATURA

1. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11 (3): 220–8.
2. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010; 40 (2): 179–204.
3. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461 (7267): 1071–8.
4. Gonzalez de Castro D, Clarke PA, Al-Lazikani B, Workman P. Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 93 (3): 252–9.
5. Novaković S. Molekularni mehanizmi nastanka raka – kancerogeneza. In: Novaković S, Hočevar M, Jezeršek-Novaković B, Strojan P, Žgajnar J, editors. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. 1. ed. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2009: 24–35.
6. Novaković S. Rakasta pretvorba celice – kancerogeneza in nastanek tumorjev – tumorigeneza = Malignant transformation of cell – cancerogenesis and tumor formation – tumorigenesis. In: Virant-Klun I, Smrkolj Š, editors. *Matične celice v reproduktivni medicini: od gametogeneze in vitro do nastanka raka = from gametogenesis in vitro to manifestations of cancer*. Znanstveno srečanje: Ljubljana, 2011 Dec 9. Ljubljana: Slovensko društvo za reproduktivno medicino, 2011: 130–42.
7. Novaković S. Imunologija tumorjev. In: Novaković S, Hočevar M, Jezeršek Novaković B, Strojan P, Žgajnar J, editors. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. 1st ed. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2009: 36–41.
8. MicroRNA database. Available online at <http://www.mirbase.org/>
9. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–11.
10. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68–74.
11. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28 (20): 3219–26.
12. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28 (3): 466–74.
13. Available online at <http://www.uptodate.com/contents/search>.

BIOLOŠKA ZDRAVILA V ONKOLOGIJI

Branko Zakotnik

Povzetek. Razvoj molekularne biologije je omogočil nova spoznanja o značilnostih rakavih celic in s tem bolj usmerjeno zdravljenje z biološkimi zdravili.

Biološka zdravila, ki jih trenutno uporabljamo, so bodisi monoklonska protitelesa, usmerjena proti receptorjem na celici ali njihovim rastnim dejavnikom (t.i. velike molekule), in zaviralci receptorskih tirozinskih kinaz in znotrajceličnih kaskadnih poti (t.i. male molekule). Vendar pa biološka zdravila žal ne delujejo samo na želeno tarčo v maligni celici, zato imajo tudi ta zdravila neželene učinke.

Danes se biološka zdravila uporabljajo za zdravljenje skoraj večine pacientov z raki, v prihodnje pa bodo na voljo verjetno za vse maligne bolezni. Z njihovo racionalno uporabo se bo preživetje bolnikov z rakom nedvomno izboljšalo, končni cilj pa je individualna tarčna terapija, prilagojena mutacijam v tumorjih posameznega pacienta.

UVOD

Mutacija genov v rakavi celici povzroči moteno regulacijo signalnih procesov, kar ima za posledico motnjo celičnega ciklusa, čezmerno delitev, nesmrtnost rakave celice (ni programirane celične smrti – apoptoze), neoangiogenezo (tvorbo novih žil), invazijo, migracijo in tvorbo oddaljenih zasevkov. Tarčno zdravljenje je usmerjeno v spremenjene signalne procese v celici z namenom, da jih prekine.

Biološka (tarčna) zdravila, ki jih trenutno uporabljamo, so bodisi monoklonska protitelesa, usmerjena proti receptorjem na površini celic ali njihovim rastnim dejavnikom (t.i. velike molekule), in zaviralci receptorskih tirozinskih kinaz in znotrajceličnih kaskadnih poti (t.i. male molekule), molekule, ki prodrejo v notranjost celic.

Vendar pa tarčna zdravila žal ne delujejo samo na želeno tarčo v maligni celici; zato imajo tudi neželene učinke, ki so odvisni od vrste tarčnih zdravil (monoklonska protitelesa lahko povzročajo tudi infuzijske in alergijske reakcije), in od tarče, na katero delujejo (npr. kožna toksičnost pri zaviralcih receptorjev za epidermalni rastni faktor).

V prispevku prikazujem biološka zdravila v onkologiji, ki so registrirana za solidne rake (raka dojke, gastrointestinalnega trakta, pljuč, ledvic, mehkih tkiv) in za limfome. Te maligne bolezni obsegajo večino, t.j. 98 % vseh primerov malignih bolezni. Ne bo govora o malignih hematoloških boleznih, kjer imajo biološka zdravila prav tako pomembno vlogo. Zdravila bom razdelil v skupine po glavnem načinu in mestu delovanja, zavedati pa se moramo, da jih zelo veliko deluje na več tarč hkrati. Prikazati želim, kakšen obseg bioloških zdravil je prišel v klinično prakso v tako kratkem času, saj so prva

registrirana zdravila z začetka tretjega tisočletja. Nekatera od naštetih zdravil je registrirala bodisi FDA (*Food and Drug Administration*) bodisi EMEA (*European Medicines Agency*) šele pred kratkim, in zato se vsa v praksi pri nas še ne uporabljajo, saj gre za draga zdravila, katerih zagotovitev plačevanja iz zdravstvenega zavarovanja zahteva precej časa. Naši bolniki pa so imeli dostop do nekaterih od teh zdravil že pred registracijo, v mednarodnih kliničnih raziskavah.

Prva molekularna tarča za zelo uspešno tarčno zdravilo v onkologiji je bil estrogenski receptor, ki se nahaja v hormonsko odvisnih tumorskih celicah, predvsem raka dojke. Vezava estrogena na ta estrogenski receptor tvori kompleks hormona in receptorja, ki aktivira ekspresijo specifičnih genov v jedru, ki stimulirajo celično rast in proliferacijo. Ta kompleks je torej gonilna sila rasti tumorja. Z zdravili, ki ta receptor blokirajo – prvo tako zdravilo je bilo tamoksifen – so dosegli odlične rezultate zdravljenja pri bolnicah z rakom dojke, in to z malo toksičnimi učinki. Kasneje so razvili proti temu receptorju še vrsto drugih zdravil, ki so bila ravno tako učinkovita. Če odkrijemo tarčo (encim, receptor...) v tumorski celici, ki je gonilna sila rasti tumorja, lahko torej z vplivom na to tarčo preprečimo rast tumorja; če je ta tarča le v tumorski celici, je tudi zelo malo sopojevov zdravljenja. Princip sinteze bioloških (tarčnih) zdravil je torej odkriti mutacijo, ki je gonilna sila rasti tumorja, ter proti tej tarči razviti učinkovito zdravilo. Na osnovi tega načela so prišla v klinično prakso v onkologiji tarčna zdravila.

TARČNA ZDRAVILA

1. Tarčna zdravila, ki zavirajo specifične encime in receptorje za rastne dejavnike, ki so udeleženi pri proliferaciji rakavih celic. Ta zdravila včasih imenujemo inhibitorji signalnih prenosov (ang. *signal transduction inhibitors*):
 - **Imatinib mezilat** je indiciran za zdravljenje gastrointestinalnih stromalnih tumorjev, nekaterih vrst levkemij, *dermatofibrosarkoma protuberans*, mielodisplastičnih sindromov, sistemske mastocitoze. Zavira vrsto encimov, ki se imenujejo tirozin-kinaze, ki so pri teh rakah mutirani in stalno aktivirani, tako da povzročajo nenadzorovano rast celic. Je mala molekula, ki vstopa v celice in jo bolniki zaužijejo v obliki tablet.
 - **Trastuzumab** je indiciran za zdravljenje tistih oblik raka dojke in želodca ki imajo na celični membrani čezmerno izražen receptor HER-2 (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*). Takih bolnikov je okoli 15 %. Zdravilo je monoklonsko protitelo, ki se veže na receptor HER-2. Mehanizem delovanja ni povsem znan. Najverjetneje učinkuje tako, da prepreči signale za rast, poleg tega pa ima

tudi druge učinke, kot je spodbujanje imunskega sistema, da napade celice z veliko izraženostjo tega receptorja.

- **Pertuzumab** je indiciran v kombinaciji s trastuzumabom in docetakse-lom za zdravljenje razsejanega raka dojke s čezmerno izraženim HER-2. Je monoklonsko protitelo, ki se veže na HER-2 na drugem mestu kot trastuzumab. To mesto omogoča interakcijo HER-2 z drugimi mem-branskimi receptorji, kot je EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*). Zdravilo najverjetneje preprečuje pošiljanje rastnih signa-lov HER-2 in inducira imunski sistem, da napada celice s čezmerno ekspresijo HER-2.
- **Lapatinib** je indiciran za zdravljenje razsejanega raka dojke, ki čez-merno izraža HER-2. Ta mala molekula inhibira več tirozin-kinaz, tudi tirozin-kinazno aktivnost HER-2. Bolniki prejemajo zdravilo v obliki tablet, ponavadi v kombinaciji s citostatikom kapecitabinom.
- **Gefitinib** in **erlotinib** sta indicirana za zdravljenje napredovalega adenokarcinoma pljuč z mutacijo EGFR (erlotinib tudi za raka tre-bušne slinavke). Ti mali molekuli inhibirata tirozin-kinazno aktivnost EGFR.
- **Cetuximab** je monoklonsko protitelo, registrirano za zdravljenje raz-sejanega raka debelega črevesa in danke brez mutacije KRAS, za primarno zdravljenje ploščatoceličnega karcinoma glave in vratu, sočasno z obsevanjem, in pri ponovitvi tega raka v kombinaciji s kemoterapijo. Zdravilo se veže na receptor EGF in preprečuje veza-vo rastnih dejavnikov ter tako preprečuje signalno aktivacijo in rast celic.
- **Panitumumab** je prav tako monoklonsko protitelo proti EGFR indici-ran za zdravljenje nekaterih bolnikov z razsejanim rakom debelega črevesa in danke.
- **Temsirolimus** je indiciran za zdravljenje napredovalega raka ledvic. Ta mala molekula je specifični inhibitor serin/treonin-kinaze, imeno-vane mTOR, ki je aktivirana v tumorskih celicah in povzroča njihovo rast in proliferacijo.
- **Everolimus** je indiciran za zdravljenje bolnikov z napredovalim ra-kom ledvic kot terapija drugega reda, pri subependimskih velikoce-ličnih astrocitomih, pri bolnikih s tuberozno sklerozo, pankreatičnih nevroendokrinih tumorjih in hormonsko odvisnem raku dojke, ki je postal odporen na hormonsko terapijo. Ta mala molekula se veže na protein imunofilin FK; z njim tvori kompleks, ki se veže na mTOR-kinazo in jo inhibira.

- **Vandetanib** je indiciran za zdravljenje razsejanega medularnega karcinoma ščitnice. Ta mala molekula se veže in inhibira aktivnost več tirozin-kinaz, kot so EGFR, VEGFR in RET.
 - **Vemurafenib** je indiciran za zdravljenje bolnikov z razsejanim malignim melanomom, ki imajo mutirano serin/treonin-kinazo BRAF (V600E). Je tudi majhna molekula.
 - **Krizotinib** je indiciran za zdravljenje bolnikov z rakom pljuč, pri katerih je izražena mutacija EML4-ALK. Ta mala molekula inhibira tirozin-kinazno aktivnost fuzijskega proteina EML4-ALK in s tem zmanjša rast tumorja in proliferacijo.
2. Tarčna zdravila, ki modificirajo funkcijo proteinov, ki regulirajo ekspresijo genov in drugih celičnih funkcij:
- **Vorinostat** in **romidepsin** sta indicirana za zdravljenje kožnega T-celičnega limfoma (CTCL) po neuspešnem zdravljenju s citostatiki. Ta mala molekula inhibira skupino encimov, imenovanih histonske deacetilaze (HDACs), ki odstranjujejo acetilne skupine iz vrste proteinov, vključno iz proteinov, ki regulirajo ekspresijo genov. S tem inducirajo celično diferenciacijo in apoptozo.
 - **Beksaroten** je ravno tako indiciran za zdravljenje nekaterih bolnikov s CTCL. Pripada spojinam, imenovanim retinoidi, ki so kemično sorodni vitaminu A. Selektivno se veže na retinoidne receptorje X in jih aktivira. Ko so aktivirani, skupaj z drugimi receptorji retinoidne kisline regulirajo ekspresijo genov, ki uravnavajo celično rast, preživetje in apoptozo.
 - **Alitretinoin**, tudi retinoid, je indiciran za zdravljenje kožnih lezij pri bolnikih s Kaposijevim sarkomom.
3. Tarčna zdravila, ki inducirajo apoptozo rakavih celic:
- **Bortezomib** je indiciran za zdravljenje bolnikov s plazmocitomom ali limfomom plaščnih celic. Bortezomib povzroča apoptozo (celično smrt) z vezavo na proteasom, ki regulira razgradnjo vrste proteinov, ki urejajo celično proliferacijo. Ta zdravila imenujemo proteasomski inhibitorji. Delujejo tudi na normalne celice, vendar ne hudo.
 - **Karfilzomib**, prav tako proteasomski inhibitor, je indiciran za zdravljenje plazmocitoma, ki je napredoval kljub bortezomibu.
 - **Pralatreksat** je indiciran za zdravljenje nekaterih bolnikov s perifernim T-celičnim limfomom. Je antifolat, molekula, ki moti DNA sintezo. Za razliko od ostalih antifolatov (npr metotreksat), ki motijo sintezo DNA vseh delečih se celicah se pralatreksat selektivno akumulira v malignih celicah ki izražajo protein RFC-1. Zato ga štejemo med tarčna zdravila.

4. Tarčna zdravila, ki blokirajo rast tumorskega žilja – neoangiogenezo:
- **Bevacizumab** je indiciran za zdravljenje bolnikov z razsejanim rakom debelega črevesa in danke, ledvic in pljuč. Bevacizumab je monoklonsko protitelo, ki se veže na VEGF (ang. *vascular epidermal growth factor*) in prepreči njegovo vezavo na receptorje na endotelijskih celicah in s tem prepreči rast novega žilja.
 - **Ziv-aflibercept** je rekombinantni fuzijski protein, indiciran za zdravljenje nekaterih bolnikov z razsejanim rakom debelega črevesa in danke. Sestavljen je iz delov dveh različnih receptorjev VEGF, združenih na delu proteina. Z vezavo z VEGF prepreči njihovo interakcijo z receptorji in angiogenezo.
 - **Sorafenib** je majhna molekula, tirozin-kinazni inhibitor, ki je indicirana za zdravljenje pacientov z napredovalim rakom ledvic ali hepatocelularnim karcinomom. Ena od kinaz, ki jo sorafenib inhibira, je udeležena v signalni poti, ki jo aktivira vezava VEGF na receptor. S tem zavira angiogenezo. Sorafenib blokira tudi encim, ki je udeležen pri celični rasti in delitvi.
 - **Sunitinib** je majhna molekula, tirozin-kinazni inhibitor, indiciran za zdravljenje razsejanega raka ledvic, gastrointestinalnega stromalnega tumorja, pankreatičnega nevroendokrinega tumorja. Sunitinib blokira poleg nekaterih drugih tudi kinaze, ki so udeležene pri VEGF-signalizaciji.
 - **Pazopanib** je indiciran za zdravljenje bolnikov z napredovalim rakom ledvic ali razsejanim sarkomom mehkih tkiv. Pazopanib je majhna molekula, ki inhibira vrsto tirozin-kinaz (VEGFR, c-KIT, PDGFR).
 - **Regorafenib** je indiciran za zdravljenje bolnikov z razsejanim rakom debelega črevesa in danke. Je majhna molekula, inhibitor več tirozin-kinaz (VEGFR, TIE2, PDGFR, RET, c-KIT, RAF).
 - **Kabozantinib** je indiciran za zdravljenje razsejanega medularnega raka ščitnice. Je majhna molekula, inhibitor več tirozin-kinaz (VEGFR, TIE2, PDGFR, RET, c-KIT, RAF).
5. Tarčna zdravila, ki delujejo tako, da pomagajo imunskemu sistemu pri uničevanju rakavih celic:
- **Rituksimab** je monoklonsko protitelo, indicirano za zdravljenje pacientov z nekaterimi B-celičnimi limfomi ali kronično limfocitno levkemijo (KLL)). Zdravilo se veže na molekulo CD20, ki se nahaja na celicah B in s tem sproži imunski odziv, ki povzroči uničenje teh celic. Rituksimab lahko tudi inducira apoptozo.
 - **Alemtuzumab** je monoklonsko protitelo, indicirano za zdravljenje bolnikov z B-celično KLL. Monoklonsko protitelo je usmerjeno proti

proteinu na površini celice B52, z vezavo na ta protein se sproži imunski odziv, ki uniči celice.

- **Ofatumumab** je monoklonsko protitelo proti CD20 na B-celicah. Indicirano je za zdravljenje bolnikov s KLL, ki se ne odzivajo na zdravljenje s fludarabinom in alemtuzumabom.
 - **Ipilimumab** je indiciran za zdravljenje bolnikov z razsejanim melanomom. To monoklonsko protitelo je usmerjeno proti citotoksičnim limfocitom T, vezanim na antigen 4 (CTLA-4), ki je izražen na površini aktiviranih celic T. Ipilimumab z inhibicijo CTLA-4 spodbudi imunski sistem, da napade melanomske celice.
6. Tarčna zdravila, ki delujejo tako, da monoklonska protitelesa, na katera so vezane toksične molekule, le-te prinesejo specifično do malignih celic.
- **Tositumomab** in **131I-tositumomab** sta indicirana za zdravljenje bolnikov z nekaterimi podtipi B-celičnih limfomov. Gre za mešanico monoklonskih protiteles proti CD20, vezanih na izotop I131. Delovanje je dvojno, imunski odziv z vezavo monoklonskega protitelesa na CD20 in selektivno sevanje celic z ekspresijo CD20.
 - **Ibritumomab tiuksetan** je indiciran za zdravljenje nekaterih bolnikov z B-celičnim limfomom. Gre za monoklonsko protitelo proti CD20, vezano na izotope (indij-111 ali itrij-90).
 - **Denilevkin diftitoks** je indiciran za zdravljenje nekaterih bolnikov s CTCL. Denilevkin diftitoks sestoji iz sekvenc proteina interlevkin-2, spojenih s toksinom difterije. Zdravilo se veže na celične receptorje IL-2, ki se nahajajo na nekaterih imunskih in malignih celicah. S tem citotoksični učinek toksina difterije usmerijo specifično na maligne celice.
 - **Brentuksimab vedotin** je indiciran za zdravljenje bolnikov z anaplastičnim velikoceličnim limfomom ali Hodgkinovo boleznijo, ki se ne odzivata na osnovna zdravila. Zdravilo sestoji iz monoklonskega protitelesa, ki je usmerjeno proti molekuli CD30 na membrani limfomskih celic, le-to pa je vezano na zdravilo monometilavristatin E (MMAE). Monoklonsko protitelo se veže na CD-30, kar povzroči internalizacijo kompleksa, v celici pa se sprosti MMAE in povzroči apoptozo.
 - **Konjugat trastuzumaba in antitubulskega citostatika maitanzina (T-DMI)** je po delovanju podoben vinkaalkaloidom. Zdravilo je po načinu delovanja nekakšen »trojanski konj«. Trastuzumab prinese zdravilo do celične tarče, nanj vezani citostatik pa nato »napade« rakavo celico.

STRANSKI UČINKI TARČNEGA ZDRAVLJENJA

Tarčno zdravljenje bolnikov je praviloma kronično, poteka do napredovanja bolezni oziroma do morebitnega razvoja nevzdržnih neželenih učinkov zdravljenja; gre za obdobje od nekaj mesecev do več let. Z navedenimi tarčnimi zdravili, neredko tudi z več zaporednimi linijami tarčnih zdravil, številnim bolnikom, ki bi jim pred ero tarčnih zdravil lahko nudili le podporno zdravljenje, pomembno izboljšamo preživetje in jim kljub mnogim potencialnim neželenim učinkom zdravljenja zagotovimo tudi zadovoljivo kakovost življenja. Pri večini bolnikov so neželeni učinki tarčnih zdravil sicer blagi do zmerni, ponavadi bolj neprijetni kot nevarni, občasno sicer pomembno vplivajo na kakovost življenja, le pri redkih bolnikih pa se razvijejo tudi ogrožajoči neželeni učinki zdravljenja.

Neželeni učinki tarčnih zdravil se pretežno kažejo kot:

- **spremembe splošnega počutja** (utrujenost, nemoč, spremembe razpoloženja, motnje spanja),
- **motnje delovanja prebavil** (spremembe okusa, občutljiva ustna sluznica, inapetenca, slabost, bruhanje, meteorizem, driske/zaprtje),
- **motnje delovanja krvožilnega sistema** (arterijska hipertenzija, srčno popuščanje, trombembolični dogodki, pogostejše krvavitve),
- **spremembe kože in lasišča** (kožni izpuščaj, suha/srbeča in občutljiva koža, hiperkeratoza, kožna razbarvanja, palmoplantarna dizestezija),
- **hormonske motnje** (hipotireoza) in še nekatere druge motnje.

Pri bolnikih, zdravljenih s tarčnimi zdravili, so pogosto patološki tudi laboratorijski izvidi: anemija, nevtropenija, trombocitopenija, hipofosfatemija, hiperurikemija, hiperglikemija, hiperlipidemija, zvišane vrednosti amilaze in lipaze in še nekateri drugi.

ZAKLJUČEK

Zdravljenje malignih bolezni postaja z novimi dognanji in prihodom bioloških zdravil zelo kompleksno in drago. Dokončno raka brez teh inovativnih zdravil ne bomo mogli obvladati. Zato bo treba uporabiti vse znanje in energijo za ukrepe, ki bodo raka kar najbolj preprečevali (primarna, sekundarna preventiva), tako da bomo lahko uporabili biološka zdravila pri vseh bolnikih, kjer tudi ti hudo dragi ukrepi ne bodo uspešni.

UPORABLJENA LITERATURA

1. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of

- HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 28; 376 (9742): 687–97.
2. Böll B, Borchmann P, Diehl V. Emerging drugs for Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 2010; 15 (4): 585–95.
 3. Brugarolas J. Renal-cell carcinoma – molecular pathways and therapies. *N Engl J Med* 2007; 356 (2): 185–87.
 4. Cabanillas F. Front-line management of diffuse large B cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2010; 22 (6): 642–5.
 5. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenás S, Szczésna A, Juhász E, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2010; 11 (6): 521–9.
 6. Cheson BD. Targeted treatment and new agents in follicular lymphoma. *Int J Hematol* 2010; 92 (1): 5–11.
 7. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347 (7): 472–80.
 8. Escudier B. Advanced renal cell carcinoma: current and emerging management strategies. *Drugs* 2007; 67 (9): 1257–64.
 9. Gelmon KA, Fumoleau, Verma S, Wardley AM, Conte PF, Miles D, et al. Results of a phase II trial of trastuzumab (H), pertuzumab (P) in patients (pts) with HER2 positive metastatic breast cancer (MBC) who had progressed during trastuzumab therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26 (Suppl): abstr 1026.
 10. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355 (26): 2733–43.
 11. Gore MA. Temsirolimus in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2007; 18 (Suppl. 9): ix87–8.
 12. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335–42.
 13. Johnston S, Pippin J Jr, Pivot X, Lichinitser M, Sadeghi S, Dieras V, et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 20; 27 (33): 5538–46.
 14. Jonker DJ, Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2040–8.
 15. Marcus R, Hagenbeek A. The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl* 2007; (67): 5–14.
 16. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361 (10): 947–57.
 17. Motzer JR, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 2010; 116 (18): 4256–65.
 18. O'Shaughnessy J, Blackwell KL, Burstein H, Storniolo AM, SledgeG, Baselga J, et al. A randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in heavily pre-treated HER2+ metastatic breast cancer progressing on trastuzumab therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26 (Suppl15): abstr 1015.

19. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 (16): 1659–72.
20. Repar A, Matos E, Zakotnik B. Tarčno zdravljenje razsejanih gastrointestinalnih stromalnih tumorjev v Sloveniji. *Onkologija* 2008; 12: (1): 13–6.
21. Rodriguez J, Gutierrez A, Obrador-Hevia A, Fernandez-Matos S, Cabanillas F. Therapeutic concepts in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2010; 85 (5): 371–86.
22. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with Oxaliplatin-based chemotherapy as first-line treatment in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2013–9.
23. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355 (24): 2542–50.
24. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 (2): 123–32.
25. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344 (11): 783–92.
26. Van Cutsem E, Lang I, D'haens G, Zaluski J, Koehne C, Folprecht G, et al. The CRYSTAL study: Assessment of the predictive value of KRAS status on clinical outcome in patients with mCRC receiving first-line treatment with cetuximab or cetuximab plus FOLFIRI. *Ann Oncol* 2008; 19 (Suppl 6): vi17-8.
27. Vogel CL, Burri A, Limentani S, Borson R, O'Shaughnessy J, Vukelja S, et al. A phase II study of trastuzumab-DM1 (T-DM1), a HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (MBC): Final results. *J Clin Oncol* 2009; 27 (Suppl): 1017.

OBRAVNAVA DEDNEGA RAKA DOJK IN JAJČNIKOV

Janez Žgajnar

Povzetek. Pri nosilcih mutacij genov, za katere danes vemo, da so povezane s pogostim zbolevanjem za rakom dojk in jajčnikov, uporabljamo različne ukrepe, s katerimi poskušamo zmanjšati zbolewnost za temi raki, podaljšati pričakovano življenjsko dobo in izboljšati kakovost življenja. V ta namen uporabljamo več strategij, med katerimi so: (i) poostren nadzor ogroženih zdravih posameznikov z namenom zgodnjega odkrivanja rakov dojk in jajčnikov, za katerega so značilni od zgodnjih let pogosti kontrolni pregledi z uporabo slikovne diagnostike (ii) preprečevanje zbolewnja z odstranjevanjem ogroženih organov (iii) preprečevanje zbolewnja s kemopreventivo. S kombinacijo ukrepov, najbolj pa s kirurško profilakso, lahko dosežemo dokazano podaljšanje pričakovane življenjske dobe ogroženih. Pri nosilcih mutacij je prilagojeno tudi kirurško in sistemsko zdravljenje že zbolelih. Pričakujemo lahko hiter razvoj obravnave teh ljudi v bližnji prihodnosti, načela individualne obravnave pa se bodo prenašala na obravnavo vseh bolnikov z rakom.

UVOD

Večina rakov dojk in jajčnikov je sporadičnih, le okoli 5–10 % jih je posledica dednih mutacij različnih genov v sklopu več sindromov, med katerimi so najpogostejše mutacije genov BRCA 1 in 2, sindrom Li-Fraumeni (gen p53), Cowdenov sindrom (gen PTEN), dedni sindrom difuznega raka želodca (gen CDH1) in Peutz-Jeghersov sindrom (gen STK 11). Ženske s temi sindromi niso bolj ogrožene le z rakoma dojk in jajčnikov, ampak tudi z nekaterimi drugimi raki, kar je pri obravnavi teh bolnic prav tako treba upoštevati. Največ pozornosti namenjamo obravnavi nosilk mutacij genov BRCA 1 in 2, ker so tudi najpogostejše. V večini populacij je nosilcev teh mutacij približno 1 : 300–500, so pa nekatere bolj zaprte populacije, kjer je prevalenca mutacij večja, na primer pri Aškenazih, kjer je pogostost mutacij 1 : 40.

Nosilci mutacij so torej bolj ogroženi z rakoma dojk in jajčnikov ter nekaterimi drugimi raki; bolezen se pojavlja v zgodnejših letih, več je tudi bilateralnih rakov, patohistološke značilnosti tumorjev pa se lahko razlikujejo glede na mutacijo genov. Pri nosilcih mutacij BRCA 1 so tumorji večinoma hormonsko neodzivni in HER-2-negativni, pri BRCA 2 pa običajno hormonsko odzivni. Zato so se v zadnjih 20 letih razvili usmerjeni pristopi k obravnavi spoznanih nosilcev, ki jih lahko delimo v tri velike skupine, in sicer: poostreni nadzor zdravih nosilcev, preprečevanje nastanka bolezni in prilagojeno zdravljenje bolnih nosilcev mutacij. Pomembno je poudariti, da je v izboru ukrepov za posameznika ključna vloga vsakega nosilca posebej, ki se lahko odloči sam, kateri ukrep mu najbolj ustreza, svojo odločitev pa seveda lahko kasneje spremeni.

NADZOR NOSILCEV MUTACIJ

Zaradi večje ogroženosti z raki ter pojavljanja pri mlajših, kot to velja za sporadične rake, je intenzivni nadzor usmerjen v čim hitrejšo odkrivanje rakov, da bi bilo zdravljenje čim uspešnejše. Metaanaliza je pokazala, da je verjetnost za razvoj raka dojk pri nosilkah gena BRCA 1 do 70. leta starosti v povprečju 57-odstotna (47–66-odstotna), za razvoj raka jajčnikov pa 25–65-odstotna. Verjetnost razvoja raka dojk pri nosilkah mutacij BRCA 2 je v povprečju 49-odstotna (40–57-odstotna), raka jajčnikov pa 15–20-odstotna (1). Pri mutacijah obeh genov je relativna ogroženost z rakom trebušne slinavke večja za 2,2–3,5-krat. Zlasti so z rakom dojk ogroženi moški, ki so nosilci mutacij BRCA 2, in to skoraj 100-krat bolj kot nenosilci, z rakom prostate pa skoraj 20-krat (2, 3).

V svetu je v uporabi več algoritmov nadzora nosilcev mutacij; značilni so pogosti klinični pregledi ter izmenjajoče se slikovne preiskave, kot so mamografija, ultrasonografija ter magnetnoresonančno slikanje (MRI). MRI se je uveljavil kot daleč najboljša metoda pri mlajših nosilkah, ker je zelo občutljiva, hkrati pa neškodljiva preiskava; obstajajo namreč podatki, da pogoste mamografije, zlasti pri mlajših ženskah, lahko večajo verjetnost raka dojk. Zelo intenzivno je pri teh nosilkah presejanje za raka jajčnikov, žal pa vsi podatki kažejo, da je pri njih neučinkovito in ne zmore odkriti zgodnejših oblik raka jajčnikov. Algoritem, ki ga uporabljamo na OI Ljubljana je zapisan v Smernicah zdravljenja raka dojk in dostopen na elektronskem naslovu http://www.onko-i.si/uploads/media/Smernice_zdravljenja_raka_dojk_2011.pdf.

PREPREČEVANJE RAKA DOJK IN JAJČNIKOV

Na voljo imamo dve strategiji: kirurško profilakso (odstranjevanje ogroženih organov) in farmakopreventivo.

Kirurška profilaksa je daleč najuspešnejša metoda preprečevanja raka dojk in jajčnikov. Dolgoletno sledenje dokazuje, da zmanjša verjetnost raka dojk za najmanj 90 %. Zdi se, da k podaljšanju pričakovane življenjske dobe nosilke največ prispeva odstranitev dojk v četrtem desetletju življenja, pričakovana korist pa je odvisna tudi od tega, ali je mutiran gen BRCA 1 ali BRCA 2 (4). Nosilkam mutacij vselej ponudimo tudi takojšnjo rekonstrukcijo, zato je tip kirurškega poseg odvisen od izbire rekonstrukcije. Po zadnjih podatkih je varna tudi mastektomija z ohranitvijo bradavice (ang. *nipple sparing mastectomy*), pri kateri kirurg ohrani kožni pokrov dojk in kolobar z bradavico, pa čeprav je ostanek žleznega tkiva pri tem posegu nekoliko večji kot pri standardni mastektomiji z ohranitvijo le kože (ang. *skin sparing mastectomy* (5)).

Še uspešnejša je kirurška odstranitev jajčnikov, ki zmanjša ogroženost z rakom za najmanj 96 %. Pri tem posegu je nujno vselej odstraniti jajcevod, od koder pri nosilkah mutacij izvira rak jajčnikov. Zato preizkušajo kirurško metodo, pri kateri bi ohranili jajčnike, odstranili bi le jajcevod ter fimbrije (6); največji stranski učinek odstranitve jajčnikov je namreč zgodnja menopvza, ki bi se ji tako lahko izognili. Zaenkrat metode še ne priporočajo. Prav tehtanje med učinkovito kirurško profilakso in stranskimi učinki postavi večino preventivnih odstranitvev jajčnikov v starostno obdobje 35–40 let. Odstranitev jajčnikov pomembno zmanjša tudi grožnjo raka dojk, če je opravljena pri ženskah v rodni dobi: za 1/3 pri nosilkah mutacij gena BRCA 1 in kar za 2/3 pri nosilkah mutacij gena BRCA2 (7).

Odstranitev jajčnikov seveda poruši hormonsko ravnovesje operirane ženske, predvsem v predmenopavznem obdobju, pa tudi v meni (8), kar pomembno poslabša življenje, hkrati pa še zveča ogroženost z nekaterimi boleznimi, kot so kardiovaskularne, osteoporoza idr. (9). Dolgoročne posledice so danes še dokaj neznane. Zato je nadomestno hormonsko zdravljenje teh žensk pomembno vprašanje. Zdi se, da je kratkotrajna uporaba (3–4 leta) predvsem estrogenskih preparatov varna in statistično značilno ne zveča ogroženosti z rakom dojk (10). V vsakem primeru pa je pri ženskah, ki so že zbolele za rakom dojk, uporaba nadomestnega hormonskega zdravljenja kontraindicirana.

V kemopreventivi raka dojk je na voljo že precej podatkov, ki kažejo, da tamoksifen manjša ogroženost z rakom dojk za približno 60 %, vendar le pri nosilkah mutacij BRCA 2, ne pa BRCA 1. To je razumljivo, ker so prvi večinoma hormonsko odzivni. Zanimivo je, da pri že bolnih nosilkah manjša verjetnost raka druge dojke pri mutacijah obeh genov. Ne glede na to, se danes kemopreventiva le redko uporablja za preprečevanje raka pri zdravih nosilkah. Pričakujemo pa nove podatke. Še posebej je izziv preprečevanje hormonsko neodzivnega raka dojk pri nosilkah mutacij BRCA 1 (11).

Zanimiva je kemopreventiva raka jajčnikov z uporabo peroralnih kontraceptivov. Rezultati si precej nasprotujejo, in to predvsem zaradi zelo različnih oblik kontracepcije v preteklosti in različne dolžine jemanja. Nedavna metaanaliza pa je pokazala, da peroralna kontracepcija pomembno zmanjša verjetnost raka jajčnikov pri nosilkah mutacij BRCA 1 in 2, ne da bi hkrati zvečala ogroženost z rakom dojk (12).

ZDRAVLJENJE RAKA PRI NOSILKAH MUTACIJ

V zdravljenju nosilk mutacij se postavlja več vprašanj, ki so povezana z verjetnostjo ponovitve bolezni, odziva tkiv na zdravljenje in morebitne specifične občutljivosti na določena zdravila. Verjetnost raka druge dojke je pri

nosilkah med 28 in 30 % v 15 letih (pri nenosilkah 5–10 %) (13), kar vsekakor vpliva na kirurški pristop. Ne glede na večjo verjetnost ponovitve lokalne bolezni je preživetje bolnic nosilk mutacij in tistih s sporadičnimi tumorjem enako, zato so strokovno sprejemljive vse opcije kirurškega zdravljenja. Za odstranitev druge dojke se odloči več bolnic nosilk mutacije kot pa nenosilk. Zanimivo je, da je verjetnost ponovitve raka dojke v isti dojki mnogo večje pri nosilkah, če niso dobivale adjuvantne kemoterapije, sicer pa ni statistično značilne razlike (14). Sistemsko zdravljenje je torej ključno, ki omogoča varno ohranitveno kirurško zdravljenje. Izbira kirurškega zdravljenja je odvisna od informacije o navzoči mutaciji; včasih nam je že ob nastopu bolezni na voljo, kar moramo uporabiti v pogovoru z bolnico.

Nosilke mutacij z rakom dojk načeloma zdravimo enako kot nenosilke. Kljub temu se nam že v bližnji prihodnosti obetajo spremembe, saj se zdi, da utegnejo biti nekatera zdravila, kot so inhibitorji PARP ter cisplatin, zaradi svojega mehanizma delovanja še posebej učinkovita pri trojno negativnih tumorjih nosilk mutacij BRCA 1, vendar moramo počakati na izsledke kliničnih raziskav, ki so v teku (15, 16).

LITERATURA

1. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* 2007; 25 (11): 1329–33.
2. Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol* 2004; 22 (4): 735–42.
3. Agalliu I, Gern R, Leanza S, Burk RD. Associations of high-grade prostate cancer with BRCA1 and BRCA2 founder mutations. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (3): 1112–20.
4. Kurian AW, Sigal BM, Plevritis SK. Survival analysis of cancer risk reduction strategies for BRCA1/2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2010; 28 (2): 222–31.
5. Stoler AJ, Wang J. Terminal duct lobular units are scarce in the nipple: implications for prophylactic nipple-sparing mastectomy: terminal duct lobular units in the nipple. *Ann Surg Oncol* 2008; 15 (2): 438–42.
6. Leblanc E, Narducci F, Farre I, Peyrat JP, Taieb S, Adenis C, et al. Radical fimbriectomy: a reasonable temporary risk-reducing surgery for selected women with a germ line mutation of BRCA 1 or 2 genes? Rationale and preliminary development. *Gynecol Oncol* 2011; 121 (3): 472–6.
7. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA* 2010; 304 (9): 967–75.
8. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Kritiz-Silverstein D, von Muhlen D. Hysterectomy, oophorectomy, and endogenous sex hormone levels in older women: the Rancho Bernardo study. *J Clin Endocr Metab* 2000; 85 (2): 645–51.
9. Parker WH, Jacoby V, Shoupe D, Rocca W. Effect of bilateral oophorectomy on women's long-term health. *Womens Health (London, Engl)* 2009; 5 (5): 565–76.
10. Stan DL, Shuster LT, Wick MJ, Swanson CL, Pruthi S, Bakkum-Gamez JN. Challenging and complex decisions in the management of the BRCA mutation carrier. *J Womens Health (Larchmt)* 2013; 22 (10): 825–34.

11. Christinat A, Pagani O. Practical aspects of genetic counseling in breast cancer: lights and shadows. *Breast* 2013; 22 (4): 375–82.
12. Cibula D, Zikan M, Dusek L, Majek O. Oral contraceptives and risk of ovarian and breast cancers in BRCA mutation carriers: a meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011; 11 (8): 1197–207.
13. Metcalfe K, Gershman S, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Kim-Sing C, et al. Predictors of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer* 2011; 104 (9): 1384–92.
14. Pierce LJ, Phillips KA, Griffith KA, Buys S, Gaffney DK, Moran MS, et al. Local therapy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with operable breast cancer: comparison of breast conservation and mastectomy. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121 (2): 389–98.
15. Bayraktar S, Gluck S. Systemic therapy options in BRCA mutation-associated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 135 (2): 355–66.
16. Lowry KP, Lee JM, Kong CY, McMahon PM, Gilmore ME, Cott Chubiz JE, et al. Annual screening strategies in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers: a comparative effectiveness analysis. *Cancer* 2012; 118 (8): 2021–30.

OBRAVNAVA DEDNEGA RAKA PROSTATE

Boštjan Šeruga

Povzetek. Rak prostate se pogosto pojavlja v nekaterih družinah in dobršen del ogroženosti njihovih članov s tem rakom je mogoče pripisati dedovanju. Z mutacijami v visoko penetrantnih genih, kot sta BRCA2 in HOXB13, ter z znanimi genski polimorfizmi, ki večajo možnost raka prostate, je mogoče razložiti samo manjši delež vseh primerov dednega raka prostate. Nekatera strokovna združenja priporočajo zgodnje presejanje za raka prostate pri moških, ki so družinsko obremenjeni s tem rakom. Pričakovati je, da bodo priporočila za obravnavo dednega raka prostate v prihodnje sledila novim molekularnim odkritjem na tem področju.

UVOD

Rak prostate je v razvitem svetu veliko zdravstveno in finančno breme. V zadnjih letih je v obravnavi raka prostate sicer bil dosežen napredek, vendar pri tej bolezni še zmeraj nimamo na voljo natančnejših orodij, s pomočjo katerih bi lahko vsakemu posameznemu moškemu, ki je bolj ogrožen z rakom prostate ali je že zbolel za njim, optimalno "prikrojili" obravnavo oziroma zdravljenje. Napredek v genski tehnologiji je dal pomembna spoznanja, ki so omogočila preprečevanje, zgodnje odkrivanje in zdravljenje nekaterih vrst raka: odkritje dednih mutacij v genih BRCA1/2, na primer, ki predvsem (ne pa izključno) zvečajo grožnjo raka dojke in jajčnikov, je omogočilo ustrezno zgodnje ukrepanje v ogroženih družinah. Določene pridobljene (somske) genske nepravilnosti v tumorskem tkivu (npr. aktivirajoča mutacija EGFR pri nedrobnoceličnem pljučnem raku ali translokacija BCR-ABL pri kronični mieloični levkemiji) so tarče za učinkovitejše zdravljenje s sodobnimi tarčnimi zdravili.

DRUŽINSKA OBREMENJENOST IN RAK PROSTATE

Najpomembnejši nevarnostni dejavniki za razvoj raka prostate so starost, črnska rasa in družinska obremenjenost z rakom prostate. Vplivi iz okolja, ki sicer niso dobro definirani, igrajo pri nastanku raka prostate pomembno vlogo. Glede na švedske podatke je 20,2 % bolnikov, ki so za rakom prostate zboleli do svojega 72. leta, bilo družinsko obremenjenih z rakom prostate, kar pomeni, da so za rakom prostate zboleli tudi njihovi očetje in/ali bratje (1, 2). Delež bolnikov z družinsko obremenjenostjo je bil pri bolnikih s rakom prostate večji kot pri bolnicah z rakom dojke (13,6 %) in bolnikih s kolorektalnim rakom (12,8 %) (1). Večje ko je število zbolelih moških v prvem kolenu (oče ali bratje) in manjša ko je njihova starost ob pojavu bolezni, toliko bolj je naslednik ogrožen z rakom prostate in tudi s smrtjo zaradi tega raka (3). Moški, star manj kot 65 let, čigar trije bratje so že

zboleli za rakom prostate, ima – na primer – 23-krat večjo verjetnost, da bo zbolel za rakom prostate kot enako star moški, ki ni družinsko obremenjen s tem rakom; za moškega iste starosti pa je verjetnost raka prostate večja samo 2–3-krat, če je za tem rakom že zbolel samo oče ali samo en brat (3).

DEDNI RAK PROSTATE

Družinska obremenjenost z rakom prostate je lahko posledica tako dednih kot drugih, zunanjih dejavnikov. Izsledki obsežne raziskave, ki je vključevala dvojajčne in enojajčne dvojčke iz Švedske, Danske in Finske kažejo, da kar 42 % ogroženosti z rakom prostate lahko pripišemo dednim dejavnikom, kar je največ med vsemi preučevanimi raki (4). Kljub temu da dedovanje igra pomembno vlogo pri raku prostate, pa molekularna osnova dednega raka prostate še ni dobro razumljena.

Podedovane mutacije v visoko penetrantnih genih BRCA1 in BRCA2 ter HOXB13 sicer zvečajo verjetnost raka prostate, vendar je delež bolnikov z rakom prostate, ki so nosilci teh mutacij, majhen. BRCA1 in BRCA2 sta proteina, ki sodelujeta pri popravilu okvarjene dvojnovijačne DNA in tako skrbita za nemoteno funkcioniranje genoma. Nosilci mutacije v genu BRCA2 imajo kar 35–40-odstotno verjetnost, da zbolijo za rakom prostate in imajo v primerjavi z moškimi v splošni populaciji tudi izrazito večjo verjetnost, da za rakom prostate zbolijo zgodaj v življenju (5, 6). Izsledki raziskav v Veliki Britaniji in ZDA kažejo, da je samo 0,8–2,6 % moških, ki zbolijo za rakom prostate v starosti ≤ 55 let, nosilcev mutacije BRCA2 (6, 7). Nadalje: pri bolnikih z družinsko obremenjenostjo zaradi raka prostate je mutacijo v genu BRCA2 mogoče najti pri < 5 % bolnikov (8). Nosilci mutacije v genu BRCA1 imajo 3–8-odstotno verjetnost, da zbolijo za rakom prostate in, podobno kot moški z mutacijo BRCA2, tudi ti moški zbole vajo zgodaj v življenju (pred 65. letom starosti) (9). V primerjavi z moškimi z rakom prostate, ki niso nosilci mutacije BRCA2, imajo moški z rakom prostate in z mutacijo BRCA2 večjo verjetnost, da je njihov tumor agresivnejši in da bodo tudi umrli zaradi raka prostate (10).

Gen HOXB13 se nahaja na kromosomu 17q in kodira transkripcijski faktor, ki je pomemben za normalen razvoj prostate. Mutacija G84E v genu HOXB13 zveča verjetnost raka prostate približno 20-krat. Mutacija je pogostejša pri moških, ki so družinsko obremenjeni in za rakom prostate zbolijo zgodaj v življenju (3,1 %), kot pri moških, ki zbolijo kasneje v življenju in niso družinsko obremenjeni z rakom prostate (0,6 %) (11). Podobno kot mutacija BRCA2 se torej tudi mutacija v genu HOXB13 pojavlja redko pri moških z rakom prostate, ki so družinsko obremenjeni.

V dednem zapisu se ljudje med seboj razlikujemo samo v približno 0,1 %, kar sicer pomeni več milijonov baznih parov DNA (12). Najpogostejši vzrok za razlikovanje DNA med posamezniki so variacije oziroma polimorfizmi v posameznih nukleotidih (ang. *single-nucleotide polymorphisms*, SNPs) določenih genov, ki se dedujejo. Z raziskavami tipa "genom široke povezanosti" (ang. *genome-wide association studies*), ki so pravzaprav raziskave tipa »primer-kontrola«, raziskovalci iščejo polimorfizme posameznih genov, ki večajo verjetnost za nastanek določene bolezni. Pri raku prostate so doslej tako odkrili več kot 30 genskih polimorfizmov (13). Problem genskih polimorfizmov je, da vsak posamezni polimorfizem zveča verjetnost raka prostate le do največ 1,3-krat in da z vsemi do sedaj znanimi genskimi polimorfizmi lahko razložimo samo približno 25 % dednega raka prostate (14).

OBRAVNAVA BOLNIKOV Z DEDNIM RAKOM PROSTATE

Zaenkrat ni posebnih priporočil za obravnavo dednega raka prostate. Medtem ko večina strokovnih združenj ne priporoča rutinskega presejanja za raka prostate oziroma opozarjajo na previdnost, kjer presejanje poteka, pa nekateri priporočajo zgodnejše in pogostejše presejanje pri moških z družinsko obremenjenostjo z rakom prostate (npr. začetek presejanja že pri 40. letu) (15). Trenutno ni priporočil za gensko testiranje za bolnike, ki so že zboleli za rakom prostate in so ali pa niso z njim družinsko obremenjeni. Boljše poznavanje molekularne osnove dednega raka prostate bo privedlo do bolj usmerjenih priporočil, kako obravnavati moške, ki so bolj ogroženi z rakom prostate ali pa so za njim že zboleli.

ZAKLJUČEK

Ko se rak prostate se pojavlja pri več članih istega družinskega drevesa, je dobršen del nevarnosti za njegov nastanek mogoče pripisati dedovanju. Čeprav je dedovanje pomembno pri moških, ki so družinsko ogroženi z rakom prostate, pa zaenkrat o tem ostaja še veliko neznanega. Z mutacijami v visoko penetrantnih genih, kot sta BRCA2 in HOXB13, ter z znanimi genski polimorfizmi, ki večajo ogroženost s tem rakom, lahko trenutno razložimo samo manjši delež vseh »dednih« primerov. Nekatera strokovna združenja priporočajo, da bi moške, ki so družinsko obremenjeni z rakom prostate, začeli zgodaj presegati, vendar splošno sprejetih priporočil še ni. Pričakovati je, da bodo nastala po novih molekularnih odkritjih na področju raka prostate.

LITERATURA

1. Hemminki K, Sundquist J, Lorenzo Bermejo J. How common is familial cancer. *Ann Oncol* 2008; 19:163–7.

2. Hemminki K, Sundquist J, Lorenzo Bermejo J. Familial risks for cancer as the basis for evidence-based clinical referral and counseling. *Oncologist* 2008; 13: 239–47.
3. Brandt A, Bermejo JL, Sundquist J, Hemminki K. Age-specific risk of incident prostate cancer and risk of death from prostate cancer defined by the number of affected family members. *Eur Urol* 2010; 58: 275-80.
4. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, 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. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, 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.
6. Agalliu I, Karlins E, Kwon EM, Iwasaki LM, Diamond A, Ostrander EA, et al. Rare germline mutations in the BRCA2 gene are associated with early-onset prostate cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 826–31.
7. Edwards SM, Kote-Jarai Z, Meitz J, Hamoudi R, Hope Q, Osin P, et al. Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1–12.
8. Gayther SA, de Foy KA, Harrington P, Pharoah P, Dunsmuir WD, Edwards SM, et al. The frequency of germ-line mutations in the breast cancer predisposition genes BRCA1 and BRCA2 in familial prostate cancer. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group United Kingdom Familial Prostate Cancer Study Collaborators. *Cancer Res* 2000; 60: 4513–8.
9. Thompson D, Easton DF; Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1358–65.
10. Gallagher DJ, Gaudet MM, Pal P, Kirchoff T, Balistreri L, Vora K, et al. Germline BRCA mutations denote a clinicopathologic subset of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2115–21.
11. Ewing CM, Ray AM, Lange EM, Zuhlke KA, Robbins CM, Tembe WD, et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med* 2012; 366: 141–9.
12. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27: 234–6.
13. Kim ST, Cheng Y, Hsu FC, Jin T, Kader AK, Zheng SL, et al. Prostate cancer risk-associated variants reported from genome-wide association studies: meta-analysis and their contribution to genetic Variation. *Prostate* 2010; 70: 1729–38.
14. Kote-Jarai Z, Olama AA, Giles GG, Severi G, Schleutker J, Weischer M, et al. Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study. *Nat Genet* 2011; 43: 785–91.
15. Prostate cancer early detection. National cancer comprehensive network. Available at http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate_detection.pdf (9. 8. 2013).

OBRAVNAVA DEDNEGA RAKA DEBELEGA ČREVESA IN DANKE

Janja Ocvirk

Povzetek. Rak debelega črevesa in danke (RDČD) je druga najpogostejša oblika raka v populaciji obeh spolov skupaj. Njegova incidenca še vedno narašča, tako da je bilo v Sloveniji v letu 2009 odkritih 1568 novih primerov. Nekoliko pogostejši je pri moških kot pri ženskah. Več kot 2/3 bolnikov je starejših od 65 let. Običajno – v okrog 60 % primerov – nastane sporadično, kar pomeni, da v družinski anamnezi zbolelega ni drugih primerov tega raka. Pri 30–35 % primerov pa je v več generacijah zbolelo za tem rakom več sorodnikov; pravimo, da gre za družinskega raka. Ko pa se rak (v 5–10 % primerov) pojavi zaradi mutacij, ki se dedujejo, gre za dednega raka debelega črevesa in danke. Bolniki z dednimi oblikami RDČD so mlajši, zbolijo okoli 10–20 let prej kot drugi, njihova bolezen pa je tudi agresivnejša. Nosilci mutacije so bolj ogroženi z RDČD kot tisti, ki te mutacije nimajo. Ne zbolijo vsi nosilci, ker pa je kombinacij mutacij več in je tudi njihovo dedovanje dokaj kompleksno, razlikujemo več sindromov dednega RDČD. Med njimi sta daleč najpogostejša dedni nepolipozni RDČD, imenovan tudi Lynchov sindrom, in družinska adenomatozna polipoza. Bolnike z dednimi oblikami je treba prepoznati, jim omogočiti genetsko svetovanje in jih multidisciplinarno obravnavati s priporočenimi pregledi in zdravljenjem.

UVOD

Rak debelega črevesa in danke (RDČD) je druga najpogostejša oblika raka v populaciji obeh spolov skupaj, takoj za kožnim nemelanomskim rakom. Njegova incidenca še vedno narašča, tako da je bilo v Sloveniji v letu 2009 odkritih 1568 novih primerov. Nekoliko pogostejši je pri moških (932 novih bolnikov) kot pri ženskah (636). Več kot 2/3 zbolelih je starejših od 65 let (1). Običajno nastane sporadično, kar pomeni da zbolijo eden v družini, v družinski anamnezi tega raka ni; tovrstnih primerov je okoli 60 %. Pri 30–35 % primerov je v več generacijah družine več bolnikov; govorimo o družinskem raku. V 5–10 % RDČD nastane zaradi mutacij, ki se dedujejo; gre za dednega raka debelega črevesa in danke.

Znaki RDČD so neznačilni, nekateri bolniki nimajo nobenih težav, drugi lahko tožijo zaradi bolečin v trebuhu, napenjanja, vetrov, minimalnih sprememb v iztrebljanju, krvi v blatu, slabosti. Večina teh znakov je povezanih tudi z drugimi boleznimi, kot so razjede na želodcu, žolčni kamni, hemoroidi, reakcije na hrano, zaradi česar veliko ljudi ne gre na pregled k zdravniku. Drugi bolezenski znaki so odvisni od lege tumorja v črevesu. Tumorji desne strani debelega črevesa lahko povzročajo krče v trebuhu, izgubo telesne teže, tipno tumorsko maso na desni strani trebuha, izguba krvi povzroča slabokrvnost in z njo povezane klinične znake, kot so utrujenost, vrtoglavica, šumenje v ušesih. Tumorji leve strani črevesa pa lahko povzročajo krče ali tope bolečine v trebuhu, slabost, bruhanje, izmenjavo zaprtja in drisk.

Lahko se pojavljajo tudi občasne krvavitve iz črevesa. Tumorji, ki vzniknejo v danki, dajejo občutek polne danke, pojavljajo se krvavitve iz danke in spremembe v premeru iztrebka, ki je tanjši. Glede na neznačilnost simptomov, ki so seveda enaki pri sporadičnih in dednih oblikah, smo tovrstne rake odkrivali velikokrat v napredovali obliki. Da bi to izboljšali, je bi uveden presejalni program Svit, namenjen populaciji od 50–69 let, za paciente z dedno obliko RDČD pa imamo genetsko svetovanje.

Številne raziskave potrjujejo, da je rak debelega črevesa in danke posledica kombinacije medsebojnega delovanja dednih dejavnikov in vplivov okolja. Verjetnost, da bi zboleli za rakom debelega črevesa in danke, dokazano večajo starost, vplivi okolja in nezdravo življenje (nezdrava in čezmerna prehrana, uživanje alkohola, kajenje, telesna neaktivnost), črevesni polipi, kronične vnetne črevesne bolezni (ulcerozni kolitis, Crohnova bolezen), poprejšnji raki debelega črevesa in danke ter dedna obremenjenost. So družine, kjer skozi več generacij zbolijo posamezniki za RDČD, kar pomeni, da gre za družinskega RDČD. Ljudje, ki izhajajo iz takih družin, so nekoliko bolj ogroženi s tem rakom kot tisti, ki nimajo sorodnikov, ki so že zboleli za RDČD. Starost, v kateri zbolijo, pa je enaka – običajno po 60. letu (1, 2).

Družine, v katerih se RDČD pojavlja v vseh generacijah, so obremenjene z dednim rakom debelega črevesa in danke. Člani zbolevali mlajši, v zgodnji odrasli dobi, oziroma vsaj 10–20 let prej kot drugi ljudje s tem rakom (2, 3).

DEDNI RAKI DEBELEGA ČREVESA IN DANKE

Dedni RDČD nastane zaradi mutacij, ki se dedujejo. Ljudje, ki so nosilci mutacije, so bolj ogroženi z RDČD kot tisti, ki te mutacije nimajo. Ne zbolijo vsi nosilci mutacij, ker pa je kombinacij mutacij več in je tudi njihovo dedovanje dokaj kompleksno, razlikujemo več sindromov dednega RDČD. Med njimi sta daleč najpogostejša dedni nepolipozni RDČD, imenovan tudi Lynchev sindrom, in družinska adenomatozna polipoza.

Dedni nepolipozni rak debelega črevesa in danke – Lynchev sindrom

Lynchev sindrom je najpogostejša oblika dednega RDČD. Njegov delež med vsemi primeri RDČD znaša 1–3 %. Sindrom se prenaša avtosomsko dominantno. Povezan je z mutacijami popravila napak pri podvajanju DNA (MMR), na genih MLH1, MSH2, MSH6 in PMS2. Nosilci mutacij so bolj ogroženi z RDČD (za 30–70 %), rakom endometrija (za 30–60 %) in drugimi tumorji prebavil (za 5–15 %). Povprečno zbolevali med 40. in 60. letom. Nosilci mutacije gena MLH1 zbolevali najmlajši. Okvara MSH2 pomeni tudi večjo ogroženost z drugimi vrstami raka prebavil, okvara MSH6 z rakom endometrija, okvaro PMS2 pa spremlja manjša ogroženost z RDČD in

endometrija kot druge mutacije. Približno 80 % mutacij je v genih MLH1 in MSH2, 10–12 % v genu MSH6, v PMS2 pa 2–3 %. Ker so simptomi in znaki RDČD nespecifični, so izdelali merila, ki pomagajo prepoznati pacienta z dednim nepolipoznim kolorektalnim rakom (ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) in ga napotiti na genetsko svetovanje (2, 3). Uporabljamo dvojje merili: Amsterdamska (4) in revidirane Smernice Bethesda (5, 6).

Po **Amsterdamskih merilih I** ima pacient dednega RDČD, če imajo RDČD vsaj trije sorodniki in so izpolnjeni vsi naslednji pogoji:

- eden od zbolelih mora biti sorodnik v prvem kolenu,
- prizadeti morata biti vsaj dveh zaporedni generaciji,
- vsaj en sorodnik je za RDČD zbolel pred 50. letom starosti,
- treba je izključiti družinsko adenomatozno polipozo,
- tumor mora biti histološko potrjen.

Amsterdamska merila II obsegajo vsa merila iz skupine I, poleg njih pa upoštevajo še primere drugih, povezanih rakov: rak endometrija, tankega črevesa, sečevoda, ledvic ali medenice.

Revidirane smernice Bethesda (5, 6) določajo, kdaj je treba v tumorju pacienta z RDČD iskati mikrosatelitsko nestabilnost (ang. *microsatellite instability*, MSI). Izpolnjen mora biti vsaj eden od naslednjih pogojev:

- če je bolnik z RDČD mlajši od 50 let,
- če ima bolnik (ne glede na njegovo starost) poleg RDČD sinhrono ali metahrono kakšen drug tumor, ki je v sklopu Lynchevega sindroma,
- če je bolnik z RDČD mlajši od 60 let in ima tumor z visoko MSI,
- če ima človek z RDČD najmanj enega sorodnika z RDČD ali kakim drugim tumorjem, povezanim z Lynchevim sindromom, in je ta sorodnik zbolel pred 50. letom starosti,
- če ima bolnik z RDČD med sorodniki vsaj dva, ki sta ne – ne glede na starost ob diagnozi – zbolela za katerim koli tumorjem v sklopu Lynchevega sindroma.

Najboljše je, če se gensko testiranje mutacij na genih MMR opravi najprej pri najmlajšem družinskem članu, ki je zbolel za RDČD, nato pa še pri ostalih članih družine (7).

Sledenje bolnikov

Ker bolnike z Lynchevim sindromom bolj ogroža RDČD, ki tudi hitreje napreduje, so napravili priporočila za zdravstveno skrb za to populacijo: kolonoskopije v 3-letnih intervalih, ki lahko zmanjšajo pojav RDČD in z njim povezano umrljivost, naj se začnejo v starosti 20–25 let. Zgornje starostne

omejitve ni, kolonoskopije naj se ponavljajo v odvisnosti od zdravstvenega stanja. Za preprečevanje raka endometrija in raka jajčnikov naj pacientke hodijo na redne letne ginekološke preglede, ko dosežejo starost 30–35 let, na ultrasonografijo trebuha in določitev antigena Ca-125. Nadzorovanje drugih rakov, povezanih z Lynchevim sindromom, je težje. Temelji na družinski anamnezi in lahko vključuje zgornjo endoskopijo in ultrasonografijo trebuha, analizo urina s citologijo vsako ali vsako drugo leto, ko dosežejo starost od 30–35 let (7).

Kemopreventiva

Nedavna randomizirana raziskava, v kateri so v skupini bolnikov z Lynchevim sindromom primerjali učinek aspirina s placebom, je pokazala, da jemanje aspirina ne zmanjša pojavnosti adenomov ali RDČD (8). Kemopreventive ne priporočajo (4, 8).

Profilaktični kirurški posegi

Podatkov, da je profilaktična kolektomija pri zdravih nosilcih mutacij uspešna, ni in je zato ne priporočajo (4).

Retrospektivna opazovalna raziskava je pokazala, da profilaktična odstranitev maternice in/ali dvostranska salpingoooforektomija prepreči ginekološke rake pri ženskah z Lynchevim sindromom; v skupini, ki profilaktične operacije niso bile deležne, je bila incidenca raka endometrija 33-odstotna, incidenca raka jajčnikov pa 5-odstotna. Profilaktično ginekološko operacijo priporočajo ženskam, nosilkam mutacij, po 35. letu oziroma po končani rodni dobi (7).

Družinski sindrom X raka debelega črevesa in danke

Pri osebah s tem sindromom so izpolnjeni pogoji *Amsterdam I*, nimajo pomanjkljivosti MMR ali celo nimajo MMR-genske napake. So bolj ogroženi z RDČD, vendar pa ne z drugimi oblikami raka. Priporočajo jim kolonoskopijo v intervalih na 3–5 let, začevši v starosti, 5–10 let manjši od tiste, v kateri je bil diagnosticiran rak pri najmlajšem sorodniku (9).

Družinska adenomatozna polipoza

Družinska adenomatozna polipoza (ang. *familial adenomatous polyposis*, FAP) je dedna bolezen, ki je avtosomsko dominantna. Zanja je značilno, da v debelem črevesu in danki zraste več sto do nekaj tisoč adenomov. Obsega 1 % vseh primerov RDČD. Mnogi bolniki s FAP imajo polipe tudi želodcu in dvanajstniku, nekateri dezmoidne tumorje, tumorje ščitnice in možganske tumorje, osteome, prirojeno hipertrofijo pigmentnega epitelija mrežnice,

nadštevilne zobe in epidermoidne ciste. Kombinacija polipov debelega črevesa in danke in zunajčrevesnih sprememb je znana kot Gardnerjev sindrom, medtem ko je sočasnost polipov debelega črevesa in možganskih tumorjev znana kot Turcotev sindrom (10–12).

Klinična diagnoza klasične FAP temelji na najdbi več kot 100 adenomov debelega črevesa. Za oslABLJENO FAP velja bolezen z manj adenomi in kasnejšim začetkom. Merila zanjo so: najmanj dva bolnika v družini, ki sta zbolela v starosti nad 30 let in sta imela 10–99 adenomov, ali en bolnik z 10–99 adenomi, ob diagnozi starejši od 30 let, sorodnik v prvem kolenu z RDČD in nekaj adenomi, bolnik z več kot 100 adenomi, a mlajši od 30 let in ne glede na to, ali ima FAP kdo od njegovih sorodnikov.

Genetika

FAP je posledica mutacij gena APC, ki jih ima več kot 70 % bolnikov s klasično FAP in okoli 25 % tistih z oslABLJENO obliko. Med genotipom in fenotipom je korelacija – klinična izraženost bolezni. V 30–40 % primerov FAP bolniki nimajo sorodnikov s to boleznijo; pri njih je torej bolezen nastala *de novo*.

Genetsko testiranje začnemo pri bolniku. Če se odkrije mutacija, lahko testiranje ponudimo tudi družinskim članom (10).

Presejanje

Presejanje je utemeljeno, saj je penetranca velika in se karcinom razvije skoraj pri vseh bolnikih, in to v starosti 40–50 let (če bolniki obdržijo debelo črevo). Genetsko testiranje je stroškovno najbolj učinkovito presejanje in je nujno potrebno. Če mutacija ni dokazana, je treba vsem družinskim članom ogrožene družine priporočiti kolonoskopijo, prvo v starosti 10–12 let, nato jo opravljati na 2 leti do 40. leta, po njem pa do 50. leta na 3–5 let; če se do te starosti polipoza ne pojavi, kolonoskopije niso več potrebne. Če pa kolonoskopija kadar koli odkrije adenome, jo je treba opraviti enkrat letno.

Bolnikom z oslABLJENO obliko je treba kolonoskopijo narediti vsako 2. leto do ugotovitve polipoze. Presejanje se mora začeti v starost 18–20 let in se nadaljuje vse življenje. Če odkrije adenom, se ponavlja letno. Presejanje za zunajčrevesne spremembe je treba začeti v starosti 25–30 let, če dotlej ni bil odkrit noben polip, sicer pa takoj po odkritju prvega črevesnega polipa. Gastroduodenoskopija naj se opravi vsako 5. leto, dokler se ne odkrijejo adenomi.

Ker se adenomi lahko pojavijo tudi v jejunumu in ileumu, pacientom priporočajo tudi redne jejunoirigografije ali pa brezžično endoskopijo s kapsulo.

Presejanje za raka ščitnice je vsakoletna ultrasonografija, presejanje za druge manifestacije ni upravičeno, ker so redke in manjšega kliničnega pomena (10,13).

Kirurški posegi

Cilj terapije je preprečiti RDČD bodisi z operacijo ali z endoskopsko polipektomijo. Kirurška resekcija je standardno zdravljenje pri bolnikih s klasično FAP, polipektomija pa je mogoča pri nekaterih bolnikih z oslajeno obliko. Možni sta sve kirurški odstranitvi: proktokolektomija z lialno-analno anastomozo in totalna kolektomija z ileorektalno anastomozo. Odločitev o vrsti operacije je odvisna od številnih dejavnikov, vključno s starostjo, izraženostjo polipoze (tj. zajetostjo danke), oceno nevarnosti nastanka dezmoidov in mestom mutacije. Ko je porazdelitev polipov difuzna ali gre za FAP, priporočajo prvo vrsto odstranitve, kadar pa je adenomov v danki le malo ali gre za oslajeno obliko FAP, pa je možna totalna kolektomija z ohranitvijo danke, vendar pa je te bolnike potem treba redno rektoskopsko pregledovati (13).

Pri adenomih dvanajstnika priporočajo endoskopsko polipektomijo. Ko je polipov več in bolezen ustreza stadiju IV po Spigelmanu, naj se opravi duodenopankreatektomija. Ker se dezmoidni tumorji radi ponovijo, naj se kirurška odstranitev odloži, če je le mogoče.

Sledenje bolnikov

Grožnja adenomov in raka danke ostaja po kolektomiji in celo po proktektomiji, zato je potreben redni endoskopski nadzor vsako ali vsako drugo leto, oziroma na 6–12 mesecev, če danke ni bila odstranjena. Pri bolnikih z oslajenim FAP priporočajo endoskopsko polipektomijo, preiskavo celotnega debelega črevesa in danke pa je treba opraviti vsako leto. Za nadzor dvanajstnika priporočajo, da se zgornja endoskopija izvede na 3–5 let (stadij I–II po Spigelmanu), medtem ko je treba preiskave pri bolj napredovalih oblikah (stadij III po Spigelmanu) opravljati na leto ali dve, pri stadiju Spigelman IV pa na 6 mesecev (4, 10,13).

Kemopreventiva

Učinkovitost primarne kemopreventive pri FAP ni bila nikoli dokazana. Sekundarna kemopreventiva z uporabo nesteroidnih antirevmatikov lahko zmanjša število in razširitev adenomov debelega črevesa in – manj zanesljivo – prepreči adenome v dvanajstniku. Ni jasno, ali zmanjšuje tudi umrljivost. Glede na neželene učinke teh zdravil na kardiovaskularni sistem pa ta preventiva ni standardna (13).

Z genom MUTYH povezana polipoza

Z genom MUTYH povezana polipoza (ang. *MUTYH-associated polyposis*, MAP) se deduje avtosomsko recesivno in ima visoko penetranco. Klinično MAP spominja na oslABLjeno obliko FAP. Povprečna starost od diagnozi RDČD je sredina petdesetih let. Običajno je manj kot 100 adenomov, zato je obravnava takega bolnika podobna obravnavi pri FAP (13).

Genetika

MAP nastane zaradi bialelne mutacije v genu MUTYH (prej znanem kot MYH). Mutacije so pri 25–30 % bolnikov z 10–100 adenomi in pri 5–30 % bolnikov z več kot 100 adenomi. Pri beli rasi več kot 80 % mutacij G382D in Y165C. Prizadetemu svetujemo genetsko testiranje. Če je mutacija prepoznana, lahko na testiranje povabimo tudi ogrožene družinske člane, ki še nimajo simptomov (npr. brati in sestre, saj gre za recesivno vrsto bolezni (4, 13).

Presejanje

Ker je MAP klinično podobna oslABLjeni FAP, bolnikom priporočamo, naj prihajajo na kolonoskopijo na 2 leti, ko dosežejo starost 18–20 let in si jo dajo delati do konca življenja. Genetsko testiranje je stroškovno najbolj upravičeno, vendar pa povsod mutacija ni poznana. Tudi pri bolnikih z MAP lahko nastanejo zunajčrevesne spremembe, čeprav redkeje kot pri FAP; zato priporočamo zgornjo endoskopijo vsakih 5 let.

Zdravljenje

Priporočila za zdravljenje so podobna kot pri oslABLjeni obliki FAP. Opravi se lahko totalna kolektomija z ohranitvijo danke, vendar pa ti bolniki potem potrebujejo redno rektoskopijo.

Pri adenomih dvanajstnika priporočajo endoskopsko polipektomijo. Ko je polipov več in bolezen ustreza stadiju IV po Spigelmanu, naj bi naredili duodenopankreatektomijo (4).

Sledenje bolnikov

Totalno kolonoskopijo je treba narediti na 6–12 mesecev. Endoskopsko polipektomijo, preiskavo celotnega debelega črevesa in danke pa je treba opraviti vsako leto. Za nadzor dvanajstnika priporočajo, da se zgornja endoskopija izvede na 3–5 let (pri stadij I–II po Spigelmanu), medtem ko je v bolj napredovalih oblikah preiskave treba delati pogosteje – na eno leto do dve (stadij III po Spigelmanu) ali na 6 mesecev (stadij IV po Spigelmanu) (4, 13).

Kemopreventiva

Doslej ni dokazov o koristnosti primarne ali sekundarne kemopreventive.

ZAKLJUČEK

RDČD je še vedno v veliki večini primerov sporadična bolezen, ki se pojavlja po 50. letu starost in za katero imamo tudi presejalni program Svit. Znaki in simptomi so neznačilni. Povezujemo ga z načinom življenja, kot sta prebogata hrana z malo vlakninami in premalo fizične aktivnosti. Nekateri ljudje pa so z RDČD bolj ogroženi, ker imajo vnetne črevesne bolezni ali polipe; v večji nevarnosti so tudi osebe, ki so jim že odstranili RDČD, njihovi potomci in člani družin, v katerih je ta rak pogostejši. Vsi ti običajno zbolevajo mlajši. Treba jih je prepoznati in jih prej in pogosteje naročati na preventivne in kurativne kolonskopije ter jih vključiti v ustrezno specialistično obravnavo.

LITERATURA

1. Incidenca raka v Sloveniji 2009, Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Register raka za Slovenijo, 2012.
2. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919–32.
3. Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, et al. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med* 2006; 354 (26): 2751–63.
4. Balmana J, Castells A, Cervantes A. ESMO Guidelines Working Group. Familial colorectal cancer risk: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl 5) v78-81.
5. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 261–8.
6. Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293 (16): 1986–94.
7. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352 (18): 1851–60.
8. Burn J, Bishop T, Mecklin JP, Macrae F, Moslein G, Olschwang S, et al. CAPP2 Investigators. Effect of aspirin or resistant starch on colorectal neoplasia in the Lynch syndrome. *N Engl J Med* 2008; 359 (24): 2567–78.
9. Lindor N, Rabe K, Petersen G, Haile R, Casey G, Baron J, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency. Familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293 (16): 1979–85.
10. Jarvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomaki P, et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000; 118 (5): 829–34.
11. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609–18.

12. Bertagnolli M, Niedzwiecki D, Compton C, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and leukemia group B protocol 89803. *J Clin Oncol* 2009; 27 (11): 1814–21.
13. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138 (6): 2044-58.

OBRAVNAVA DEDNEGA MELANOMA

Marko Hočevar

Povzetek. Za melanom velja tako kot za vse ostale vrste raka, da je kancerogeneza več-stopenjski proces, pri katerem nastane več zaporednih mutacij, preden celica dokončno maligno alterira. Zgodnji dogodek je običajno takšna mutacija, ki povzroči stalno proliferacijsko aktivnost in s tem možnost prenašanja mutacij na naslednje generacije celic. Pri sporadičnih rakah nastane takšna mutacija v posamezni somatski celici, pri dednih rakah pa takšno mutacijo bolnik podeduje od staršev in je zato že ob rojstvu v vseh somatskih celicah in v polovici spolnih celic.

Pri nastanku melanoma je eden izmed najzgodnejših in najverjetneje nujni dogodek neprestana aktivacija signalne poti RAS-RAF-MEK-ERK. S tem dobijo melanociti za kancerogenezo nujno potrebno stalno proliferacijsko sposobnost. Naslednji nujni korak v nastanku melanoma je zaobiti proces apoptoze melanocitov, ki je eden bistvenih mehanizmov proti nastanku raka. Glavno vlogo pri tem ima verjetno pot INK4A (p16)-CDK4-RB, ki se v normalnih razmerah aktivira kot odziv na mutirani gen B-RAF. Pozni dogodek pri napredovanju melanoma je čezmerna aktivacija signalne poti PI3K-AKT s pomočjo mutiranih genov, kot so PTEN, C-KIT, N-RAS ali drugi, s katero dobijo melanomske celice sposobnost metastaziranja.

Oblika melanoma je dedna, ko se rak pojavi pri dveh ali več sorodnikih, značilno 10 do 20 let prej kot pri sporadičnih primerih, poleg tega pa so pri dedni obliki primarni melanomi pogosto multipli. Za nastanek dednega melanoma so odgovorni visoko penetrantni geni. CDKN2A na lokusu 9p21 je za tumor supresorski gen, ki kodira dva proteina – p16 in p14ARF. Mutirani p16 omogoči fosforilacijo proteina Rb, vstop v fazo S in prezgodnje nadaljevanje celičnega cikla. Mutirani p14ARF prepreči razgradnjo p53, kar zaustavi tako fazo G1 kot G2. Pogostost mutacij CDKN2A naraste s približno 0,01 % v splošni populaciji na 40 % v družinah z dedno obliko melanoma. Drugi visoko penetrantni gen, ki povzroča nastanek dednega melanoma, je gen CDK4. Doslej sta bili opisani samo dve različni mutaciji (R24H pri 11 družinah in R24C pri 6 družinah) na drugem eksonu gena CDK4. Skupaj je po celem svetu opisanih samo 17 družin, ki pa so zelo številne, tako da je posameznikov z mutiranim genom CDK4 zelo verjetno več kot 120. Mutirani gen CDK4 inhibira vezavo proteina p16. Ostali visoko penetrantni geni so trenutno še predmet intenzivnih raziskav.

UVOD

Za melanom velja tako kot za vse ostale vrste raka, da je na ravni posamezne maligne celice to vedno dedna genska bolezen. Osnova za nastanek raka je namreč sprememba dednega materiala (DNK) v celičnem jedru, ki celici omogoči, da se izogne različnim regulacijskim mehanizmom in se nenadzorovano deli, s tem pa prenaša pridobljene lastnosti na naslednjo generacijo. Karcinogeneza je vedno večstopenjski proces, kjer je potrebnih več mutacij, preden se celica dokončno maligno spremeni. Za večino solidnih rakov velja, da je potrebnih vsaj 7 mutacij različnih genov, ki sodelujejo pri delitvi celic (protoonkogeni) in njeni regulaciji (supresorski geni). Zgodnji dogodek je običajno takšna mutacija, ki povzroči stalno proliferacijo in s tem možnost prenašanja mutacij na naslednje generacije celic. Pri veliki večini rakov nastane mutacija v posamezni somatski celici, ki se nato ob

dodatno pridobljenih mutacijah postopno maligno spremeni. V teh primerih gre za sporadične rake, ki so večinoma bolezen starejših, saj je za nastanek kombinacije mutacij različnih genov potreben čas. Pri 3–5 % bolnikov z rakom pa je ugotovljeno, da so eno od zgodnjih mutacij podedovali od staršev in so jo zato imeli že ob rojstvu v vseh somatskih celicah in v polovici spolnih celic. Posledica je hitrejša karcinogeneza, kar se kaže v zgodnejšem zbolevanju (10–20 let prej kot pri enakih sporadičnih rakih); pogosteje nastane tudi več primarnih rakov. V teh primerih gre za dedne rake, ki se dedujejo avtosomsko dominantno.

V nadaljevanju bomo opisali že znane mutacije, ki sodelujejo pri nastanku melanoma, in gene, ki so odgovorni za dedni melanom.

NASTANEK MELANOMA

Somatske mutacije v različnih regulacijskih genih so odgovorne za iniciacijo, promocijo in napredovanje melanoma. Fenotipsko se te mutacije kažejo kot zaporedje različnih histoloških sprememb, ki jih opisuje Clarkov model nastanka melanoma (nevus→displastični nevus→radialna faza rasti melanoma→vertikalna faza rasti melanoma→metastatski melanom). Eden izmed najzgodnejših in najverjetneje nujni dogodek v patogenezi melanoma je nenehna aktivacija signalne poti RAS-RAF-MEK-ERK, ki jo imenujemo tudi mitogensko aktivirana proteinskokinazna signalna pot (ang. *mitogen-activated protein kinase*). S tem dobijo melanociti za kancerogenezo nujno potrebno stalno proliferacijsko sposobnost. Mutirani gen B-RAF najdemo pri 50–70 %, N-RAS pa pri 15–25 % melanomskih celičnih linij in primarnih melanomov.

Naslednji nujni korak v nastanku melanoma je zaobiti proces staranja (ang. *senescence*) melanocitov, kar melanocitom omogoči, da se izognejo apoptozi (programirani celični smrti), ki je eden bistvenih mehanizmov proti nastanku raka. Glavno vlogo pri tem ima verjetno pot INK4A (p16)-CDK4-RB, ki se v normalnih okoliščinah aktivira kot odziv na mutirani gen B-RAF. Dodatno vlogo pri uravnavanju mehanizmov, ki vodijo v apoptozo, imata gena ARF in TP53, ki pa sta pri večini melanomov spremenjena. Pozni dogodek pri napredovanju melanoma je čezmerna aktivacija signalne poti PI3K-AKT s pomočjo mutiranih genov, kot so PTEN, C-KIT, N-RAS ali drugi, s katero dobijo melanomske celice sposobnost metastaziranja.

Opisana pot nastanka melanoma in geni, ki v njej sodelujejo, je pri bolnikih z melanomom najpogostejša, vendar seveda ne edina. Glede na kompleksnost procesa podvojevanja DNK in njegovega nadzorovanja, v katerem sodelujejo zelo številni geni, so pri nastanku melanoma možne še praktično neštete kombinacije mutacij ali pa samo spremenjene aktivnosti drugih genov. Kateri geni so bolj/manj aktivni pri posameznem melanomu, lahko –

tako kot pri ostalih rakih – ugotavljamo z genskim podpisom. Genski podpis je tudi zelo pomemben in neodvisen prognostični dejavnik bolezni. Glede na genski podpis lahko bolnike z melanomom delimo v 4 skupine:

- normalna – aktivni so običajni geni,
- z burnim imunskim odzivom – aktivni so zlasti geni, zadolženi za imunski odziv,
- s pigmentacijo – aktivni so zlasti geni, zadolženi za pigmentacijo,
- s proliferacijo – aktivni so zlasti geni, zadolženi za proliferacijo.

Bolniki v prvih dveh skupinah imajo boljšo prognozo, ker imajo manj maligne (ang. *low grade*) melanome, bolniki v preostalih dveh skupinah pa slabšo, ker so njihovi melanomi hudo maligni (ang. *high grade melanomas*).

Ugotovitev, kateri geni so mutirani pri bolniku, nima le prognostičnega pomena, važna je tudi za zdravljenje, saj so na voljo tarčna zdravila, ki specifično delujejo na mutirane gene: vemurafinib inhibira mutirani gen B-RAF, ki je odgovoren za stalno proliferacijsko aktivnost melanomskih celic. Pri vseh bolnikih z metastatskim melanomom je zato treba določiti, ali je gen B-RAF mutiran in – če je (približno v 50 % primerov) – začeti zdravljenje z vemurafinibom in ne več s klasično kemoterapijo.

DEDNI MELANOM

Približno 10 % bolnikov z malignim melanomom ima pozitivno družinsko anamnezo. Pozitivna družinska anamneza na splošno pomeni 2-krat večjo ogroženost z malignim melanomom. Družinsko obliko malignega melanoma lahko razdelimo v tri skupine: sporadične primere melanoma, ki se kopičijo v nekaterih družinah, družinsko obliko melanoma, ki je posledica nizko penetrantnih alelov, in dedno obliko, ki je posledica visoko penetrantnih alelov. Zadnja oblika je relativno redka. Vanjo sodi približno 1 % vseh primerov melanoma. Oblika malignega melanoma pa je dedna, ko se pojavi pri dveh ali več sorodnikih, značilno 10 do 20 let prej kot pri sporadičnih primerih, poleg tega pa imajo bolniki z dedno obliko pogosto multiple primarne melanome. Za dedno obliko je značilen unilateralni vzorec dedovanja znotraj družine. Pri družinah, katerih člani imajo kožni melanom in/ali atipične nevuse, gre za sindrom družinskih atipičnih multiplih kožnih znamenj/melanomov (ang. *familial atypical multiple mole/melanoma*, FAMMM).

VISOKO PENETRANTNI GENI

Gen CDKN2A na lokusu 9p21 je tumor-supresorski gen, povezan z dedno obliko malignega melanoma. Produkta gena sta proteina p16 in p14ARF. Oba imata skupen 2. in 3. ekson, a se ob nastanku p16 prepíše ekson 1 α ,

ob nastanku p14ARF pa ekson 1 β . Protein p16 inhibira kompleks ciklina D in kinaze 4 (CDK 4) ali kinaze 6 (CDK 6), kar posledično zavre fosforilacijo proteina Rb (protein retinoblastoma), celični cikel pa se ustavi v fazi G₁. Okvarjeni protein p16 omogoči fosforilacijo proteina Rb, vstop v fazo S in pre-zgodnje nadaljevanje celičnega cikla. Protein p14ARF prepreči razgradnjo p53, kar zaustavi tako fazo G₁ kot G₂. Poleg tega vpliva tudi na transkripcijske faktorje, na katere se veže protein Rb. Večina mutacij je na eksonu 1 α ali na 2. eksonu. Pogostost teh mutacij, ki je 0,01-odstotna v splošni populaciji, je v družinah z dedno obliko malignega melanoma kar 40-odstotna. Mutacije na 2. eksonu inaktivirajo tako p16 kot p14ARF. Odkrite so le tri mutacije, ki so na eksonu 1 β . Pri bolniku z multiplimi primarnimi melanomi je bila dokazana insercija na eksonu 1 β , v družini s štirimi zbolelimi člani delecija, opisana pa je tudi substitucija pri dveh članih družine z malignim melanomom.

Spremenjeni CDKN2A najdemo pri 50 % družin s sindromom FAMM, a povezava gena s številom in displazijo nevusov še ni povsem jasna. CDKN2A je visoko penetranten gen, saj je ogroženost z malignim melanomom pri nosilcih mutacije do 80. leta starosti v Evropi 53-odstotna, v ZDA 76-odstotna, v Avstraliji pa kar 91-odstotna. Podatek kaže, da mutacijo CDKN2A pri kancerogenezi melanoma močno podpira količina UV-žarkov.

Drugi visoko penetrantni gen, ki povzroči nastanek dednega melanoma, je gen CDK4. Doslej sta bili opisani samo dve različni mutaciji (R24H pri 11 družinah in R24C pri 6 družinah) na drugem eksonu gena CDK4. Skupaj je po vsem svetu opisanih samo 17 družin, ki pa imajo veliko članov, tako da je posameznikov z mutiranim genom CDK4 zelo verjetno več kot 120 (od 209 testiranih je bilo 89 pozitivnih). V največji opisani družini z Norveške so imeli mutacijo pri 33 družinskih članih v štirih generacijah. Mutirani CDK4 gen inhibira vezavo proteina p16.

Pri vseh ostalih bolnikih (družinah), ki izpolnjujejo pogoje dednega raka in pri katerih ne najdemo mutacije genov CDKN2A ali CDK4, so možne mutacije številnih drugih genov, ki lahko povzročijo nastanek dednega melanoma. Konzorcij Genomel trenutno pripravlja nabor kandidatnih genov, dobljenih z manjšimi nacionalnimi študijami, ki bodo nato testirani na zelo velikem številu vzorcev (več kot 1000) družin, ki izpolnjujejo pogoje dednega melanoma in pri katerih niso našli mutacije genov CDKN2A ali CDK4. Rezultate lahko pričakujemo v naslednjih dveh letih.

Pri vseh bolnikih z melanomom, ki izpolnjujejo merila za dednega raka, je indicirano onkološko genetsko svetovanje, pri katerem se bolniku ponudi tudi možnost genetskega testiranja. Trenutno se testirata gena CDKN2A in CDK4. Dedni melanom sodi med tri izjeme v onkološki genetiki, kjer se genetski test ponudi otrokom pred puberteto (med 10. in 12. letom), in zato

o testiranju odločajo starši. Sicer je pravilo onkološke genetike, da se o genetskem testu vedno odločajo polnoletne osebe same zase. Razlog za izjemo je, da se največja potencialna škoda pri nosilcih mutiranih genov CDKN2A ali CDK4 naredi ob neustrezni zaščiti pred UV-žarki v obdobju pubertete, ko se melanociti najbolj delijo.

NIZKO PENETRANTNI GENI

Nizko penetrantni aleli in izpostavljenost sončnim žarkom zvečajo tako ogroženost z malignim melanomom v splošni populaciji kot pogostost melanoma v dovezetnih družinah. Eden od teh genov je gen za receptor melanokortina (gen MC1R). Izpostavljenost UV-žarkom zveča tvorbo melanina prek slabo poznanih mehanizmov, ki vključujejo neposredni učinek žarkov na melanocite, aktivacijo melanocitov z MSH (melanocite stimulirajočim hormonom ali melanotropinom) ter parakrini učinek dušikovega monoksida, ki ga izločajo keratinociti. MSH se veže na receptor melanokortin-1 melanocitov (MC1R) in spodbuja tvorbo melanina. Ta je sestavljen iz dveh kemično različnih oblik pigmenta: evmelanin prevladuje pri ljudeh s temnejšo poltjo, je rjavo-črn in deluje fotoprotektivno; rdeče-rumeni feomelanin ima šibek fotoprotektivni učinek, ob fotoaktivaciji pa nastanejo kisikovi prosti radikali, ki delujejo citotoksično in mutageno. Razmerje med evmelaninom in feomelaninom v koži je odgovorno za različne tipe kože. V koži in laseh rdečelasih prevladuje feomelanin, poleg tega pa nastaja še manj evmelanina, zaradi česar je njihova koža ob izpostavljenosti sončnim žarkom hitro opečena in le malo porjavi. Kakšno je razmerje pigmentov v koži, je odvisno od oblike MC1R. Gen za MC1R se nahaja na lokusu 16q24.3. Za ta gen je značilna visoka stopnja polimorfizma v populaciji, ogroženost z melanomom pa se pri nosilcu določenega alela zveča za 2–4-krat, a je znatno manjša kot pri mutaciji CDKN2A. Določeni aleli so povezani z različnimi fenotipi oz. različnimi kliničnimi tipi kože. Trije aleli (Arg151Cys, Arg160Trp in Asp294His) so povezani s fenotipom, katerega značilnosti so rdeči lasje, pege in svetla polt, ki ne porjavi, in jih spremlja večja ogroženost z malignim melanomom. Pri nosilcih enega od teh alelov se ogroženost zveča, čeprav imajo temnejšo, olivno polt. Poleg tega so nekateri aleli gena MC1R verjetno udeleženi pri nastanku malignega melanoma, neodvisno od njihovega učinka na fenotip. Največja ogroženost je morda povezana z alelom Asp84Glu. V avstralski populaciji je 72 % bolnikov z melanomom nosilcev vsaj enega od opisanih alelov, v Veliki Britaniji pa le 28 %. Poleg tega so raziskave pokazale, da se penetranca mutacije CDKN2A zveča ob navzočnosti enega od opisanih alelov s 50 na 84 %, ob tem pa se zmanjša povprečna starost ob diagnozi z 58 na 37 let.

ZAKLJUČEK

Melanom je, tako kot vsi ostali raki, bolezen, pri kateri sta nastanek in napredovanje odvisna od spremenjenega delovanja genov, ki so sicer odgovorni za delitev celice in njeno natančno regulacijo. Informacija o tem, kateri geni so pri bolniku z melanomom spremenjeni, je vedno bolj pomembna, saj omogoča na eni strani ciljano zdravljenje s tarčnimi zdravili (vemurafinib) ali pa preventivne ukrepe, s katerimi je mogoče zmanjšati možnost nastanka melanoma pri nosilcih zarodnih mutacij.

LITERATURA

1. Clark WH, Jr. Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 83–8.
2. Eskandarpour M, Kiaii S, Zhu C, Castro J, Sakko AJ, Hansson J. Suppression of oncogenic NRAS by RNA interference induces apoptosis of human melanoma cells. *Int J Cancer* 2005; 115: 65–73.
3. Hoeflich KP, Gray DC, Eby MT, Tien JY, Wong L, Bower J, et al. Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models. *Cancer Res* 2006; 66 (2): 999–1006.
4. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122 (2): 337–41.
5. Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence – halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006; 355 (10): 1037–46.
6. Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 2003; 22 (20): 3063–9.
7. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (14): 8292–7.
8. Yang G, Rajadurai A, Tsao H. Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* 2005; 125 (6): 1242–51.
9. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24 (2): 273–85.
10. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006; 6 (3): 184–92.
11. Jönsson G, Dahl C, Staaf J, Sandberg T, Bendahl PO, Ringnér M, et al. Genomic profiling of malignant melanoma using tiling-resolution arrayCGH. *Oncogene* 2007; 26 (32): 4738–48.
12. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998; 58 (10): 2170–5.
13. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006; 12 (9): 406–14.
14. Harbst K, Staaf J, Lauss M, Karlsson A, Masback A, Johansson I, et al. Molecular profiling reveals low- and high-grade forms of primary melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18 (15): 4026–36.

15. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; 8 (1): 15–21.
16. Goldstein AM, Struewing JP, Chidambaram A, Fraser MC, Tucker MA. Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92 (12): 1006–10.
17. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 (12): 894–903.
18. Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* 2001; 117 (2): 294–300.
19. Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O’Gorman LE, Green AC et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 2000; 66 (1): 176–86.
20. Hocevar M, Avbelj M, Peric B, Zgajnar J, Besic N, Battelino T. High prevalence of germline CDKN2A mutations in Slovenian cutaneous malignant melanoma families. *Croat Med J* 2006; 47: 851–4.
21. Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet* 2013; 50 (4): 264–70.

OBRAVNAVA DEDNEGA RAKA ŠČITNICE

Nikola Bešić, Damijan Bergant

Povzetek. Rak ščitnice je redka bolezen, saj dosega le 1 % primerov vseh malignomov. V 10 % primerov je rak ščitnice medularne oblike, ki je dedna pri približno 25 % bolnikov z medularnim rakom ščitnice (MRŠ). Vzrok za nastanek dednega MRŠ je mutacija proto-onkogene RET. Dedni MRŠ se pojavlja v sklopu sindroma multiple endokrine neoplazije (MEN) tip 2A, tipa MEN-2B in kot familiarni MRŠ. Sindrom MEN-2 je avtosomsko dominantno podedovana bolezen, za katero ocenjujejo, da ima v splošni populaciji incidenco 2,5/100.000. MEN-2B ima najbolj malignen klinični potek. Dedno obliko MRŠ je mogoče odkriti s presejanjem ožjih krvnih sorodnikov bolnika z MRŠ. MRŠ se razvije kadar koli v življenju pri več kot 95 % nosilcev mutacij, zato je treba pri njih narediti profilaktično tiroidektomijo. Na Onkološkem inštitutu v Ljubljani, na katerem zdravimo vse slovenske bolnike z MRŠ, skrbimo za genetsko svetovanje in testiranje že od leta 1996. Laboratorijski del testiranja naredijo v laboratoriju prof. dr. Damjana Glavača na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Mutacijo proto-onkogene RET smo dokazali pri 36 osebah: pri 15 prvih dokazanih nosilcih mutacije v družini (t.i. indeksni primeri) iz 15 družin in 21 njihovih krvnih sorodnikih. Štirim nosilcem mutacije smo naredili profilaktično totalno tiroidektomijo. Ob operaciji so bili stari 5, 12, 20 in 51 let. Glede na to, da pri nastanku MRŠ sodeluje RET-receptorska tirozin-kinaza, bi za zdravljenje MRŠ prišli v poštev inhibitorji tirozin-kinaze. Zaenkrat so v kliničnih raziskavah preverjali vandentanib, imatinib, sunitinib, sorafenib, motaseniab in številna druga zdravila, ki delujejo prek RET-kinaze, VEGRF, EGFR, c-KIT ali IGF-1R.

OPREDELITEV IN EPIDEMIOLOŠKI PODATKI

Rak ščitnice je redka bolezen, saj obsega samo 1 % vseh malignomov (1). Čeprav je klinična slika pri veliki večini primerov raka ščitnice podobna, ne gre za eno bolezen, pač pa za heterogeno skupino bolezni, ki imajo različen klinični potek in prognozo: papilarni, folikularni, medularni rak in anaplastični rak ščitnice (2). Raka ščitnice razvrščamo na podlagi vrste celic, iz katerih nastane: iz tirocitov, to je celic, ki izdelujejo ščitnične hormone (papilarni, folikularni in anaplastični rak), in neuroendokrinih parafolikularnih C-celic (medularni rak) (3–5).

Dedno obliko raka ščitnice ima 25 % bolnikov z medularnim rakom ščitnice (MRŠ), med bolniki s ščitničnimi raki, ki izvirajo iz tirocitov, pa ima familiarno obliko le 5 % bolnikov (6). Slednji se pojavljajo v sklopu sindroma PTEN-hamartomov (Cowdenovega sindroma, familiarne adenomatozne polipoze/Gardnerjevega sindroma, sindroma Carneyevega kompleksa tip 1, Wernerjevega sindroma, Peutz Jeghersovega sindroma in sindroma ataksia-teleangiektazija) (6). Med bolniki s papilarnim rakom ščitnice ima približno 5 % bolnikov familiarno obliko papilarnega raka z oksifilijo ali brez nje, familiarnega papilarnega raka ščitnice s papilarnim rakom ledvic ali familiarnega papilarnega raka ščitnice z multinodozno golšo (7).

MEDULARNI KARCINOM

MRŠ nastane iz celic C ščitnice, ki med drugimi bioaktivnimi snovmi izločajo hormon kalcitonin. Sodi med nevroendokrine tumorje. Ima ga približno 5–10 % bolnikov z rakom ščitnice (8). Približno 75 % bolnikov z MRŠ ima sporadično obliko, dedno pa približno 25 % bolnikov (9–11).

Dedni medularni rak ščitnice

Dedni MRŠ se pojavlja v sklopu naslednjih sindromov: multiple endokrine neoplazije (MEN) tip 2A, ki je najpogostejši, MEN-2B in familiarni MRŠ (12). MEN-2B ima najmalignejši klinični potek (13). MEN-2 je avtosomsko dominantno dedna bolezen, za katero ocenjujejo, da ima v splošni populaciji incidenco 2,5/100.000 (14).

Dedne oblike MRŠ so posledica mutiranega protoonkogenega RET v zarodnih celicah. Mutirani protoonkogen RET prek predstopnje (hiperplazije celic C) spodbudi procese maligne transformacije ščitničnih celic C (13,15).

Multipla endokrina neoplazija 2A

MEN-2A je najpogostejša oblika MEN-2. V njenem sklopu se MRŠ pojavlja (v 100 %) v kombinaciji s feokromocitomom (v 40–50 %) ali hiperplazijo občitničnih žlez ali adenomom občitnične žleze (v 10–20 %), kožno amiloidozo ali Hirschprungovo boleznijo. Za diagnozo MEN-2A zadoščata dva elementa sindroma pri pacientu ali pri kakem članu družine (16). MRŠ se največkrat pokaže kot prva manifestacija bolezni v starosti od 5 do 25 let (17). S klasičnim fenotipom MEN-2A so povezane mutacije protoonkogenega RET na kodonu 634, nekoliko manj na kodonu 609, 611, 618 ali 620 (18). Tudi mutacije kodonov 533, 630, 790, 791, 804 ali 891 lahko povzročijo fenotip MEN-2A (18).

Multipla endokrina neoplazija 2B

Sindrom MEN-2B je najbolj agresivna oblika MEN-2, a se na srečo pojavlja bolj poredko, saj ga ima le 5–10 % bolnikov z MEN. Za MEN-2B sta značilna MRŠ in feokromocitom, ponavadi brez hiperparatiroidizma. Druge fizične značilnosti bolnikov z MEN-2B so: nevrofibromatoza sluznic, intestinalna ganglionevromatoza, Marfanoidni habitus in ohlapnost sklepov (18). Dedno mutacijo protoonkogenega RET v kodonu 918 ima kar 95 % bolnikov s klasičnim fenotipom MEN-2B (18). Nosilci mutacije skoraj vedno zbolijo že v prvem letu življenja. Sindrom MEN-2B ima agresivnejši potek MRŠ z večjo zboleznostjo in smrtnostjo kot MEN-2A. Bolniki z MEN-2B pogosto nimajo

MRŠ v družinski anamnezi, zato je pri njih najverjetnejša mutacija gena *de novo* (17).

Familiarna oblika medularnega raka ščitnice

Familiarna oblika MRŠ (fMRŠ) je najmilejša oblika MEN-2. MRŠ pogosto ne spremljajo drugih manifestacij MEN. Tipično bolniki zbolijo starejši. O fMRŠ je mogoče govoriti, ko zbolijo vsaj štirje člani družine, kar je redko. Pogosto pa jo diagnosticiramo na podlagi biokemičnega in genetskega presejanja sorodnikov. Prognoza fMEN je relativno ugodna, vendar so poročali tudi o agresivnem poteku MRŠ, in to v zvezi z mutacijo kodona 804 (19). Približno polovica družin z fMRŠ ima mutacijo v intracelularnem delu protoonkogenega RET na kodonu 768, 790, 791 ali 804 (20).

Protoonkogen RET

Protoonkogen RET se nahaja na kromosomu 10 v predelu q11.2 in ga sestavlja 21 eksonov. Gen RET kodira beljakovino RET (angl. *rearranged during transfection*), ki je receptor za tirozin-kinazo. Ta receptor je izražen v tkivih in tumorjih, ki so nastali iz nevralne plošče. Pri odraslih je beljakovina RET normalna v ganglijih, kromafinih celicah sredice nadledvične žleze, avtonomnih živcih in ščitničnih celicah C (21). Mutacija protoonkogenega RET deluje na presnovne poti, ki so pomembne za rast, proliferacijo, diferenciacijo, preživetje celic in programirano celično smrt. Zadošča že točkovna mutacija protoonkogenega RET, da povzroči maligno transformacijo celice.

Prvo dedno mutacijo protoonkogenega RET so odkrili že leta 1993 (22). V zadnjem desetletju se je zvečalo število tipov mutacij protoonkogenega RET. Kar 98 % bolnikov z MEN-2A in 80–90 % bolnikov z fMRŠ ima dedno mutacijo protoonkogenega RET na enem od pet cisteinskih kodonov, ki kodirajo ekstracelularno področje tirozin-kinaznega proteina RET: 609, 611, 618, 629 (ekson 10) ali 634 (ekson 11) (20). Kar 80 % bolnikov z MEN-2A ima mutacijo kodona 634 na eksonu 11 (23). Redkeje pa diagnosticiramo necisteinske mutacije, ki so pri fMRŠ (kodoni 768, 790, 791, 804, 806, 891) in MEN-2B (kodona 833 in 918) (24). Več kot 95 % bolnikov s sindromom z MEN-2B ima mutacijo kodona 918 (14). Poleg dednih mutacij protoonkogenega RET imajo bolniki tudi somatsko mutacijo na kodonu 918, ki jo je včasih mogoče najti samo v tumorju. Poročajo, da je mutacija M918T dokazljiva v tumorju kar pri 30–40 % bolnikov s sporadičnim MRŠ (14).

Mutacija protoonkogenega RET in ogroženost z medularnim rakom ščitnice

Po ogroženosti z MRŠ razvrščamo nosilce dednih mutacij protoonkogenega RET v tri skupine (14). Najbolj so z agresivno obliko bolezni ogroženi nosilci

mutacije na kodonu 883, 918 ali 922, saj pri njih tumor lahko metastazira že v prvem letu življenja (14). Zaradi tako velike ogroženosti v zgodnjem otroštvu je svetovana profilaktična tiroidektomija že v prvih šestih mesecih življenja.

Z MRŠ so precej ogroženi nosilci mutacije na kodonu 609, 611, 618, 620, 630 ali 634 (14); preventivna tiroidektomija je umestna pred petim letom starosti.

Z MRŠ so manj ogroženi nosilci mutacije na kodonu 533, 768, 790, 791, 804 ali 891; MRŠ nastane kasneje v življenju, redko pred desetim letom starosti (14).

Zdravljenje medularnega raka ščitnice

Splošno sprejeta predoperacijska diagnostika obsega ultrazvočno preiskavo vratu, tankoigelnno aspiracijsko biopsijo, določitev serumskih tumorskih označevalcev kalcitonina, karcinoembrionalnega antigena (CEA) in iskanje ter določitev dedne mutacije protoonkogenega RET (3, 4). Pred operacijo ščitnice je treba biokemično in z računalniško tomografijo ali z magnetnorezonančno preiskavo izključiti feokromocitom, da se med operacijo izognemo hipertenzijski krizi (3, 4). Pred operacijo moramo narediti ultrazvočno preiskavo ščitnice in vratu. Preiskavo prsnega koša in mediastinuma z računalniško tomografijo ali magnetno resonanco moramo narediti pri bolnikih z zasevki v bezgavkah in koncentracijo kalcitonina, višjo od 400 pg/ml (3).

Kirurško zdravljenje je temeljno pri MRŠ. Enako zdravimo bolnike, ki imajo sporadično ali dedno obliko MRŠ. Pri vseh bolnikih z MRŠ, ki je velik 1 cm ali več, je indicirana totalna tiroidektomija in obojestranska disekcija centralnega kompartmenta (regija VI). Disekcijo lateralnega vratnega kompartmenta (regija II–V) napravimo pri bolnikih z dokazanimi zasevki v teh bezgavkah. Pri bolnikih s tumorjem premera 1 cm ali več ali z zasevki v centralnem kompartmentu lahko napravimo profilaktično disekcijo lateralnega vratnega kompartmenta (3). Pooperacijsko obsevanje vratu in zgornjega mediastinuma je indicirano pri tumorjih T4a in T4b in če v vratu veliko bezgavk z metastazami. Za zdravljenje z obsevanjem se pri otrocih odločimo le izjemoma. V ZDA in v Evropi za zdravljenje lokoregionalno napredovale ali metastaske bolezni priporočajo vandetanib in kabozantinib (3).

Ker pri nastanku MRŠ sodeluje receptorska tirozin-kinaza RET, bi za zdravljenje MRŠ lahko prišli v poštev inhibitorji tirozin-kinaze (25). Zaenkrat so v kliničnih raziskavah preverjali vandentanib, imatinib, sunitinib, sorafenib, motaseni in številna druga zdravila, ki delujejo prek RET-kinaze, VEGFR, EGFR, c-KIT ali IGF-1R (25).

Genetsko svetovanje in testiranje pri MRŠ

Dedno obliko MRŠ lahko odkrijemo s presejanjem ožjih krvnih sorodnikov bolnika z MRŠ. Z gensko analizo krvi, ki je za preiskovanca povsem nenevarna, je mogoče ugotoviti, če je testiranec nosilec mutacije protoonkogenega RET že pred razvojem MRŠ oziroma v začetni fazi MRŠ (26). MKŠ bo kdaj koli v življenju nastal pri več kot 95 % nosilcih mutacij, zato svetujejo profilaktično tiroidektomijo pri vseh nosilcih mutiranega gena (3, 4, 26).

Genetsko svetovanje in testiranje v Ljubljani

Na Onkološkem inštitutu v Ljubljani, na katerem zdravimo vse slovenske bolnike z MRŠ, opravljamo genetsko svetovanje in testiranje že od leta 1996. Laboratorijski del testiranja opravi Laboratorij za molekularnogenetske preiskave na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani (27, 28).

Zgodnje odkritje in čim zgodnejše kirurško zdravljenje izboljša preživetje bolnikov oziroma nosilcev mutiranega gena in manj agresivno in cenejše zdravljenje. Na Onkološkem inštitutu v Ljubljani smo v obdobju od leta 1996 do leta 2008 genetsko testirali 115/144 (79,8 %) bolnikov z MKŠ. Mutacijo protoonkogenega RET smo dokazali pri 36 osebah: pri 15 indeksnih bolnikih iz 15 družin in 21 njihovih krvnih sorodnikih (29). Mutacije protoonkogenega RET so bile na eksonih 10, 11, 13 in 16 (29). Štirje nosilci mutacij še niso zboleli. Vsem štirim smo naredili profilaktično totalno tiroidektomijo (29). Ob operaciji so bili stari 5, 12, 20 in 51 let (29). Tudi naši rezultati kažejo, da je koristno (nujno) genetsko testirati vse bolnike z MKŠ in vse krvne sorodnike nosilcev mutiranega protoonkogenega RET, saj se le tako da preprečiti nastanek MRŠ, pri že zbolelih pa začeti zdravljenje prej, kar izboljša prognozo.

ZAKLJUČEK

Vzrok za nastanek dednega medularnega raka ščitnice je mutacija protoonkogenega RET. Vsem bolnikom s tem rakom je treba svetovati, da gredo na genetsko testiranje. Če testiranje v periferni krvi odkrije mutacijo protoonkogenega RET, je koristno testirati še krvne sorodnike. Na ta način se ugotovi, kdo je nosilec mutacije. Ker za MRŠ zboli kar 95 % nosilcev mutiranega protoonkogenega RET, je treba nosilcu mutacije svetovati profilaktično totalno tiroidektomijo. Najbolj so z agresivnim MRŠ ogroženi nosilci mutacije na kodonu 883, 918 ali 922; saj pri njih rak lahko zaseva že v prvem letu življenja. Pri nosilcih mutacije na teh kodonih zaradi velike verjetnosti za nastanek raka v zgodnjem otroštvu svetujemo profilaktično tiroidektomijo že v prvih šest mesecih življenja.

LITERATURA

1. Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W. European Thyroid Cancer Taskforce. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006; 154 (6): 787–803.
2. Bešić N, Tumorji ščitnice, obščitničnih žlez, nadledvičnih žlez in neuroendokrini tumorji prebavil. In: Novaković S, Hočevar M, Jezeršek Novaković B, Strojan P, Žgajnar J, Jug-Hartman M, editors. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2009: 272–83.
3. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Thyroid carcinoma. Version 2.2013. Available at http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/thyroid.pdf
4. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. American Thyroid Association Guidelines Task Force Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009; 19 (6): 565–612.
5. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1167–214.
6. Nosé V. Thyroid cancer of follicular cell origin in inherited tumor syndromes. *Adv Anat Pathol* 2010; 17 (6): 428–36.
7. Nosé V. Familial non-medullary thyroid carcinoma: an update, *Endocr Pathol* 2008; 19 (4): 226–40.
8. Keiser HR, Beaven MA, Doppman J, Wells S Jr, Buja LM. Sipple's syndrome: medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma, and parathyroid disease. Studies in a large family. NIH conference. *Ann Intern Med* 1973; 78 (4): 561–79.
9. Lairmore TC, Frisella MM, Wells SA. Genetic testing and early thyroidectomy for inherited medullary thyroid carcinoma. *Ann Med* 1996; 28 (5): 401–6.
10. Saad MF, Ordonez NG, Rashid RK, Guido JJ, Hill CS Jr, Hickey RC, et al. Medullary carcinoma of the thyroid. A study of the clinical features and prognostic factors in 161 patients. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63 (6): 319–42.
11. Schuffenecker I, Billaud M, Calender A, Chambe B, Ginet N, Calmettes C, et al. RET proto-oncogene mutations in French MEN 2A and FMTC families, *Hum Mol Genet* 1994; 3 (11): 1939–43.
12. Gertner ME, Kebebew E. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Curr Treat Options Oncol* 2004; 5 (4): 315–25.
13. O'Riordain DS, O'Brien T, Weaver AL, Gharib H, Hay ID, Grant CS, et al. Medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia types 2A and 2B. *Surgery* 1994; 116 (6): 1017–23.
14. Paragliola RA, Corsello SM, Torino F, Barbnabei A. Genetic and molecular pathophysiology of medullary thyroid carcinoma. In: Carpi A, Mechanick JI, editors. *Thyroid cancer. From emergent biotechnologies to clinical practice guidelines*. Boca Raton: CRC Press, 2011: 39–58.
15. Wolfe HJ, Melvin KE, Cervi-Skinner SJ, Saadi AA, Juliar JF, Jackson CE, et al. C-cell hyperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1973; 289 (9): 437–41.
16. Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO, et al. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid* 2005; 15 (6): 531–44.
17. Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2. Implications for clinical management, *Hormones (Athens)* 2009; 8 (1): 23–8.

18. Machens A, Ukkat J, Brauckhoff M, Gimm O, Dralle H. Advances in the management of hereditary medullary thyroid cancer. *J Intern Med* 2005; 257 (1): 50–9.
19. Fattoruso O, Quadro L, Libroia A, Verga U, Lupoli G, Cascone E, et al. A GTG to ATG novel point mutation at codon 804 in exon 14 of the RET proto-oncogene in two families affected by familial medullary thyroid carcinoma. *Hum Mutat* 1998; (Suppl 1): S167–71.
20. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, et al. Familial medullary thyroid carcinoma with noncysteine ret mutations: phenotype-genotype relationship in a large series of patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (8): 3746–53.
21. Ball DW. Medullary thyroid cancer: monitoring and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007; 36 (3): 823–37.
22. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363 (6428): 458–60.
23. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, van Vroonhoven TJ, Roehler HD, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 2003; 349 (16): 1517–25.
24. You YN, Lakhani VT, Wells SA Jr. The role of prophylactic surgery in cancer prevention. *World J Surg* 2007; 31 (3): 450–64.
25. Torino F, Barnabei A, Paragliola RM, Corsello SM. Molecular targeted therapies of medullary thyroid carcinoma. In: Carpi A, Mechanick JI, editors. *Thyroid cancer. From emergent biotechnologies to clinical practice guidelines*. Boca Raton: CRC Press, 2011: 351–66.
26. Dralle H, Gimm O, Simon D, Frank-Raue K, Gortz G, Niederle B, et al. Prophylactic thyroidectomy in 75 children and adolescents with hereditary medullary thyroid carcinoma: German and Austrian experience. *World J Surg* 1998; 22 (7): 744–50.
27. Bergant D, Hočevar M, Bešič N, Glavač D, Korošec B, Caserman S. Hereditary medullary thyroid cancer in Slovenia – genotype-phenotype correlations. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118: 411–6.
28. Glavač D, Korošec B, Bergant D, Hočevar M, Bešič N. Molecular diagnostics of multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN II) In: Luzar B, Poljak M, Glavač D, Balažoč J, editors. *Molekularna diagnostika v medicini: zbornik predavanj*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2005: 185–91.
29. Bergant D, Glumac N. Rezultati genetskega presejanja bolnikov z MTC na OI v obdobju 1995–2008 – Preventivne tiroidektomije. In: Rems Miran, Studen Pauletič P, editors. *5. kongres Združenja kirurgov Slovenije z mednarodnim sodelovanjem, Kranjska Gora, 25.–27. november 2010. Zbornik povzetkov*. Ljubljana: Združenje kirurgov Slovenije, 2010: 21.

GENETSKO SVETOVANJE – DELOVANJE AMBULANTE ZA GENETSKO SVETOVANJE NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU LJUBLJANA

Mateja Krajc

Povzetek. V okviru Ambulante za onkološko genetsko svetovanje in testiranje obravnavamo družine, v katerih se rak pojavlja pogosteje. Najpogostejši sindromi, pri katerih omogočimo genetsko testiranje, so dedni rak dojk in/ali jajčnikov, dedni nepolipozni rak debelega črevesa, družinska adenomatozna polipoza in družinska oblika kožnega melanoma.

Dejavnost opravlja multidisciplinarni tim, ki ga sestavljajo zdravniki različnih specialnosti (kirurg, radioterapevt, internist, ginekolog, radiolog, genetski epidemiolog-specialist javnega zdravja in psihiater), molekularni biolog, diplomirana medicinska sestra in klinični psiholog. V Ambulanto za onkološko genetsko svetovanje lahko bolnika napoti osebni zdravnik ali zdravnik specialist, pri katerem je bolnik trenutno v obravnavi.

V okviru kliničnih poti genetskega svetovanja in testiranja so jasno definirane indikacije za napotitev na posvet. Posvet pred testiranjem in po njem je obvezen del vsake obravnave, prav tako vsako družino obravnava multidisciplinarni konzilij, ki pripravi program spremljanja glede na izvid testiranja. Hudo ogrožene z rakom dojk, jajčnikov in prostate spremljamo v okviru Genetske ambulante Centra za bolezni dojk na Onkološkem inštitutu Ljubljana v skladu z zadnjimi uveljavljenimi mednarodnimi smericami in glede na sprejete klinične poti genetskega svetovanja na Onkološkem inštitutu Ljubljana.

UVOD

V Ambulanti za onkološko genetsko svetovanje in testiranje na Onkološkem inštitutu (OI) Ljubljana obravnavamo družine, kjer se rak pojavlja pogosteje. Najpogostejši sindromi, pri katerih omogočimo genetsko testiranje, so dedni rak dojk in/ali jajčnikov, dedni nepolipozni rak debelega črevesa, družinska adenomatozna polipoza ter družinska oblika kožnega melanoma.

Za dejavnost skrbi multidisciplinarni tim, ki ga sestavljajo zdravniki različnih specialnosti (kirurg, radioterapevt, internist, ginekolog, radiolog, genetski epidemiolog-specialist javnega zdravja in psihiater), molekularni biolog, diplomirana medicinska sestra in klinični psiholog.

V ambulanto za onkološko genetsko svetovanje lahko bolnika napoti osebni zdravnik ali zdravnik specialist, ki ga trenutno obravnava.

Indikacije za napotitev na svetovanje so (1):

I. Za dednega raka dojk in/ali jajčnikov:

- znana mutacija (okvara gena) v družini,
- rak dojk pred 40. letom,
- obojestranski rak dojk,
- trojno negativni rak dojk,

- rak dojk in jajčnikov,
- moški z rakom dojk,
- pozitivna družinska anamneza: (i) sorodnica v prvem kolenu z rakom dojk pred 40. letom, (ii) sorodnik moškega spola v prvem kolenu z rakom dojk, (iii) sorodnica v prvem kolenu z obojestranskim rakom dojk, (iv) dve sorodnici v prvem in drugem kolenu z rakom dojk pred 60. letom ali z rakom jajčnikov, ne glede na njihovo starost ob diagnozi, (v) tri sorodnice v prvem ali drugem kolenu z rakom dojk in/ali jajčnikov.

II. Za dednega nepolipoznega raka debelega črevesa:

- znana mutacija (okvara gena) v družini,
- vsaj trije sorodniki z rakom debelega črevesa (RDČ), od katerih je eden zbolel pred 50. letom, od drugih dveh pa je eden sorodnik v prvem kolenu,
- osebe, ki so zbolele za dvema rakoma, povezanima z dednim RDČ (to pa so kolorektalni rak, rak endometrija, rak jajčnikov, rak želodca, rak trebušne slinavke, rak tankega črevesa in rak sečil),
- osebe z RDČ in sorodnikom v prvem kolenu, prav tako z RDČ in/ali s kakim rakom, povezanim z RDČ, in/ali kolorektalnim adenomom; vsaj eden od primerov je bil odkrit pred 45. letom, adenom pa pred 40. letom starosti,
- osebe z RDČ ali karcinomom endometrija, zbolele pred 45. letom,
- osebe z adenomi, mlajše od 45 let.

III. Za družinsko adenomatozno polipozo:

- znana mutacija (okvara gena APC) v družini,
- osebe, pri katerih je odkritih več kot deset adenomatoznih polipov.

IV. Za družinsko obliko kožnega melanoma:

- znana mutacija (okvara gena) v družini,
- v družini sta za kožnim melanomom zbolela vsaj dva sorodnika v prvem kolenu,
- vsaj dva sorodnika s kožnim melanomom (KM), če je eden od njiju zbolel z več primarnimi KM ali ima sindrom atipičnih nevusov,
- vsaj trije sorodniki s kožnim melanomom.

Indikacije za napotitev na posvet so jasno definirane v okviru kliničnih poti genetskega svetovanja in testiranja. Posvet pred testiranjem in po njem je obvezen del vsake obravnave, prav tako se vsaka družina obravnava na multidisciplinarnih konzilijih, kjer pripravimo program spremljanja glede na izvid testiranja.

POTEK OBRAVNAVE

Prvi stik bolnika z Ambulanto za onkološko genetsko svetovanje je največkrat po telefonu. Medicinska sestra v prvem pogovoru bolniku na kratko razloži potek obravnave genetskega svetovanja, nato mu pošlje vprašalnik za zbiranje družinskih podatkov (rodovnik) in informativno gradivo. Ko bolnik vrne izpolnjen vprašalnik, sledi nadaljnja obravnava bolnika/družine. Iz poslanih podatkov narišemo rodovnik – družinsko drevo – in po dogovorjenih metodah ocenimo, ali so izpolnjena merila za genetsko svetovanje. S pomočjo računalniškega programa ocenimo verjetnost mutacije v družini in ogroženost zdravih posameznikov. Družino nato z vsemi zbranimi in analiziranimi podatki obravnavamo na rednih mesečnih sestankih multidisciplinarnega tima, tako pred testiranjem kot po njem. Na sestanku pripravimo priporočila za preventivne ukrepe oziroma program kontrolnih pregledov, ki jih lahko oseba, če je to izvedljivo, opravlja na Ol v okviru ambulantne dejavnosti. Po tem sestanku povabimo bolnika na genetsko svetovanje in mu podamo mnenje multidisciplinarnega tima (1).

Klinične poti onkološkega genetskega svetovanja in testiranja

V okviru Ambulante za onkološko genetsko svetovanje in testiranje smo pripravili štiri klinične poti obravnave pacientov (2). Pacient nam je bil v ospredju razmišljanja in osnovno vodilo pri oblikovanju algoritma obravnave. Cilji kliničnih poti onkološkega genetskega svetovanja in testiranja se ne razlikujejo od kliničnih poti drugih področij in so osnova za enakovredno obravnavo pacientov. Prav tako so lahko klinične poti osnova za nenehno izpopolnjevanje kakovosti obravnave in omogočajo merjenje učinkovitosti obravnave.

Obravnava pacientov se nenehno spreminja glede na doktrino obravnave. V okviru multidisciplinarnih sestankov jih nenehno dopolnjujemo in izboljšujemo. Opisi kliničnih poti zato niso statični dokumenti, ampak »živa snov«, ki jo sproti dograjujemo v smeri boljše obravnave pacienta. Klinična pot je torej orodje, ki natančno opisuje proces zdravstvene obravnave kake skupine pacientov, in sicer od vstopa pacienta v proces zdravstvene obravnave pa vse do njenega zaključka (3).

V okviru Ambulante za onkološko genetsko svetovanje in testiranje lahko obravnavo pacienta razdelimo v štiri večje sklope, zato so tudi nastale štiri klinične poti obravnave. Prvi in najboljšežnejši del obravnave je namenjen družinam, kjer se pogosteje pojavljata rak dojke in jajčnikov. Opisuje jo klinična pot za onkološko genetsko svetovanje in testiranje za dednega raka dojke in/ali jajčnikov. Druga klinična pot opisuje obravnavo družin, kjer se v več generacijah pojavlja rak debelega črevesa in danke in raki, ki so povezani s tem sindromom. Gre za klinično pot, ki obravnava posameznike iz

družin, kjer je postavljen sum na Lynchev sindrom, torej na dedni nepoli-pozni rak debelega črevesa in danke. Glede na rastoče breme te bolezni v populaciji bo obravnava teh družin prevladujoče delo Ambulante za onko-loško genetsko svetovanje in testiranje. Tretja klinična pot je namenjena družinam, pri katerih je postavljena klinična diagnoza družinske polipoze. V teh družinah namreč na podlagi kliničnega pregleda (več kot sto polipov, najdenih ob kolonoskopiji) skoraj vedno najdemo okvare na genu APC, v proces svetovanja in testiranja pa so vključeni tudi otroci po 10. letu starosti. Četrta klinična pot je opis obravnave vseh drugih redkih dednih sindromov, kjer se v družinah pojavljajo kombinacije različnih rakov in drugih diagnoz in je potreben pozoren pregled tako diagnoz kot tudi možnosti preventivnih ukrepov, kadar je sum na dedni sindrom potrjen (na primer sindrom Li-Fraumeni, Peutz Jeghersov sindrom in številni drugi).

Obravnava družin se tako nenehno spreminja glede na trenutno doktrino obravnave. V okviru rednih mesečnih multidisciplinarnih sestankov obravnavo nenehno dopolnjujemo in izboljšujemo. Vsi, ki smo vključeni v obravnavo pacienta, tako poznamo svoje pristojnosti in dolžnosti pri vsakem koraku obravnave. Klinične poti onkološkega genetskega svetovanja in testiranja so objavljene na spletni strani OI in so prosto dostopne (4–7).

Prednosti genetskega svetovanja

Kdor se zaveda, da je bolj ogrožen s kako rakavo boleznijo in ve, da je nosilec mutacije na genih, ki so odgovorni za nastanek raka, lahko lažje in z večjo gotovostjo soodloča pri programu rednih in kontrolnih pregledov. Tistim, ki so bolj ogroženi z rakom, svetujemo redne kontrolne preglede, ki se začno veliko prej in so tudi pogostejši kot za splošno populacijo. Po drugi strani pa lahko tisti, ki niso nosilci ogrožajoče mutacije, izstopijo iz strogih programov kontrolnih in preventivnih ukrepov. Negativni izvid testa je precejšnje olajšanje tako za preiskovanca kot za njegove sorodnike. Nezanemarljiv dosežek pa je spoznanje zdravega načina življenja in sprememba življenjskih navad, ki zmanjšajo ogroženost z rakom. Zavedati se je namreč treba, da ljudje, ki niso nosilci okvarjenih genov, niso brez nevarnosti, da zbolijo za rakom: ostaja jim splošna populacijska ogroženost, zaradi česar je zelo pomembno, da se vključijo v presejalne programe, ki jih država omogoča splošni populaciji. Za oceno ogroženosti posameznika je potrebno družinsko drevo z natančnimi podatki o zbolevanju družinskih članov v več generacijah (8).

Pomembno je poudariti, da je odločitev za genetsko testiranje svobodna. Vsakdo ima pravico, da zavrne predlagano genetsko testiranje, kar pa seveda ne sme v ničemer spremeniti obravnave, če vendarle zbolijo. Vsi podatki o rezultatu genetskega testiranja so tajni, osebe pa zavezano k molčečnosti v skladu z zakonom. Prav tako podatkov o testiranju in izvidu

testiranja nima od testirancev nihče pravice zahtevati niti jih niso dolžni nikomur predati.

Omejitve genetskega testiranja

Za nosilce mutacij je informacija, da jih hudo ogroža kakšna rakava bolezen, lahko težko breme, ki povzroča čustvene stiske, depresijo ali jezo; njihove sorodnike, kjer mutacije nismo odkrili, pa velikokrat bremeni občutek krivde. Negativni rezultat genetskega testiranja žal ni vedno zagotovilo, da testirani v resnici ni nosilec mutacije; v takem primeru ostaja ogroženost z rakom neznana.

Kratka zgodovina delovanja ambulante in načrtovana prihodnost

Genetsko svetovanje in testiranje se na Ol izvaja že od leta 1999, sprva v okviru raziskovalnega projekta, kasneje, od leta 2008, pa kot redna zdravstvena dejavnost inštituta. Prva testiranja so bila opravljena v sodelovanju s kolegi iz Belgije, na Svobodni univerzi v Bruslju. Od leta 2008 vse genetske teste dela Laboratorij za molekularno diagnostiko Ol. Prav tako smo leta 2010 vsem pacientom, ki so hudo ogroženi z rakom dojk, jajčnikov in prostate omogočili sledenje na Ol. V okviru popoldanske Ambulante za sledenje stanja hudo ogroženih tako lahko celostno obravnavamo bolnike in njihove svojce. Smo ena redkih vrhunskih ustanov, ki zdravstveno stanje svojih pacientov spremlja v okviru redne obravnave, tako da jim ni treba iskati pregledov po drugih ustanovah v državi.

Število obravnavanih pacientov iz leta v leto narašča: leta 2012 smo opravili 739 svetovanj, od tega 413 prvih; 275 pacientov smo poslali na testiranje.

Letos je v ospredju prizadevanje za informatizacijo baze podatkov, posodobitev registra dednih rakov, ki je tudi že v osnutku zakona o zbirkah podatkov. To bo olajšalo nadzor in analizo že zbranih podatkov. Poleg tega želimo okrepiti službo svetovanja za dednega raka debelega črevesa in še naprej sodelovati s kolegi v tujini v okviru raznih raziskovalnih projektov.

ZAKLJUČEK

Genetsko svetovanje ogroženim družinam je proces, ki traja dalj časa, vsak novi dogodek v družinah pa da nova spoznanja in spremeni svetovanje. Pomembno je dobro poznati problematiko, obvladati komunikacijo s pacienti, njihovimi sorodniki in s kolegi v timu. Le tako je namreč mogoče zagotoviti kakovostno svetovanje.

V Sloveniji poteka onkološko genetsko svetovanje in testiranje pri družinah z rakom dojke, jajčnikov, debelega črevesa, ščitnice in malignega melanoma ter za rake v sklopu redkih dednih sindromov raka. Vsako družino tako na rednih sestankih obravnava multidisciplinarni tim zdravnikov različnih specialnosti, pri svetovanju pa sta vedno navzoči tudi psihologinja in specializirana medicinska sestra. V tem času smo poleg splošnih ugotovitev o pogostosti dednega raka v slovenski populaciji prišli tudi do nekaj ugotovitev, lastnih naši populaciji, ki nam omogočajo lažje, hitrejše in informativnejše svetovanje. Obravnava pacientov poteka v okviru izdelanih kliničnih poti. Osnovno vodilo pri pripravi kliničnih poti onkološkega genetskega svetovanja in testiranja nam je dobrobit pacienta. Ključ za oblikovanje algoritma obravnave je opredelitev optimalne pacientove poti od prvega kontakta do zaključka obravnave.

Obravnava pacientov se spreminja s posodabljanjem doktrine, ki je podprto z dokazi. Obravnavo tako nenehno dopolnjujemo in izboljšujemo. Prav tako nam standardizirana obravnava omogoča stalno merjenje njene kakovosti, predvsem pa varnejšo in enakovredno obravnavo vseh pacientov.

LITERATURA

1. Informacija o genetskem svetovanju in testiranju na Onkološkem inštitutu Ljubljana. Available at http://www.onko-i.si/dejavnosti/zdravstvena_dejavnost/skupne_zdravstvene_dejavnosti/genetsko_svetovanje/.
2. Krajc M, Vrečar A, Hotujec S, Novaković S. Klinične poti onkološkega genetskega svetovanja in testiranja na Onkološkem inštitutu Ljubljana, *Onkologija* 2012; 1: 18-20.
3. Marušič D, Simčič B. Priročnik za oblikovanje kliničnih poti, Republika Slovenija Ministrstvo za zdravje, Ljubljana 2009. Available at http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/page/uploads/kakovost/Klinicne_poti/prirocnik_OBLIKOVANJE_KP_slo_170310.pdf.
4. Klinična pot onkološkega genetskega svetovanja za dedni rak dojke in/ali jajčnikov. Available at http://www.onko-i.si/uploads/media/Svetovanje_in_testiranje_za_dedni_rak_dojk_in_ali_jajcnikov.pdf.
5. Klinična pot onkološkega genetskega svetovanja za dedni nepolipozni rak debelega črevesa. Available at http://www.onko-i.si/uploads/media/Svetovanje_in_testiranje_za_dedni_nepolipozni_rak_debelega_crevesa_in_danke.pdf.
6. Klinična pot onkološkega genetskega svetovanja za družinsko adenomatozno polipozo. Available at http://www.onko-i.si/uploads/media/Svetovanje_in_testiranje_za_druzinsko_adenomatozno_polipozo.pdf.
7. Klinična pot onkološkega genetskega svetovanja za redke dedne sindrome. Available at http://www.onko-i.si/uploads/media/Svetovanje_in_testiranje_za_redke_dedne_sindrome.pdf.
8. Informacijska zbiranka za bolnike, ki so napoteni v ambulanto za onkološko genetsko svetovanje – Dedni rak dojke in/ali jajčnikov, Onkološki inštitut Ljubljana, 2013.

ETIČNI VIDIKI GENETSKE OBRAVNAVE DEDNIH RAKOV

Tone Žakelj, Jože Trontelj

Genetika, dednost, rakave bolezni in etika – štirje pojmi, o katerih večina ljudi vsaj nekaj ve, vendar o njih raje ne govori veliko. Ko spregovorijo, se izkaže, da prve tri pojme povezujejo z napredkom znanosti, ki dokazuje že poprej intuitivno zaznano usojenost, neizbežnost, ki pa večinoma – posebej ko govorijo mladi – zadeva druge, predvsem starejše, ne pa njih same. In etika? Etika je nekaj filozofskega, čustvenega ali vsaj polrazumskega; za mnoge laike najmanj sočutje, ki bi ga moralo – še bolj kot najbližji sorodniki – »obsojenim« z neljubo ali celo usodno genetiko (podedovano boleznijo) izkazovati zdravstveno osebje, pa ga – po njihovem mnenju – zlasti medicina zmore premalo. Tudi mnenje filozofov, celo priznanih formalnih in znanih specialistov za etiko, ni enotno: za mnoge – pogosto označene kot konservativne (v pomenu nazadnjaške) – obsega etičnost v sklopu načel in ravnanj, ki ščitijo človeka v medicinski obravnavi (1) tudi nujno, vsaj minimalno razumsko in čustveno zadržanost ali vsaj previdnost pred širokim in svobodnim razkrivanjem individualnih ali celo družinskih in družbenih karakteristik in usod, ki jih določa genetika, tudi onkološka. Za druge, tako imenovane moderne, utilitarne etike, pa je klasična etika le nekakšna nepotrebna ovira, ki zadržuje razvoj in napredek znanosti in s tem tudi človeštva (2, 3).

Vprašanje, ali so genetske preiskave enakovredne drugim kliničnim in laboratorijskim preiskavam ali pa je nanje paciente treba posebej in drugače pripraviti in ali so izsledki genetskih preiskav enakovredni ostalim osebnim zdravstvenim podatkom ali pa vendarle zaslužijo posebno obravnavo in strožje varovanje, se je še posebej zaostriło v zadnjem desetletju prejšnjega stoletja, ko se je silovito zvečala tehnična in tudi finančna dosegljivost genetskih testov (4).

Mnogi trdijo, da genetski podatki ne zaslužijo posebne obravnave in zaščite. Njihov prvi argument je, da je prvi znani genetski podatek družinska anamneza. V dokaz te trditve navajajo Talmud, resda njegov novejši del, ki pa je vendarle nastal že v 2. stoletju po Kristusu, ki nekje svetuje: »Če da mati obrezati svojega prvega sina in ta sin zaradi tega umre, iz istega razloga pa ji umre tudi njen drugi sin, naj tretjega ne da obrezati.« Sestre mater takih sinov svari, da njihovim sinovom grozi enaka usoda. Hemofilijo so nato – 1600 let kasneje – znova prepoznali, spet iz družinske anamneze. Družinska anamneza je razkrila še številne druge družinske in dedne bolezni, načine dedovanja in lahko celo prikaže ogroženost potomcev. Za izdelavo družinske anamneze so v zadnjem času izdelali celo vrsto računalniških programov (5, 6). Družinska anamneza je skozi stoletja ohranila svoj pomen.

Kot dokazujejo tudi prispevki tega seminarja, je pogosto celo odločilna pri presoji, ali pacienta napotiti na genetsko preiskavo ali ne. Družinska anamneza in genetika sta nedvomno čvrsto povezani.

Zanimanje ljudi za lastno genetsko determiniranost in tehnična ter finančna dostopnost do genetskih analiz so – posebej v zadnjem desetletju – izkoristili številni strokovnjaki genetiki za svojo poslovno priložnost; svojo usposobljenost in opremljenost na področju, ki je bilo še do nedavnega v rokah tradicionalno dokaj strogo pravno in etično nadzorovane medicine, so prenesli v svobodnejše, zakonsko manj nadzorovano podjetništvo; v pravno slabo ali celo neopredeljenem področju prodajajo genetske teste. Po internetu in drugih sredstvih javnega obveščanja ponujajo za razmeroma visoko, a za mnoge še sprejemljivo ceno različne nabore genetskih preiskav, vključno z iskanjem še ne (dovolj) razumljenih genetskih onkoloških označevalcev. Naročniki raziskav večinoma niso poučeni, kaj bodo pomenili rezultati, ki jih bodo prejeli, razlage ne dobijo niti z izvidom. Zbegani in zaskrbljeni iščejo razlago pri svojih osebnih zdravnikih, mnogi tudi zahtevajo, naj jim zdravniki izvide genetskih preiskav vpišejo v zdravstveno kartoteko (4, 7). Ta »splošni« interes za genetske izvide in za njihovo zapisovanje v zdravstveno dokumentacijo je drugi argument zagovornikov enakovrednosti vseh osebnih medicinskih podatkov.

Njihov tretji argument, ki je morda še najmočnejši, pa je, da je pravica »ne vedeti« za lastne genetsko določene slabosti oz. jih prikriti, zlasti če so prenosljive na potomce, v resnici le pravica do neodgovornosti in brezbržnosti do prihodnjih rodov (7).

Razpravljanje o drugačnosti genetskih podatkov še vedno poteka, tako da soglasje na individualni ravni ni doseženo in prav verjetno še zlepa ali pa nikoli ne bo. Vendar so doslej večino strokovne pa tudi velik del zainteresirane laične javnosti bolj prepričali argumenti uglednih mednarodnih bioetičnih teles (1, 8, 9) in Svetov za bioetiko številnih evropskih držav (4), ki sodijo, da so genetski podatki zaradi svojih lastnosti posebno občutljivi osebni podatki. Zakaj, zelo jasno pojasnjuje UNESCOva *Mednarodna deklaracija o človeških genetskih podatkih*: genetski podatki so lahko napovedni, ne zadevajo zgolj preiskovanca, pač pa tudi člane njegove družine, sorodnike in potomce; prav lahko gre za informacije, katerih pomen v času genetske preiskave še ni jasen; imajo lahko tudi širši kulturni pomen (4). Individualni genetski podatki kaj lahko povzročijo genetsko diskriminacijo (pri delodajalcih, zdravstvenih in življenjskih zavarovalnicah, pa tudi v družinskem okolju – človek z znanim »slabim« genetskim izvidom je lahko obravnavan kot neprimeren za biološko starševstvo (7) ali – ko gre za otroka – za posvojitve (10) in stigmatizacijo posameznika, neenakost v medicinski obravnavi. Človek, ki privoli v genetsko testiranje, mora biti dobro poučen o preiskavi in njenih možnih posledicah, dobiti mora strokovno, a razumljivo razlago

izvidov (genetsko svetovanje pred preiskavo in po njej). Ima tudi pravico, da ne zve za izvide svojih genetskih preiskav. Posebej problematične so genetske preiskave na ljudeh, ki niso sposobne privolitve; dovoljene so le, če so jim v neposredno korist (in tudi v predimplantacijskem testiranju) (4, 11–13). Tako določa tudi *Dodatni protokol (h Konvenciji o človekovih pravicah v zvezi z biomedicino) o genetskem testiranju za zdravstvene namene* (1), ki ga je 23. 7. 2009 ratificirala tudi Slovenija in ima moč zakona. Slovenija sicer ima Zakon o genski tehnologiji, vendar ne vsebuje določb za humano genetiko. Velja torej le omenjeni *Dodatni protokol*, vendar nima – kot bi jih imel ustrezní zakon – kazenskih sankcij za nespoštovanje odredb protokola (14).

V genetiki rakavih bolezni veljajo ista etična načela, kot za druge bolezni: potrebna je veljavna privolitev preiskovanca po temeljiti in njemu razumljivi poučitvi, zagotoviti mu je treba zasebnost in zaupnost, varovanje podatkov, pravico, da izve ali pa da noče izvedeti za rezultate, predvsem pa razumljivo genetsko svetovanje pred testiranjem in po njem. Spoštovati je treba njegovo avtonomijo in mu dati znanje in čas, da se odloči, če in koliko svojega izvida bo razkril sorodnikom zaradi svoje moralne odgovornosti do morebitnih potomcev (7, 15). Prav tako, da se ženska, hudo ogrožena z rakom dojke, prostovoljno in popolnoma poučena morda odloči za profilaktični ukrep, ki – kljub odlični obnovitveni kirurgiji – nujno zahteva vsaj hud duševni napor in mnogo poguma (16). Zelo težka je tudi odločitev staršev v imenu lastnega otroka, npr. za profilaktično tiroidektomijo, čeprav vedo, da mu sicer grozi smrt zaradi rakave bolezni (17).

Nedvomno pa onkološka genetika ni pomembna le za preučevanje dednih rakavih bolezni, ampak – in morda zaenkrat predvsem – za vpogled v genetske lastnosti tumorske celice same (4, 18).

Po svetu tečejo številne raziskave o genskem zdravljenju raka (19). Dolga leta so v ZDA in Evropi preverjali virusne vektorje, ki bi v rakavo celico vnesli gen ali pa gene ki bi odpravil/i »neposlušnost« celice za spodbude, ki ji omogočajo nenadzorovano delitev. Ne Agencija za zdravila iz ZDA ne evropska agencija doslej še nista dovolili komercialne rabe kakršnega koli takega zdravila (20). Negotovost, kako se bodo gensko spremenjeni virusi »skombinirali« z naravnimi, je prevelika. Ni nemogoče, da se bodo tovrstna prizadevanja končala tako, kot so se poskusi in obeti s ksenotransplantacijo; povsem jih je ustavila grožnja prenosa prionskih bolezni.

Človeštvo na področju genetike seveda ne potrebuje samo zakonodaje in priporočil. Potrebuje predvsem izobraževanje javnosti, da bo čim boljše razumela dileme, ki jih sproža genetsko testiranje. Če hočemo od njega kar največjo korist, pa bodo morale odločitve temeljiti na razumu, ne le na znanju. Znanje, ki se na področju genetike nenehno veča, a bi bilo vpeljano

v prakso prehitro, brez temeljitega preverjanja, brez upoštevanja dolgoletnih izkušenj s sorodnih področij, brez etičnega razmisleka – kar vse na dolgi rok znanje spremeni v razum –, je namreč kaj lahko zlorabljeno ali pa škoduje.

LITERATURA

1. Človekove pravice v zvezi z biomedicino : Oviedska konvencija in dodatni protokoli. Available at <http://www.kme-nmec.si/Docu/Okonvencija.pdf>
2. Žakelj T, Trontelj J. Etični razmislek – nepotrebna cokla ali varovalka napredka? Pogled z biomedicinskega stališča. Seminar o etiki za profesorje srednjih šol. Debeli rtič, 15. februar 2006.
3. Trontelj J. O etiki in "utilitarni etiki" v medicini. In: Avguštin SA, editor. VI. konferenca slovenskih zdravnikov iz sveta in Slovenije. Ljubljana, 28.-29. maj 2009. Ljubljana: Svetovni slovenski kongres, 2009: 41-5.
4. Trontelj J, Grošelj U. Osnutek stališča Komisije republike Slovenije za medicinsko etiko o uporabi komercialnih genetskih testov. Pred natisom.
5. Pyeritz RE. The family history: the first genetic test, and still useful after all those years. *Rev Gen Med* 2012; 14 (1): 3–9.
6. Lynch HT. Cancer family history and genetic testing: are malpractice adjudications waiting to happen? *AJG* 2002; 97 (3): 518–20.
7. Surbone A. Legislation on genetic testing and practice of oncology. *Crit Rev Oncology Hematol* 2009; 69: 95–7.
8. Statement by the European Group on Ethics in Science and New Technologies on advertising genetic test via the Internet. 24. Feb. 2003. Available at http://ec.europa.eu/bepa/european-group-ethics/docs/statement_ege_advertising_genetic_en.pdf
9. Nuffield Council on Bioethics, Medical profiling and online medicine: The ethics of 'personalised healthcare' in a consumer age. Available at <http://www.nuffieldbioethics.org/sites/default/files/Medical%20profiling%20and%20online%20medicine%20-%20the%20ethics%20of%20%27personalised%20healthcare%27%20in%20a%20consumer%20age%20%28Web%20version%20-%20reduced%29.pdf>
10. Wheeler R. Predictive testing for pre-malignancy as a prelude to adoption? *An English case. Familial Cancer*; 2010; 9: 71–4.
11. Niermeijer MF, de Wert G, Dondorp W. Preimplantation genetic diagnosis for cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 794.
12. Malkin D. Prenatal diagnosis, preimplantation genetic diagnosis, and cancer: was Hamlet wrong? *J Clin Oncol* 2009; 27 (27): 4446–7.
13. Spits C, De Rycke M, Van Ranst N, Verpoest W, Lissens W, Van Steirteghem A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition syndromes. *Prenat Diagn* 2007; 27: 447–56.
14. Balažič J, Trontelj J. Etika v medicinskem delu predloga Zakona o uporabi genske tehnologije. In: Flis V, Reberšek-Gorišek J, Rijavec V, et al, editors. *Medicina in pravo: izbrana poglavja*: 2001, 2002, 2003. Maribor: Splošna bolnišnica Maribor, 2004; 13-8.
15. Harris M, Winship I, Spriggs M. Controversies and ethical issues in cancer-genetics clinics. *Lancet Oncol* 2005; 6: 301–10.
16. Surbone A. Social and ethical implications of BRCA testing. *Ann Oncology* 2011; 22 (Suppl 1): i60–6.

17. Tischkowitz M, Rosser E. Inherited cancer in children: practical/ethical problems and challenges. *Eur J Cancer* 2004; 40 : 2459–70.
18. Rudolf G, Peterlin B. Uporaba DNK genetskega testa v medicini. *Zdrav Vestn* 2009; 78: 65–71.
19. Alexandrova R. Experimental strategies in gene therapy cancer. *J BUON* 2009; 14 (Suppl 1): S23-32.
20. Workshop on gene therapy, Ljubljana, Ljubljana, 6 December 6 2006 (hand-out)

SEZNAM AVTORJEV

po abecedi priimkov

Prim. mag. Damijan Bergant, dr. med.
Oddelek za kirurško onkologijo
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Prof. dr. Nikola Bešić, dr. med.
Oddelek za kirurško onkologijo
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Prof. dr. Marko Hočevar, dr. med.
Oddelek za kirurško onkologijo
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Mag. Mateja Krajc, dr. med.
Ambulanta za onkološko genetsko
svetovanje in testiranje
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Dr. Srdjan Novaković, univ.dipl. biol.,
znansveni svetnik
Oddelek za molekularno diagnostiko
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška 2, Ljubljana

Doc. dr. Janja Ocvirk, dr. med.
Sektor internistične onkologije
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška 2, 1000 Ljubljana

Izred. prof. dr. Maja Primic-Žakelj, dr. med.
Epidemiologija in register raka
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Dr. Boštjan Šeruga, dr. med.
Sektor internistične onkologije
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Akad. prof. dr. Jože Trontelj, dr. med.
Komisija RS za medicinsko etiko
Inštitut za klinično nevrofiziologijo
Univerzitetni klinični center Ljubljana
Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana

Izred. prof. dr. Zakotnik Branko, dr. med.
Sektor za internistično onkologijo
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

Tone Žakelj
Komisija RS za medicinsko etiko
Inštitut za klinično nevrofiziologijo
Univerzitetni klinični center Ljubljana
Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana

Prof. dr. Janez Žgajnar, dr. med.,
strokovni direktor
Onkološki inštitut Ljubljana
Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana

XXI. seminar “In memoriam dr. Dušana Reje” so finančno podprli

ASTRAZENECA UK LTD, Podružnica v Sloveniji

BAYER d. o. o.

FUNDACIJA “DOC. DR. J. CHOLEWA“

MERCK d. o. o.

PFIZER, Podružnica Ljubljana

ROCHE FARMACEVTSKA DRUŽBA d. o. o.

SIEMENS d. o. o., Ljubljana