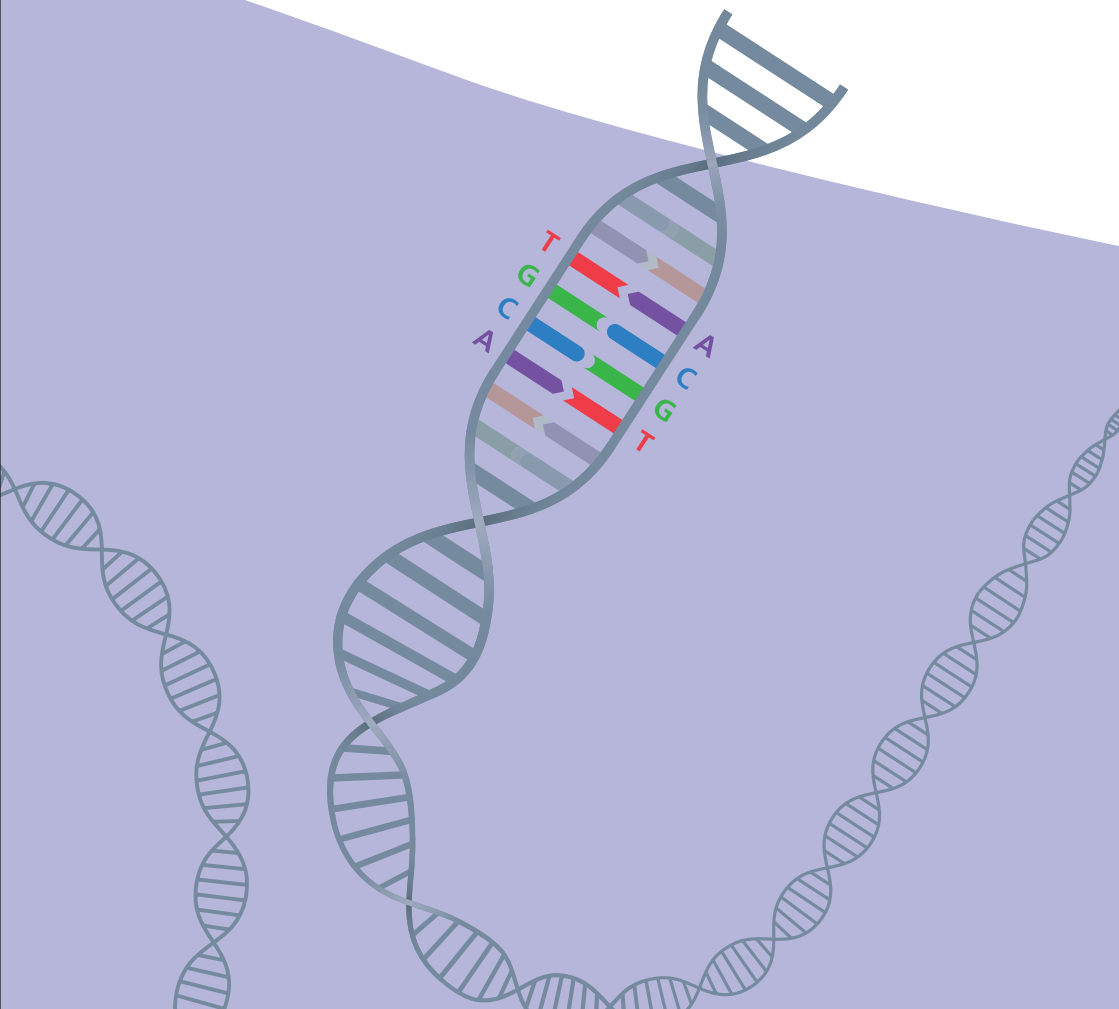




ONKOLOŠKI INŠTITUT  
INSTITUTE OF ONCOLOGY  
LJUBLJANA

## MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA V ONKOLOGIJI

Genetsko testiranje oseb s sumom  
na dedno obliko raka in genetske  
preiskave pri različnih vrstah tumorjev



## MOLEKULARNA DIAGNOSTIKA V ONKOLOGIJI

Genetsko testiranje oseb s sumom na dedno obliko raka in genetske preiskave pri različnih vrstah tumorjev

**Avtorja:** Srdjan Novaković, Petra Škerl

**Soavtorice:** Vida Stegel, Ana Blatnik, Vita Šetrajčič Dragoš

**Sodelavci:** Ira Koković, Gašper Klančar, Alenka Bombač, Marina Bučič, Anja Zagožen Klasinc, Vesna Vogrič, Gregor Hertl, Simona Traven, Katarina Gimpelj, Irena Vukšinič in Nevenka Klavs

**Recenzentka:** Mateja Krajc

**Lektorica:** Nadja Horvat, Jezikovna zadruga Soglasnik, z.o.o.

**Oblikovanje:** Barbara Bogataj Kokalj, Studio Aleja d.o.o.

**Ilustracije:** Matic Leban

**Izdajatelj in založnik:** Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška 2, 1000 Ljubljana

**Tisk:** Tisk Žnidarič d.o.o., Kranj

**Naklada:** 3000 izvodov

Prva izdaja

Leto izida: 2022

GENET/2022/1

Knjižice za bolnike so dosegljive tudi v digitalni obliki na spletnih straneh  
[www.onko-i.si/za-javnost-in-bolnike/publikacije](http://www.onko-i.si/za-javnost-in-bolnike/publikacije)

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

616-006-076

NOVAKOVIĆ, Srdjan

Molekularna diagnostika v onkologiji : genetsko testiranje oseb s sumom na dedno obliko raka in genetske preiskave pri različnih vrstah tumorjev / [avtorja Srdjan Novaković, Petra Škerl ; soavtorice Vida Stegel, Ana Blatnik, Vita Šetrajčič Dragoš ; ilustracije Matic Leban]. - 1. izd. - Ljubljana : Onkološki inštitut, 2022

ISBN 978-961-7029-46-8  
COBISS.SI-ID 120884995

## KAZALO

SLOVAR OSNOVNIH POJMOV .....	4
OSNOVE GENETIKE .....	6
NASTANEK GENETSKIH SPREMEMB .....	12
DOLOČANJE GENETSKIH SPREMEMB .....	16
KAJ JE RAK IN KAKO NASTANE?.....	18
DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK RAKA .....	19
DEDNI RAKI .....	21
Potek testiranja pri osebah s sumom na dedno obliko raka.....	21
Izvid molekularno-genetske preiskave pri dednih rakih.....	26
Naključne najdbe .....	30
Somatski mozaicizem.....	30
SPORADIČNI RAKI.....	32
Testiranje na prisotnost klinično pomembnih različic (patogenih različic/mutacij) in drugih genetskih sprememb v tumorju .....	32
Vrste genetskih preiskav .....	33
Potek testiranja.....	34
Izvid testiranja tumorjev.....	38
ZAKLJUČEK.....	40
Viri .....	40

## SLOVAR OSNOVNIH POJMOV

**Celica** – osnovna gradbena in funkcionalna enota vseh živih organizmov

**Dedni raki** – so posledica genetskih sprememb (patogenih različic/mutacij) v zarodnih in spolnih celicah. Te spremembe (patogene različice/mutacije) se dedujejo oziroma prenašajo na potomce

**DNK** – deoksiribonukleinska kislina; dedni material celice

**Epigenetska sprememba** – pomeni spremenjeno izražanje genov, ki je posledica kemijskih sprememb na molekuli DNK ali njenih nosilnih beljakovinah; zaporedje nukleotidov v DNK ostane nespremenjeno

**Gen** – del zapisa DNK; osnovna funkcionalna enota dedovanja

**Kromosom** – nitasta struktura v celičnem jedru; nosilec genov, sestavljen iz DNK, histonov in nehistskih beljakovin

**Metilacijski status** – kemijske spremembe (metilacija) na molekuli DNK ali njenih nosilnih beljakovinah, lahko je pokazatelj stopnje izražanja genov

**Mutacija** – genetska okvara, »škodljiva« različica v DNK, povezana z boleznijo; strokovno patogena ali verjetna patogena različica

**NGS** – sekvenciranje druge generacije

**Nukleotidi** – osnovni gradniki nukleinskih kislin DNK in RNK

**Patogena različica** – glej razlago pri mutacija

**PCR** – verižna reakcija s polimerazo – molekularno-genetska metoda

**RNK** – ribonukleinska kislina

**Sekvenciranje** – molekularno-genetska metoda za določanje zaporedja nukleotidov v DNK

**Somatska patogena različica (mutacija)** – genetska okvara v celicah posameznih organov; se ne deduje na potomce

**Sporadični raki** – so posledica genetskih sprememb (patogenih različic/mutacij), ki nastanejo v telesnih (somatskih) celicah – različnih celicah tkiv in organov. Te spremembe (patogene različice/mutacije) se ne dedujejo na potomce

**Verjetno patogena različica** – glej razlago pri mutacija

**Zarodna patogena različica (mutacija)** – genetska okvara, ki je prisotna v vseh celicah posameznika, tudi v spolnih, in se deduje na potomce

Spoštovani bralec,

izjemen napredek na področju genetike v zadnjih dveh desetletjih je omogočil boljše razumevanje nastanka in razvoja raka. Danes z gotovostjo vemo, da je rak genska bolezen, ki nastane zaradi sprememb (patogenih različic/mutacij) v dednem zapisu (genih) normalne celice.

Če patogene različice (mutacije) nastanejo v zarodnih ali spolnih celicah (semenčice, jajčne celice), se lahko dedujejo s staršev na potomce in so prisotne v vseh celicah v organizmu. Z metodami molekularne diagnostike odkrivamo nosilce takšnih patogenih različic (mutacij), kar predstavlja osnovo za opredelitev stopnje ogroženosti testirane osebe, da zboli za določeno vrsto **dednega** raka. V zadnjem času je status dednih patogenih različic (mutacij) v določenih genih tudi osnova za ustrezno načrtovanje zdravljenja.

Velika večina rakov nastane kot posledica genetskih sprememb (patogenih različic/mutacij), ki na novo nastanejo v telesnih (somatskih) celicah – različnih celicah tkiv in organov. Takrat govorimo o **sporadičnih** rakih. V primeru sporadičnih oblik raka se te spremembe (patogene različice/mutacije) ne prenašajo oziroma se ne dedujejo na potomce. Te spremembe (patogene različice/mutacije) so prisotne izključno v rakastih celicah, pri čemer je molekularna diagnostika usmerjena v njihovo odkrivanje v tumorju. Testiranje tumorjev omogoča natančnejšo diagnostiko in načrtovanje bolniku prilagojenega zdravljenja.

V knjižici želimo čim razumljiveje razložiti osnovne pojme genetike in povzeti molekularne mehanizme nastanka raka. Opisujemo potek genetskega testiranja pri osebah s sumom na dedno obliko raka ter predstavljamo potek testiranja tumorjev.

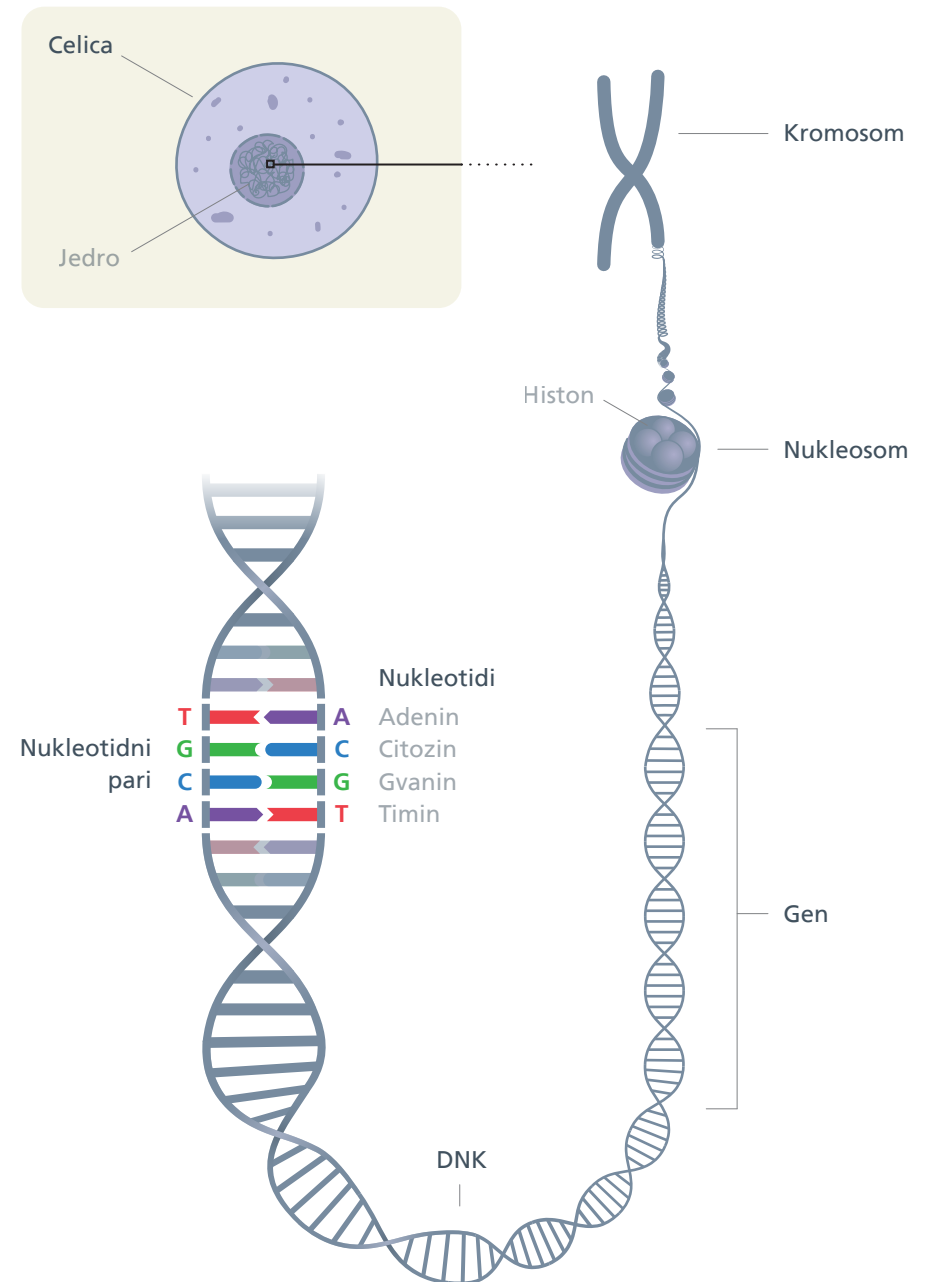
Knjižica je namenjena predvsem onkološkim bolnikom ter tudi širši strokovni in laični javnosti.

## OSNOVE GENETIKE

Osnovna enota živih organizmov je celica. Dedni material, ki ga najdemo v vsaki človeški celici (kot tudi celicah drugih organizmov), imenujemo deoksiribonukleinska kislina – DNK. Molekula DNK ima obliko zaprte dvojne vijačnice, ki je sestavljena iz različnih zaporedij štirih gradbenih elementov, imenovanih nukleotidi – ti so sestavljeni iz sladkorja (deoksiriboze), dušikove baze (adenin (A), gvanin (G), citozin (C), timin (T)) in fosfatne skupine (Slika 1).

Vse informacije, pomembne za razvoj in delovanje organizma, so v molekuli DNK zapisane in shranjene v obliki različnih kombinacij in zaporedij omenjenih štirih nukleotidov. Zapisi v molekuli DNK so v več kot 99 % enaki pri vseh ljudeh. Različne lastnosti posameznikov torej temeljijo na manj kot 1-odstotni razliki v zapisih v molekuli DNK. Zapisi na dvojni vijačnici so

**Slika 1: Struktura DNK v celici.** Deoksiribonukleinska kislina – DNK predstavlja dedni material vsake celice. Večina celične DNK se nahaja v jedru celice, kjer je zavita kot sukanec okrog nosilnih proteinov (histonov) v strukture, imenovane kromosomi. Molekula DNK ima obliko zaprte dvojne vijačnice, ki je sestavljena iz različnih zaporedij štirih gradbenih elementov, imenovanih nukleotidi. Nukleotidi so sestavljeni iz sladkorja (deoksiriboze), dušikove baze (adenin (A), gvanin (G), citozin (C), timin (T)) in fosfatne skupine. Vse informacije, pomembne za razvoj in delovanje organizma, so v molekuli DNK zapisane in shranjene v obliki različnih kombinacij in zaporedij omenjenih štirih nukleotidov. Zapisi na dvojni vijačnici so razdeljeni na gene, ki predstavljajo osnovne funkcionalne enote dedovanja. Za večino genov velja, da ima vsak posameznik po dve kopiji vsakega gena – po enega od vsakega starša. Geni so organizirani v strukture, imenovane kromosomi. Vsaka človeška celica (razen spolnih) vsebuje 46 kromosomov (23 parov). Vloga DNK je, da zagotovi pravilen zapis in omogoča natančen prepis (prenos) informacije na molekule ribonukleinske kisline (RNK) in dokončno sintezo funkcionalnih beljakovin.

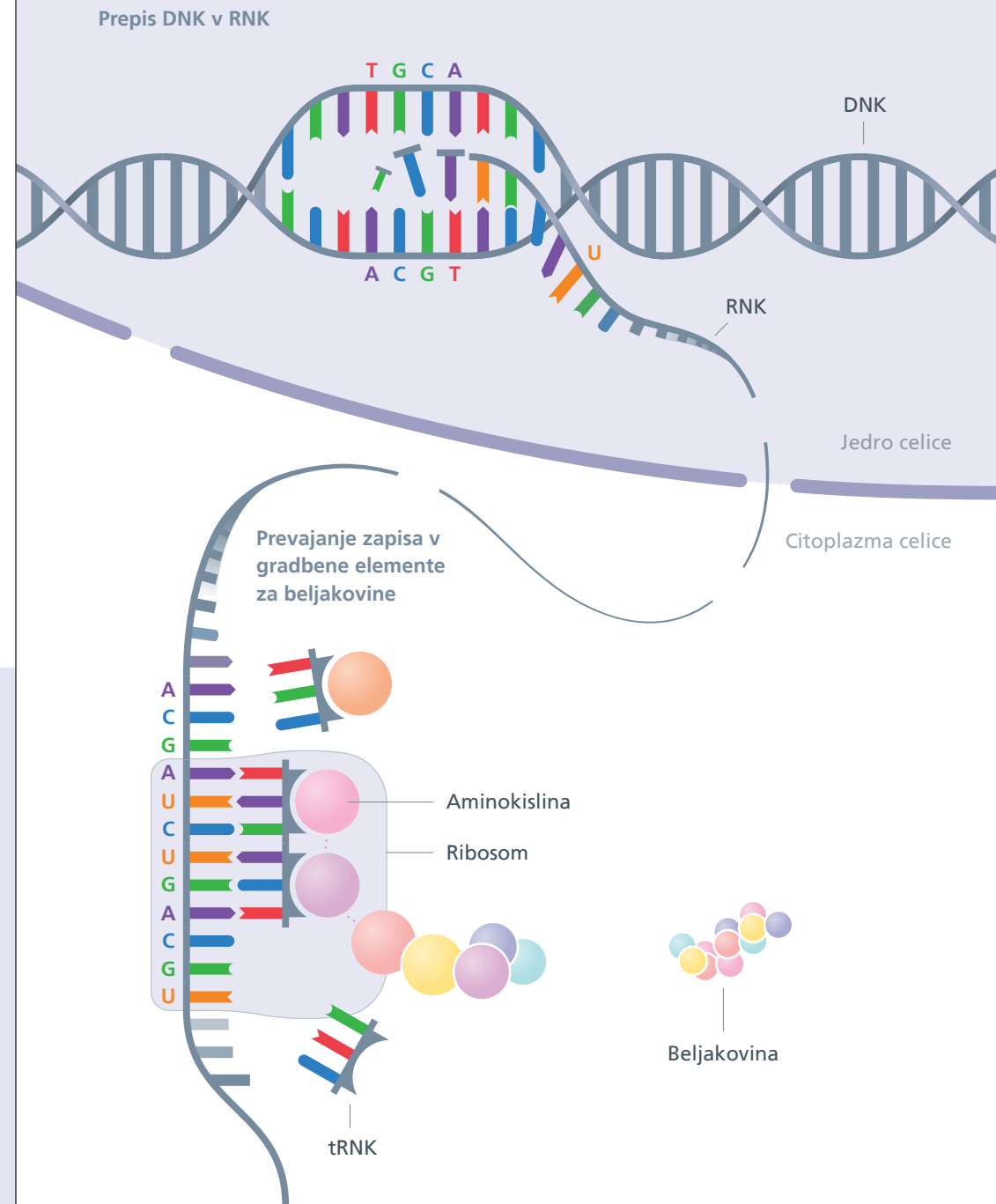


funkcionalno razdeljeni na gene, ki predstavljajo osnovne enote dedovanja. Če izvzamemo gene, ki so na spolnih kromosomih, velja, da ima vsak posameznik po dve kopiji vsakega gena – po enega od vsakega starša. Po podatkih, s katerimi trenutno razpolagamo, naj bi bilo v človeških celicah 20000–25000 genov. Večina celične DNK se nahaja v celičnem jedru, kjer je zavita kot sukanec okrog nosilnih beljakovin v strukture, imenovane kromosomi.

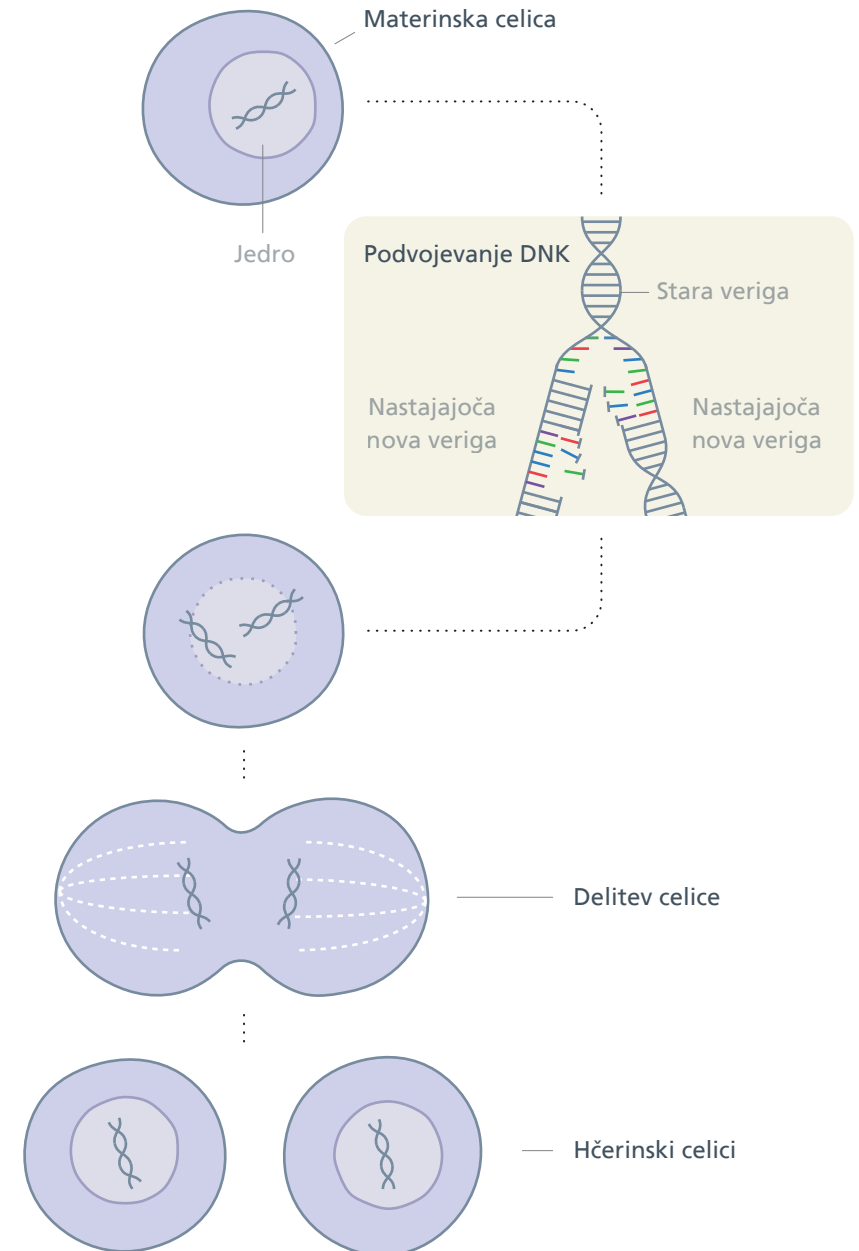
Ob delitvi celic se deli tudi dedni material, kar omogoča ohranjanje osnovnih značilnosti celice in procesov v njej, zato je izrednega pomena, da se dedni material pravilno pomnoži, razdeli in nespremenjen prenese v hčerinske celice. S tem se zagotavlja, da tudi v hčerinskih celicah potekajo procesi, ki so odvisni od pravilnega delovanja številnih beljakovin, za katere so zapisi shranjeni v strukturi DNK.

Vloga DNK je torej, da zagotovi pravilen zapis in omogoča natančen prepis (prenos) informacije na molekule ribonukleinske kisline – RNK (Slika 2).

**Slika 2: Struktura in vloga RNK v celici.** Ribonukleinska kislina – RNK ima obliko enojne vijačnice, ki je sestavljena, podobno kot DNK, iz različnih zaporedij štirih gradbenih elementov, imenovanih nukleotidi. Nukleotidi so sestavljeni iz sladkorja (riboze), dušikove baze (adenin (A), gvanin (G), citozin (C), uracil (U)) in fosfatne skupine. V jedru celice se na določene molekule RNK (sporočilne RNK – mRNK) natančno prepisejo informacije, zapisane v DNK. Informacijske RNK potujejo iz jedra v citoplazmo celice, kjer se s pomočjo posebnega kompleksa, ki ga imenujemo ribosom, prevajajo v določeno zaporedje aminokislin, gradbenih elementov beljakovin. Vsako aminokislino opredeljujejo trije nukleotidi, ki jih imenujemo kodoni. Druge vrste molekul RNK (npr. prenašalna – tRNK ...) ne služijo kot matrice (predloge) za sintezo beljakovin, ampak bodisi pomagajo pri procesu nastajanja beljakovin bodisi delujejo kot regulatorne molekule za prepisovanje in prevajanje informacij, zapisanih v DNK.



Del molekul RNK deluje kot matrica (predloga) za prevajanje zapisa v gradbene elemente za beljakovine (aminokisljine) in dokončno sintezo funkcionalnih beljakovin. Druge molekule RNK ne služijo kot matrice (predloge) za sintezo proteinov, ampak bodisi pomagajo pri procesu nastajanja beljakovin bodisi delujejo kot regulatorne molekule za prepisovanje in prevajanje informacij, zapisanih v DNK (Slika 2).



**Slika 3: Proces podvojevanja/pomnoževanja DNK in delitev celic.**

Podvojitev dednega materiala (molekul DNK) se zgodi pred delitvijo celice. Med podvojevanjem nastaneta dve enaki kopiji molekul DNK. Proces poteka v treh glavnih fazah:

1. odpiranje dvojne vijačnice,
2. ločitev verig,
3. sinteza novih verig.

Pri tem sodeluje veliko različnih encimov, ki zagotavljajo natančno in kontrolirano podvojevanje genetskega materiala. Podvojevanju genetskega materiala sledi delitev celice, kjer se dedni material (DNK) razdeli na dva enaka dela med hčerinski celici. Hčerinske celice imajo enak dedni zapis kot materinska (prvotna) celica. V primeru spremembe/napake v DNK se ta prenese na hčerinske celice.

## NASTANEK GENETSKIH SPREMEMB

Procesa prepisovanja in prevajanja informacij, zapisanih v DNK, in podvojevanja DNK sta izredno kompleksna in zahtevna (Slika 2, 3), zato med njunim potekom velikokrat nastanejo napake. Na DNK lahko nastajajo spremembe in poškodbe tudi zaradi delovanja različnih dejavnikov iz okolja ali same celice. Spremembe v nukleotidnem zaporedju DNK so posledica zamenjave, izgube ali vgraditve enega ali več nukleotidov. Prav tako so lahko posledica izgube ali podvojitve celih ali delov kromosomov ter zlepljanja napačnih koncev kromosomov (Slika 4).

Spremembe/napake, ki nastanejo na DNK in se prenašajo ob njenem podvojevanju na naslednjo generacijo celic, imajo lahko dalekosežne posledice, saj spreminjajo zaporedje nukleotidov v zapisih v molekuli DNK. Za samo celico in celoten organizem so lahko spremembe/napake na DNK kritične, zato v celici obstaja cela vrsta kontrolnih in popravljalnih mehanizmov, prek katerih celica ohranja nespremenjeno DNK. V primeru manjših napak v molekuli DNK se te popravijo, ko so te napake/okvare preobsežne, pa kontrolni mehanizmi ustavijo delitev celice z okvarjeno DNK in tako preprečijo prenos napake na naslednjo generacijo celic.

Čeprav obstajajo številni in natančni popravljalni mehanizmi, ti občasno napake v DNK ne odkrijejo/prepoznajo in je ne popravijo ali pa jo popravijo le delno. V tem primeru se spremenjena/okvarjena DNK prenese v hčerinske celice in takrat govorimo o novi različici.

Če gre za »škodljivo« različico, povezano z boleznijo, govorimo o mutaciji oziroma bolj strokovno o patogeni ali verjetno patogeni različici. Patogene različice (mutacije) lahko nastanejo v vsaki celici v organizmu.

Če nastanejo v spolnih celicah (jajčne celice in spermiji) staršev, bodo prisotne v vseh celicah potomca – v tem primeru jih imenujemo zarodne patogene različice (mutacije). Če nastanejo v

Nespremenjena DNK,  
gen ni okvarjen



Beljakovina

Spremenjena DNK,  
gen je okvarjen



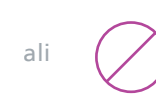
**Mutageni dejavniki**  
Spremeni se  
zaporednje  
nukleotidov v DNK in  
nastane patogene  
različica (mutacija).



Spremenjena,  
nedelujoča  
beljakovina



**Epigenetski dejavniki**  
Spremeni se izražanje  
gena, zaporedje  
nukleotidov v DNK je  
nespremenjeno in  
nastane epigenetska  
sprememba.



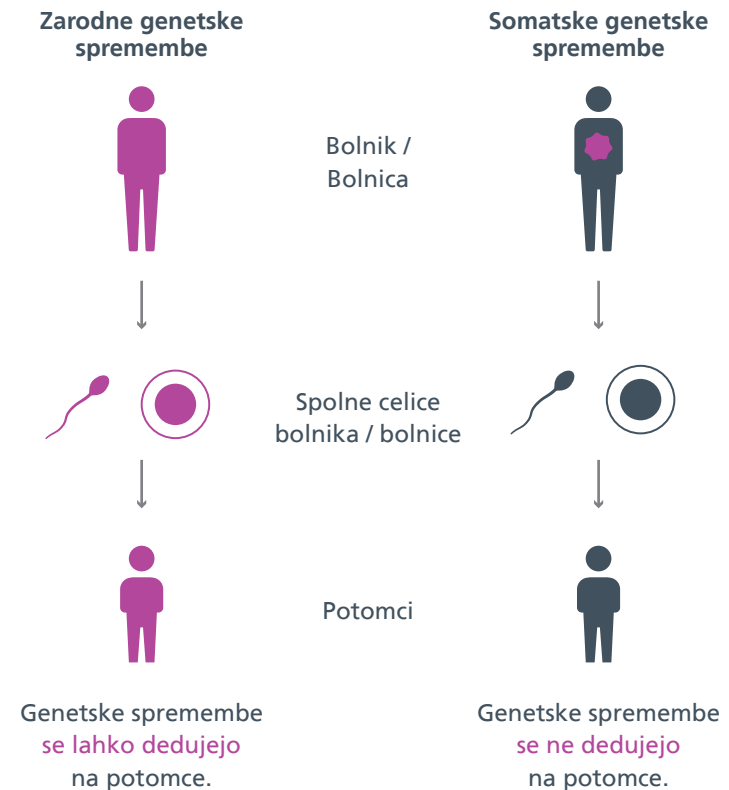
Ni beljakovine

**Slika 4: Spremembe v molekuli DNK.** Spremembe (napake) v molekuli DNK lahko nastanejo zaradi različnih dejavnikov, ki jih s skupnim imenom imenujemo kancerogeni dejavniki. Kancerogene dejavnike delimo na tiste, ki neposredno spremenijo zaporedje v DNK – mutageni dejavniki, in na tiste, ki zaporedja nukleotidov ne spreminjajo, ampak spremenijo stopnjo izražanja genov (večje ali manjše izražanje) – epigenetski dejavniki. Kancerogeni dejavniki lahko izvirajo iz okolja (npr. cigaretni dim, UV-sevanje, virusi) ali iz same celice (npr. prosti radikali). Spremembe (napake) lahko v celici nastanejo/obstanejo zaradi okvarjenih kontrolnih in popravljalnih mehanizmov celične DNK. V primeru spremenjene/okvarjene DNK v celici ne more nastati določena beljakovina ali pa je ta nedelujoča, kar lahko vodi v nastanek raka.

celicah posameznih organov (npr. koža, črevo, dojka ...), bodo prisotne samo v celicah, ki se razvijejo iz mutirane celice, ne pa v ostalih celicah istega organa ali celicah drugih organov – v tem primeru jih imenujemo somatske patogene različice (mutacije).

Patogene različice (mutacije), ki so prisotne v spolnih celicah, se dedujejo, medtem ko se patogene različice (mutacije) v ostalih celicah ne dedujejo (Slika 5). Nekatere nove različice so neškodljive ali celo predstavljajo določeno prednost za organizem. Patogene različice (mutacije) prizadenejo delovanje posameznih genov in tako sprožijo nastanek različnih bolezni, med drugimi tudi raka.

Poleg zgoraj opisanih sprememb (patogenih različic/mutacij), ki neposredno prizadenejo samo zaporedje nukleotidov, se lahko na molekuli DNK in nosilnih beljakovinah te molekule zgodijo kemične spremembe, ki neposredno ne spremenijo zapisa nukleotidov, ampak vplivajo na stopnjo izražanja genov. Takšne spremembe imenujemo epigenetske spremembe (Slika 4). Primer takšnih sprememb je spremenjen metilacijski status molekule DNK, ki ga lahko uporabljamo kot pokazatelja sprememb v izražanju genov.



**Slika 5: Zarodne in somatske genetske spremembe (patogene različice/mutacije).** Patogene različice (mutacije) lahko nastanejo v vsaki celici v organizmu. Če nastanejo v spolnih celicah (jajčne celice in spermiji) staršev, bodo prisotne v vseh celicah potomca – v tem primeru jih imenujemo zarodne patogene različice (mutacije). Če nastanejo v celicah posameznih tkiv ali organov (npr. koža, črevo, dojka ...), bodo prisotne samo v celicah, ki se razvijejo iz celice s patogeno različico (mutacijo), ne pa v ostalih celicah istega organa ali celicah drugih organov – v tem primeru jih imenujemo somatske patogene različice (mutacije). Patogene različice (mutacije), ki so prisotne v spolnih celicah, se dedujejo, medtem ko se patogene različice (mutacije) v ostalih celicah ne dedujejo.



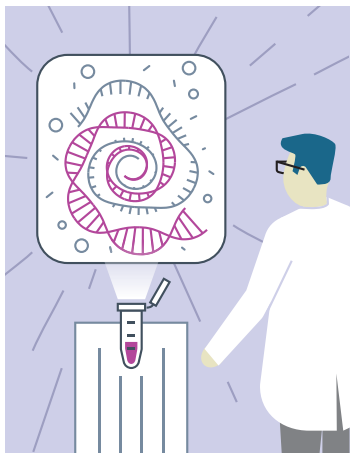
## DOLOČANJE GENETSKIH SPREMEMB

V molekularni diagnostiki za odkrivanje/določanje genetskih sprememb (patogenih različic/mutacij in epigenetskih sprememb) uporabljamo različne molekularno-genetske metode in tehnike. Vse se začne z izolacijo DNK in RNK iz različnih vrst bioloških vzorcev – periferna kri, punktat kostnega mozga, aspiracijska biopsija, sveže ali zmrznjeno tkivo, tkivo, vklopljeno v parafin, bris ustne sluznice in drugo. V DNK in RNK natančno opredeljujemo genetske spremembe (patogene različice/mutacije) ter v odvisnosti od izhodnega materiala, uporabljenega za izolacijo, opredeljujemo, ali je patogena različica (mutacija) prisotna samo v določenih celicah – somatska patogena različica (mutacija) ali tudi v vseh ostalih celicah v telesu – zarodna patogena različica (mutacija) (Slika 6).

Slika 6: Osnovni koraki v molekularni diagnostiki.



1.  
**Sprejem vzorca.**

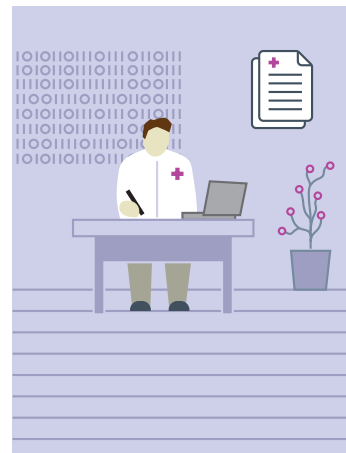


2.  
**Izolacija DNK in/ali RNK iz vzorca.**



3.

**Analiza vzorca z uporabo različnih molekularno-genetskih tehnik**, s katerimi v DNK in RNK natančno opredeljujemo genetske spremembe (patogene različice/mutacije). Osnovne tehnike, ki jih uporabljamo, so verižna reakcija s polimerazo (PCR), verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR), neposredno sekvenciranje (sekvenciranje po Sangerju) in sekvenciranje druge generacije (NGS). Najosnovnejša tehnika je metoda PCR, kjer z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov pomnožimo del DNK, ki nas zanima. Nastale PCR-produkte po končanem PCR analiziramo s pomočjo gelske elektroforeze. Metoda RT-PCR je različica metode PCR. Z RT-PCR lahko določimo že znane patogene različice (mutacije) v klinično pomembnih genih. Z metodo neposrednega sekvenciranja določimo zaporedje nukleotidov v DNK. S to metodo lahko določimo zaporedje v krajših predelih izbranega gena, z metodo NGS pa določimo nukleotidno zaporedje več milijonov fragmentov DNK številnih genov hkrati. To pomeni, da lahko v istem času pregledamo tudi 100 in več različnih genov v različnih preiskovanih vzorcih.



4.

**Pregled podatkov in rezultatov ter priprava izvida molekularno-genetske preiskave.**

## KAJ JE RAK IN KAKO NASTANE?

Rak je genska bolezen, ki nastane zaradi patogenih različic (mutacij) ali posebnih kemičnih sprememb na DNK (epigenetskih sprememb) v eni sami celici. Rak ni ena bolezen, temveč je skupek različnih bolezni, za katere je značilna nekontrolirana delitev celic kot posledica nedelovanja mehanizmov, ki so odgovorni za pravilno celično delitev, celično staranje in celično smrt. Teoretično lahko rak nastane iz katere koli celice, ki se deli.

Če nastane zaradi patogenih različic (mutacij), ki so prisotne v zarodnih ali spolnih celicah (semenčice, jajčne celice), govorimo o dednih oblikah raka, če pa nastane zaradi patogenih različic (mutacij) v somatskih celicah (celicah posameznih organov), govorimo o sporadičnih oblikah raka (glej zgoraj za pojasnilo o dedovanju sprememb (patogenih različic/mutacij) v DNK in Sliki 5). Trenutna ocena je, da je od 5 do 10 % vseh rakov dednih in kar okrog 90 % sporadičnih. Vzroki za nastanek raka so patogene različice (mutacije) ali strukturne (epigenetske) spremembe genov, ki kontrolirajo pravilnost podvojevanja DNK in aktivacijo popravljanih mehanizmov (tumorski supresorski geni), ter genov, ki so odgovorni za sproženje nadzorovane celične smrti (apoptoze).

Rak nastane zaradi delovanja številnih znotraj- ali zunajceličnih dejavnikov, ki jih imenujemo kancerogeni dejavniki. Ne glede na vrsto in vir kancerogenih dejavnikov je njihova skupna lastnost, da spreminjajo celično DNK. Danes poznamo več kot 200 različnih vrst raka, ki se med seboj razlikujejo po svoji biologiji in molekularnih spremembah (patogene različice/mutacije in epigenetske spremembe), ki so povzročile nastanek raka ali so nastale pozneje med razvojem bolezni kot posledica destabilizacije celičnega genoma. Glede na vlogo, ki jo ima določena sprememba v procesu nastanka raka, govorimo o gonilnih in pridruženih patogenih različicah (mutacijah). Gonilne patogene

različice (mutacije) so tiste, ki so neposredno odgovorne za začetek malignega spreminjanja celice (prva faza v procesu nastanka raka). Pridružene patogene različice (mutacije) so tiste, ki niso neposredno odgovorne za maligno spreminjanje celice, ampak so nastale kot posledica destabilizacije celičnega genoma in lahko celici dajejo določene prednosti pri njenem preživetju. Maligno spreminjanje celice in nastanek raka sta posledica radikalnih sprememb celične DNK in trenutno velja, da je vsaj 1 % vseh človeških genov posredno ali neposredno vpleten v nastanek in širjenje raka. Torej pri raku ne gre za bolezen, ki jo povzročijo spremembe v enem značilnem genu, ampak za spremembe v več različnih genih.

Glede na zgoraj napisano je jasno, da za posamezne vrste raka obstajajo značilne spremembe (patogene različice/mutacije in epigenetske spremembe), ki jih lahko uporabimo kot molekularne označevalce. Število patogenih različic (mutacij) in epigenetskih sprememb je odvisno od vrste raka in se giblje od nekaj patogenih različic (mutacij) pri otroških tumorjih do 100 in več patogenih različic (mutacij) pri melanomu (vrsta kožnega raka) ali raku pljuč.

## DEJAVNIKI TVEGANJA ZA NASTANEK RAKA

Dejavnike tveganja za nastanek raka lahko v grobem razdelimo na okoljske in podedovane genetske dejavnike. Med okoljske dejavnike uvrščamo tiste, ki so povezani z življenjskim slogom (npr. kajenje, pitje alkohola, prekomerno sončenje), ali tiste, na katere posameznik nima vpliva (npr. visoka stopnja sevanja, prisotnost nevarnih kemikalij, različne vrste virusnih ali bakterijskih okužb). Med okoljske dejavnike uvrščamo tudi t. i. znotrajcelične »naravne procese«, ki vključujejo nastanek prostih radikalov, delovanje hormonov itd.

Podedovani genetski dejavniki so vse spremembe (patogene različice/mutacije), ki jih starši prenesejo na otroke. Dedna nagnjenost k razvoju raka je lahko posledica močno ogrožajočih sprememb (patogenih različic/mutacij) v enem samem genu – monogenska nagnjenost (npr. patogene različice (mutacije) v genu APC pri družinski adenomatozni polipozi – FAP), patogene različice (mutacije) ali epigenetske spremembe v posameznih genih, zaradi katerih je občutno zvišano tveganje za nastanek raka (npr. patogene različice (mutacije) v genih *BRCA1* in *BRCA2* za nastanek raka dojk in/ali jajčnikov; patogene različice (mutacije) v genu *TP53* za sindrom Li-Fraumeni; patogene različice (mutacije) v genih *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* in *PMS2* za sindrom Lynch). Dedna nagnjenost je lahko tudi posledica številnih sprememb (patogenih različic/mutacij in epigenetskih sprememb) v različnih genih, ki vsaka po malem prispevajo k ogroženosti za razvoj bolezni, praviloma v povezavi z delovanjem dodatnih dejavnikov iz okolja (poligenska nagnjenost).

## DEDNI RAKI

Dedni raki so praviloma posledica genetskih sprememb (patogenih različic/mutacij) v zarodnih, tj. spolnih celicah. Te spremembe (patogene različice/mutacije) se dedujejo oziroma prenašajo na potomce (Slika 5). Čeprav je že dolgo znan obstoj družin s povečanim številom družinskih članov, ki so zboleli za rakom, so začeli ta pojav šele v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja povezovati z dedovanjem oz. geni, ki so neposredno odgovorni za nastanek raka. Ob upoštevanju kompleksnosti procesa nastanka rakaste celice ter števila potrebnih dogodkov, da si celica zagotovi vse spremembe, ki so pogoj za uspešno maligno preobrazbo, je jasno, da podedovane patogene različice (mutacije), ki destabilizirajo genom, močno skrajšajo čas za nastanek raka, zato je za nosilce dednih patogenih različic (mutacij), ki so povezane z nastankom raka, značilno, da imajo večje tveganje, da zbolijo in da zbolijo prej, kot je povprečje v populaciji.

## POTEK TESTIRANJA PRI OSEBAH S SUMOM NA DEDNO OBLIKO RAKA

Pri vseh posameznikih in njihovih družinah, kjer sumimo na dedno obliko raka, je najprej potrebno onkološko genetsko svetovanje. To poteka v okviru Oddelka za onkološko klinično genetiko na Onkološkem inštitutu Ljubljana. Pri tem specialist klinične genetike oceni verjetnost prisotnosti patogene različice (mutacije) pri posamezniku/družini in najprej napoti na genetsko testiranje tistega posameznika, pri katerem je verjetnost prisotnosti genetske okvare največja. Več informacij o poteku genetskega posveta lahko najdete v informativnem gradivu »Kaj je dedni rak?«, ki je dostopno na spletnem mestu Onkološkega inštituta Ljubljana ([www.onko-i.si](http://www.onko-i.si)). Obravnava pri specialistu klinične genetike je možna na podlagi napotnice, ki jo izda osebni zdravnik ali kateri koli drug zdravnik specialist.

Specialist klinične genetike vas bo napotil na genetsko preiskavo/ testiranje, kadar je to smiselno.

**Podatki za stik Oddelka za onkološko klinično genetiko:**

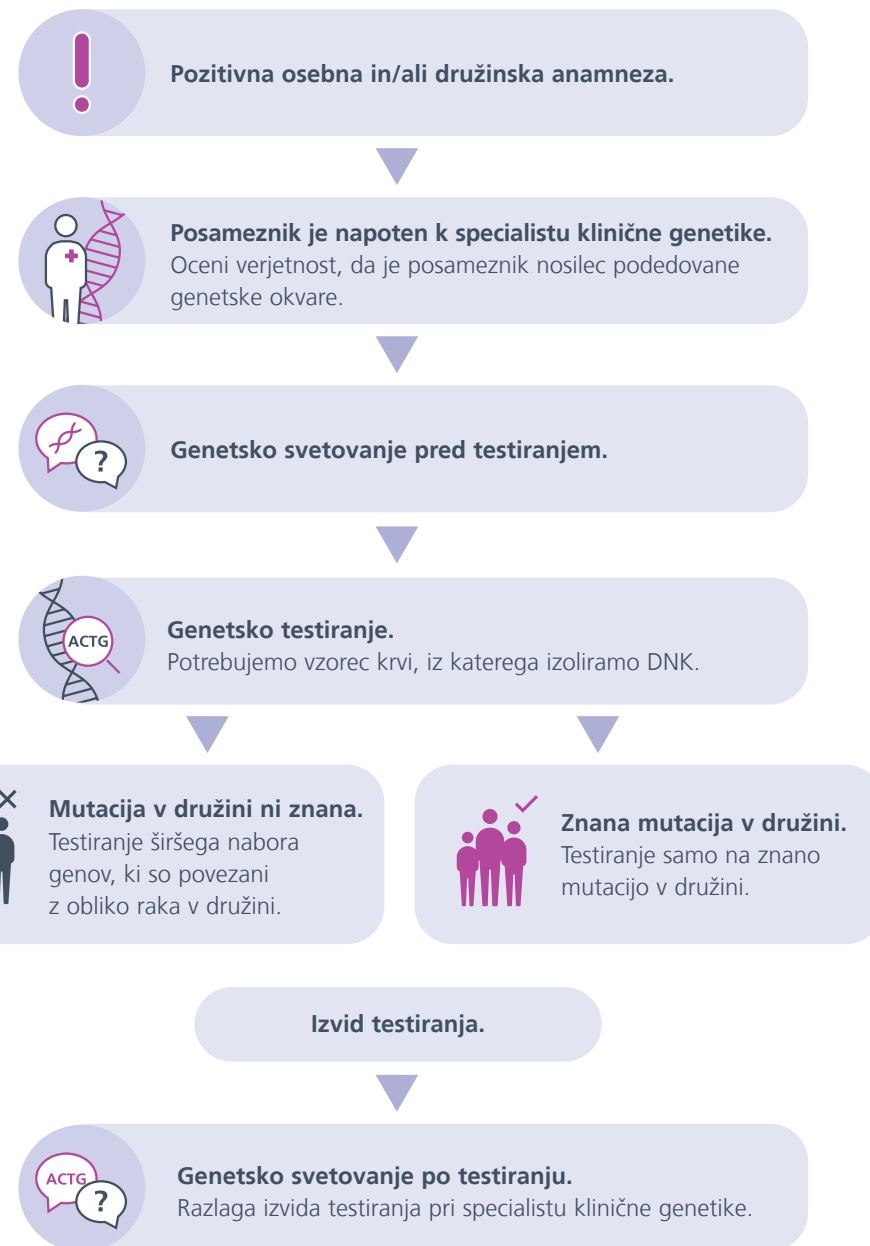
E: genetika@onko-i.si; T: 01 5879 649.

Testiranje zarodnih patogenih različic (mutacij) opravljamo na zdravem oziroma netumorskem tkivu, za katerega predpostavljamo, da ima enako dedno zasnovo, kot so jo imele embrionalne celice preiskovane osebe. Pri nas testiranje zarodnih patogenih različic (mutacij) izvajamo s testiranjem DNK, izolirane iz krvi (bolj natančno iz levkocitov). V določenih primerih kri ni primeren material za testiranje zarodnih patogenih različic (mutacij), in sicer takrat, ko ima preiskovanec hematološko obolenje (npr. levkemijo, limfom) ali pa je imel presajen kostni mozeg. V tem primeru testiranje zarodnih patogenih različic (mutacij) izvajamo iz brisa ustne sluznice ali drugega netumorskega tkiva (Slika 7).

Odvzete vzorce krvi po opravljeni analizi shranimo v našem laboratoriju, če je bilo med genetskim posvetom podano soglasje za shranjevanje vzorcev. Vzorce krvi hranimo predvsem za primer, da bi bili v prihodnosti potrebni dodatni testi, včasih pa jih uporabimo za standardizacijo in razvoj novih testov ali v raziskovalne namene.

**Slika 7: Potek testiranja pri dednih rakih.**

Med posvetom/obravnavo specialist klinične genetike posamezniku predstavi prednosti in slabosti genetskih preiskav, v primeru predvidenega genetskega testiranja pa posameznik podpiše soglasje za genetsko testiranje, nadaljnje ravnanje z rezultati testiranja in preostankom odvzetih vzorcev.



Genetsko testiranje posameznikov z dednimi sindromi zajema testiranje različnega nabora genov, ki so povezani z večjo ogroženostjo za nastanek določene vrste raka pri posamezniku oziroma družini (Slika 8). Nabor testiranih genov sledi trenutnim strokovnim smernicam in se lahko s časom spreminja.








Naš laboratorij je opremljen z najsodobnejšo opremo. Z uporabo različnih molekularno-diagnostičnih tehnik (PCR, RT-PCR, neposredno sekvenciranje, metoda sekvenciranja druge generacije – NGS) določamo genetske spremembe (patogene različice/mutacije) v posameznem genu ali spremembe (patogene različice/mutacije) v številnih genih.

S trenutno najsodobnejšim pristopom testiranja molekularno-genetskih sprememb (patogenih različic/mutacij), metodo NGS, določamo nukleotidno zaporedje več milijonov fragmentov DNK hkrati, kar nam omogoča, da lahko naenkrat pregledamo tudi 100 in več različnih genov v preiskovanem vzorcu. Metoda NGS nam torej omogoča analizo večjega števila genov hkrati, zaradi česar je sam postopek testiranja hitrejši in cenejši (Slika 6). Čas od odvzema vzorca do priprave izvida je od enega do treh mesecev.

**Slika 8: Geni, ki jih testiramo za ugotavljanje ogroženosti za različne vrste raka pri najpogostejših dednih sindromih.**

Geni, ki jih pregledujemo pri pogostejših vrstah dednega raka. Poleg navedenih pogostih dednih vrst raka testiramo tudi gene, ki so značilni za redkejšje oblike dednih predispozicij za razvoj raka (niso prikazani v tabeli): geni, povezani z rakom ledvic, rakom ščitnice, feokromocitomi/paragangliomi, neurofibromatozo, švanomatozo, multiplimi primarnimi tumorji.

Opomba: Nabor testiranih genov sledi trenutnim strokovnim smernicam in se lahko s časom spreminja.

 <b>Rak dojg</b>	 <b>Rak jajčnikov</b>	 <b>Rak debelega črevesa in danke</b>	 <b>Rak prostate</b>	 <b>Rak trebušne slinavke</b>	 <b>Dedni difuzni rak želodca</b>	 <b>Maligni melanom (kožni rak)</b>
<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>TP53</i> <i>PTEN</i> <i>STK11</i> <i>CDH1</i> <i>PALB2</i> <i>CHEK2</i> <i>ATM</i> <i>BARD1</i> <i>NF1</i>	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>TP53</i> <i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>EPCAM</i> <i>BRIP1</i> <i>RAD51C</i> <i>RAD51D</i>	<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>EPCAM</i> <i>TP53</i> <i>PTEN</i> <i>STK11</i> <i>CHEK2</i> <i>APC</i> <i>MUTYH</i> <i>BMP1A</i> <i>SMAD4</i> <i>POLE</i> <i>POLD1</i> <i>NTHL1</i> <i>MSH3</i>	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>ATM</i> <i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>TP53</i> <i>PTEN</i> <i>PALB2</i> <i>CHEK2</i> <i>BARD1</i> <i>BRIP1</i> <i>RAD51B</i> <i>RAD51C</i> <i>RAD51D</i> <i>FANCL</i> <i>HOXB13</i>	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>ATM</i> <i>PALB2</i> <i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>TP53</i> <i>STK11</i> <i>CDKN2A</i> <i>SPINK1</i>	<i>CDH1</i> <i>CTNNA1</i>	<i>CDKN2A</i> <i>CDK4</i> <i>BRCA2</i> <i>BAP1</i> <i>MITF</i> <i>TERT</i>

## PRISTOP K TESTIRANJU ZARODNIH PATOGENIH RAZLIČIC (MUTACIJ)

Pristop h genetskemu testiranju je odvisen od tega, ali testiramo posameznika iz družine brez znane patogene različice (mutacije) ali posameznika iz družine z že znano družinsko patogeno različico (mutacijo). V prvem primeru izvedemo testiranje širšega nabora genov, ki so povezani z obliko raka, ki se pojavlja v družini. V drugem primeru testiramo posameznika na znano družinsko patogeno različico (mutacijo).

Za testiranje potrebujemo vzorec venske krvi, iz katere izoliramo DNK.

Poleg prvega odvzema vzorca krvi opravimo tudi drugi odzem vzorca krvi, ki ga uporabimo za potrditev vseh pozitivnih izvidov, pri testiranju posameznikov iz družin z znano patogeno različico (mutacijo) pa tudi za potrditev negativnih izvidov.

## IZVID MOLEKULARNO-GENETSKE PREISKAVE PRI DEDNIH RAKIH

Na izvidu molekularno-genetske preiskave preiskave so povzeti rezultati testiranja izbranega nabora genov. Nukleotidne različice, ki smo jih dokazali med testiranjem, so razvrščene v pet razredov glede na klinično pomembnost. Na izvidu so navedene patogene različice (razred 5), verjetno patogene različice (razred 4) in različice z nejasnim kliničnim pomenom (VUS, razred 3). Klinično nepomembne različice – verjetno benigne različice (razred 2) in benigne različice (razred 1) – niso navedene na izvidu, saj po podatkih iz literature in podatkovnih baz ne povišajo ogroženosti za nastanek raka pri posamezniku.

Pozitiven rezultat pomeni, da smo pri analizi dokazali patogeno različico (mutacijo) v genu, ki je povezan z nastankom raka pri posamezniku/družini. Negativen rezultat pomeni, da pri analizi nismo dokazali patogene različice (mutacije) v genih, ki so povezani s povečano ogroženostjo za nastanek raka pri

posamezniku/družini. Na izvidu so lahko navedene tudi različice, za katere trenutno njihova povezava z nastankom raka še ni dokončno opredeljena (različice z nejasnim kliničnim pomenom – različice razreda 3 ali VUS). S časom se lahko klinični pomen teh različic spremeni in se lahko izkažejo kot vzrok za nastanek raka pri posamezniku/družini ali pa se ugotovi, da gre za normalne, neškodljive različice. Osebjem Oddelka za molekularno diagnostiko ob ponovno dokazani različici nejasnega kliničnega pomena pri istem ali drugem preiskovancu slednjo na novo opredeli na osnovi strokovnih smernic in informacije o pomembnih spremembah posreduje kliničnemu genetiku.

## PRIMER REZULTATA TESTA PRI PREISKOVANCU BREZ ZNANE PATOGENE RAZLIČICE (MUTACIJE) V DRUŽINI

**Pozitiven:** v vzorcu DNK je prisotna patogene različica (mutacija) v klinično pomembnem genu, ki je povezana z nastankom raka pri posamezniku/družini. Preiskovanec je bolj ogrožen, da zbolijo za nekaterimi vrstami raka – glede na preiskovani gen oz. sindrom.

### Rezultati:

Klinično pomembna različica je dokazana.			
»Klinično pomembna različica« je definirana kot genetska sprememba, ki je povezana s povečano ogroženostjo za nastanek raka.			
Gen	Patogena različica	Razred	Interpretacija
BRCA2	(LRG_29311) c.3975_3978dupTGCT p.(Ala1327Cysfs*4)	heterozigot 5	Visoka ogroženost za nastanek rakov, povezanih s sindromom dednega raka dojk in jajčnikov. Različica je lahko pomembna za načrtovanje zdravljenja.

**Obrazložitev:**  
Patogena različica c.3975\_3978dupTGCT p.(Ala1327Cysfs\*4) v genu BRCA2 povzroči premik bralnega okvira in nastanek prezgodnjega stop kodona ter posledično nastanek okrnjenega ali spremenjenega proteina. Nosilci patogenih in verjetno patogenih različic (PR/VPR) v genu BRCA2 so bolj ogroženi, da zbolijo za raki, povezanimi s sindromom dednega raka dojk in/ali jajčnikov, kot splošna populacija (NCCN, 2022). Različica se nahaja v regiji OCCR (angl. Ovarian Cancer Cluster Region) gena BRCA2 (c.2807-6401).  
Po smernicah NCCN in ESMO so bolniki z rakom jajčnikov, prostate, dojke ali trebušne slinavke ter dokazano PR/VPR v genih BRCA1 ali BRCA2 lahko primerni za zdravljenje z zaviralci PARP proteinov (NCCN, 2022a, 2022b, 2022c, 2022d; ESMO, 2020; Mosele et al., 2020). Dokazane PR/VPR v zgoraj navedenih genih so lahko vzrok za okvaro homologne rekombinacije. Svetujemo posvet s specialistom klinične genetike in lečečim onkologom, ki opredeli pomen različice za načrtovanje zdravljenja.

Rezultat je veljaven, ko je potrjen z analizo ponovno odvzetega vzorca.

### Opombe:

Svetujemo vam, da se o rezultatu molekularno genetske preiskave in nadaljnjih priporočilih posvetujete s specialistom klinične genetike, ki bo podal dokončno oceno ogroženosti za nastanek raka. Rezultat testa je lahko pomemben tudi za vaše sorodnike.  
Vsi sorodniki preiskovanca/-ke v prvem kolenu imajo 50 % verjetnost, da so nosilci enake zgoraj navedene patogene različice. Svetujemo jim posvet s specialistom klinične genetike.  
Obrazložitev različic po razredih je podana na hrbtni strani izvida.

**Negativen:** v vzorcu DNK ni prisotna patogena različica (mutacija) v pregledanih genih. To pomeni, da preiskovanec ni nosilec patogenih različic (mutacij), ki so povezane s povečano ogroženostjo za nastanek raka. Negativen izvid ne more povsem izključiti genetskega vzroka za bolezen pri preiskovancu oz. družini, saj je lahko sprememba (patogena različica/mutacija) prisotna v katerem izmed genov, ki niso bili pregledani, ali pa je z uporabljeno metodo ni mogoče zaznati (tehnična omejitev). V teh primerih se oceni ogroženost glede na družinsko anamnezo in klinično sliko.

#### Rezultati:

**Klinično pomembna različica ni dokazana.**

»Klinično pomembna različica« je definirana kot genetska sprememba, ki je povezana s povečano ogroženostjo za nastanek raka.

**Obrazložitev:**  
V preiskovanih genih so lahko prisotne genske spremembe, ki jih zaradi omejitev uporabljenih metod ni možno zaznati. Klinično pomembne različice so lahko prisotne tudi v drugih genih, ki niso bili preiskovani.

#### Opombe:

Svetujemo vam, da se o rezultatu molekularno genetske preiskave in nadaljnjih priporočilih posvetujete s specialistom klinične genetike, ki bo podal dokončno oceno ogroženosti za nastanek raka. Rezultat testa je lahko pomemben tudi za vaše sorodnike. Obrazložitev različic po razredih je podana na hrbtni strani izvida.

**Nejasen:** zaznana je bila sprememba oz. različica, katere pomena trenutno ne znamo opredeliti. Tovrstne različice se lahko sčasoma izkažejo za vzrok dednih rakov ali pa se pozneje odkrije, da gre za neškodljive različice. Včasih so v tem primeru potrebne dodatne preiskave pri preiskovancu in/ali njegovih svojcih.

Dodatne ugotovitve:				
Gen	Različica	Razred	Interpretacija	
RAD51C (LRG_3141)	c.1028C>G p.(Pro343Arg)	heterozigot	3	Neznan vpliv na ogroženost za nastanek raka.

## PRIMER REZULTATA TESTA PRI PREISKOVANCU Z ZNANO PATOGENO RAZLIČICO (MUTACIJO) V DRUŽINI

**Pozitiven:** v vzorcu DNK je prisotna patogena različica (mutacija), ki je znana v družini. Preiskovanec je bolj ogrožen, da zbolijo za nekaterimi vrstami raka – glede na preiskovani gen oz. sindrom.

#### Rezultati:

**Klinično pomembna različica je dokazana.**

»Klinično pomembna različica« je definirana kot genetska sprememba, ki je povezana s povečano ogroženostjo za nastanek raka.

Gen	Patogena različica	Razred	Interpretacija
<b>BRCA1</b> (LRG_29211)	<b>c.181T&gt;G p.(Cys61Gly)</b>	heterozigot	5

**Obrazložitev:**  
V družini znana patogena različica c.181T>G p.(Cys61Gly) v genu BRCA1 povzroči zamenjavo aminokislina ter posledično nastanek okrnjenega ali spremenjenega proteina. Nosilci patogenih in verjetno patogenih različic (PR/VPR) v genu BRCA1 so bolj ogroženi, da zbolijo za raki, povezanimi s sindromom dednega raka dojk in/ali jajčnikov, kot splošna populacija (NCCN, 2022). Po smernicah NCCN in ESMO so bolniki z rakom jajčnikov, prostate, dojke ali trebušne slinavke ter dokazano PR/VPR v genih BRCA1 ali BRCA2 lahko primerni za zdravljenje z zaviralci PARP proteinov (NCCN, 2022a, 2022b, 2022c, 2022d; ESMO, 2020; Mosele et al., 2020). Dokazane PR/VPR v zgoraj navedenih genih so lahko vzrok za okvaro homologne rekombinacije. Svetujemo posvet s specialistom klinične genetike in lečečim onkologom, ki opredeli pomen različice za načrtovanje zdravljenja.

**Rezultat je veljaven, ko je potrjen z analizo ponovno odvzetega vzorca.**

#### Opombe:

Svetujemo vam, da se o rezultatu molekularno genetske preiskave in nadaljnjih priporočilih posvetujete s specialistom klinične genetike, ki bo podal dokončno oceno ogroženosti za nastanek raka. Rezultat testa je lahko pomemben tudi za vaše sorodnike. Vsi sorodniki preiskovanca/-ke v prvem kolenu imajo 50 % verjetnost, da so nosilci enake zgoraj navedene patogene različice. Svetujemo jim posvet s specialistom klinične genetike. Obrazložitev različic po razredih je podana na hrbtni strani izvida.

**Negativen:** v vzorcu DNK ni prisotna patogena različica (mutacija), ki je znana v družini. To pomeni, da preiskovanec ni podedoval patogene različice (mutacije) v pregledanem genu. Ogroženost za raka je podobna kot pri vrstnikih, ki raka v družini nimajo.

#### Rezultati:

**Klinično pomembna različica ni dokazana.**

»Klinično pomembna različica« je definirana kot genetska sprememba, ki je povezana s povečano ogroženostjo za nastanek raka.

Gen	Patogena različica
<b>BRCA1</b> (LRG_29211)	<b>Patogena različica c.181T&gt;G p.(Cys61Gly) ni dokazana.</b>

**Obrazložitev:**  
V družini znana patogena različica c.181T>G p.(Cys61Gly) v genu BRCA1, povezana z visoko ogroženostjo za nastanek rakov, povezanih s sindromom dednega raka dojk in/ali jajčnikov, ni dokazana. Preiskovanec/-ka zato ni ogrožen/-a za nastanek rakov povezanih s sindromom dednega raka dojk in/ali jajčnikov, ki so posledica preiskovane različice (NCCN, 2022). Rahlo povišana ogroženost za nastanek rakov glede na splošno populacijo ni izključena. Dokončno oceno ogroženosti poda specialist klinične genetike.

**Rezultat je veljaven, ko je potrjen z analizo ponovno odvzetega vzorca.**

#### Opombe:

Svetujemo vam, da se o rezultatu molekularno genetske preiskave in nadaljnjih priporočilih posvetujete s specialistom klinične genetike, ki bo podal dokončno oceno ogroženosti za nastanek raka. Rezultat testa je lahko pomemben tudi za vaše sorodnike. Obrazložitev različic po razredih je podana na hrbtni strani izvida.

## NAKLJUČNE NAJDBE

Med genetskim testiranjem lahko odkrijemo patogeno različico (mutacijo) v genu, ki po trenutnih strokovnih smernicah ni dokazano povezan z dednim sindromom oziroma vrsto raka, zaradi katerega je bil preiskovanec napoten na testiranje. Te najdbe imenujemo naključne najdbe in jih zaradi njihove povezave z drugimi vrstami raka poročamo na naših izvidih. Primeri naključnih najdb, ki jih je po strokovnih smernicah nujno poročati, so patogene različice (mutacije) v genih *APC*, *BRCA1*, *BRCA2* in drugih.

## SOMATSKI MOZAICIZEM

V redkih primerih lahko testiranje pokaže prisotnost **somatskega mozaicizma**. Za somatski mozaicizem je značilno, da je patogena različica (mutacija) prisotna samo v delu telesnih celic, ne pa v vseh celicah, kot to velja za podedovane (zarodne) patogene različice (mutacije). Genetska sprememba (patogena različica/mutacija) nastane po oploditvi jajčne celice med razvojem in delitvijo celic zarodka. Posledice somatskega mozaicizma so odvisne od različnih dejavnikov: kdaj v razvoju zarodka pride do spremembe (patogene različice/mutacije), dela telesa ter deleža telesnih celic, ki so prizadete, gena, vrste patogene različice in njenega patofiziološkega učinka. Če je somatska patogena različica (mutacija) prisotna v obliki somatskega mozaicizma, ne pa zgolj v samem tumorju, lahko pride do vznika novega tumorja na drugi lokaciji (kjer se nahajajo celice, ki nosijo to patogeno različico). Prenos patogene različice (mutacije) na potomce je v primeru somatskega mozaicizma možen, če je patogena različica (mutacija) prisotna tudi v spolnih celicah posameznika. Pri potrjevanju/izključevanju somatskega mozaicizma so potrebne dodatne preiskave iz različnih izhodnih materialov/vzorcev tkiva, ki jih glede na vrsto patogene različice (mutacije) po posvetu določita analitik v laboratorijski medicini in specialist klinične genetike.

## POMEN TESTIRANJA ZA ZARODNE GENETSKE SPREMEMBE

Na podlagi rezultatov genetskega testiranja, klinične slike in družinske anamneze (obremenjenost z raki v družini) specialist klinične genetike oceni, kolikšno je tveganje, da posameznik zbolí za rakom, ter predlaga ukrepe, ki omogočajo zgodnje odkrivanje ali celo preprečijo nastanek potencialnega raka pri še zdravih nosilcih patogene različice (mutacije). Nekatere genetske spremembe (patogene različice/mutacije) so pomembne tudi pri načrtovanju zdravljenja.

**Rezultat testa je pomemben tudi za krvne sorodnike (otroke, brate, sestre, starše).**



## SPORADIČNI RAKI

Sporadični (nededni) raki so posledica genetskih sprememb (patogenih različic/mutacij), ki na novo nastanejo v telesnih (somatskih) celicah – različnih celicah tkiv in organov. V primeru sporadičnih oblik raka se te spremembe (patogene različice/mutacije) ne prenašajo oziroma se ne dedujejo na potomce (Slika 5), vplivajo pa na lastnosti rakaste celice in so pomembne tako pri določanju vrste raka kot tudi izbiri ustreznega zdravljenja.

### TESTIRANJE NA PRISOTNOST KLINIČNO POMEMBNIH RAZLIČIC (PATOGENIH RAZLIČIC/MUTACIJ) IN DRUGIH GENETSKIH SPREMOMB V TUMORJU

Molekularno-genetsko testiranje oziroma genotipizacija tumorjev je podlaga za natančnejšo diagnostiko in uvedbo bolniku prilagojenega zdravljenja. V tumorju lahko dokažemo tako zarodne (prisotne v vseh celicah v organizmu) kot tudi somatske različice (prisotne v delu telesnih celic ali zgolj v tumorju). Zgolj na osnovi testiranja tumorja ne moremo razločiti, ali gre za zarodno ali somatsko različico. Za razjasnitev izvora različice testiramo prisotnost različice v krvi ali drugem netumorskem tkivu. Če je različica prisotna v krvi ali netumorskem tkivu v visokem deležu (50–100 %), gre za zarodno različico. Če je različica prisotna v krvi ali drugem netumorskem tkivu v nizkem deležu (pod 30 %), gre verjetno za somatski mozaicizem. Če različice v krvi in drugem netumorskem tkivu ne dokažemo, gre verjetno za somatsko različico, omejeno na tumor.

V rakasti celici je običajno nakopičeno večje število patogenih različic (mutacij). Breme patogenih različic (mutacij) v tumorju (TMB) je pri različnih tumorjih različno in je lahko tudi napovednik pričakovanega odziva na zdravljenje z določenimi zdravili (imunoterapija). Določamo ga kot število različic na

milijon pregledanih nukleotidov (število različic na eno mega bazo).

Tumorji se med seboj razlikujejo tudi glede vrste patogenih različic (mutacij), ki se pojavljajo v tumorskih celicah. Te spremembe imenujemo »vzorec patogenih različic (mutacij) v tumorju«. Nekateri vzorci patogenih različic (mutacij) nam služijo kot napovednik odziva na zdravljenje z določenimi zdravili. Tak primer je mikrosatelitska nestabilnost – MSI. Visoka mikrosatelitska nestabilnost v tumorju (MSI-H) pomeni za bolnika možnost zdravljenja z imunoterapijo.

### VRSTE GENETSKIH PREISKAV

Opravljamo preiskave za različne vrste raka: limfom, rak debelega črevesa in danke, maligni melanom, rak jajčnikov, gastrointestinalne stromalne tumorje, rak dojke, rak ščitnice, rak ledvic, rak trebušne slinavke, rak prostate in druge. V okviru diagnostike limfomov določamo klonalnost limfocitov B in T ter translokaciji t(11;14) in t(14;18). V okviru testiranja solidnih tumorjev določamo klinično pomembne različice (mutacije) v različnih genih, ki so pomembne za uvedbo specifičnega tarčnega zdravljenja, natančnejšo diagnozo ali prognozo poteka bolezni. Z istim namenom s testiranjem tumorjev določamo tudi druge molekularno-genetske spremembe – breme patogenih različic (mutacij) v tumorju (TMB), vzorci patogenih različic (mutacij), stopnja metilacije določenih genov in drugo.

Poleg testiranja tumorjev opravljamo tudi preiskave, ki jih lahko uporabimo za napoved učinkovitosti presnavljanja zdravil. Te preiskave izvajamo iz vzorca krvi.

Seznam preiskav ter navodila za naročanje preiskav in pošiljanje vzorcev so dostopni na spletnem mestu Onkološkega inštituta Ljubljana ([www.onko-i.si](http://www.onko-i.si)) ali na Oddelku za molekularno diagnostiko.

Molekularno-genetske preiskave tumorjev lahko z napotnico naročijo različni zdravniki specialisti, ki obravnavajo onkološke bolnike.

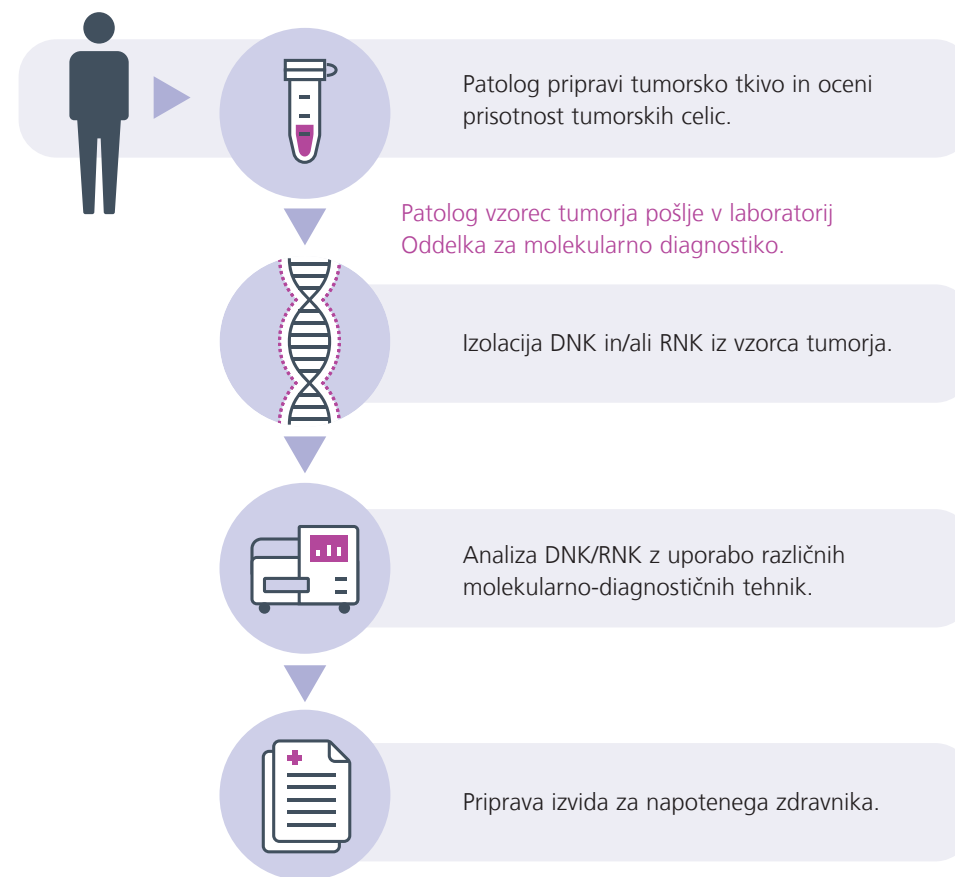
## TESTIRANJE TUMORJEV

Z genotipizacijo tumorjev zaznamo klinično pomembne različice (mutacije) in druge spremembe, kot so breme patogenih različic (mutacij) v tumorju, vzorci patogenih različic (mutacij) in stopnja metilacije določenih genov. Navedene molekularno-genetske spremembe uporabljamo kot:

- **Napovedne označevalce** – napoved odziva na zdravljenje z določenimi zdravili (ugotavljanje, ali bo terapija z določenim zdravilom uspešna).
- **Prognostične označevalce** – napoved poteka oz. hitrost napredovanja bolezni.
- **Diagnostične označevalce** – boljša opredelitev tumorjev.
- **Farmakokinetske/farmakodinamske označevalce** – napoved presnavljanja zdravil; testiranje izvajamo iz krvi; bolnike testiramo na prisotnost določenih različic, ki vplivajo na učinkovitost presnavljanja zdravil.
- **Spremljanje odziva na zdravljenje ali zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni.**
- **Oceno verjetnosti, da je tumor pri bolniku posledica dedne nagnjenosti k razvoju raka.**

## POTEK TESTIRANJA

Za testiranje potrebujemo vzorec tumorskega tkiva; slednjega pripravijo patologi, ki ocenijo prisotnost tumorskih celic v testiranem vzorcu. V vzorcu mora biti dovolj tumorskih celic (nad 30 %), da je testiranje uspešno in rezultat testiranja zanesljiv. Iz tumorskega tkiva izoliramo DNK in/ali RNK (Slika 9). Pri preiskavi MSI potrebujemo tudi vzorec netumorskega (normalnega) tkiva ali vzorec krvi.













Slika 9: Potek testiranja tumorjev.

Z uporabo različnih molekularno-diagnostičnih tehnik (PCR, RT-PCR, neposredno sekvenciranje ter NGS) določamo genetske spremembe (patogene različice/mutacije) v posameznem genu ali spremembe (patogene različice/mutacije) v številnih genih. Uporaba večgenskih panelov vključuje analizo manjšega števila genov in analizo več kot 500 genov. Genetske spremembe (patogene različice/mutacije) določamo v DNK in/ali RNK (Sliki 9, 10).

**Slika 10: Klinično pomembni geni, ki jih testiramo pri različnih vrstah raka v okviru genotipizacije tumorjev.**

Pri testiranju tumorjev uporabljamo genske panele, ki vključujejo tudi več kot 500 genov. V tumorskem tkivu določamo klinično pomembne različice (patogene različice/mutacije) v različnih genih in tudi druge molekularno-genetske spremembe, kot so breme patogenih različic (mutacij) v tumorju, vzorci patogenih različic (mutacij), stopnja metilacije določenih genov in druge spremembe, ki so pomembne za uvedbo specifičnega tarčnega zdravljenja, natančnejšo diagnozo ali prognozo poteka bolezni. Opomba: Nabor testiranih genov sledi trenutnim strokovnim smernicam in se lahko s časom spreminja.

 <b>Rak pljuč</b>	 <b>Maligni melanom (kožni rak)</b>	 <b>Rak debelega črevesa in danke</b>	 <b>Rak jajčnikov</b>	 <b>Rak dojk</b>	 <b>Rak želodca in GIST</b>	 <b>Rak mehurja</b>	 <b>Rak prostate</b>	 <b>Rak trebušne slinavke</b>	 <b>Rak ledvic</b>
<i>ALK</i> <i>BRAF</i> <i>EGFR</i> <i>ERBB2</i> <i>FGFR2</i> <i>FGFR3</i> <i>KRAS</i> <i>MET</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> <i>RET</i> <i>ROS1</i> in drugi značilni geni	<i>BRAF</i> <i>NRAS</i> <i>KIT</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>ERBB2</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni	<i>PIK3CA</i> <i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni	<i>PDGFRA1</i> <i>KIT</i> <i>BRAF</i> <i>NF1</i> <i>CDH1</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni	<i>FGFR2</i> <i>FGFR3</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>ATM</i> <i>BARD1</i> <i>BRIP1</i> <i>CDK12</i> <i>CHEK1</i> <i>CHEK2</i> <i>FANCL</i> <i>PALB2</i> <i>RAD51B</i> <i>RAD51C</i> <i>RAD51D</i> <i>RAD54L</i> <i>PPP2R2A</i> <i>PTEN</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>PALB2</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni	<i>mTOR</i> <i>VHL</i> <i>FGFR2</i> <i>FGFR3</i> <i>NTRK1</i> <i>NTRK2</i> <i>NTRK3</i> in drugi značilni geni

## IZVID TESTIRANJA TUMORJEV

Na izvidu molekularno-genetske preiskave so povzeti rezultati testiranja izbranega nabora genov. Nukleotidne različice so razvrščene v štiri razrede glede na klinično pomembnost. Na izvidu so navedene različice z znanim kliničnim pomenom (razred I), različice z možnim kliničnim pomenom (razred II) in različice z nejasnim kliničnim pomenom (VUS, razred III). Verjetno benigne različice in benigne različice (razred IV) niso navedene na izvidu, saj niso klinično pomembne. Pri različicah z znanim kliničnim pomenom je podana tudi učinkovina in možen odziv bolnika na zdravljenje. V razred I (različice z znanim kliničnim pomenom/mutacije) so uvrščene tiste različice, pri katerih je že jasno dokazano (podprto z večjimi kliničnimi študijami), da so povezane z odzivom na zdravljenje z določenimi zdravili ali prognozo ali diagnozo določene vrste raka. Običajno so tudi že opisane v mednarodnih strokovnih smernicah. Če so različice uvrščene v druge razrede, npr. razred II, je povezava različice s kliničnim pomenom pri določenem tipu raka manj jasna oziroma še niso bile opravljene ali zaključene dovolj obsežne klinične študije ali pa je pomen različice neznan, npr. razred III.

### POMEN TESTIRANJA TUMORJEV

Rezultat testa je v pomoč pri postavljanju natančnejše diagnoze, prognozi poteka bolezni in uvedbi bolniku prilagojenega zdravljenja.

## PRIMER IZVIDA PRI TESTIRANJU TUMORJA JAJČNIKA

**Pozitiven:** v vzorcu DNK je prisotna klinično pomembna različica (mutacija). Bolnik je na podlagi rezultata primeren za zdravljenje z ustreznim tarčnim zdravilom.

### Rezultati:

KLINIČNO POMEMBNE RAZLIČICE					
Gen/Fuzija:	Rezultat:	Različica	AF(%)	Učinkovina	Pričakovan odgovor
<b>BRCA1</b>	<b>različica razreda I</b>	<b>c.1687C&gt;T p.(Gln563*)</b>	63.31	zaviralci PARP	občutljivi - verjetno odgovori na zdravljenje
Različice razreda I so različice z znanim kliničnim pomenom. Različica razreda I c.1687C>T p.(Gln563*) v genu BRCA1 povzroči nastanek prezgodnjega stop kodona ter posledično nastanek okrnjenega ali spremenjenega proteina. Po smernicah NCCN in ESMO so bolniki z rakom jajčnikov, prostate, dojke ali trebušne slinavke ter dokazano klinično pomembno različico v genih BRCA1 ali BRCA2 primerni za zdravljenje z zaviralci PARP proteinov (NCCN, 2022, 2022a, 2022b, 2022c; ESMO, 2020; Mosele et al., 2020). Dokazane klinično pomembne različice v zgoraj navedenih genih so lahko vzrok za okvaro homologne rekombinacije. Z uporabljenimi metodami ni možno ločiti somatskih od zarodnih različic. Zarodne patogene različice v genih BRCA1 in BRCA2 so povezane s sindromom dednega raka dojke in/ali jajčnikov (NCCN, 2022d). V primeru, da osebna ali družinska anamneza ustreza sindromu dednega raka dojke in/ali jajčnikov, je pacienta priporočljivo napotiti na posvet s specialistom klinične genetike.					
<b>BRCA2</b>	<b>nemutiran</b>				
Z genotipizacijo DNA smo dokazali klinično pomembne različice.					

**Negativen:** v vzorcu DNK ni prisotna klinično pomembna različica (mutacija). Bolnik na podlagi rezultata ni primeren za zdravljenje s tarčnim zdravilom, saj zdravljenje ne bi bilo uspešno.

### Rezultati:

KLINIČNO POMEMBNE RAZLIČICE				
Gen/Fuzija:	Rezultat:	Različica	Učinkovina	Pričakovan odgovor
<b>BRCA1</b>	<b>nemutiran</b>		zaviralci PARP	verjetno slabše odgovori na zdravljenje
<b>BRCA2</b>	<b>nemutiran</b>		zaviralci PARP	verjetno slabše odgovori na zdravljenje
Bolniki z rakom jajčnikov, prostate, dojke ali trebušne slinavke brez dokazane klinično pomembne različice v genih BRCA1 ali BRCA2 lahko slabše odgovorijo na zdravljenje z zaviralci PARP proteinov kot bolniki z dokazano klinično pomembno različico.				
Z genotipizacijo DNA nismo dokazali klinično pomembnih različic.				

**Druge najdbe:** v vzorcu DNK so prisotne različice, ki so lahko pomembne v primeru suma na dedno obliko raka ali kot možne tarče za zdravila v prihodnosti. Pod to rubriko so navedene tudi spremembe oz. različice, katerih pomena trenutno ne znamo opredeliti (različice razreda III).

DRUGE NAJDBE				
Gen/Fuzija:	Rezultat:	Različica	AF(%)	
<b>TP53</b>	<b>različica razreda II</b>	<b>c.815T&gt;G p.(Val272Gly)</b>	68.81	
Različice razreda II so različice z možnim kliničnim pomenom. Različica razreda II c.815T>G p.(Val272Gly) v genu TP53 povzroči zamenjavo aminokislina ter posledično nastanek okrnjenega ali spremenjenega proteina. V tumorju detektirane patogene ali verjetno patogene različice v genu TP53 so pogosto somatskega izvora. Z uporabljenimi metodami ni možno ločiti somatskih od zarodnih različic. Zarodne patogene različice v genu TP53 so povezane s sindromom Li-Fraumeni. V primeru, da osebna ali družinska anamneza ustreza sindromu Li-Fraumeni, je pacienta priporočljivo napotiti na posvet s specialistom klinične genetike.				
<b>RAD51D</b>	<b>različica razreda III</b>	<b>c.664G&gt;A p.(Glu222Lys)</b>	57.28	
Različice razreda III so različice nejasnega kliničnega pomena. Z uporabljenimi metodami ni možno ločiti somatskih od zarodnih različic.				

## ZAKLJUČEK

V Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana izvajamo testiranje za dedne in sporadične oblike raka. Pri tem določamo spremembe (patogene različice/mutacije) v posameznem genu ali spremembe (patogene različice/mutacije) v številnih genih (večgenski paneli, ki vključujejo analizo tudi več kot 500 genov). Spremembe (patogene različice/mutacije) določamo v DNK in/ali RNK, ki jih za testiranje zarodnih sprememb (patogenih različic/mutacij) izoliramo iz krvi (levkocitov), in za testiranje somatskih sprememb (patogenih različic/mutacij) iz tumorskega tkiva. Spremembe (patogene različice/mutacije), ki jih določamo, nam omogočajo oceno ogroženosti z rakom, boljšo opredelitev tumorja, oceno biološkega poteka bolezni ne glede na zdravljenje, uvajanje zdravljenja in napoved odziva na zdravljenje ali spremljanje poteka bolezni. Razen klasičnih različic (patogenih različic/mutacij) lahko kot molekularno-genetske označevalce uporabimo določene spremembe na DNK, kot so vzorci patogenih različic (mutacij) v tumorju (npr. mikrosatelitska nestabilnost – MSI), breme patogenih različic (mutacij) v tumorju (TMB), metilacijski status in drugo. Rezultat molekularno-genetskega testiranja je namenjen zdravnikom, ki se ukvarjajo s klinično genetiko ali zdravljenjem onkoloških bolnikov, ali patologom, ki ob odločanju o nadaljnji obravnavi bolnika ali opredelitvi tumorja upoštevajo še druge dejavnike, kot so npr. družinska anamneza, klinična slika, različni histopatološki pokazatelji in drugo.

### Viri:

NOVAKOVIĆ, Srdjan. Kancerogeneza. V: HOČEVAR, Marko (ur.), STROJAN, Primož (ur.). *Onkologija: učbenik za študente medicine*. 1. izd. Ljubljana: Onkološki inštitut: = Institute of Oncology, 2018. Str. 38-57. ISBN 978-961-7029-06-2. <https://www.onko-i.si/ucbenik-onkologija>. [COBISS.SI-ID 2927483]

NOVAKOVIĆ, Srdjan. Molekularna diagnostika. *Novice Europa Donna*. Junij 2019, št. 73, str. 6–8. ISSN 1580-5387. [COBISS.SI-ID 3303547]

## MOJI ZAPISKI

MOJI ZAPISKI

Lined writing area for notes.

