



Prediktivní (presymptomatické) genetické testování

Onemocnění s nástupem příznaků v dospělosti
Onkogenetika



Monogenní onemocnění

- Převážně se manifestují od ranného dětského věku
- Méně než 10% se manifestuje po pubertě, asi 1% po skončení reprodukčního věku



Genetické testování

- Odhalování etiopatogenetických mechanismů, upřesnění klasifikace nemocí, cílená léčba a prevence
- Limitace- vztah genotyp X fenotyp, genetická heterogenita, neúplná penetrance
- Absence efektivní léčby, prevence u řady onemocnění



DNA diagnostika

- Nepřímá- vazebná analýza
 - Přímá
-
- Diagnostické testy
 - Prediktivní(presymptomatické) testy

Prediktivní testování

Predikce budoucího rizika rozvoje onemocnění
(blížící se jistotě u některých onemocnění)

Dopady

- Zdravotní
- psychologické
- Sociální
- etické



Důvody prediktivního testování

- Zdravotní- včasná léčba, chirurgická intervence, preventivní opatření
- Osobní důvody-osvobození od nejistoty, životní plány: partnerské vztahy, rodičovství, výběr zaměstnání...
- Současný nebo budoucí prospěch členů rodiny(zejména potomků)
- Kombinace



Etické normy- dle WHO

- Všeobecná podpora, využití k prevenci nebo léčení
- Dobrovolnost- po předchozí adekvátní informaci, pouze s informovaným souhlasem
- Dostupnost- zletilým osobám i při absenci možností léčby, k předejití poškození testované osoby, nebo jejího partnera a rodiny. Genetické konzultace odpovídající charakteru diagnózy
- Testování nezletilých pouze za předpokladu zdravotního prospěchu (léčba, prevence)
- Zaměstnavatelé, pojišťovny, školy, státní a jiné instituce by neměly mít přístup k výsledkům testů .



Příklady

- Huntingtonova chorea
- Hereditární nádorové dispozice



Huntingtonova choroba

- Neurodegenerativní onemocnění – progresivní motorické, kognitivní, psychiatrické projevy
- Průměrný nástup mezi 35-44 rokem, medián přežití 15-18 let po nástupu
- amplifikace 36 a více CAG repetitivních trinukleotidů v HTT (gen huntingtin 4p16.3).



Huntingtonova choroba

- Léčba pouze symptomatická, nezabrání postupu projevů onemocnění.
- Podpůrná péče s důrazem na ošetrovatelskou péči, péče o příjem potravy, péče ve speciálních zařízeních, a zajištění státních příspěvků.



Huntingtonova chorea

- Diagnostický test- výsledky mají dopad i pro ostatní členy rodiny
- Pochopení dopadu
- Prediktivní testy
- Protokolární postup



Protokolární postup

- Většinou zabere několik měsíců(3-6)
- Vstupní pohovor s genetikem
- Neurologické a psychologické, ev. psychiatrické vyšetření
- Odběr krve po písemném informovaném souhlase
- Osobní sdělení výsledků genetikem
- Následné podpůrné konzultace a sledování dle potřeby
- Žadatel má právo kdykoliv od testu odstoupit
- Vhodný doprovod partnera nebo jiné blízké osoby
- Kontakt na svépomocnou skupinu, informační materiály
- Test od 18 let, u nezletilých je nepřípustné
- Prenatální diagnostika je možná pouze u plodu pozitivně testované osoby



Genetická konzultace před testem

- Zahrnuje vysvětlení a posouzení:
 - očekávání klienta
 - důsledků testování vs. netestování,
 - metody
 - přesnost metody
 - pravděpodobnost, že výsledek bude pozitivní
 - další dopady, náklady
 - plán oznámení výsledků vyšetření, jakou formou



Genetická konzultace po testu

- Zahrnuje:
 - vysvětlení výsledku a jeho důsledků
 - dopad na jednotlivce a členy rodiny- možnosti terapie, péče, prevence
 - plán na informování příbuzných
 - psychologická podpora a kontakty na specialisty- další péče, kontakty na svépomocné organizace



Prevence u plánovaných potomků

- Prenatální diagnostika

- Možná pouze pokud rodič v riziku je již prediktivně otestovaný s pozitivním výsledkem

- Preimplantační genetická diagnostika

- Vazebná analýza může umožnit prevenci i v situaci, kdy rodič ještě není prediktivně testovaný



Hereditární nádorové dispozice



Nádorová onemocnění- genetické souvislosti

- Jsou 2. nejčastější příčinou úmrtí
- Každý 3. člověk má riziko onemocnění malignitou
- 75-80%- sporadická forma onemocnění
- 10% familiární formy – kumulace nádorových onemocnění v rodině, není definován typ dědičnosti, vnímavé geny + zevní faktory
- 5-10% hereditární nádorová predispozice – germinální mutace v tumor supresorových genech, onkogenech či mismatch repair genech



Familiární výskyt

- 2 a více případů v rodině u příbuzných 1. a 2. stupně
- výskyt v pozdějším věku
- nejasná dědičnost (náhodný výskyt, vliv zevního prostředí, genetické faktory - geny s nízkou penetrancí, polygenní dědičnost)



Hereditární výskyt

- 2 a více případů v rodině u příbuzných 1. a 2. stupně
- časný výskyt
- autosomálně dominantní obraz dědičnosti



Hereditární nádorové syndromy- mechanizmy onkogeneze

- Knudsonova teorie- dvojzásahová

Tumor-supressorový gen je vyřazen z funkce až mutací obou jeho alel

- Vogelsteinova teorie- vícestupňový proces kancerogeneze

Postupné hromadění genetických(a epigenetických) změn, některé mohou být vrozené, jiné mohou vznikat jako výsledek expozice kancerogenům nebo onkogenním virům

Cíl genetického poradenství

- **Jedná se v rodině o v.s. hereditární predispozici?**
- **Vytipovat osoby v riziku**
- **Zajištění molekulárně genetického vyšetření dle možností**
- **Určení osob v rodině ,které predispozici získaly**
- **Ve spolupráci s dalšími klinickými obory zajistit primární a sekundární prevenci u rizikových osob**

Suspekce na hereditární nádorovou predispozici

- příbuzní I. a II. stupně se stejným typem tumoru
- kombinace určitých typů nádorů u blízkých příbuzných (ca prsu a ovaria, kolorektální ca a ca endometria)
- 2 členové rodiny s identickým vzácným tumorem (ca štítné žlázy)
- neobvykle časný výskyt tumorů
- bilaterální tumor v párových orgánech
- synchronní či metachronní metastázy, nádorové duplicity

Genetické testování hereditárních nádorových dispozic

Doporučení American Society of Clinical Oncology (ASCO):
(J.Clin. Oncol., 2003, 21:2397-2406)

Nabídnout genetické testování:

- 1. osobám s osobní nebo rodinnou anamnézou svědčící pro geneticky podmíněnou nádorovou predispozici**
- 2. pokud může být genetický test adekvátně interpretován**
- 3. pokud výsledky testu pomohou při stanovení diagnózy nebo ovlivní léčebnou nebo chirurgickou péči o pacienty nebo členy rodiny s hereditárním rizikem karcinomu.**

Genetické testování provádět jen v souvislosti s genetickou konzultací před a po testování

Podmínky genetického testování

- **Vyšetření indikuje klinický genetik**
- **protokolární postupy**
- **Optimální je zahájení vyšetření u nemocného v rodině**
- **před vyšetřením vždy informovaný souhlas**
- **vyšetření je podmíněno genetickým poradenstvím**
- **od testování může pacient kdykoli odstoupit či odmítnout znát výsledek**
- **pokud není mutace u nemocného nalezena, neznamená to, že je hereditární forma v rodině vyloučena**
- **vhodná i psychologická podpora**

Příklady onemocnění

- **Ca prsu a ovaria** - BRCA 1/2
- **Lynchův syndrom (HNPCC)** MMR geny: MLH1, MSH2, PMS1, PMS2, MSH6
- **FAP** - APC ,MUTYH
- **Juvenilní polypóza** – SMAD4/BMPR1A
- **Peutz-Jeghers syndrom**- STK11
- **Cowden syndrom**- PTEN
- **Hereditární difúzní Ca žaludku**- CDH1
- **Li Fraumeni syndrom** - TP53
- **Von Hippel Lindau**- VHL
- **MEN1** - MEN1
- **MEN 2** - RET
- **Familiární melanom**- CDKN2A
- **Gorlinův syndrom**- PTCH, SUFU
- **Retinoblastiom** - Rb1
- **Neurofibromatosa** - NF1/2
- **Tuberózní skleróza**- TSC1,TSC2
- **Wilms tumor** geny WT1, WT2, WT3
- **Familiární papilární Ca ledvin**- MET
- **Syndromy chromosomální instability**(AT,NBS,FA,Bloom sy)



Formy genetického testování

- Testování individuálních rizikových genů- postupný proces testování využívající Sangerovo sekv., screeningové metody(HRM-vysokorozlišovací analýza křivek tání, vysokorozlišovací kapalinová chromatografie) k detekci patol.fragmentů a následné sekvenaci
- MLPA(multiplexová ligačně podmíněná amplifikace) pro detekci genových a introgenových přestaveb.
- NGS, panelové sekvenování (ThruSight Cancer panel, CZECANCA,)
- Celoexomové, celogenomové sekvenování- zatím jen výzkumně.



NGS-panelové sekvenace

- Detekce mutací v desítkách-stovkách genů
- Diagnostika rychlejší zahrnující větší spektrum kauzálních genů
- Analýza výsledků je složitá a pracná, nutná filtrace nevýznamných variant, ověření potenciálně patogenních variant
- Ověření patogenní mutace nezávislou metodou (Sanger.sekvenování)
- Zachytí bodové mutace, ale rozsáhlejší delece/duplikace nezachytí- MLPA
- Obtížné vyšetření genů obsahujících pseudogeny



Interpretace genetického testování

- Pozitivní záchyt patogenní mutace- lze testovat příbuzné
- Záchyt varianty nejasného významu- nelze testovat příbuzné, ale není vyloučena dědičná etiologie
- Žádný záchyt mutace- nelze testovat příbuzné, není vyloučena dědičnost, stanovení rizik a prevence empiricky(Clausův model u nádorů prsu), dle rodinné zátěže(obecně doporučováno sledování alespoň o 10 let dříve než se vyskytl nejčasnější nádor v rodině)

Prediktivní testování

- Možné pouze při nálezu mutace v rodině
- od 18 let (výjimka- FAP,MEN,VHL,Rb,NF-tam kde lze nabídnout prevenci již u dětí)
- Zcela dobrovolné
- Genetická konzultace před testem- význam testování, informovaný souhlas,následné informace
- Genetická konzultace po testu- sdělení výsledku, vyplývajících rizik,možnosti prevence(sledování, operace, chemoprevence)
- Předání kontaktu na pracoviště(odborné lékaře) zajišťující preventivního sledování

Problémy

- **etické: vzniku nádoru neumíme zabránit**
- **u nosičů celoživotní riziko kolem 80%**
- **u některých typů prevence obtížná**
(Li-Fraumeni syndrom)
- **psychologické: vyrovnání se s vysokým rizikem**
- **rozdělení rodiny- zdraví x nemocní**
- **Vysoké riziko přenosu dispozice na děti**
- **sociální: riziko diskriminace pojišťoven, zaměstnavatele**

Primární prevence

- Omezit škodliviny - zákaz kouření, minimálně alkohol, u GIT zákaz alkoholu
- strava s omezením tuků, masa, kořeněných jídel, uzenin
- dostatek vlákniny, minimálně 4 -5 dávek ovoce a zeleniny denně
- prevence stresu
- prevence nadměrného slunění
- pravidlená přiměřená fyzická aktivita

Sekundární prevence

- Cíleně podle onemocnění
- Komplexní sledování
- Zobrazovací vyšetření – UZ, MRI, CT, endoskopie...
- Klinické sledování
- Preventivní léčba
- Preventivní operace



HBOC-Hereditární nádor prsu a ovaria

- Incidence Ca prsu 6-8%, Ca vaječnicků 1-2%
- Dědičná etiologie asi 5-10%

- 52%- mutace BRCA1 genu
- 32%-mutace BRCA2 genu
- 16%- jiné geny (TP53, MLH1, MSH2, MSH6, STK11, CDH1, PTEN, CDKN2A, geny středního rizika: ATM,CHEK2,PALB2, BRIP1)

Indikační kritéria testování BRCA1,2 genů

- Sporadické:
 - Nádor prsu, včetně in situ- do 40- 45 let
 - Ca ovarií/vejcovodů, primárně peritoneální v jakémkoliv věku
 - Bilat. nádor prsu nebo ipsilat. 2 nezávislá ložiska-1.dg. do 50 let
 - Nádor prsu medulární nebo triple negat. do 60 let
 - Duplicita prs+ovarium v jakémkoliv věku
 - Nádor prsu u muže v jakémkoliv věku
- Familiární:
 - 3 příbuzní bez věkové limitace
 - 2 příbuzní s nádorem prsu , alespoň 1 do 50 let
 - Nádor prsu a nádor ovarií nebo nádor prsu u muže bez věkové limitace
 - Nádor prsu a další 2 příbuzní s nádory pankreatu nebo prostaty

Rizika malignity u nosičů mutace BRCA1/2

■ BRCA1

- Ca prsu do 40 let **19%**
- Ca prsu do 70 let **40-85%**
- Sekund.Ca prsu až **60%**
- Ca ovarií až **60%**
- Kolorektální Ca 4xvyšší
- Ca prostaty 3x vyšší
- Ca prsu u muže až **3%**

■ BRCA2

- Ca prsu **40-85%**
- Ca ovarií **10-20%**
- Ca žl.cest 5x vyšší
- Ca žaludku 3x vyšší
- Ca prostaty 4x vyšší
- Maligní melanom 3x vyšší
- Kolorektální Ca 4x vyšší
- Ca prsu u muže **6%**

Schéma sledování zdravých nosičů mutace BRCA1/2

- Samovyšetření prsů 1x měsíčně
- Sledování od 20-25 let
- Od 25-35 let střídavě MR/ UZ á 6 měs.
- Od 35-65 let střídat MR/ MMG á 6 měs
- Gynekol.vyš a TVUZ á 6 měs
- Ca markery á 6-12 měs
- UZ břicha 1x ročně
- Hemokult od 45 let 1x ročně
- Kolonoskopie od 45 let 1x za 3-5 let
- Kožní vyš. 1x ročně
- U mužů vyšetření prostaty od 45 let 1x ročně
- Profylaktická mastektomie
Optimální věk 30 let
90% redukce rizika vzniku Ca prsu
- Profylaktická adnexektomie
Optimálně 35-40 let
50% redukce Ca prsu
97% redukce Ca ovaria
3% reziduální riziko peritoneálního Ca

Stanovení empirických rizik

- **Clausův model** - odhad celoživotního rizika vzniku nádoru prsu dle výskytu nádorů prsu a vaječníků v rodinné anamnéze- 9 tabulek (www.linkos.cz)
- **Pecnův model** - výpočet rizika vzniku nádoru dle osobní a rodinné anamnézy (www.koc.cz)

Rozdělení do 3 rizikových skupin

Riziko do 10%- nízké

10-20%- střední

20-30%- vysoké



HNPC- Lynchův syndrom

- Incidence kolorektálního Ca (CRC) v populaci 2-4%
- HNPCC u 2-4% případů CRC
- Mutace v MMR genech: MLH1, MSH2, PMS1, PMS2, MSH6
- Muži: celoživotní riziko CRC 90%
- Ženy: celoživotní riziko CRC 70%
 - riziko Ca endometria 40%
 - riziko Ca ovaria 10-20%
- Obě pohlaví : riziko Ca žl.cest, Ca žaludku, Ca močových cest, riziko sekundárního nádoru 60%



Indikační Amsterdamská kritéria II

- alespoň 3 příbuzní s Ca sdruženým s HNPCC(CRC, endometria,tenkého střeva, ureteru, ledvinné pánvičky..)
- Jeden nemocný je I.st.příbuzný ostatních dvou
- Jsou postiženy alespoň 2 po sobě jdoucí generace
- Alespoň jeden nemocný do 50 let věku
- Je vyloučena FAP
- Nádory ověřeny patologem



Dispenzarizace nosičů mutace v genech pro HNPCC

- Hemokult od 20 let 1x ročně
- Kolonoskopie od 20 let 1x za 2 roky
- Gastroduodenoskopie 1x za 3 roky
- Gynekologické vyš, TVUZ, CA 125 od 20 let 1x ročně, od 30 let 2x ročně
- Cytologie stěru děložní sliznice od 30 let 1x ročně
- UZ břicha od 30 let 1x ročně
- Vyšetření moče 1x ročně
- Kožní vyšetření 1x ročně
- Profylaktická HYE a AE - 35-40 let

Empirická rizika CRC dle RA


■ Populační riziko	2%	*
■ Příbuzný 1.st.s dg.CRC pod 45 let	5x	(10%)
■ Příbuzný 1.st.s dg.CRC nad 45 let	3x	(6%)
■ Příbuzný 1.a 2.st.v linii s dg CRC	4x	(8%)
■ Oba rodiče s dg CRC	5x	(11%)
■ Dva příbuzní 1.st.v linii s dg.CRC	8x	(17%)
■ Tři příbuzní 1.st.v linii s dg. CRC	25x	(50%)

* Kumulativní riziko CRC v ČR do 74 let je pro muže 7,32%, pro ženy 3,6%



Familiární adenomatózní polypóza FAP

- Incidence 1 na 10 000
- Mezi 10-20 rokem života v tlustém střevě 100 až tisíce adenomatózních polypů
- Téměř ve 100% malignizace
- Polypy v žaludku, duodenu, tenkém střevě
- Extrakolické projevy: osteomy čelisti, desmoidní tumory, hypertrofie pigmentového listu sítnice(CHRPE)
- Mutace APC genu



Dispenzarizace nosičů mutace v APC genu

Od 10 let věku:

- Celkové vyšetření 1x ročně
- Endoskopie konečnicku, při nálezů polypů kompletní kolonoskopie 1x za 6 měsíců
- UZ břicha, AFP
- Oční vyšetření 1x ročně

Od 30 let věku

- Gastroduodenoskopie od 25 let, četnost dle počtu a morfologie polypů á 6 měs-4 roky



FAP prevence

- Proktokolektomie- při invazivním Ca, těžké polypoze, dysplázii vysokého stupně, následné sledování GIT á 1 rok
- Chemoprevence tvorby polypů- inhibitor COX-2(celecoxib)
- Prevence růstu desmoidů- Tamoxifen

Li-Fraumeni syndrom

- Hereditární predispozice k onemocnění širokým spektrem nádorů:

- Sarkomy (měkkých tkání, kostí)
- Nádory prsu(časný nástup)
- Nádory mozku
- Leukémie

U dětí:

- Adrenokortikální nádory
- Rhabdomyosarkomy
- Nádory chorioidálního plexu
- gen TP53



Indikační kritéria testování Li-Fraumeni

- Proband : sarkom, n.mozku, premenopauzální Tu prsu, ADC tu, leukemie, bronchovaskulární Ca plic(pod 46 let)
- Příbuzný 1. nebo 2. stupně s jedním z výše uvedených nádorů pod 56 let, nebo s několika primárními nádory
- Proband s několika prim.nádory z nichž 2 jsou typické pro LFS pod 46 let
- Proband s ADC tu nebo n. prsu pod 36 let bez mutace BRCA1/2

Dispenzarizace osob s prokázanou mutací genu TP53

- Samovyšetření varlat 1x měsíčně
- Samovyšetření prsů 1x měsíčně od 16 let
- Celkové vyšetření(v.,hm.,TK,moč)+ 1x za 6 měsíců
- UZ břicha a pánve á 6 měsíců
- KO,FW,LDH,bHCG, AFP, 17-OH-progesteron, testosteron, DHEAS á 6 měsíců
- Oční vyšetření 1x ročně
- MR mozku 1x ročně+ celotělové MR 1x ročně
- Kolonoskopie á 2 roky od 30 let, gastrokopie á 3 roky od 35 let
- Kožní vyšetření 1x ročně
- U žen sledování prsou a gynekol.sled. jako u BRCA+, včetně profylaktické mastektomie
- U mužů vyšetření varlat, prostaty, PSA 1x ročně od 40 let

Syndromy chromosomální instability- SCI

- Ataxia teleangiectasia(AT)- sy Louis-Barové

Syndrom s neurologickými, imunologickými, endokrinologickými, kožními, jaterními projevy

- Nijmegen breakage syndrom(NBS)

Mikrocefalie, pre- a postnatální růstová retardace, poruchy imunity

- Fanconiho anemie (FA)

Pancytopenie, imunodeficience, mikrocefale, růstová retardace, mentální retardace, hluchota, abnormality palců

- Bloomův syndrom(BS)

Pre- a postnatální růstová retardace, imunodeficience, fotosenzitivita, erytém s teleangiectasiemi

- Xeroderma pigmentósum(XP)

Extrémní senzitivita na UV záření,xerodermie, poruchy pigmentace, kožní nádory, progerie,



SCI

- AR dědičná onemocnění
- Vzácné syndromy
- Porucha retrace DNA
- Vysoká přecitlivělost buněk vůči mutagenům(ionizační záření-RTG,UV, chemické mutageny)



SCI-klinický obraz

- Porucha reparace DNA- nejvíce patrná u buněk rychle se dělících
- Poruchy imunity, opak.infekty
- Poruchy růstu
- Poruchy pohlavního zrání
- Zvýšené riziko nádorů- leukemií, lymfomů(i pro přenašeče)
- Pigmentové změny po ozáření kůže(UV,RTG)



Laboratorní charakteristiky SCI

- Snížení imunoglobulinů, T a B lymfocytů
- Pancytopenie u FA
- Chromozomální a chromatidové zlomy a přestavby(ZCA)
- Enormní nárůst ZCA po ozáření a styku s určitými chemikáliemi (DEB/MMC)
- Molekulárně genetické vyšetření- průkaz mutací daného genu

SCI- mol.gen.dagnostika

- AT- gen ATM(11q22)
- FA- heterogenní, geny 18 komplementčních skupin
FANCA(16q24),FANCB(Xp22),FANCC(9q22),FANCE(6p21),
FANCF(11p14),FANCD1-BRCA2(13q12),...
- NBS – gen NBN(8q21)
- Bloom sy – gen RECQL3 (15q26.1)
- XP - heterogenní, geny 8 komplementačních skupin –XPA
(9q22), XPB (2q14), XPC(3p25), XPD(19q13), XPE(11p11),
XPF(16p13), XPG(13q33), XPV(6p21)



Prevence u SCI

- Prevence infekcí- trvalá imunostimulace
- Ochrana před ionizujícím zářením
- Trvale provitamín A,Ac.Folicum,C vitamín, E vitamín
- Při vyvinutí nádoru kontraindikace radioterapie a radiomimetických cytostatik, ostatní cytostatika minimální dávky(1/10)



Prekoncepční poradenství

- Plánování těhotenství
- Získané chrom. aberace
- Rizikové těhotenství
- Prenatální sledování
- Kryokonzervace gamet
- Reprodukční obtíže - asistovaná reprodukce



literatura

- Molekulární genetiká v onkologii (Foretová,Svoboda,Slabý a kol.)
- Klinická onkologie, Supplementum,
- OMIM
- ORPHANET
- GENETSTS