

Odmiany genów związanych z rakiem piersi o nieznanym znaczeniu i ich rzeczywista rola w praktyce klinicznej. Część pierwsza: zalecenia z perspektywy genetyki klinicznej

Susan Miller-Samuel, RN, MSN, Deborah J. MacDonald, PhD, Jeffrey N. Weitzel, MD, Ferdy Santiago, MD, Martin A. Martino, MD, Tara Namey, MS, CGC, AnnMarie Augustyn, MS, CGC, Rebecca Mueller, BA, Andrea Forman, MS, CGC, Angela R. Bradbury, MD, Gloria J. Morris, MD, PhD

Semin Oncol 2011, 38: 469-480.

Większości chorych na raka piersi nie poznano w pełni przyczyny powstania tego nowotworu. Wiadomo natomiast, że u osób obciążonych zwiększonym ryzykiem zachorowania na niektóre nowotwory może być wskazane przeprowadzenie badań genetycznych w celu ustalenia, czy są one nosicielami mutacji genowych. *BRCA1* i *BRCA2* są genami supresorowymi nowotworu, cechującymi się silną penetracją. Występowanie szkodliwej mutacji linii zarodkowej w jednym z nich stwarza ryzyko zachorowania na raka piersi i raka jajnika, zwiększa też zagrożenie rozwojem innych nowotworów złośliwych, m.in. raka trzustki, raka gruczołu krokowego lub raka piersi u mężczyźni. Dodatni wynik badania genetycznego to niezwykle ważna informacja dla chorych, ich rodzin oraz lekarzy zalecających postępowanie. Inne związane z rakiem piersi geny o silnej penetracji to m.in. gen *PTEN* (choroba Cowdena) i gen *TP53* (zespół Li-Fraumeni, Li-Fraumeni syndrome, LFS). Opracowano testy pozwalające na wykrycie tych zaburzeń genetycznych. Zrozumienie przyczyn występowania określonych nowotworów ułatwia sprawowanie nadzoru nad osobami zagrożonymi zachorowaniem dzięki częstszemu poddawaniu ich badaniom przesiewowym i proponowaniu im profilaktycznego leczenia chirurgicznego.

Jak jednak postąpić, gdy wyniki testów genetycznych nie są jednoznaczne? Nie odpowiadają one wówczas na pytanie, lecz obarczają praktykujących lekarzy dręczącymi pytaniami, na które brak odpowiedzi. Niepewne wyniki testu genetycznego określa się zwykle mianem wariantów o niepewnym znaczeniu (variant of uncertain significance, VUS). Uzyskanie ich wprowadza zamęt i wzbudza dodatkowy niepokój osób zagrożonych i ich rodzin, nasuwa też wiele wątpliwości lekarzowi odpowiedzialnemu za podejmowanie decyzji o dalszym postępowaniu. Zaleca się wprawdzie, by lekarze nie podejmowali ich na podstawie VUS, nie wiadomo jednak, jak jest w praktyce klinicznej. Czasem trudno zignorować wyniki VUS, zwłaszcza u osób z obciążającym wywiadem chorobowym lub rodzinnym, przemawiającym za możliwością występowania uszkadzających mutacji genowych. Po uzyskaniu VUS należy powiedzieć chorej o wykryciu pewnych zmian w przeprowadzonym u niej teście genetycznym, których znaczenie jest niejasne, ponieważ uzyskanego wyniku nie uznano jeszcze za przyczynę szkodliwego wpływu na czynność białka kodowanego przez dany gen ani za zmianę niemającą takiego wpływu. *BRCA1* i *BRCA2* są

Dr Miller-Samuel,
APNG Advanced Practice Nurse
in Genetics, Thomas Jefferson
University Hospital, Jefferson
Breast Care Center, Filadelfia, PA,
Stany Zjednoczone.

Dr MacDonald,
Assistant Professor,
Division of Clinical Cancer Genetics,
Department of Population Sciences,
City of Hope,
National Cancer Center, Duarte, CA,
Stany Zjednoczone.

Dr Weitzel,
Professor and Chief,
Division of Clinical Cancer Genetics,
Department of Population Sciences,
City of Hope, National Cancer
Center, Duarte, CA,
Stany Zjednoczone.

Dr Santiago,
Department of Medical Oncology,
LeHigh Valley Cancer Center,
Allentown, PA,
Stany Zjednoczone.

Dr Martino,

Department of Gynecologic,
Oncology, Director,
Robotic Surgery, LeHigh Valley
Cancer Center, Allentown, PA,
Stany Zjednoczone.

Dr Namey,

Department of Clinical Genetics,
LeHigh Valley Cancer Center,
Allentown, PA,
Stany Zjednoczone.

Dr Augustyn,

Department of Clinical Genetics,
LeHigh Valley Cancer Center,
Allentown, PA,
Stany Zjednoczone.

Dr Mueller,

Arcadia University, Filadelfia, PA,
Stany Zjednoczone.

Dr Forman,

Department of Clinical Genetics,
Fox Chase Cancer Center,
Filadelfia, PA,
Stany Zjednoczone.

Dr Bradbury,

Department of Clinical Genetics,
Fox Chase Cancer Center,
Filadelfia, PA,
Stany Zjednoczone.

Dr Morris,

Attending Physician
Hematology and Oncology,
Associates of Northeastern PA,
PC Director, Family Risk Assessment
Program, Dunmore, PA,
Assistant Professor of Medicine,
Commonwealth Medical College,
Scranton, PA,
Stany Zjednoczone,
Feature Editor, Current Clinical
Practice, Seminars in Oncology.

Adres do korespondencji:

Gloria J. Morris, MD, PhD,
Editor, Current Clinical Practice,
Hematology and Oncology
Associates of Northeastern PA, PC,
1100 Meade St, Dunmore,
PA 18512, USA;
e-mail: dr.gjmorris@gmail.com

dużymi i ważnymi genami supresorowymi nowotworu, dlatego znajomość stanu czynnościowego kodowanych przez nie białek jest tak ważna. W rzeczywistości jednak uzyskanie VUS nie informuje o tym stanie.

Przedstawienie opinii ekspertów o postępowaniu po uzyskaniu VUS poprzedzi krótkie omówienie wyników trzech kategorii testów genetycznych: dodatniego, ujemnego i VUS, które może się okazać przydatne dla praktykujących lekarzy o specjalnościach z pogranicza klinicznej genetyki nowotworów.

POTWIERDZENIE MUTACJI *BRCA1* LUB *BRCA2*

Po uzyskaniu dodatnich wyników testu, potwierdzających występowanie mutacji uszkadzających *BRCA1* lub *BRCA2*, sytuacja staje się jasna, wiadomo bowiem, że mutacje tych silnie penetrujących genów supresorowych nowotworu wybitnie sprzyjają rozwojowi pewnych nowotworów. Wykrycie mutacji zarodkowej *BRCA1* lub *BRCA2* w rzeczywistości odpowiada zagrożeniu powstaniem określonego nowotworu. Badaniom genetycznym należy wówczas poddać bliskich członków rodziny takiej chorej, by ustalić u nich stan nosicielstwa mutacji.

Mutacja uszkadzająca zmienia czynność białka kodowanego przez dany gen. Zgodnie z hipotezą dwóch uderzeń, jej obecność wyjaśnia występowanie u niektórych osób silnych predyspozycji do rozwoju określonych nowotworów, które często są rozpoznawane u nich w młodszym wieku (<50 lat) niż typowy dla większości chorujących na nie dorosłych. Dodatnie wyniki testów genetycznych mają decydujące znaczenie, ułatwiają bowiem wybór dalszego postępowania. Ułatwieniu tego wyboru służą wytyczne National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Należy też uwzględnić fenotypowe cechy danej rodziny.

Krewni niebędący nosicielami znanej mutacji nie muszą się poddawać agresywnym badaniom przesiewowym, narażającym na wzbudzenie niepokoju, ponoszenie kosztów i dodatkowe problemy wynikające z uzyskania wyników fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich. Wykrycie mutacji w obrębie genu *BRCA1* lub *BRCA2* pozwala lekarzowi na zalecenie dalszego postępowania opartego na dowodach naukowych.

Wykrycie mutacji genów *PTEN* lub *TP53* jest zwykle wskazaniem dla lekarzy doświadczonych w postępowaniu z osobami zagrożonymi wystąpieniem dziedzicznych zespołów rodzinnych do podejmowania działań zgodnie z wytycznymi NCCN. Po wykazaniu mutacji w którymkolwiek z silnie penetrujących genów związanych z nowotworami ważną rolę odgrywa interpretacja fenotypów występujących w danej rodzinie.

WYKLUCZENIE MUTACJI *BRCA1* I *BRCA2*

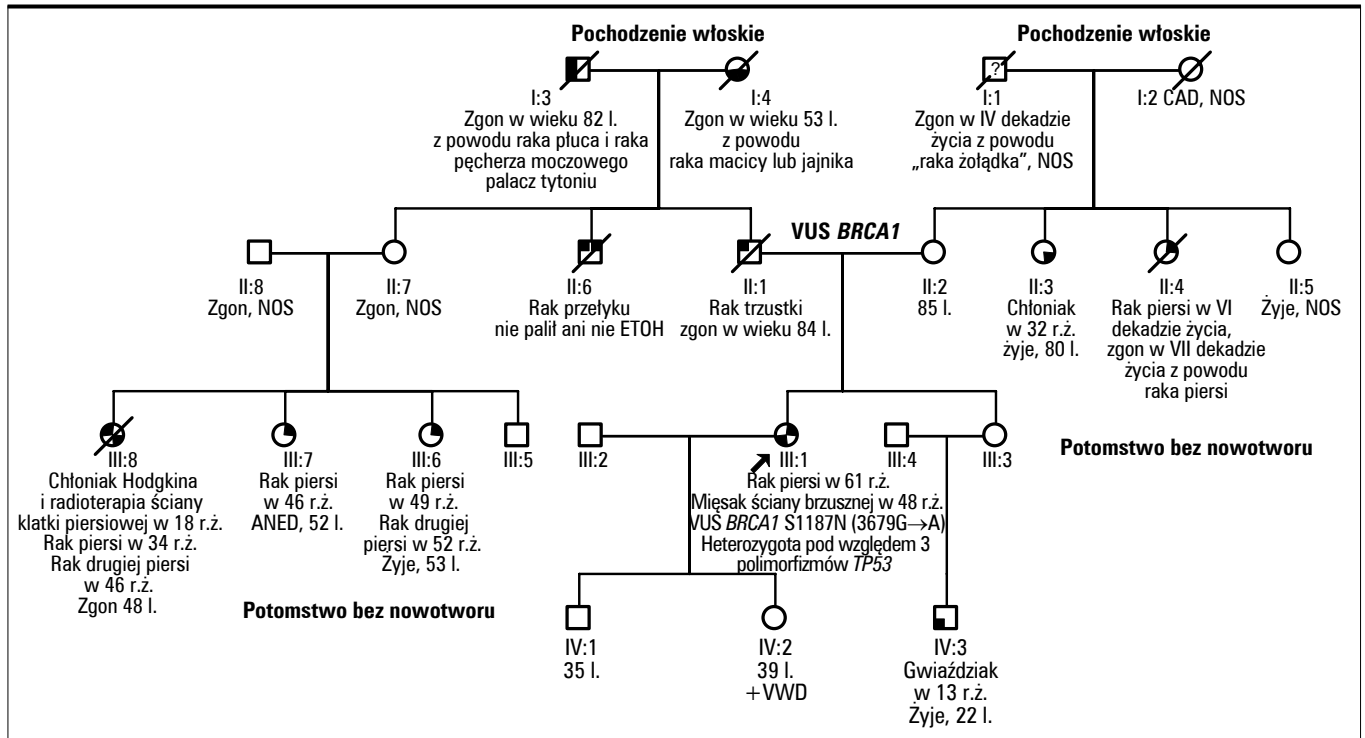
Ujemne wyniki testów genetycznych oceniających mutacje *BRCA1* i *BRCA2* są w pełni wiarygodne tylko wtedy, gdy taką mutację wykryto u bliskiego krewnego. W innych sytuacjach interpretacja ujemnego wyniku testu wymaga zachowania ostrożności, zwłaszcza jeśli u osoby badanej lub wśród jej krewnych rozpoznano nowotwór złośliwy. Powody uzasadniające przyjęcie takiej postawy są następujące:

- w ocenianych genach nadal może występować mutacja, na wykrycie której nie pozwalają dostępne obecnie metody,
- nowotwór może się rozwinąć w następstwie mutacji lub wielu zmian polimorficznych w innym genie albo zespole genów, których wyraźnie nie zidentyfikowano lub
- rak może się rozwinąć sporadycznie i nie jest dziedziczny.

WARIANT O NIEZNANYM ZNACZENIU KLINICZNYM

Warianty o niepewnym znaczeniu (VUS) są wykrywane u około 12-13% osób badanych w kierunku mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*.¹ Możliwość ich wystąpienia należy starannie omówić

RYCINA 1



Przypadek 1. Drzewo genealogiczne pierwszej chorej, przedstawiające krewnych pierwszego, drugiego, trzeciego i czwartego pokolenia, wygenerowane za pomocą programu Cyrillic (www.cyrillicsoftware.com). Wykorzystano standardowe symbole, zgodnie z NCCN Guidelines, wersja 2.2011, High Risk Syndromes.⁴⁵

NOS – bliżej nieokreślony, CAD – zgon z powodu nowotworu, ETOH – nadużywanie alkoholu, ANED – żyjący bez objawów nowotworu, VUS – wariant o niepewnym znaczeniu.

z chorą. Powinien to zrobić doświadczony genetyk podczas konsultacji poprzedzającej decyzję kobiety o poddaniu się takiemu badaniu. Podkreśla to znaczenie pełnej konsultacji genetycznej przez doświadczonego specjalistę.¹⁻⁸

Wyjaśnienie chorej i jej rodzinie informacji określonych mianem VUS może sprawić lekarzowi trudność. Taki wynik oznacza wykrycie pewnych zmian, których znaczenie dla zwiększenia ryzyka zachorowania na dziedziczny nowotwór trudno określić. Klasyfikację VUS stwierdzonych w *BRCA1* i *BRCA2* zmienia się na rzadko występujące mutacje uszkadzające lub nieszkodliwy polimorfizm. Czas, w jakim następuje taka zmiana klasyfikacji, sięga jednak od 10 dni do 10 lat.

Zastrzeżenia budzi też postępowanie z członkami rodziny osoby, u której wykryto VUS. W laboratorium wykonującym testy genetyczne *BRCA* można wprowadzić bezpłatnie zbadać niektórych innych krewnych takiej osoby, dotyczy to jednak zwykle tylko rodziców lub innych krewnych, u których wcześniej rozpoznano nowotwór, a spodziewany czas ich przeżycia jest krótki. Większość towarzystw ubezpieczeniowych nie pokrywa kosztów badań wykonywanych z powodu VUS, ale

u niektórych krewnych przeprowadzenie takich badań jest nadal bardzo wskazane, nawet jeśli musieliby za nie zapłacić. Uświadomienie członkom rodziny braku korzyści i potencjalnych zagrożeń wynikających z uzyskania VUS zajmuje czas i może doprowadzić krewnych do rezygnacji z poddawania się dalszym badaniom. W takiej sytuacji to lekarz powinien zdecydować o wykonaniu badań przez członków rodziny lub stanowczo im to odradzić. Wówczas krewni skłaniający się ku wykonaniu testów mogą zasięgnąć opinii kolejnego specjalisty pracującego w innym ośrodku badań genetycznych. Między członkami rodziny a lekarzem rodzi się konflikt, który w końcu może naruszyć ich relacje.

Zagadka kliniczna nr 1: Postępowanie w sytuacji ryzyka rozwoju raka piersi u chorej i jej krewnych z VUS w *BRCA*.

Zagadka kliniczna nr 2: Postępowanie w sytuacji ryzyka wystąpienia raka jajnika u chorej i jej krewnych z VUS w *BRCA*.

Zagadka kliniczna nr 3: Badania przesiewowe w kierunku raka trzustki u chorej i jej krewnych z VUS w *BRCA*.

Zagadka kliniczna nr 4: Postępowanie w sytuacji ryzyka wystąpienia raka gruczołu krokowego w krewnych chorej z VUS w BRCA.

Zagadka kliniczna nr 5: Postępowanie w sytuacji ryzyka wystąpienia innych typów nowotworów u chorej i jej krewnych z VUS w BRCA.

PRZYPADEK 1: VUS W BRCA1

Probantką jest 62-letnia kobieta rasy białej pochodzenia włoskiego, u której rozpoznano inwazyjnego przewodowego raka jednej piersi i raka przewodowego *in situ* (ductal carcinoma *in situ*, DCIS). Kobieta miała wówczas 61 lat. W badaniu immunohistochemicznym w obrębie inwazyjnego raka piersi wykazano ekspresję receptorów estrogenowych (estrogen receptor, ER) i progesteronowych (progesterone receptor, PR) oraz brak ekspresji receptorów dla HER2.

Chora przeżyła operację, chemioterapię i radioterapię z powodu mięsaka ściany brzucha, którego rozpoznano, gdy miała 48 lat. W wieku 40 lat przeżyła doszczętną histerektomię z obustronnym usunięciem przydatków z powodu mięśniaków macicy.

Wywiad rodzinny w kierunku chorób nowotworowych jest dość niezwykły (ryc. 1). U ojca chorej, namiętnego palacza tytoniu, rozpoznano raka trzustki. Mężczyzna miał wówczas 84 lata i zmarł w ciągu roku. U siostrzeńca chorej w 13 r.ż. rozpoznano gwiaździaka. Siostrzeniec ma obecnie 22 lata i żyje bez objawów nowotworu (alive with no evidence of disease, ANED). U ciotki matki chorej rozpoznano bliżej nieokreślonego (not otherwise specified, NOS) chłoniaka, gdy miała 32 lata. W wieku 80 lat nie występowały u niej objawy nowotworu. U innej ciotki matki w VI dekadzie życia stwierdzono nieokreślonego bliżej raka piersi, z powodu którego zmarła w VII dekadzie życia. Babka ze strony ojca zmarła w wieku 53 lat z powodu nieokreślonego bliżej nowotworu macicy lub jajnika. Wuj ze strony ojca chorował na nieokreślonego bliżej raka przełyku. Podobno nie pił on alkoholu ani nie palił tytoniu. Dziadek ze strony ojca, namiętny palacz tytoniu, chorował jednocześnie na raka płuca i raka pęcherza moczowego. Zmarł w wieku 82 lat. Nietypowe były też losy trzech siostr, kuzynek chorej ze strony ojca. U wszystkich rozpoznano nowotwór, choć rodzice żadnej z nich nie chorowali na nowotwory. Jedna z nich w wieku 18 lat przeżyła napromienianie klatki piersiowej z powodu chłoniaka Hodgkina, w wieku 34 lat rozpoznano u niej raka piersi, a w wieku 46 lat raka drugiej piersi. Kobieta zmarła z powodu nowotworu w wieku 48 lat. Jej siostra zachorowała na raka piersi w wieku 46 lat. U trzeciej z siostr w wieku 49 lat rozpoznano raka piersi, w wieku 52 lat raka drugiej piersi, zaś w wieku 53 lat uznano ją za żyjącą bez objawów nowotworu.

Z powodu tak niecodziennego wywiadu rodzinnego oraz po uwzględnieniu przebytego leczenia z powodu chłoniaka chorej zaproponowano skorzystanie z wszechstronnego poradnictwa genetycznego. Po konsultacji genetycznej zaoferowano jej przeprowadzenie testów genetycznych: Comprehensive BRCAAnalysis i BRCAAnalysis Rearrangement Test (BART, Myriad Genetics Laboratories, Salt Lake City, UT) w kierunku mutacji BRCA1, BRCA2 oraz analizy sekwencji genu TP53 w kierunku zmian towarzyszących LFS lub zespołowi podobnemu do LFS (LFS-like syndrome, LFL). Chora zdecydowała się poddać tym badaniom.

Wyniki analizy sekwencji genu TP53 nie wykazały żadnej znaczącej mutacji zarodkowej w jego obrębie. Okazało się natomiast, że chora jest heterozygotą pod względem trzech polimorfizmów TP53, co zarejestrowano wcześniej w bazie danych International Agency for Research on Cancer (IARC).⁹ Nie przeprowadzono dodatkowych badań w kierunku powieleń i delecji w genie TP53 z uwagi na konieczność ponoszenia dodatkowych kosztów i sytuację finansową chorej. Trzeba dodać, że chora nie spełniała ściśle kryteriów nakazujących wykonanie testów genetycznych w kierunku LFS lub LFL zgodnie z wytycznymi NCCN.¹⁰ Badania te przeprowadzono jednak po uwzględnieniu obaw, jakie budziły wszystkie wykryte u niej nowotwory, młody wiek chorej w chwili ich rozpoznania oraz obciążające dane z wywiadu rodzinnego.

Testy oceniające geny BRCA ujawniły VUS w BRCA1: S1187N (3679G→A). Wariant ten koduje substytucję asparaginy w miejsce seryny w pozycji aminokwasowej 1187 w białku BRCA1. Według dodatkowych informacji uzyskanych z laboratorium, taki VUS stwierdzono dotąd w siedmiu niespokrewnionych ze sobą rodzinach i nie towarzyszyły mu żadne znane szkodliwe mutacje w tym samym genie. W laboratorium zwrócono też uwagę, że jeśli dany VUS współlistniał z innymi mutacjami uszkadzającymi w obrębie tego samego genu, prawdopodobieństwo szkodliwego wpływu tego VUS jest mniejsze. Nie wiadomo, czy można uznać za słuszne stwierdzenie odwrotne, czyli jeśli VUS nie towarzyszą dodatkowe mutacje uszkadzające (jak u omawianej chorej), należy podejrzewać szkodliwość samego VUS. Po uzyskaniu opisanych wyników testów genetycznych nie przeprowadzono badań oceniających znalezione u chorej VUS wśród członków jej rodziny.

Chorą oceniono za pomocą testu Oncotype DX (Genomic Health, Redwood, CA), dzięki któremu ustalono, że ryzyko nawrotu nowotworu jest pośrednie. Wyniki bardzo starannie omówiono z chorą, po czym nie wyraziła ona zgody na poddanie się chemioterapii neoadiuwantowej. Wybrała radykalne leczenie chirurgiczne polegające na obustronnej mastektomii, po którym otrzymała adiuwantowo chemioterapię eksemestanem (Pharmacia & Upjohn, Nerviano, Włochy).

Zagadnienia wymagające dyskusji klinicznej

Należy odpowiedzieć na następujące pytania:

- Biorąc pod uwagę nieoficjalną informację pochodzącą z laboratorium oraz obciążający wywiad chorobowy i wywiad rodzinny, jakie powinny być zalecenia dotyczące badań przesiewowych i działań zmierzających w kierunku ograniczenia ryzyka chorej i jej najbliższych krewnych?

- Jaką rolę w rozwoju raka piersi odegrało przebyte przed 12 laty napromienianie z powodu mięsaka ściany brzucha?

- Profil IHC raka piersi chorej nie był zgodny z profilem większości raków piersi związanych z mutacją *BRCA1*.¹¹ Jak należy to rozumieć?

- Czy niecodzienny wywiad rodzinny jest wskazaniem do zaproponowania najbliższym krewnym chorej badań w kierunku VUS, choć obecnie na ogół zniechęca się do takiego postępowania? Towarzystwa ubezpieczeniowe zwykle nie zwracają kosztów takich badań. Ponadto nawet jeśli rodzina zechce sama zapłacić za ich wykonanie, nadal nie wiadomo, jak interpretować ich wyniki do czasu zmiany ich klasyfikacji w laboratorium.

- Nie w pełni poznano dokładne ilościowe ryzyko rozwoju raków piersi i jajnika u nosicieli mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*. Wyniki badań sugerują jednak, że mutacje uszkodzające tych genów mogą stwarzać 87-procentowe ryzyko zachorowania na raka piersi i 44-procentowe ryzyko zachorowania na raka jajnika u kobiet do 70 r.ż.¹² Mutacje genów *BRCA* zwiększają też ryzyko rozwoju raka piersi u mężczyzn, a także raka gruczołu krokowego, raka trzustki i innych nowotworów.¹³

- Co należy zalecić, by rozwiązać obawy o zachorowanie na LFS lub LFL i jak postąpić z chorą, która nie spełnia ściśle wymaganych kryteriów klinicznych? Jeśli występują wyraźne powody, w laboratorium zwykle zaleca się przeprowadzenie dodatkowych analiz genetycznych w kierunku duplikacji i delecji. W omawianej sytuacji nie było to jednak konieczne, zatem po uzyskaniu wstępnych wyników nie zalecono dalszych badań genu *TP53*. Z uwagi na sytuację finansową chorej nie podejmowano badań oceniających delecje i duplikacje w genie *TP53*.

PRZYPADEK NR 2: VUS W *BRCA2*

Probantką jest 74-letnia kobieta, która w V dekadzie życia, po menopauzie, przeżyła mastektomię i adiuwantowe leczenie tamoksyfenem z powodu raka lewej piersi z ekspresją receptorów hormonalnych. Nie wymagała zastosowania radioterapii ani chemioterapii. Ponadto

przed 6 laty przeżyła tyreoidektomię z powodu raka pęcherzykowego tarczycy. U jej córki również rozpoznano raka piersi w II stopniu zaawansowania, z ekspresją receptorów hormonalnych. Miała ona wówczas 43 lata i była przed menopauzą. Wymagała zastosowania chemioterapii neoadiuwantowej, następnie mastektomii i radioterapii oraz adiuwantowego leczenia tamoksyfenem. U córki przeprowadzono testy w kierunku mutacji *BRCA1* i *BRCA2*, które wykazały nosicielstwo wariantu *BRCA2* o nieokreślonym znaczeniu. Z tego powodu usunięto drugą pierś i obustronnie przydatki, by zmniejszyć ryzyko ponownego zachorowania (drzewo genealogiczne przedstawia rycina 2).

Probantka jest pochodzenia włoskiego, a wśród jej przodków nie było Żydów aszkenazyjskich. Nie przeżywała nadmiernie długo na słońcu. Stosuje umiarkowaną dietę (węglowodany stanowią ~40-50%). Systematycznie poddawała się badaniom przesiewowym w kierunku nowotworów, w tym cytologii wydzielin z szyjki macicy i mammografii, a także kolonoskopii (co 2-3 lata).

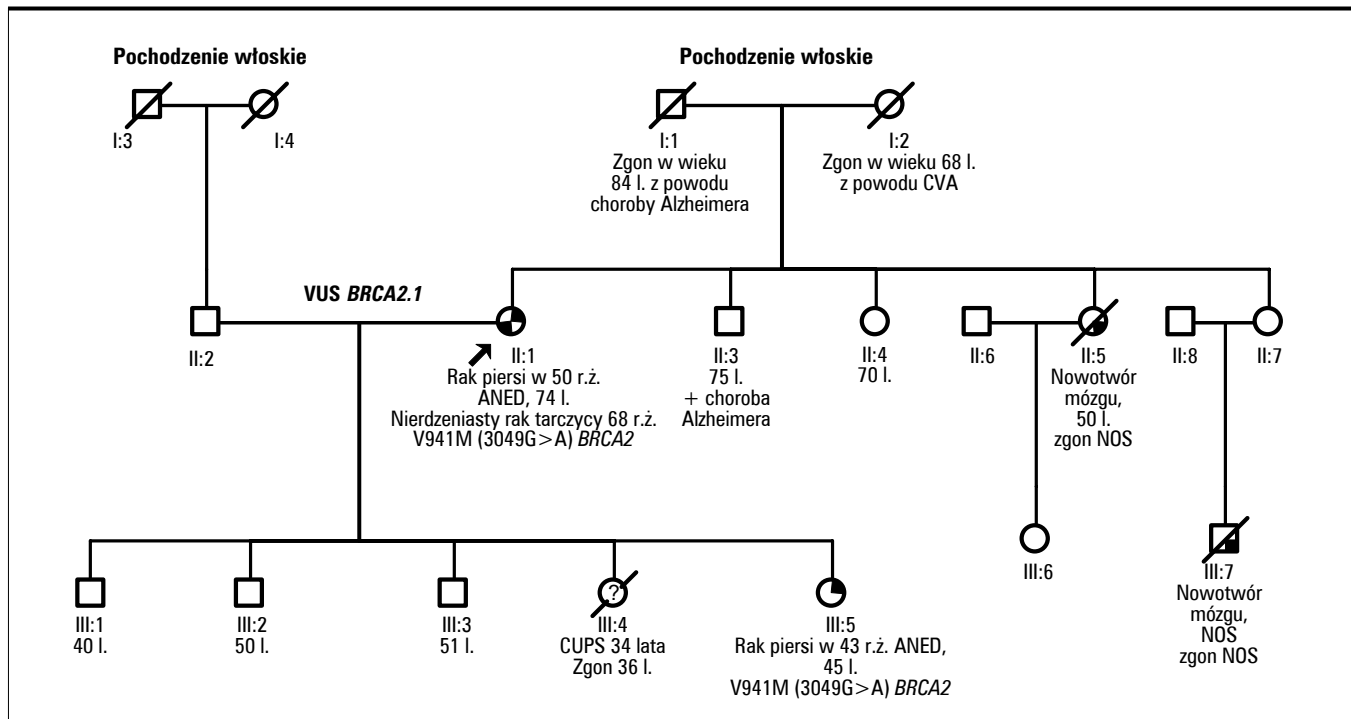
U starszej córki chorej w wieku 34 lat rozpoznano nowotwór niewiadomego pochodzenia z przerzutami do mózgu i wątroby. U siostry w V dekadzie życia stwierdzono nowotwór mózgu. Druga siostra chorej miała 73 lata i cieszyła się dobrym zdrowiem, ale u jej syna rozpoznano nowotwór mózgu w III dekadzie życia (ryc. 2).

U probantki przeprowadzono analizę genu *BRCA2* w poszukiwaniu pojedynczej mutacji, którą wcześniej wykryto u jej córki. Stwierdzono ten sam VUS w pozycji odpowiadającej V941M (3049G→A), którego następstwem jest podstawienie metioniny w miejsce waliny w 941 pozycji w łańcuchu aminokwasowym białka *BRCA2*. Na podstawie danych zgromadzonych w wykonującym badanie laboratorium genetycznym taka zmiana może, ale nie musi wpływać na czynność białka kodowanego przez gen *BRCA2*, zatem znaczenia występowania tego wariantu dla powstania ryzyka rozwoju raka piersi lub raka jajnika nie można określić wyłącznie na podstawie analizy sekwencjonowania. W raporcie analizy sprzężeń przeprowadzonej w tym samym laboratorium genetycznym opisano to zdarzenie jako pierwsze wystąpienie tego wariantu w niespokrewnionych rodzinach.

PRZYPADEK 3: VUS *BRCA2* FAWORYZUJĄCY POLIMORFIZM

Probantką jest 45-letnia kobieta, u której rozpoznano inwazyjnego przewodowego raka lewej piersi w I stopniu zaawansowania z ekspresją receptorów hormonalnych. Z tego powodu przeżyła ona operację wycięcia guzka piersi i węzłów chłonnych pachowych,

RYCINA 2



Przypadek 2. Drzewo genealogiczne drugiej chorej, przedstawiające krewnych pierwszego, drugiego i trzeciego stopnia, wygenerowane za pomocą programu Cyrillic (www.cyrillicsoftware.com).

CVA – zdarzenie ze strony układu sercowo-naczyniowego, ANED – żyjący bez objawów nowotworu, NOS – bliżej nieokreślony, CUPS – pierwotny nowotwór o nieznanym umiejscowieniu, VUS – wariant o niepewnym znaczeniu.

adiuwantową chemioterapię, a następnie radioterapię, a także adiuwantowe leczenie tamoksyfenem. Chora ma dwoje dzieci. U żadnej z jej krewnych nie rozpoznano raka piersi przed menopauzą. Dziadek ze strony matki zachorował na raka gruczołu krokowego w wieku 69 lat, zaś u ciotecznej babki ze strony matki oraz u kuzynki matki rozpoznano raka piersi po menopauzie (drzewo genealogiczne przedstawiono na rycinie 3). Chora pochodzi z Europy, a wśród jej przodków nie było Żydów aszkenazyjskich.

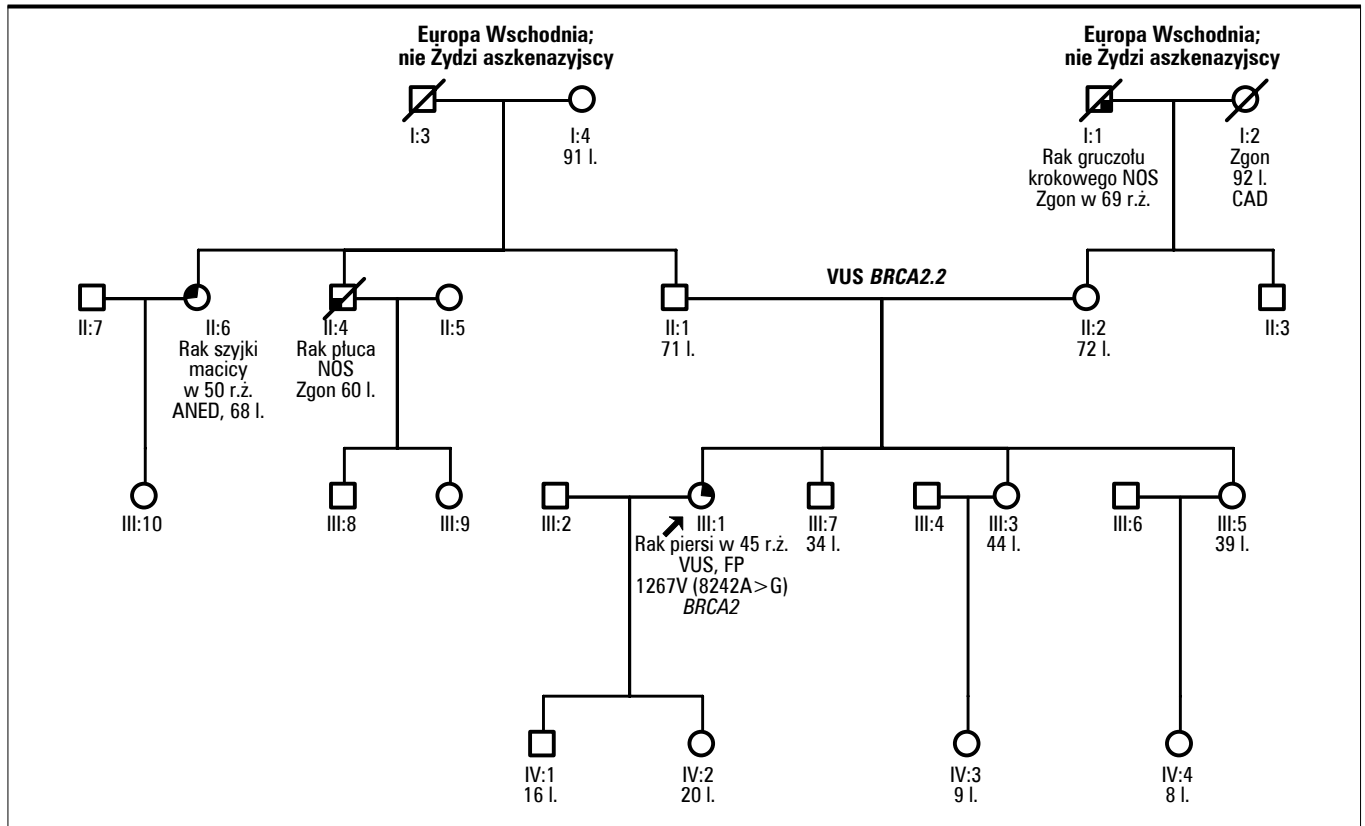
Probantkę oceniono w kierunku występowania mutacji BRCA. Opierając się na tabelach statystycznych prawdopodobieństwo wystąpienia takiej mutacji określono na 6,7%. Nie stwierdzono mutacji w obrębie BRCA1 ani rearanzacji sekwencji genu w żadnym z pięciu możliwych miejsc ich występowania. Wykryto natomiast wariant genetyczny BRCA2 w pozycji I2672V (8242A→G), który początkowo opisano jako wariant genetyczny o nieznanym znaczeniu, później zaś zmieniono klasyfikację na prawdopodobny polimorfizm. Następstwem wystąpienia tego wariantu było zastąpienie izoleucyny walina w pozycji 2672 w łańcuchu amino-

kwasowym białka BRCA2. Dane pochodzące z analizy sprzężeń oraz dane własne laboratorium genetycznego sugerują silny związek takiego VUS z mniejszym prawdopodobieństwem wystąpienia raka u osoby cechującej się taką zmianą oraz w jej rodzinie. Jest to typowe dla osób, u których nie występują mutacje BRCA1 ani BRCA2, i sprawia, że prawdopodobieństwo uszkadzającego działania tego wariantu jest mniejsze.^{2,14} Jego obecność obserwowano w dziewięciu niespokrewnionych ze sobą rodzinach i w żadnej z nich nie współistniał on z nowotworem. Występował najczęściej u osób pochodzących z Ameryki Łacińskiej lub Karaibów (11,1%) oraz Europy Zachodniej (33,3%), natomiast pochodzenia pozostałych 55,6% osób nie określono.

ZAGADNIENIA KLINICZNE WYMAGAJĄCE OMÓWIENIA (PRZYPADKI 2 ORAZ 3)

Wiadomo, że występowanie uszkadzającej mutacji BRCA2 stwarza ryzyko rozwoju w ciągu życia raka piersi u kobiet sięgające 45-84%, ryzyko rozwoju w ciągu

RYCINA 3



Przypadek 3. Drzewo genealogiczne trzeciej chorej, przedstawiające krewnych pierwszego, drugiego i trzeciego stopnia, wygenerowane za pomocą programu Cyrillic (www.cyrillicsoftware.com).

CAD – zgon z powodu nowotworu, ANED – żyjący bez objawów nowotworu, NOS – bliżej nieokreślony, VUS – wariant o niepewnym znaczeniu, FP – faworyzujący polimorfizm.

życia raka jajnika sięgające 11-64%,^{10,12,14-20} ryzyko rozwoju w ciągu życia raka piersi u mężczyzn i raka gruczołu krokowego sięgające odpowiednio 32 i 20% oraz ryzyko rozwoju w obu populacjach raka trzustki i czerniaków odpowiednio u 2 i 4%.¹⁴⁻²⁰

Przyjęte przez autorów zagrożenia kliniczne wymagające rozstrzygnięcia to:

Jak należy postąpić z krewnymi pierwszego stopnia opisanych kobiet, u których wykryto warianty o nieokreślonym znaczeniu, biorąc pod uwagę:

- ryzyko rozwoju raka piersi
- ryzyko rozwoju raka jajnika i badania przesiewowe
- ryzyko rozwoju raka trzustki i badania przesiewowe
- ryzyko rozwoju raka gruczołu krokowego
- ryzyko rozwoju innych nowotworów?

OPINIE GENETYKÓW KLINICZNYCH

U wielu członków rodziny pierwszej z omawianych chorych rozpoznano nowotwór złośliwy, często w młodym wieku. Ocena predyspozycji powstawania nowotworu pod wpływem zmian w pojedynczym genie oraz ustalenie zaleceń dotyczących wykonywania badań przesiewowych u członków rodziny i zmniejszania ryzyka ich zachorowania wymagają jednak uwzględnienia kilku aspektów wywiadu rodzinnego. Należy zacząć od probantki, napromienianej z powodu mięsaka ściany brzucha w wieku 48 lat, u której w wieku 61 lat rozwinął się rak piersi. Najprawdopodobniej rak piersi powstał u niej sporadycznie, choć nie można całkowicie wykluczyć pewnej roli rozproszonego promieniowania.²¹ Rak piersi szczególnie często rozwija się u chorych napromienianych z powodu chłoniaka Hodgkina.

Zależność tę dostrzega się jednak tylko u kobiet napromieniowanych w czasie, gdy ich piersi się rozwijały. Przykładem jest kuzynka ze strony ojca, u której obszar napromieniania podanego w wieku 18 lat z powodu chłoniaka Hodgkina był rozległy jak płaszcz. W wieku 34 lat zachorowała na raka piersi, a gdy ukończyła 46 lat, rozpoznano u niej raka drugiej piersi.²² Dodatkowym utrudnieniem jest rozwój raka piersi u obu siostr tej kuzynki: jedna z nich miała wówczas 46 lat (III:7), a druga (III:6) 49 lat w chwili rozpoznania raka jednej piersi i 52 lata w chwili rozpoznania raka drugiej piersi. Zwiększa to prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji *BRCA* przede wszystkim u obu tych kobiet, zwłaszcza jeśli ich babka rzeczywiście chorowała na raka jajnika lub jeśli ich matka przeżyła w młodym wieku operację obustronnego usunięcia jajników, co zmniejszyło ryzyko jej zachorowania na raka piersi i raka jajnika. Najlepszą metodą określenia, czy w rodzinie ze strony ojca dziedziczono raka piersi lub jajnika (hereditary breast/ovarian cancer, HBOC), byłoby oznaczenie sekwencji *BRCA* tej z siostr, u której wystąpił rak jednej piersi, w poszukiwaniu rearanzacji w genie *BRCA* (*BRCA* rearrangement testing, BART). Wykrycie mutacji uszkadzającej *BRCA* byłoby wskazaniem do poszukiwania jej u siostry leczonej wcześniej z powodu chłoniaka Hodgkina. Nieodnalezienie mutacji sprawczej powoduje, że HBOC rozpoznaje się na podstawie obrazu klinicznego. Etiologię nowotworów występujących u probantki można uznać za wieloczynnikową, wydaje się to bowiem całkiem prawdopodobne. Wobec tego poza potencjalnym rakiem jajnika u babki ze strony ojca nowotwory występujące u pozostałych członków rodziny raczej nie są następstwem pojedynczej mutacji genowej, ponieważ nie rozpoznawano ich w dzieciństwie, żaden z krewnych płci męskiej nie chorował na raka piersi, nie potwierdzono rozpoznania raka jajnika, a matka kuzynek nigdy nie chorowała na nowotwór. Była to jednak jedyna ciotka ze strony ojca, zatem brak innych kobiet w tej gałęzi rodziny ogranicza możliwość dalszej oceny,²³ podobnie jak brak informacji dotyczących wywiadu chorobowego trzech kuzynek ojca. Dlatego zdecydowanie zalecamy potwierdzenie rozpoznania nowotworu u babki ze strony ojca, jeśli to tylko możliwe, na podstawie weryfikacji wyniku badania histopatologicznego (najlepiej) lub świadectwa zgonu. Należy też uzyskać więcej informacji o kuzynkach ze strony ojca, zwracając uwagę na wszelkie możliwości wystąpienia nowotworu dziedzicznego, co mogłoby tłumaczyć rozwój nowotworów u tego rodzeństwa.

W rodzinie probantki ze strony ojca można byłoby wprawdzie podejrzewać występowanie zespołu HBOC, ponieważ jej ojciec chorował na raka trzustki, co zdarza się w niektórych rodzinach z mutacją *BRCA2*, ale nowotwór ten rozpoznano u niego, gdy miał 84 lata, zbyt

późno zatem, by brać pod uwagę ryzyko dziedziczne. Ponadto raka przelyku, obserwowanego u jedyne go wuja chorej ze strony ojca, który nigdy nie palił tytoniu ani nie pił alkoholu, rzadko rozpoznaje się w rodzinach obciążonych mutacjami *BRCA2*, a jeśli tak, to jedynie w określonych regionach geograficznych, np. w Chinach.²⁴ Kolejnym argumentem świadczącym przeciw rozwojowi nowotworu u probantki z powodu mutacji pojedynczego genu jest niewykrycie mutacji uszkadzających podczas analizy sekwencji genów *BRCA* i *TP53*. W badaniu *TP53* ujawniono polimorfizm stwierdzany za ledwie u 1-2% osób w populacji. Wykryty szczególny wariant *BRCA1*, S1187N, powoduje zastąpienie jednego aminokwasu innym o zbliżonym ładunku. Jego występowanie stwierdzono w siedmiu niespokrewnionych rodzinach, a na podstawie analizy za pomocą trzech programów oceniających mutacje zmiany sensu: SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), POLY-PHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) i AlignAGVD (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php/) uznano go za łagodny. Nie ma zatem jakichkolwiek wskazań do poddawania innych członków rodziny testom poszukującym tego wariantu, ponieważ jego nosicielstwo w praktyce klinicznej nie ma znaczenia w określaniu ryzyka rozwoju nowotworu. Chociaż większość guzów z mutacjami *BRCA1* cechuje brak ER, a wśród nosicielek tej mutacji częstszy jest fenotyp potrójnie receptorowo ujemny, trzeba pamiętać, że u blisko 33% osób z mutacją *BRCA1* wynik badania IHC będzie zbliżony do wyniku uzyskanego u probanta (potwierdzi występowanie ER/PR i wykluczy HER2).

Należy teraz przeanalizować prawdopodobieństwo występowania mutacji zarodkowej wśród krewnych probantki ze strony matki. Jedynym genem branym pod uwagę jest tu *TP53*, którego mutacje powodują wystąpienie rzadko spotykanego LFS. Wśród krewnych ze strony matki rozpoznano wprawdzie kilka nowotworów, w tym większość u osób młodych, brakuje jednak spójnego wzorca mutacji, jakiego można byłoby się spodziewać po LFS cechującym się silną penetracją genu. Jedynym rodzeństwem probantki jest siostra, która nie choruje na nowotwór, ale u jej syna a siostrzeńca probantki rozpoznano nowotwór mózgu, gdy miał 13 lat. W rodzinach dotkniętych LFS często występują nowotwory mózgu i mięsaki, natomiast rak piersi jest rozpoznawany bardzo rzadko, na ogół przed ukończeniem 30 lat.²⁵ Możliwe zatem, że u siostrzeńca spełniającego kryteria Chompret,²⁶ powstała *de novo* mutacja *TP53* lub nosicielem tej mutacji jest jedno z jego rodziców, które jednak nie zachorowało dotąd na nowotwór, ponieważ jest w stosunkowo młodym wieku (syn ma za ledwie 22 lata). Matka probantki (i jej siostry) ma 85 lat i nie chorowała na nowotwór. Wyjątkowo rzadko mogłaby się zdarzyć sytuacja, w której matka i siostra probantki nigdy nie zachorowałyby na nowo-

twór mimo nosicielstwa mutacji genu *TP53*. Mutacja byłaby konieczna do powiązania chłoniaka rozpoznanego w wieku 32 lat u 80-letniej obecnie ciotki ze strony matki z nowotworem mózgu u siostrzeńca probantki. Wystąpienie raka piersi w późniejszym wieku u innej ciotki ze strony matki należy uznać za sporadyczne. Ponadto dzieci ciotki nie chorowały na nowotwory, mało prawdopodobne zatem, by w rodzinie tej występował LFS o silnej penetracji genu, nawet gdyby uwzględnić śmierć babki ze strony matki w wieku około 40 lat, z powodu być może raka żołądka.

Jak już wspomniano, najwięcej informacji pozwalających na wskazanie przyczyny rozwoju raka piersi i ustalenie zasad postępowania z krewnymi można uzyskać dzięki zaoferowaniu testu *BRCA* chorym na raka kuzynkom ze strony ojca, będącym w wieku 46 i 49 lat. Jeśli mutacja uszkodzająca nie występuje, jak w omawianej rodzinie, zgodnie z zaleceniami NCCN córki kobiet chorych na raka piersi niezwiązanego z mutacją w pojedynczym genie powinny poddawać się przesiewowej mammografii poczynając od 35 r.ż.^{27,28} Zaleca się nadzorowanie krewnych ze strony matki, mające na celu wczesne rozpoznanie nowotworu, określone na podstawie indywidualnego zagrożenia zachorowaniem.

U chorych opisanych wyżej jako przypadki 2 i 3, u których w IV dekadzie życia rozpoznano raka piersi z ekspresją receptorów hormonalnych, przeprowadzono sekwencjonowanie genów *BRCA1* i *BRCA2*, które ujawniło VUS w obrębie genu *BRCA2*. Warianty *BRCA2* powodowały zastąpienie jednego niepolarnego aminokwasu innym. Na podstawie oceny mutacji typu braku sensu za pomocą wspomnianych wyżej programów (SIFT, POLY-PHEN i Align AGVD), wykorzystanych u pierwszej z omawianych chorych, stwierdzono, że takie zmiany mają niewielkie znaczenie i są dobrze tolerowane. Wyniki badań przeprowadzonych z użyciem tych programów wydają się potwierdzać łagodną naturę VUS, nie oceniano jednak ich wiarygodności w praktyce klinicznej. Podobnie jak u pierwszej chorej, nie ma żadnych wskazań do wykonywania u innych członków rodziny testów poszukujących wariantów genu *BRCA* w celu określenia ryzyka zachorowania na nowotwór i zasad postępowania, niezależnie od tego, czy krewny chorował wcześniej na nowotwór, czy nie. Użycie terminu VUS oznacza, że nie ustalono znaczenia występowania danego wariantu w praktyce klinicznej. Jedynym wyjątkiem jest VUS uznawany za podejrzany uszkodzający na podstawie mocnych dowodów na jego związek z nowotworem. Większość praktykujących lekarzy traktuje takie osoby jak nosiciele mutacji wyraźnie uszkodzających.

W ustalaniu ryzyka rozwoju nowotworu i opracowywaniu strategii je zmniejszających u członków rodzin ważną rolę odgrywa przeprowadzenie pełnej analizy

BRCA wraz z testem oceniającym rearanżację genów (BART). Ocena rearanżacji zwiększa czułość analizy z około 80-85% do około 90-95%. Blisko 10% mutacji *BRCA* to rozległe rearanżacje.²⁹ Niektóre są swoiste dla pewnych grup osób, ale można je znaleźć u przedstawicieli wszystkich grup etnicznych. Przedstawimy teraz dalszą ocenę każdej z opisanych wyżej chorych oraz zalecenia dotyczące postępowania wobec niej.

Probantka druga jest 74-letnią matką jednej z nosicielek VUS. W V dekadzie życia u probantki rozpoznano raka piersi z ekspresją receptorów hormonalnych, a w wieku 68 lat pęcherzykowego raka tarczycy. Przeprowadzone u niej testy w kierunku mutacji punktowych wykazały, że również ona jest nosicielką VUS. Ponieważ laboratorium wykonuje bezpłatnie testy w kierunku wariantów *BRCA* u bliskich krewnych chorych na nowotwór z mutacją *BRCA*, by zgromadzić dane umożliwiające badania swoistych VUS, zakładamy, że był to powód wykonania testu u probantki. Trzeba bowiem jasno powiedzieć, że w praktyce klinicznej przeprowadzanie takich badań zupełnie nie znajduje uzasadnienia. W tym laboratorium po raz pierwszy wykryto taki VUS. Występowanie lub brak VUS nie wpływają na wybór postępowania, a wyniki oznaczenia wariantu nie wnoszą informacji ważnych dla chorej i jej rodziny.

Wywiad rodzinny budzi niepokój, ponieważ probantka i jej córka chorowały na raka piersi, a inna córka zmarła w wieku 36 lat z powodu przerzutów do mózgu i wątroby nowotworu, którego objawy wystąpiły u niej w wieku 34 lat, a którego punktu wyjścia nie ustalono. Mózg i wątroba są częstymi miejscami przerzutów raka piersi, nie można jednak przyjąć, że u omawianej chorej występował właśnie ten nowotwór. Ponadto u probantki rozpoznano w wieku 68 lat pęcherzykowego raka tarczycy, a u dwojga jej krewnych stwierdzono nowotwór mózgu. Jedną z tych osób była siostra probantki, która zmarła w wieku 50 lat, drugą zaś siostrzeniec probantki zmarły w III dekadzie życia. W rozpoznaniu różnicowym należy uwzględnić zespół Cowdena,³⁰ biorąc pod uwagę występowanie nowotworów u probantki, a także LFS³¹ z uwagi na występowanie nowotworów piersi i mózgu oraz pierwotnego nowotworu niewiadomego pochodzenia. Rak piersi i rak tarczycy są wprawdzie cechami zespołu Cowdena, występują jednak często, a probantka w chwili zachorowania nie była na tyle młoda, by podejrzewać mutacje genowe o silnej penetracji. Ponadto nowotwory mózgu nie wchodzi w skład tego zespołu, są natomiast głównym rodzajem nowotworów występujących w przebiegu LFS (obok nowotworów kory nadnercza, raków piersi i mięsaków). Członkowie tej rodziny nie spełniali klasycznych kryteriów LFS, spełniali natomiast kryteria Chompret.²⁶ Jak wspomniano w omówieniu pierwszej z chorych, raki piersi występujące w przebiegu LFS są rozpoznawane

zwykle przed ukończeniem 50 lat, a często przed ukończeniem 30 lat. Rak tarczycy jest rzadko występującym nowotworem, pojawia się jednak w rodzinach chorych na LFS. W omawianej rodzinie można przyjąć, że wśród krewnych ze strony ojca nie występują cechy świadczące o dziedziczeniu zespołu nowotworowego wywołanego mutacją pojedynczego genu, a struktura tej linii jest odpowiednia (co najmniej dwie krewnie I lub II stopnia dożyły co najmniej 45 lat).²³ Testy w kierunku rearanzacji BRCA powinno się zatem wykonać u probantki i jej córki. U córki rozpoznano raka piersi, gdy miała 43 lata. Przeżyła wcześniej mastektomię, a także operację usunięcia drugiej piersi i obu jajników, by zmniejszyć ryzyko ponownego zachorowania. Może ona spełniać warunki udziału w badaniach oceniających przydatność nowych leków opracowanych dla nosicielek mutacji BRCA, u których nastąpiła progresja raka piersi po leczeniu wstępnym.³² Jeśli wynik testów w kierunku rearanzacji BRCA jest niejednoznaczny (nie wyodrębniono wyraźnej mutacji uszkodzającej), uzasadnione jest przeprowadzenie analizy genu TP53 u córki. Wykonanie tego badania zaleca się też u każdego z członków rodziny, u którego w młodym wieku wystąpi nowotwór typowy dla LFS.

Jeśli opisany VUS ma jakiegokolwiek znaczenie, a razie pozostaje ono nieznanne. Postępowanie z osobami, które chorowały na nowotwór, będzie zależało od wyników dalszych badań i oceny klinicznej. Zalecenia dla niechorującej dotąd 49-letniej córki probantki uwzględniają roczne wykonywanie mammografii oraz rezonansu magnetycznego (MR) piersi,³³ ponieważ empiryczne ryzyko jej zachorowania na raka piersi w wieku 79 lat, oszacowane na podstawie tabeli Clausa,³⁴ wynosi 22,6%. Inne badania to badanie piersi przez pracownika opieki zdrowotnej co pół roku i samodzielne badanie piersi co miesiąc. Należy też rozważyć zastosowanie chemoprewencji (podanie tamoksyfenu lub raloksyfenu, jeśli kobieta przeżyła menopauzę), ponieważ dwie jej krewnie pierwszego stopnia chorowały na raka piersi, a ryzyko jej zachorowania na ten nowotwór w ciągu 5 lat, oszacowane na podstawie modelu Gail,³⁵ znacznie przekracza minimalną wartość progową 1,7%.

Historia trzeciej probantki jest mniej skomplikowana, ponieważ jej wywiad rodzinny nie jest wyraźnie obciążający, a struktura drzewa genealogicznego ze strony obojga rodziców jest prawidłowa. Jedynym medycznym wskazaniem do przeprowadzenia testu BRCA było wystąpienie u niej raka piersi w wieku 45 lat. Inne nowotwory rozpoznawane wśród członków jej rodziny były niezwiązane z mutacją genu BRCA, z wyjątkiem raka gruczołu krokowego, stwierdzonego u dziadka ze strony matki w 69 r.ż. Ponieważ nowotwór ten często występuje u mężczyzn w podeszłym wieku, wiek dziadka w chwili ustalenia rozpoznania nie wnosi wiele do oceny ryzyka zachorowań na raka w rodzinie.

Wyniki dotychczasowych testów w kierunku mutacji BRCA nie budzą obaw. Wyodrębniony wariant BRCA2 uznano za polimorfizm pożyteczny, a programy oceniające skutki mutacji typu braku sensu potwierdzają słuszność takiej interpretacji. Podobnie jak w przypadku obu kobiet omówionych wcześniej, probantka powinna się poddać testowi rearanzacji BRCA, by na podstawie pełnej diagnostyki uznać, że w rodzinie nie występuje mutacja BRCA. Jeśli założyć brak takiej mutacji, matka i siostry chorej, liczące 39 i 44 lata, a także jej 20-letnia córka są obciążone zaledwie nieznacznie zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi, wynikającym z zachorowania krewnego pierwszego stopnia. Zaleca się, by po ukończeniu 35 lat rokrocznie wykonywały mammografię, po ukończeniu 30 lat dwa razy w roku poddawały się badaniu piersi przez lekarza, a co miesiąc same przeprowadzały badanie piersi. Jeśli nie zostaną wykryte mutacje uszkodzające BRCA, nie ma wskazań do wykonywania badań przesiewowych w kierunku innych nowotworów. Rozpoznanie zmian w obrębie genu BRCA w połączeniu z zachorowaniem na raka trzustki w wywiadzie rodzinnym powinno skłonić do rozważenia badań przesiewowych w kierunku tego nowotworu. W omawianej rodzinie nikt nie chorował na raka trzustki. Celowość wykonywania badań przesiewowych w kierunku raka gruczołu krokowego wymaga wspólnego ustalenia przez każdego z mężczyzn i jego lekarza.

Deborah J. MacDonald, PhD,
Jeffrey N. Weitzel, MD

OPINIA GENETYKÓW SPECJALIZUJĄCYCH SIĘ W NOWOTWORACH

U pierwszej z probantek zalecamy wykonanie badań przesiewowych i podjęcie opisanych dalej działań, mających na celu zmniejszenie ryzyka zachorowania. Po pierwsze należałoby wyjaśnić, czy u babki ze strony ojca wystąpił rak trzonu macicy, czy rak jajnika. Gdyby był to rak jajnika, chora i wszystkie krewnie obciążone ryzykiem wymagają postępowania zgodnego z aktualnymi wytycznymi NCCN dotyczącymi osób dotkniętych zespołem dziedzicznego raka piersi i jajnika. Gdyby nie udało się wyjaśnić typu nowotworu babki, postępowanie powinno zależeć od rodzaju nowotworów występujących w rodzinie, z uwzględnieniem wieku w chwili ustalenia rozpoznania. Uzasadnione jest wykonywanie badań przesiewowych, czyli rokrocznej mammografii i MR poczynając od 25 r.ż. u wszystkich spokrewnionych kobiet obciążonych ryzykiem. U wszystkich krewnych ze strony ojca probantki należy rozważyć przeprowadzenie badań przesiewowych w kierunku raka trzustki w kontekście badań naukowych. Z uwagi

na możliwość występowania LFS, od 25 r.ż. powinno się wykonywać kolonoskopię co 2-5 lat, a także oceniać stan skóry i ośrodkowego układu nerwowego.

Znaczenie radioterapii przebytej z powodu mięsaka powłok brzusznych w późniejszym rozwoju raka piersi budzi kontrowersje. Udowodniono zwiększenie ryzyka rozwoju tego nowotworu u chorych eksponowanych na promieniowanie jonizujące, zwłaszcza jeśli jest to napromienianie klatki piersiowej w trakcie szybkiego kształtowania się piersi. Napromienianie jest również czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworów złośliwych w polu jego działania. Mało prawdopodobne jednak, by napromienianie powłok brzusznych u omawianej chorej obejmowało również piersi. Dlatego uważamy, że leczenie to nie odegrało roli w etiologii raka piersi u tej chorej, rozpoznanej w 61 r.ż.^{10,36-38}

Wyniki badania IHC raka piersi tej chorej były odmienne od uzyskiwanych podczas badań większości raków piersi związanych z mutacją *BRCA1*. Trzeba pamiętać, że około 80% raków piersi związanych z mutacją uszkodzającą genu *BRCA1* to raki potrójnie receptorowo ujemne, natomiast w 20% nowotworów stwierdza się ekspresję ER i PR. Zatem rozpoznanie raka z ekspresją tych receptorów nie pozwala uznać VUS wykrytego w obrębie *BRCA1* za niepowodujący uszkodzenia.

Testy w kierunku VUS zaoferowalibyśmy bliskim krewnym chorej w określonych okolicznościach. Zalecamy ich wykonanie u wszystkich członków rodziny chorujących na nowotwory, nie są one natomiast wskazane u zdrowych krewnych. Najbliżsi kuzyni ojca również spełniają aktualne kryteria NCCN wykonywania testów *BRCA*, zalecamy więc przeprowadzenie u co najmniej jednego z nich sekwencjonowania *BRCA1* i *BRCA2*, a także ocenę dużych rearanżacji (delekcji/duplikacji) obu tych genów.

Dostrzegamy pewne ryzyko wystąpienia LFS i LFL w tej rodzinie, choć nie spełnia ona ściśle klinicznych kryteriów LFS. Potwierdzamy zasadność przeprowadzenia badań w kierunku LFS. Zalecamy też wykonanie testów w kierunku delekcji i duplikacji w obrębie genu *TP53*. Oszacowano, że około 7% mutacji tego genu jest następstwem delekcji lub duplikacji. Uzyskanie ujemnego wyniku testu probantki w kierunku delekcji lub duplikacji w genie *TP53* uzasadnia poszukiwanie mutacji *TP53* u jej siostrzeńca. Wykrycie takiej mutacji pozwalałoby wówczas sądzić, że oba te nowotwory powstały niezależnie od siebie. Zalecalibyśmy zatem poddanie badaniom przesiewowym wszystkim członków rodziny, zgodnie z zasadami opisanymi wyżej.

U drugiej z probantek współistnienie raka piersi z rakiem pęcherzykowym tarczycy jest wskazaniem do dalszej oceny, która określi, czy chora spełnia kryteria NCCN wykonywania badań w kierunku zespołu

Cowdena. Probantka spełniała dwa spośród trzech takich kryteriów. Należałoby ponadto zaproponować probantce uczestnictwo w prowadzonych obecnie badaniach dotyczących zespołu Cowdena. Gdyby okazała się ona nosicielką mutacji uszkodzającej *PTEN*, badania w kierunku tej mutacji powinno się zaproponować wszystkim członkom rodziny obciążonym ryzykiem zachorowania na ten zespół.

W rodzinach probantek 2 i 3 proponujemy następujące zalecenia dotyczące badań przesiewowych i oceny ryzyka rozwoju nowotworu złośliwego. Krewnym pierwszego stopnia drugiej probantki należy zaoferować rokroczne wykonywanie mammografii, rozpoczynane na 10 lat przed osiągnięciem wieku, w którym raka piersi rozpoznano u najmłodszej z członkiń tej rodziny. Warto też rozważyć rokroczne wykonywanie badania MR, zwłaszcza u zdrowej córki probantki. Siostry i matka trzeciej probantki powinny być rokrocznie poddawane mammografii po ukończeniu 35 lat (10 lat przed rozpoznaniem raka piersi u probantki). Ponieważ żadna z kobiet w rodzinie nie chorowała na raka jajnika, w grupie VUS *BRCA* badania przesiewowe w kierunku tego nowotworu nie są konieczne. Profilaktyczne obustronne usunięcie przydatków należy rozważyć indywidualnie, zasięgając konsultacji ginekologa specjalizującego się w onkologii, ponieważ dotychczasowe dane i zasadności takiego postępowania są zbyt skąpe, by udzielać bezpośrednich porad. Z chorą i jej krewnymi trzeba porozmawiać o objawach raka jajnika. Nie udowodniono również korzystnego wpływu badań przesiewowych w kierunku raka trzustki na przeżycie chorych, dlatego w rodzinie, w której stwierdzono VUS *BRCA*, ale nikt nie chorował na raka trzustki, nie zalecamy wykonywania takich badań. Mężczyźni spokrewnieni z probantkami 2 i 3 nie wymagają dodatkowych zaleceń dotyczących badań przesiewowych w kierunku raka gruczołu krokowego. Prawdopodobnie najwięcej skorzystają, jeśli poddadzą się badaniom przesiewowym odpowiednim do wieku. Krewni probantek 2 i 3 wymagają wykonywania badań przesiewowych właściwych dla płci i wieku, a z niepokojącymi objawami powinni się zgłaszać do lekarza.^{10,39}

*Ferdy Santiago, MD, Martin A. Martino, MD,
Tara Namey, MS, CGC,
AnnMarie Augustyn, MS, CGC*

OPINIA GENETYKÓW KLINICZNYCH

Ustalenie zaleceń dla nosicieli VUS genów *BRCA1* lub *BRCA2* może być trudne. Zgodnie z definicją, wpływ VUS na ryzyko rozwoju nowotworu jest niejasny. Na podstawie wyników testów laboratoryjnych

VUS można niekiedy sklasyfikować w kategorii zmian stwarzających większe ryzyko rozwoju nowotworu. Wpływ zmian VUS na takie ryzyko jest niejednoznaczny, więc NCCN zaleca nieuwzględnianie w praktyce klinicznej wariantów o nieznanym znaczeniu.¹⁰ Jeśli nie uzyskano danych wyraźnie świadczących o zwiększeniu ryzyka rozwoju nowotworu przez określony VUS, zalecenia dotyczące wykonywania badań przesiewowych i podejmowania działań zapobiegawczych należy ustalić, opierając się na osobistym i rodzinnym wywiadzie dotyczącym zachorowań na nowotwory. Ważne jest osiągnięcie dobrego porozumienia między chorym a lekarzem, ponieważ interpretacja niektórych wyników może się zmienić, pociągając za sobą zmianę planu postępowania.

Zalecenia dotyczące wykonywania badań przesiewowych u probantki drugiej, u której raka piersi rozpoznano w 50 r.ż., nie zmieniłyby się pod wpływem wyników testów genetycznych uzyskanych u członków jej rodziny. Po zakończeniu leczenia z powodu raka piersi probantka i jej córka powinny kontynuować poddawanie się mammografii co roku i badaniu piersi podczas wizyty u onkologa co pół roku. Jeśli w rodzinie nie obserwowano zachorowań na raka jajnika, mutacji uszkadzających ani uszkadzających VUS, zalecamy roczne badanie piersi i badanie ginekologiczne. Trzeba podkreślić, że zalecenia te mogą się zmienić po zmianie klasyfikacji VUS. Program badań przesiewowych wykonywanych u zdrowych krewnych probantki zależy od osobistego i rodzinnego wywiadu chorobowego. Krewnie pierwszego stopnia chorej na raka piersi rozpoznanego w wieku ≤ 50 lat i obciążone ryzykiem zachorowania w ciągu życia na ten nowotwór przekraczającym 20% według modelu Clausa,³⁴ powinny co roku poddawać się MR i mammografii, a co pół roku badaniu klinicznemu piersi przeprowadzanemu przez lekarza. Postępowanie to należy rozpocząć u kobiet w wieku poprzedzającym o 5-10 lat wiek krewnej, u której raka piersi rozpoznano w najmłodszym wieku.³⁵ Kobiety te spełniają również kryteria, nakazujące rozważenie zastosowania chemoprewencji tamoksyfenem lub raloksyfenem. Zwracamy uwagę na znaczenie śledzenia stanu VUS w rodzinie, ponieważ przedstawione zalecenia mogą się zmienić po uznaniu VUS za uszkadzający. Pragniemy też podkreślić konieczność rejestrowania kolejnych zachorowań na nowotwory wśród członków rodziny, które również mogą zmienić zalecenia dotyczące wykonywania badań przesiewowych lub zwrócić uwagę na uwzględnienie innych zespołów nowotworowych. Jeśli w rodzinie nie stwierdzono mutacji *BRCA1/2* ani uszkadzającego VUS w obrębie tych genów, a wywiad rodzinny w kierunku raka trzustki lub raka gruczołu krokowego jest bez znaczenia, nie zalecamy podejmowania badań przesiewowych w kierunku raka trzustki

ani wcześniejszego rozpoczęcia badań przesiewowych w kierunku raka gruczołu krokowego.

Probantka trzecia powinna być poddana obserwacji właściwej osobom po zakończeniu leczenia z powodu raka piersi, a także opisanej wyżej ocenie narządu rodowego. Nikt inny w jej rodzinie nie chorował na nowotwór, utrzymujemy zatem nasze zalecenia dotyczące postępowania wobec zdrowych krewnych probantki. Według oszacowań na podstawie modelu Clausa³⁴ i innych modeli oceniających ryzyko rozwoju raka piersi na podstawie danych z wywiadu rodzinnego, wśród krewnych pierwszego stopnia płci żeńskiej ryzyko rozwoju tego nowotworu w ciągu życia nie powinno przekroczyć 20%. Dlatego zalecamy typowe postępowanie polegające na wykonywaniu mammografii co roku i badania piersi przez lekarza co pół roku. Z uwagi na młody wiek kobiety, która jako jedyna w rodzinie zachorowała na raka piersi, zalecamy rozpoczęcie badań przesiewowych przez jej krewnie już po ukończeniu 35 lat. Ponownie zwracamy uwagę na możliwość zmiany klasyfikacji wariantu lub pojawienie się nowych zdarzeń w wywiadzie rodzinnym, które mogą zmienić zalecenia dotyczące badań przesiewowych w kierunku nowotworu.

Testy genetyczne mogą dostarczyć ostatecznych danych dotyczących ryzyka zachorowania, natomiast wprowadzenie wysokowydajnych technologii diagnostycznych DNA zwiększyło liczbę rozpoznawanych VUS.³⁶ Należy się spodziewać dalszego wzrostu tej liczby w miarę zwiększenia dostępności testów wyodrębniających nowe geny i uzyskiwania zgody na badanie populacji dotąd ocenianych niedostatecznie, o różnych wywiadach rodzinnych. Określenie znaczenia wariantów w praktyce klinicznej jest trudne. Najlepiej ustalić je na podstawie wyników badań wielospecjalistycznych, integrujących dane dotyczące czynności białek, ewolucyjnego stopnia zachowania sekwencji genu, kosegregacji i genetyki populacji. Zaproponowano wprowadzić modele uwzględniające wszelkie dostępne dane, mające ułatwić klasyfikację VUS, ale zgromadzenie, ocena i uogólnienie tych danych stwarzają nadal problemy.^{2,40} Dlatego lekarze zalecają obecnie udzielanie porad osobom, u których wykryto VUS, opierając się na wywiadzie rodzinnym⁴⁰ i osobistych czynnikach ryzyka.⁴¹ Podkreślają też znaczenie osiągnięcia i utrzymania właściwego porozumienia między tymi osobami a ich lekarzami prowadzącymi i specjalistami w dziedzinie genetyki. Kliniki, w których są przeprowadzane testy genetyczne i ocena ryzyka, muszą opracować system umożliwiający ponowne nawiązanie kontaktu z chorym. Będzie to ważne zwłaszcza gdy w przyszłości zmieni się klasyfikacja wariantów lub staną się dostępne nowe testy genetyczne. Z czasem może się zmienić postępowanie z chorymi, u których uzyskano niejednoznaczne wyniki. Wpływają na to takie czynniki, jak zmiany w wywiadzie

osobistym i rodzinnym, zmiana klasyfikacji VUS oraz pojawienie się nowych testów genetycznych.

Wykrywanie wariantów odzwierciedla korzyści wynikające ze współpracy ze specjalistą w genetyce, np. doradcą genetycznym, w prowadzeniu badań genetycznych. Są oni szkoleni w przekazywaniu złożonych informacji genetycznych, znajomości ograniczeń testów i interpretowaniu ich wyników wobec badanych osób i ich rodzin. Stosunkowo często mają do czynienia z takimi wynikami. Doradcy genetyczni są łącznikami przekazującymi chorym nowe informacje dotyczące VUS i dostępnych testów genetycznych.

*Rebecca Mueller, BA, Andrea Forman, MS, CGC,
Angela R. Bradbury, MD*

OMÓWIENIE

Przedstawiono przypadki trzech kobiet, u których w stosunkowo młodym wieku rozpoznano raka piersi we wczesnym stopniu zaawansowania, z obciążającym wywiadem rodzinnym w kierunku raka piersi i innych nowotworów związanych z mutacją *BRCA*. Spełniały one kryteria przeprowadzenia testów w kierunku HBCO i wszechstronnej analizy sekwencji *BRCA*. Wyniki badań genetycznych wykazały jednak mutacje zarówno *BRCA1*, jak i *BRCA2*, sklasyfikowane jako VUS, ale niepowodujące uszkodzeń. Jednym z nich jest polimorfizm sekwencji genetycznej, którego wcześniej nie wiązano z rozwojem raka piersi, raka jajnika ani innych nowotworów w badanych rodzinach. Praktykujący lekarze i chorzy mają przed sobą zadanie, jak przewidzieć ryzyko wystąpienia raka piersi lub raka jajnika u chorych i członków ich rodzin oraz jak z nimi postępować. Należy też przewidzieć ryzyko wystąpienia nowotworów trzustki, gruczołu krokowego i skóry. Z uwagi na niepewność i zakres udziału tych czynników genetycznych

w powstawaniu nowotworów z każdą z tych chorych starannie omawia się strategię postępowania zmniejszającego takie ryzyko, uwzględniając jej uwarunkowania. Warianty zmian genetycznych ocenili specjaliści z Clinical Cancer Genetics, którzy użyli do tego celu modeli komputerowych służących określeniu szkodliwości danej zmiany. Takie postępowanie ułatwia złagodzenie obaw pojawiających się po uzyskaniu niejednoznacznego wyniku badania genetycznego, mającego wyjaśnić zagrożenie zachorowaniem na nowotwór. Z piśmiennictwa wynika, że chorzy stosunkowo dobrze przyjmują taką informację i jej następstwa.^{6,8,42-44} Zaleca się też wykonywanie testów oceniających rearanżacje dużych fragmentów genów *BRCA* oraz uwzględnianie innych zespołów zwiększających ryzyko rozwoju raka piersi.

W drugiej części artykułu przedstawimy szczegółowe zalecenia, jak ograniczyć takie ryzyko. Swoje opinie przedstawią specjaliści w chirurgii raka piersi, leczeniu nowotworów narządu rodnego, nowotworów układu moczowo-płciowego oraz w gastroenterologii. Przypadki chorych będą analizowane w czasie rzeczywistym, z uwzględnieniem braku pewności co do wpływu wariantów zmian genetycznych na przebieg kliniczny.

*Susan Miller-Samuel, RN, MSN,
Gloria J. Morris, MD, PhD*

© 2011, 2012 Elsevier Inc. All rights reserved. This article from Seminars in Oncology 2011;38:469-480 Variants of Uncertain Significance in Breast Cancer-Related Genes: Real-World Implications for a Clinical Conundrum. Part One: Clinical Genetics Recommendations by Susan Miller-Samuel, Deborah J. MacDonald, Jeffrey N. Weitzel, Ferdy Santiago, Martin A. Martino, Tara Namey, AnnMarie Augustyn, Rebecca Mueller, Andrea Forman, Angela R. Bradbury, Gloria J. Morris is translated and reprinted with permission of Elsevier.

PIŚMIENNICTWO

- Domchek S, Weber BL. Genetic variants of uncertain significance: flies in the ointment. *J Clin Oncol* 2008;26:16-17.
- Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB, Spurdle AB, Iversen ES, Greenblatt MS. Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum Mutat* 2008;29:1265-72.
- Gómez García EB, Oosterwijk JC, Timmermans M, et al. A method to assess the clinical significance of unclassified variants in the *BRCA1* and *BRCA2* genes based on cancer family history. *Breast Cancer Res* 2009;11:R8.
- O'Neill SC, Rini C, Goldsmith RE, Valdimarsdottir H, Cohen LH, Schwartz MD. Distress among women receiving uninformative *BRCA1/2* results: 12-month outcomes. *Psychooncology* 2009;18:1088-1096.
- Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, et al. Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. *Hum Mutat* 2008;29:1314-1326.
- Vos J, van Asperen CJ, Wijnen JT, Stiggelbout AM, Tibben AD. Disentangling the Babylonian speech confusion in genetic counseling: an analysis of the reliability and validity of the nomenclature for *BRCA1/2* DNA-test results other than pathogenic. *Genet Med* 2009;11:742-9.
- van Dijk S, Otten W, Timmermans DR, et al. What's the message? Interpretation of an uninformative *BRCA1/2* test result for women at risk of familial breast cancer. *Genet Med* 2005;7:239-45.
- Petrucelli N, Lazebnik N, Huelsman KM, Lazebnik RS. Clinical interpretation and recommendations for patients with a variant of uncertain significance in *BRCA1* or *BRCA2*: a survey of genetic counseling practice. *Genet Test* 2002;6:107-13.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007;28:622-9.
- http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf.
- Constantinidou A, Jones RL, Reis-Filho JS. Beyond triple-negative breast cancer: the need to define new subtypes. *Exp Rev Anticancer Ther* 2010;10:1197-213.

12. Ford D, Easton DF, Bishop DT, et al. Risks of cancer in *BRCA1*-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 1994;343:692-5.
13. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998;62:676-89.
14. Easton DF, Deffenbaugh AM, Pruss D, et al. A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the *BRCA1* and *BRCA2* breast cancer predisposition genes. *Am J Hum Genet* 2007;81:873-83.
15. 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;72:1117-30.
16. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutation in *BRCA1* and *BRCA2*. *Science* 2003;302:643-6.
17. Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in *BRCA1* or *BRCA2*: a review of the literature. *J Clin Oncol* 2004;22:735-42.
18. The Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer Risks in *BRCA2* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1310-6.
19. Brose MS, Timothy R, Rebbeck TR, et al. Cancer risk estimates for *BRCA1* mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1365-72.
20. van Asperen CJ, Brohet RM, Meijers-Heijboer EJ. Cancer risks in *BRCA2* families: estimates for sites other than breast and ovary. *J Med Genet* 2005;42:711-9.
21. Nichols KE, Heath JA, Friedman D, et al. TP53, *BRCA1*, and *BRCA2* tumor suppressor genes are not commonly mutated in survivors of Hodgkin's disease with second primary neoplasms. *J Clin Oncol* 2003;21:4505-9.
22. Travis LB, Hill DA, Dores GM, et al. Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with Hodgkin disease. *JAMA* 2003;290:465-75.
23. Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, et al. Limited family structure and *BRCA* gene mutation status in single cases of breast cancer. *JAMA* 2007;297:2587-95.
24. Hu N, Wang C, Han XY, et al. Evaluation of *BRCA2* in the genetic susceptibility of familial esophageal cancer. *Oncogene* 2004;23:852-8.
25. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li-Fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol* 2009;27:1250-6.
26. Chompret A, Brugieres L, Ronsin M, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer* 2000;82:1932-7.
27. Bevers TB, Armstrong DK, Arun B, et al. Breast cancer risk reduction. *J Natl Compr Cancer Netw* 2007;5:676-701.
28. Daly MB, Axilbund JE, Buys S, et al. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. *J Natl Compr Cancer Netw* 2010;8:562-94.
29. del Valle J, Feliubadalo L, Nadal M, et al. Identification and comprehensive characterization of large genomic rearrangements in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122:733-43.
30. Pilarski R. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns* 2009;18:13-27.
31. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li-Fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol* 2009;27:1250-6.
32. Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Phase II trial of the oral PARP inhibitor olaparib in *BRCA*-deficient advanced breast cancer. In: Grunberg SM, ed. 45th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. Vol 27. Orlando, FL: ASCO Publications; 2009:7s.
33. Saslow D, Boetes C, Burke W, et al. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA Cancer J Clin* 2007;57:75-89.
34. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer: implications for risk prediction. *Cancer* 1994;73:643-51.
35. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1879-86.
36. Stopfer J, Domchek S. Evaluation and management of women with *BRCA1/2* mutations. <http://www.cancernetwork.com/gynecologiccancer/content/article/10165/105318>. *Oncology* 2005;19.
37. National Cancer Institute. *BRCA1* and *BRCA2*: cancer risk and genetic testing. Retrieved November 20, 2010 from <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/BRCA>.
38. Metcalfe KA, Lynch HT, Ghadirian P, et al. The risk of ovarian cancer after breast cancer in *BRCA1* and *BRCA2* carriers. *Gynecol Oncol* 2005;96:222-6.
39. Saam J, Burbridge LA, Bowles K, et al. Decline in rate of *BRCA 1/2* variants of uncertain significance: 2002-2008. Myriad for Professionals. Retrieved November 22, 2010 from <https://www.myriadpro.com/resources/myriad-publications>.
40. Vink GR, van Asperen CJ, Devilee P, Breuning MH, Bakker E. Unclassified variants in disease-causing genes: nonuniformity of genetic testing and counseling, a proposal for guidelines. *Eur J Hum Genet* 2005;13:525-7.
41. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast cancer screening and diagnosis. Version 1.2011. www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast-screening.pdf. Accessed May 23, 2011.
42. Van Dijk S, van Asperen CJ, Jacobi CE, et al. Variants of uncertain clinical significance as a result of *BRCA1/2* testing: impact of an ambiguous breast cancer risk message. *Genet Test* 2004;8:235-9.
43. Peshkin BN, DeMarco TA, Brogan BM, et al. *BRCA1/2* testing: complex themes in result interpretation. *J Clin Oncol* 2001;19:2555-65.
44. Nelson DR. 'A variant of uncertain significance' and the proliferation of human disease gene databases. *Hum Genom* 2005;2:70-4.
45. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Colorectal Cancer Screening, Version 2.2011. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colorectal_screening.pdf Accessed May 23, 2011.