

Přínos masivního paralelního sekvenování pro diagnostiku dědičných forem nádorů ovaria v České republice

Contribution of Massive Parallel Sequencing to Diagnosis of Hereditary Ovarian Cancer in the Czech Republic

Soukupová J.¹, Lhotová K.¹, Zemánková P.¹, Vočka M.², Janatová M.¹, Stolařová L.¹, Borecká M.¹, Kleiblová P.³, Macháčková E.⁴, Foretová L.⁴, Koudová M.⁵, Lhota F.⁵, Tavandzis S.⁶, Zikán M.⁷, Stránecký V.⁸, Veselá K.³, Panczak A.^{3,9}, Kotlas J.³, Kleibl Z.¹

¹ Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK v Praze

² Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

³ Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze

⁴ Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁵ Centrum lékařské genetiky a reprodukční medicíny GENNET, Praha

⁶ Oddělení lékařské genetiky, Laboratoře AGEL, Nový Jičín

⁷ Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a Nemocnice na Bulovce, Praha

⁸ Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF UK a VFN v Praze

⁹ Radioterapeutická a onkologická klinika FN Královské Vinohrady, Praha

Souhrn

Východiska: Karcinom ovaria, závažné nádorové onemocnění s vysokou mortalitou, je v České republice diagnostikováno každým rokem přibližně u 1 000 žen. Riziko vzniku onemocnění je zvýšeno u nosiček mutací v některých nádorových predispozičních genech. S vysokým relativním rizikem (RR > 5) jsou spojeny mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, geny Lynchova syndromu, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*; s možným zvýšením rizika mutace v genech *ATM*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *BARD1*. Cílem práce bylo určit frekvenci mutací v nádorových predispozičních genech v naší populaci. **Metody a výsledky:** Celkem 1 057 pacientek s karcinomem ovaria a 617 nenádorových kontrol bylo vyšetřeno pomocí panelového sekvenování nové generace na platformě Illumina. Patogenní mutace ve vysoko rizikových genech, vč. velkých genomových přestaveb, byly v našem souboru zachyceny u 30,6 % pacientek; u neselektovaných pacientek byla frekvence mutací téměř 25 %, u pacientek s negativní rodinnou anamnézou 18 %. Nejčastěji mutovanými predispozičními geny byly *BRCA1* a *BRCA2*, součet frekvence mutací v ostatních ovariálních predispozičních genech odpovídal frekvenci mutací v genu *BRCA2*. Záchyt mutací u pacientek starších 70 let byl více než třikrát vyšší v porovnání s pacientkami ve věku pod 30 let. **Závěr:** Karcinom ovaria je heterogenní onemocnění s vysokým podílem dědičné formy onemocnění. Vzhledem k nedostatku adekvátních screeningových modalit pro včasnou diagnostiku onemocnění je identifikace nosiček mutací v ovariálních predispozičních genech klíčová, s vysokým potenciálem k celkovému snížení mortality z důvodu karcinomu ovaria.

Klíčová slova

karcinom ovaria – nádorové geny – mutace – masivní paralelní sekvenování – sekvenování nové generace – panel genů

Tato práce byla podpořena grantem AZV 15-27695A, SVV2019/260367, PROGRES Q28/LF1.

This work was supported by grants AZV 15-27695A, SVV2019/260367, PROGRES Q28/LF1.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



RNDr. Jana Soukupová, Ph.D.

Ústav biochemie a experimentální onkologie

1. LF UK v Praze

U Nemocnice 5

128 53 Praha 2

e-mail: jproko@lf1.cuni.cz

Obdrženo/Submitted: 7. 3. 2019

Přijato/Accepted: 24. 4. 2019

doi: 10.14735/amko2019572

Summary

Background: Ovarian cancer is a disease with high mortality. Approximately 1,000 women are diagnosed with ovarian cancer in the Czech Republic annually. Women harboring a mutation in cancer-predisposing genes face an increased risk of tumor development. Mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, and Lynch syndrome genes (*RAD51C*, *RAD51D*, and *STK11*) are associated with a high risk of ovarian cancer, and mutations in *ATM*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, and *BARD1* appear to increase the risk. Our aim was to examine the frequency of mutations in cancer-predisposing genes in the Czech Republic. **Materials and methods:** We analyzed 1,057 individuals including ovarian cancer patients and 617 non-cancer controls using CZEKANCA panel next-generation sequencing on the Illumina platform. Pathogenic mutations in high-risk genes, including CNVs, were detected in 30.6% of patients. The mutation frequency reached 25.0% and 18.2% in subgroups of unselected ovarian cancer patients and patients with a negative family cancer history, respectively. The most frequently mutated genes were *BRCA1* and *BRCA2*. The overall frequency of mutations in non-*BRCA* genes was comparable to that in *BRCA2*. The mutation frequency in ovarian cancer patients aged >70 years was three times higher than that in patients diagnosed before the age of 30. **Conclusion:** Ovarian cancer is a heterogeneous disease with a high proportion of hereditary cases. The lack of efficient screening for early diagnosis emphasizes the importance of identifying carriers of mutations in ovarian cancer-predisposing genes; this is because proper follow-up and prevention strategies can reduce overall ovarian cancer-related mortality.

Key words

ovarian neoplasms – cancer genes – mutation – massively-parallel sequencing – next generation sequencing – gene panel

Úvod

Karcinom ovaria patří mezi závažná nádorová onemocnění žen v ČR. Každým rokem je diagnostikován u přibližně 1 000 žen a zhruba 700 žen tomuto onemocnění podlehe [1]. Incidence ovariálního karcinomu stoupá s věkem a nejvyšší prevalence dosahuje mezi 6. a 7. dekadou. Celoživotní riziko rozvoje ovariálního karcinomu v běžné populaci se u žen pohybuje kolem 1,5 %, avšak je významně zvýšeno u nosiček zárodečných mutací v některých nádorových predispozičních genech.

Dědičná forma karcinomu ovaria představuje přibližně 20 % případů, tedy významně více než u jiných běžných typů nádorů. V současné době jsou proto ke genetickému vyšetření indikovány všechny pacientky s karcinomem ovaria (ale i vejcovodů a primárního peritoneálního karcinomu) bez ohledu na věk. Identifikace mutací predisponujících ke vzniku karcinomu ovaria umožňuje nabídnout nosičkám odpovídající léčebnou strategii a genetické poradenství a je podmínkou cílené preventivní péče o asymptomatické osoby s mutací.

Hlavními genetickými faktory dědičné formy karcinomu ovaria jsou, podobně jako u hereditární formy karcinomu prsu, mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*. Celoživotní riziko rozvoje karcinomu ovaria se pohybuje u nosiček mutací v genu *BRCA1* mezi 35–60 %, u nosiček mutací v *BRCA2* mezi 12–25 % [2,3]. Ačkoliv je klinický význam mutací v *BRCA1/2* vysoký, nevysvětluje všechny případy fa-

miliárních forem onemocnění. Zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria bylo prokázáno i u nosiček mutací v dalších genech kódujících proteiny, které se podobně jako *BRCA1* a *BRCA2* podílejí na reparaci dvouřetězcových zlomů DNA cestou homologní rekombinace. V současné době existují klinická doporučení zohledňující zvýšené riziko vzniku karcinomu ovaria u nosiček mutací v 10 genech (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *EPCAM*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*) a zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu pro 12 genů (*ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*) [4].

V porovnání s četností mutací v genech *BRCA1/2* je frekvence mutací v dalších predispozičních genech výrazně (často řádově) nižší a významně se liší mezi populacemi. Postupná analýza jednotlivých genů je z důvodu značné finanční a časové náročnosti v praxi nepoužitelná. K dramatické změně možností diagnostiky došlo s rozvojem sekvenování nové generace (next generation sequencing – NGS), jež umožnilo vyšetření většího počtu genů v krátké době při příznivých ekonomických nákladech [5].

Pro diagnostické účely identifikace nádorové predispozice jsme zkonstruovali a validovali univerzální panel CZEKANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) [6] pro komplexní, rentabilní a rychlou analýzu germinálních mutací vč. velkých přestaveb v hlavních predispozičních genech, ale i v kandidátních genech asociovaných se zvýšeným rizi-

kem vzniku nejčastějších solidních nádorů v naší populaci [7].

Metody

Pomocí panelu CZEKANCA v1.0, který obsahuje sondy cílící na kódující sekvence 219 genů, jsme analyzovali 1 057 pacientek s karcinomem ovaria. Analýza probíhala v laboratořích Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK v Praze, Masarykova onkologického ústavu v Brně, v laboratořích Gennet v Praze a Agel v Novém Jičíně. Medián věku v době diagnózy byl 52,6 roku (14,8–86,2). Klinické charakteristiky pacientek jsou uvedeny v tab. 1.

Abychom mohli odlišit vzácné patologické a populačně specifické mutace, vyšetřili jsme pomocí stejného panelu genů skupinu 617 zdravých kontrol (jedinci starší 60 let bez osobní a rodinné nádorové anamnézy u přímých příbuzných).

Vzorky genomové DNA izolované z leukocytů periferní krve od pacientů indikovaných ke genetickému vyšetření byly analyzovány podle jednotného protokolu, který zahrnoval i následné bioinformatické zpracování dat [6].

Identifikované zárodečné varianty v genech spojených se syndromem dědičného karcinomu prsu a ovaria byly prioritizovány na základě frekvence výskytu varianty u méně než 1 % vzorků v projektu 1 000 Genomes [8] a současně u méně než 1 % vzorků našich populačních kontrol. Zbývající raritní varianty byly klasifikovány do 5 tříd dle IARC (International Agency for Research on Cancer): 1 – benigní, 2 –

pravděpodobně benigní, 3 – varianta nejasného významu (variant of unknown significance – VUS), 4 – pravděpodobně patogenní, 5 – patogenní. Jako patogenní nebo pravděpodobně patogenní byly dle doporučení ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles) konsorcia [9] označeny varianty vedoucí k předčasnému zkrácení proteinu (nonsense a posunové mutace, velké genomové přestavby, pokud nejsou klasifikovány jinak), mutace postihující konzervativní sestřihová místa a missense mutace klasifikované jako patogenní v databázi ClinVar [10].

V analyzovaném souboru jsme se zaměřili na hodnocení prokazatelně patogenních alterací v genech, ke kterým v současnosti existují klinická doporučení péče o nosičky mutací zohledňující riziko vzniku karcinomu ovaria (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *EPCAM*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*) a prsu (*ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*) [4].

Výsledky

Mutace v genech predisponujících ke vzniku dědičné formy karcinomu ovaria (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *EPCAM*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*)

Patogenní dědičnou mutaci v některém z genů predisponujících ke karcinomu ovaria jsme identifikovali celkem u 323 z 1 057 (30,6 %) analyzovaných patientek s karcinodem ovaria (tab. 2). Nejvíce patogenních mutací jsme zachytili v hlavních predispozičních genech *BRCA1* (210/1 057; 19,9 %) a *BRCA2* (75/1 057; 7,1 %). Mutace v genech způsobujících Lynchův syndrom byly nalezeny u 9 z 1 057 (0,9 %) patientek. Zbývající 3 % nalezených mutací se rovnoměrně rozdělila mezi 29 nosiček mutací v genech *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*. Ve skupině kontrol byly v uvedených genech s prokázanou asociací s karcinodem ovaria zachyceny patogenní mutace pouze u 4 z 617 osob (0,7 %; tab. 2).

Klinické a histopatologické charakteristiky ovlivňující pravděpodobnost výskytu germinálních mutací

S ohledem na osobní onkologickou anamnézu (tab. 3) je nejvyšší pravdě-

Tab. 1. Charakteristika souboru 1 057 patientek s karcinodem ovaria.

	Počet patientek	% ze známých
Věk v době diagnózy		
do 29 let	75	7,2
30–49 let	365	35,2
50–69 let	529	51
> 70 let	68	6,6
není k dispozici	20	
Histologie		
high-grade serózní	375	41,3
serózní, bez určení grade	138	15,2
low-grade serózní	75	8,3
endometrioidní	77	8,5
mucinózní	35	3,9
ze světlých buněk	12	1,3
jiný maligní histologický typ	81	8,9
border-line tumors	121	13,3
není k dispozici	143	
Osobní anamnéza		
pouze karcinom ovaria	817	77,3
karcinom ovaria a prsu	180	17
karcinom ovaria a jiný nádor (mimo karcinom prsu)	60	5,7
Rodinná anamnéza		
bez onkologického onemocnění	495	48,2
karcinom prsu a ovaria v rodině	288	28
karcinom ovaria v rodině	102	9,9
mnohočetný výskyt nádorových onemocnění v rodině	143	13,9
není k dispozici	29	

podobnost výskytu mutací u patientek s duplicitou karcinomu prsu a ovaria, kde mutaci nacházíme u téměř dvou třetin vyšetřovaných (107/180; 59,4 %). U čtvrtiny vyšetřovaných se dědičné mutace vyskytovaly u patientek se solitární diagnózou karcinomu ovaria (203/817; 24,8 %) nebo u patientek, které kromě karcinomu ovaria vyvinuly i jiné nádorové onemocnění (15/60; 25,0 %). Mutace v genech *RAD51C*, *RAD51D* a *BRIP1* převažovaly u patientek s diagnózou so-

litárního ovariálního karcinomu (25/29; 86 %).

Vzhledem k rodinné anamnéze (tab. 3) jsme našli nejvyšší procento mutací u patientek z rodin, ve kterých se vyskytoval pouze karcinom ovaria (55/102; 53,9 %), přičemž mutace téměř výhradně postihovaly geny *BRCA1* (43/55; 78 %) a *BRCA2* (10/55; 18 %). Vysoký výskyt mutací v predispozičních genech jsme zaznamenali i u patientek s rodinným výskytem karcinomu ovaria a prsu

Tab. 2. Frekvence patogenních mutací v genech jasně predisponujících ke vzniku dědičné formy karcinomu ovaria.

	Pacientky; n = 1 057 n (%)	Kontroly; n = 617 n (%)	p
<i>BRCA1</i>	210 (19,9 %)	0	$2,2 \times 10^{-16}$
<i>BRCA2</i>	75 (7,1 %)	4 (0,6 %)	$2,8 \times 10^{-11}$
<i>RAD51C</i>	11 (1,0 %)	0	0,009
<i>BRIP1</i>	9 (0,9 %)	0	0,031
<i>RAD51D</i>	9 (0,9 %)	0	0,031
<i>MLH1</i>	5 (0,5 %)	0	0,031
<i>MSH2</i>	2 (0,2 %)	0	
<i>MSH6</i>	2 (0,2 %)	0	
celkem	323 (30,6 %)	4 (0,6 %)	$2,2 \times 10^{-16}$

(129/288; 44,8 %) a u pacientek s rodinným výskytem karcinomu ovaria a dalších typů nádorů (45/143; 31,5 %). Mutace však byla zachycena i u 18,2 % pacientek s negativní rodinnou anamnézou (90/495), což ve výsledku znamená, že tato skupina zahrnovala více než čtvrtinu nosiček patogenních mutací (90/323; 27,9 %).

Zastoupení histologických typů ovariálních tumorů u nosiček mutací v predispozičních genech ukazuje, že serózní nádory tvoří přibližně dvě třetiny ovariálních karcinomů ve skupinách nosiček s mutacemi v genech predisponujících ke vzniku hereditárního karcinomu ovaria (graf 1). Výjimkou byla malá skupina devíti nosiček mutací v genech Lynchova syndromu, ve které jsme za-

Tab. 3. Výskyt germinálních mutací v genech predisponujících ke vzniku karcinomu ovaria v závislosti na klinických a histopatologických charakteristikách.

	<i>BRCA1</i> (%)	<i>BRCA2</i> (%)	<i>BRIP1,</i> <i>RAD51C,</i> <i>RAD51D</i> (%)	<i>MLH1,</i> <i>MSH2,</i> <i>MSH6</i> (%)	Celkem (%)
Dle osobní anamnézy					
pouze karcinom ovaria (n = 817)	132 (16,2)	43 (5,3)	25 (3,1)	3 (0,4)	203 (24,8)
karcinom prsu a ovaria (n = 180)	72 (40,0)	29 (16,1)	3 (1,7)	3 (0,6)	107 (59,4)
karcinom ovaria a jiný nádor mimo karcinom prsu (n = 60)	6 (10,0)	3 (5,0)	1 (1,7)	5 (8,3)	15 (25,0)
Dle rodinné anamnézy					
pouze karcinom ovaria v rodině (n = 102)	43 (42,2)	10 (9,8)	0	2 (2,0)	55 (53,9)
karcinom prsu a ovaria v rodině (n = 288)	86 (29,9)	33 (11,5)	8 (2,8)	2 (0,7)	129 (44,8)
karcinom ovaria a jiný nádor mimo karcinom prsu v rodině (n = 143)	31 (21,7)	11 (7,8)	1 (0,7)	2 (1,4)	45 (31,5)
bez rodinné anamnézy (n = 495)	48 (9,7)	21 (4,2)	18 (3,6)	3 (0,6)	90 (18,2)
není k dispozici (n = 29)	2	0	2	0	4
Dle histologického typu					
high-grade serózní (n = 357)	88 (23,5)	35 (9,3)	12 (3,2)	3 (0,8)	150 (40,0)
serózní bez specifikovaného grade (n = 138)	35 (25,4)	8 (5,8)	5 (3,6)	0	50 (36,2)
low-grade serózní (n = 75)	9 (12,0)	3 (4,0)	1 (1,3)	0	13 (17,3)
endometrioidní (n = 77)	14 (18,2)	2 (2,6)	4 (5,2)	2 (2,6)	26 (36,4)
mucinózní (n = 38)	3 (8,6)	2 (5,7)	0	0	7 (20,0)
ze světlých buněk (n = 12)	1 (8,3)	0	0	1 (8,3)	2 (16,7)
jiný maligní histologický typ (n = 81)	2 (2,5)	1 (1,2)	1 (1,2)	1 (1,2)	9 (11,1)
border-line tumors (n = 121)	34 (28,1)	7 (5,8)	3 (2,5)	0	47 (38,8)
není k dispozici (n = 143)	24 (16,8)	17 (14,0)	3 (2,5)	2 (1,4)	53 (37,1)

znamenal vyšší zastoupení endometroidních nádorů a nádorů ze světlých buněk.

Nejnižší průměrný věk v době diagnózy karcinomu ovaria byl u nosiček vzácných mutací v genu *MSH2* (42,2 roku), následovaly geny *RAD51C* (49,2 roku), *MLH1* (49,9 roku), *BRCA1* (50,3 roku), *RAD51D* (53,9 roku), *BRIP1* (54,4 roku), *BRCA2* (57,6 roku) a *MSH6* (62,0 roku). Výskyt patogenních mutací v uvedených genech byl překvapivě více než trojnásobný u pacientek starších 70 let (14/68; 21,0 %) v porovnání s pacientkami mladšími 30 let (4/75; 6,7 %; $p = 0,01$).

Mutace v genech predisponujících ke vzniku dědičné formy karcinomu prsu (*ATM, BARD1, CHEK2, NBN, PALB2*)

V dalších genech, jejichž mutace jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu a kde bychom mohli předpokládat rovněž zvýšení rizika rozvoje karcinomu ovaria, jsme zachytili patogenní mutace celkem u 36/1 057 (3,4 %) pacientek a 7/617 (1,1 %) kontrol (celkem $p = 0,0037$; tab. 4).

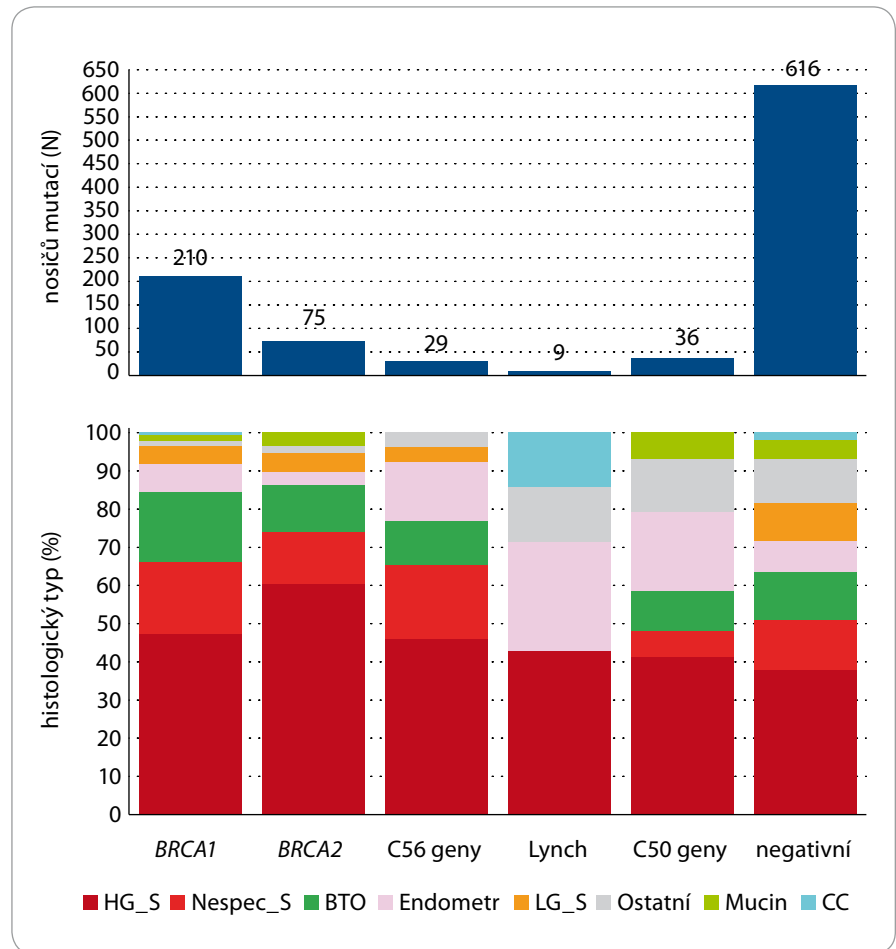
Nejvyšší frekvence mutací v těchto genech jsme našli ve skupině pacientek s diagnózou karcinomu prsu a ovaria v osobní anamnéze (11/180; 6,1 %) a u pacientek z rodin s výskytem pouze karcinomu ovaria (6/102; 5,9 %) (tab. 3). Nejnižší věk v době diagnózy karcinomu ovaria byl u pacientek s mutacemi v genu *CHEK2* (41,8 roku), následován geny *ATM* (49,6 roku), *NBN* (51,1 roku), *BARD1* (54,7 roku) a *PALB2* (61,4 roku).

V dalších genech spojených se syndromem dědičného karcinomu prsu a ovaria – *NF1, PTEN, STK11, TP53, CDH1* – jsme v našem souboru nezachytili žádnou patogenní alteraci.

Více než jedna patogenní mutace v genech spojených se syndromem dědičného karcinomu prsu a ovaria byla nalezena u 7 pacientek (0,66 %, což zahrnovalo heterozygotní nosičky mutací v *BRCA1* a *BRCA2* (2×), *BRCA1* a *NBN* (2×), *BRCA1* a *CHEK2*, *BRCA1* a *ATM*, *BRCA1* a *MLH1*).

Diskuze a závěr

Rozvoj NGS umožňuje paralelní analýzu germinálních mutací řady nádorových



Graf 1. Zastoupení histologických typů u nosiček mutací v predispozičních genech.

Tab. 4. Záchyt mutací v genech predisponujících ke karcinomu prsu.

	Pacientky n = 1 057 (%)	Kontroly n = 617 (%)	
<i>NBN</i>	13 (1,2)	2 (0,3)	
<i>CHEK2</i>	8 (0,8)	1 (0,2)	
<i>PALB2</i>	6 (0,6)	2 (0,3)	
<i>BARD1</i>	5 (0,5)	0	
<i>ATM</i>	4 (0,4)	2 (0,3)	
celkem	36 (3,4)	7 (1,1)	$p = 0,0037$

predispozičních genů. U karcinomu ovaria jsou s prokázaným vysokým rizikem onemocnění (relativní riziko (RR) > 5) v současné době spojeny mutace v genech *BRCA1, BRCA2, BRIP1, RAD51C, RAD51D, STK11, MSH2* a *MLH1*. Analýza může být provedena zároveň u několika desítek pacientů, což vede ke zrychlení diagnostického procesu. Vyšetření roz-

sáhlých populací indikovaných pacientů umožňuje získat dostatečné informace o frekvenci výskytu příčinných mutací v populaci, které jsou nezbytným předpokladem k postupnému zpřesňování rizik spojených se vznikem dědičných nádorů u nosičů mutací v nádorových predispozičních genech. Výskyt mutací v některých nově identifikovaných pre-

dispozičních genech (*BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D* a genu Lynchova syndromu) je však velmi vzácný a k vyhodnocení jejich podílu na vzniku karcinomu ovaria je nezbytná spolupráce diagnostických týmů v ČR i zahraničí. Na základě takto získaných poznatků se dynamicky vyvíjejí nejen indikační kritéria ke genetickému vyšetření, ale i klinická doporučení péče o nosiče patogenních mutací [11].

Z provedených analýz u pacientek s ovariálním karcinomem v ČR vyplývá, že mezi nosiči příčinných mutací v genech s jasně prokázanou asociací se zvýšeným rizikem vzniku ovariálního karcinomu dominují nosičky mutací *BRCA1* a *BRCA2* (88 %). Zbývajících nezanedbatelných 12 % případů v naší populaci představují nosičky mutací v dalších ovariálních predispozičních genech (*BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D* a genu Lynchova syndromu). Z výsledků naší analýzy vyplývají určitá populační specifika v zastoupení mutací v těchto nových predispozičních genech v ČR. Zatímco v naší populaci bylo zastoupení mutací v těchto genech rovnoměrné, práce Norquista et al (USA) popisuje dvojnásobnou frekvenci mutací v genu *BRIP1* (26/1 915; 1,3 %) v porovnání s četností mutací v genech *RAD51C* a *RAD51D* (každý 11/1 915; 0,6 %) [12]. V německé populaci byla popsána frekvence mutací v genu *BRIP1* u pacientek s karcinomem ovaria dokonce 2,6 %, přestože v této studii nebyly hodnoceny velké genomové přestavby [13]. Ve skupině genů spojených s Lynchovým syndromem jsme nejvíce mutací našli v genu *MLH1* (gen *PMS2* nebyl vyšetřován), podobně jako je tomu u pacientů s kolorektálním karcinomem, zatímco v některých pracích jsou u pacientek s karcinomem ovaria popisovány mutace především v genu *MSH6* a *PMS2* [12]. Porovnání výsledků našich analýz s výsledky zahraničních studií však komplikuje skutečnost, že některé studie neanalyzují přítomnost velkých genomových přestaveb v zárodečném genomu, protože jejich identifikace pomocí NGS může být obtížná. V naší práci jsme tyto důležité (a v případě delecí v naprosté většině i patogenní) genetické aberace potvrdili z vyšetření CZECANCA panelem, který byl optimalizován na detekci velkých přestaveb [6],

u 3,1 % (33/1 057) pacientek, a to v genech *BRCA1* (22), *BRIP1* (4), *MLH1* (2), *CHEK2* (4) a *PALB2* (1). V genu *BRIP1* představovaly rozsáhlé delece dokonce polovinu všech nalezených mutací. Četnost velkých genomových přestaveb ukazuje, že jejich analýza musí být nepostradatelnou součástí genetického testování nádorových predispozičních genů.

Podíl alterací v dalších kandidátních predispozičních genech s možným podílem na vzniku karcinomu ovaria (*ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*) je srovnatelný s celkovou frekvencí mutací v genech *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D* a genu Lynchova syndromu.

Záchyt sedmi vícenásobných nosičů patogenních variant v našem souboru ukazuje důležitost genetické konzultace a v indikovaných případech opodstatňuje nové testování pacientek pomocí NGS (u probandů z rodin se závažnou rodinnou onkologickou anamnézou či u pacientek s nádorovými multiplicitami negativně testovaných dříve použitými metodami). Genetická konzultace a následné vyšetření hlavních predispozičních genů jsou indikovány dle současných kritérií pro každou pacientku s karcinomem ovaria, bez ohledu na věk, osobní či rodinnou anamnézu či histologický typ nádoru. Toto doporučení podporují i výsledky naší práce, která analyzuje 1 057 pacientek s karcinomem ovaria, což přibližně odpovídá roční incidenci tohoto onemocnění v ČR (998 případů v roce 2016). Patogenní mutace v genech s jasným klinickým významem pro karcinom ovaria jsme zachytili u 323/1 057 (30,6 %) vyšetřovaných pacientek. Srovnatelnou frekvenci mutací (24 %) popsal Walsh et al [14], avšak v některých studiích byla nalezená frekvence mutací v ovariálních predispozičních genech značně nižší (např. Carter et al 13 %) [15]. Rozdíly ve frekvenci mutací u pacientek s karcinomem ovaria mezi jednotlivými pracemi ilustrují nejen odlišnosti ve výskytu patogenních mutací mezi populacemi, ale i ve výběru analyzovaných pacientek, vyšetřovaných predispozičních genů či typu hodnocených mutací. Naš soubor byl obohacen o mladé pacientky a pacientky s pozitivní rodinnou anamnézou. Zatímco frekvence mutací u nemocných

před rokem 2010 přesahovala 40 %, po rozšíření indikačních kritérií v roce 2015 [16–19] bylo u 334 pacientek analyzovaných na 1. LF UK zachyceno 83 nosiček mutací (25 %). U neselektovaných, prospektivně testovaných vzorků analyzovaných ve spolupracujících laboratořích zahrnutých v našem souboru pacientek byly zachyceny patogenní mutace u 33/156 (21,2 %) nemocných. Lze tedy obecně konstatovat, že přibližně každá čtvrtá pacientka s karcinomem ovaria v naší populaci je nosičkou patogenní mutace v klinicky významném genu s prokázaným vysokým rizikem vzniku ovariálního karcinomu. U pacientek s negativní rodinnou anamnézou je to přibližně každá pátá. Vysoký podíl pacientek s karcinomem ovaria s hereditární formou onemocnění se do budoucna díky identifikaci mutací v dalších genech s predispozicí ke karcinomem ovaria patrně ještě mírně zvýší. Frekvence mutací je u pacientek starších 70 let více než třikrát vyšší v porovnání s velmi mladými pacientkami (s diagnózou ve věku pod 30 let). Nižší frekvenci patogenních mutací u velmi mladých pacientek lze částečně vysvětlit vyšším zastoupením histologických typů, především low-grade serózních a mucinózních karcinomů, pro které je typická nižší frekvence mutací v predisponujících genech, zatímco u pacientek starších 70 let převažovaly high-grade serózní karcinomy. Přesto byla nízká frekvence mutací ve sledovaných predispozičních genech u velmi mladých pacientek překvapivá a ukazuje na možnou úlohu dalších genů při vzniku onemocnění.

Vzhledem k omezeným možnostem časné diagnostiky karcinomu ovaria je pro nosičky mutací v genech spojených s vysokým rizikem onemocnění (RR > 5) doporučena preventivní salpingooforektomie (risk-reducing salpingo-ophorectomy – RRSO). RRSO je spojena s řadou vedlejších účinků, proto je nutné její vhodné načasování, které se odvíjí od průměrného věku v době diagnózy u nosiček mutací či podle věku onemocnění v rodině (tab. 5). S ohledem na frekvenci mutací v genech vysokého rizika u pacientek s ovariálním karcinomem v ČR může racionální indikace RRSO přispět ke snížení mortality z důvodu karcinomu ovaria v ČR.

Serózní adenokarcinomy představují 60–80 % ze všech histopatologických typů ovariálních tumorů [20]. V našem souboru jsme high-grade serózní karcinom ovaria našli u dvou třetin pacientek s identifikovanou zárodečnou mutací v některém z ovariálních predispozičních genů, s výjimkou genů Lynchova syndromu. Frekvence mutací u žen s nádory jiného histologického typu však byla také významná a opodstatňuje genetické testování bez ohledu na histologický typ nádoru.

Se vzrůstajícím množstvím poznatků o nádorové predispozici se rozšiřuje spektrum klinicky relevantních genů. Použití větších panelů genů v rutinní diagnostické praxi umožňuje nejen pružně reagovat na rostoucí požadavky onkologů a klinických genetických, ale v případě rozšíření počtu genů s klinickou utilitou umožňuje vyhodnotit tyto geny zpětně bez nutnosti nového sekvenování, a tedy dodatečných finančních nákladů. Identifikace hereditárních alterací v genech *BRCA1* a *BRCA2* (a pravděpodobně i dalších predispozičních genech, jejichž proteinové produkty se spolupodílejí na reparaci genomové DNA) umožňuje využít genetické analýzy jako prognostického ukazatele pro konvenční chemoterapii (genotoxickými chemoterapeutiky) i cílenou a specifickou léčbu (PARP inhibitory) [21].

Literatura

- uzis.cz. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [online]. Dostupný z <http://www.uzis.cz>.
- Pennington KP, Swisher EM. Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol* 2012; 124(2): 347–353. doi: 10.1016/j.jgyn.2011.12.415.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72(5): 1117–1130. doi: 10.1086/375033.
- nccn.org. National Comprehensive Cancer Network; version 3.2019. [online]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf.
- Soukupová J. Úskalí interpretace sekvenčních dat v diagnostice dědičných nádorových syndromů. *Labor Aktuell* 2016; 20(4): 4.
- Soukupová J, Zemánková P, Lhotová K et al. Validation of CZECA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One* 2018; 13(4): e0195761. doi: 10.1371/journal.pone.0195761.

Tab. 5. Existující doporučení péče o nosičky patogenních mutací v genech predisponujících ke karcinomu ovaria [4].

Gen	Riziko vzniku karcinomu ovaria**	Doporučení RRSO
<i>ATM</i> *	?	dle RA
<i>BRCA1</i>	35–60 %	RRSO (35–40let)
<i>BRCA2</i> *	12–25 %	RRSO (40–45let)
<i>BRIP1</i> *	10–15 %	RRSO (45–50let)
<i>BARD1</i>	?	dle RA
<i>CHEK2</i>	?	dle RA
<i>MSH2</i>	15–24 % do 70 let	dle RA
<i>MLH1</i>	11–20 % do 70 let	dle RA
<i>MSH6</i>	?	dle RA
<i>PMS2</i> *	?	dle RA
<i>EPCAM</i>	?	dle RA
<i>NBN</i> *	?	dle RA
<i>PALB2</i> *	?	dle RA
<i>RAD51C</i> *	10–15 %	RRSO (45–50let)
<i>RAD51D</i>	10–15 %	RRSO (45–50let)
<i>STK11</i>	18–21 %	dle RA

*AR sy, **populační riziko 1,3 %

RRSO – riziko redukcující salpingooforektomie, RA – rodinná anamnéza

- Soukupová J, Zemánková P, Kleiblová P et al. CZECA: CZEch CAncer paNel for Clinical Application – návrh a příprava cíleného sekvenčního panelu pro identifikaci nádorové predispozice u rizikových osob v České republice. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): S46–S54. doi: 10.14735/amko2016S46.
- internationalgenome.org. The 1000 Genomes Browser. [online]. Available from: <http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers>.
- enigmaconsortium.org. ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles). [online]. Available from: <https://enigmaconsortium.org/>.
- ncbi.nlm.nih.gov. ClinVar. [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
- Nielsen SM, Eccles DM, Romero IL et al. Genetic testing and clinical management practices for variants in non-*BRCA1/2* breast (and breast/ovarian) cancer susceptibility genes: an international survey by the Evidence-Based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA) clinical working group. *J Clin Oncol* 2018; 36(2): 1–42.
- Norquist BM, Harrel MI, Brady MF et al. Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncol* 2016; 2(4): 482–90. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5495.
- Weber-Lassalle N, Hauke J, Ramser J et al. *BRIP1* loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res* 2018; 20(1): 7. doi: 10.1186/s13058-018-0935-9.
- Walsh T, Casadei S, Lee MK et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal car-

- cinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(44): 18032–18037. doi: 10.1073/pnas.1115052108.
- Carter NJ, Marshall ML, Susswein LR et al. Germline pathogenic variants identified in women with ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2018; 151(3): 481–488. doi: 10.1016/j.jgyn.2018.09.030.
- Foretová L, Macháčková E, Palácová M et al. Doporučení rozšíření indikačních kritérií ke genetickému testování mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* u hereditárního syndromu nádorů prsu a ovarií. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): S9–S13. doi: 10.14735/amko2016S9.
- Plevová P, Novotný J, Petráková K et al. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií. *Klin onkol* 2009; 22 (Suppl 1): S8–S11.
- Petráková K, Palácová M, Schneiderová M et al. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): S14–S21. doi: 10.14735/amko2016S14.
- Zikán M. Gynekologická prevence a gynekologické aspekty péče u nosiček mutací genů *BRCA1* a *BRCA2*. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): S22–S30. doi: 10.14735/amko2016S22.
- Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol* 2008; 26(32): 5284–93. doi: 10.1200/JCO.2008.18.1107.
- Morgan RD, Clamp AR, Evans DG et al. PARP inhibitors in platinum-sensitive high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018; 81(4): 647–658. doi: 10.1007/s00280-018-3532-9.