

д-р Зорница Богомилова Камбурова-Мартинова, д.м.

Сравнителен анализ на герминативни и соматични генетични варианти при овариален карцином

*Молекулярна характеристика,
клинична значимост и
терапевтични приложения*

Плевен 2026

**Сравнителен анализ на герминативни и соматични генетични варианти
при овариален карцином**

Автор:

**© д-р Зорница Богомилова Камбурова-Мартинова, д.м. – лекар – генетичен
консултант**

монография

Първо издание, 2026

Рецензенти:

Проф. д-р Иванка Исталианова Димова, дм

Доц. Драгомира Николова, дм

© Издател: ИЦ “МУ – Плевен”, ул. “св. Климент Охридски” №1

ISBN 978-954-756-375-9

**Всички авторски права са запазени! Не се разрешава копиране,
възпроизвеждане, както и разпространение на книгата или части от нея по
какъвто и да е друг начин, без разрешение на автора.**

РЕЦЕНЗИЯ

От Проф. д-р Иванка Исталианова Димова, дм

на монографичен труд на тема: „Сравнителен анализ на герминативни и соматични генетични варианти при овариален карцином: Молекулярна характеристика, клинична значимост и терапевтични приложения“

Автор: д-р Зорница Богомилова Камбурова-Мартинова

Овариалният карцином продължава да бъде едно от най-големите предизвикателства в съвременната онкогинекология поради високата си смъртност и късното диагностициране. През последните години парадигмата в онкологията се измести от чисто морфологично към дълбоко молекулярно разбиране на туморите. В този контекст трудът на д-р Камбурова-Мартинова е изключително актуален. Той разглежда овариалния карцином не просто като едно заболяване, а като съвкупност от биологично различни образувания, изискващи персонализиран терапевтичен подход. Изследването на баланса и взаимодействията между наследствената предразположеност (герминативни варианти) и придобитите туморни изменения (соматични мутации) е на гребена на вълната на съвременната прецизна медицина.

Монографията притежава класическа, логична и добре балансирана академична структура. Тя превежда читателя от фундаменталните епидемиологични и етиологични концепции през детайлната молекулярна класификация и патогенеза до чисто практическите и приложни аспекти на персонализираната медицина и генетичното консултиране.

Особено впечатление прави интердисциплинарният модел, който съчетава клинична практика, онкопатология и високотехнологична медицинска генетика. Обосноваването на методологията — използването на масивно паралелно секвениране (NGS) — е напълно адекватно за целите на изследването. Използването на паралелен анализ на ДНК от периферна кръв и от туморна тъкан (FFPE) за една и съща кохорта пациенти е „златен стандарт“ за разграничаване на наследствените от придобитите генетични събития.

Авторът демонстрира отлична осведоменост по отношение на международната литература и съвременните теории. Много добре са представени съвременните концепции за произхода на високостепенния серозен карцином от фалопиевите тръби и ролята на хроничното възпаление в туморогенезата.

Най-стойностната и оригинална част на монографията е собственото проучване, представено в Глава 11. Изследването на 33 български пациентки с овариален карцином запълва локалните и популационни данни за България. Оценката на

съотношението между герминативните и соматичните мутации предоставя реални клинични доказателства за т.нар. хипотеза за „двойния мутационен удар“ при инактивацията на тумор-супресорните гени (като *BRCA1* и *RAD51D*). Патогенни или вероятно патогенни герминативни варианти са идентифицирани при 9 от 33 пациентки (27,3%), което показва дял от почти една трета на наследствения овариален карцином сред изследваните жени. Най-често засегнатият ген е *BRCA1*, като патогенни варианти в него са открити при 3 пациентки (9,1% от цялата кохорта). Освен това са установени по един път патогенни варианти в гените *ATM*, *RAD51D*, *NBN*, *FANCL* и *WRN*. При една пациентка е установено наличие на патогенни герминативни варианти в два гена, асоциирани с онкологична предразположеност (*TP53* и *FANCF*), покриващо критериите за синдром на мултилокусна наследствена неоплазия (MINAS). За всички пациентки с установени герминативни варианти е представена подробна информация, включваща анамнестични данни, генеалогичен анализ, генетичен анализ, интерпретация на откритите варианти, препоръки на генетичната консултация.

Авторът напълно обосновано поставя фокус върху мутациите в *TP53* и дефицита в хомоложната рекомбинация (HRD). Това има пряко отношение към избора на терапия с PARP инхибитори и прогнозирането на платиновата чувствителност на туморите. В съответствие с данните от TCGA, в изследваната група пациентки най-често засегнатият ген е *TP53*, като патогенни или вероятно патогенни соматични варианти в него са установени при 21 пациентки (63,6%). Алелната честота на тези изменения варира от 15% до 97%, което отразява туморната хетерогенност и наличието на клонални/субклонални събития. Втората по честота група соматични изменения засяга *PIK3CA*, установен при 4 пациентки (12,1%). За разлика от *TP53*, тези мутации се срещат както при серозни, така и при несерозни подтипове. Активиращите мутации в *KRAS* са идентифицирани при 2 пациентки (6,1%), а в единични случаи са установени мутации в гените *BRAF*, *ERBB2* и *AKT1* (3% всяка). Дефицитът на хомоложната рекомбинация (homologous recombination deficiency, HRD) е характерен за значителна част от високостепенните серозни овариални карциноми и е пряко свързан с герминативни или соматични промени в гени, участващи в репарацията на двуверижните разкъсвания на ДНК. За разлика от директното генотипиране на единичен ген, HRD често се доказва чрез функционални сурогати, отразяващи следствията на дефектната репарация. Най-широко използваната концепция е геномното „scar“ профилиране, базирано на: LOH (loss of heterozygosity), TAI (telomeric allelic imbalance), LST (large-scale state transitions), които се интегрират в композитни HRD-скорове. В монографичният труд пространно се разглеждат аспектите на HRD тестването, макар и такова конкретно

да не е проведено при изследваните пациентки. В рамките на изследваната кохорта се очертават три молекулярни сценария: 1) Наследствено доминиран модел – HR-гени + *TP53*; 2) Соматично доминиран *TP53* модел – без установен герминативен вариант; 3) Сигнално-активиран модел – MAPK/PI3K драйвър при липса на HR-генна мутация. Тези модели не са взаимно изключващи се и могат да се припокриват, което отразява сложната клонална еволюция на заболяването.

Високостепенният серозен карцином се характеризира с висока геномна нестабилност и почти универсална асоциация с *TP53* дисфункция, като в значима част от случаите се наслагва HRD фенотип поради герминативни и/или соматични изменения в гени, свързани с репарацията чрез хомоложна рекомбинация (HRR). HRD не само обуславя висока степен на хромозомна нестабилност, но и определя чувствителността на туморите към платинови производни и PARP инхибитори, което превръща този механизъм в ключов терапевтичен таргет. HRD се утвърждава като централна ос за молекулярна стратификация на серозните високостепенни карциноми и на част от тубарните карциноми. Молекулярната стратификация не следва да се ограничава до *BRCAl/2*, а да включва по-широк спектър от гени в хомоложната рекомбинация и свързаните пътища. Насочването към комбиниране на генотипен HRR анализ с HRD скоринг ще подобри стратификацията за PARP-инхибиторна терапия и ще позволи идентификация на HRD-позитивни случаи без очевидни патогенни варианти в HRR гени. Това направление е критично за максимално обхващане на пациентите, които могат да се възползват от таргетни терапии.

Монографията на д-р Зорница Камбурова-Мартинова представлява завършен, задълбочен и иновативен научен труд. Тя има както ясен научен принос (генериране на специфични за българската популация геномни данни при овариален карцином), така и сериозен научно-приложен и практически принос. Авторът предлага работеща рамка за интерпретиране на комплексни NGS данни, което е от полза за сформирането на мултидисциплинарни онкологични комитети.

Трудът напълно отговаря на изискванията за монографично изследване и горещо го препоръчвам на вниманието на медицинските генетици, онколози, патолози и гинеколози в страната.

РЕЦЕНЗЕНТ:

Проф. д-р Иванка Исталианова Димова, дм

РЕЦЕНЗИЯ

от Доц. Драгомира Николова, дм

на монография на тема: „Сравнителен анализ на герминативни и соматични генетични варианти при овариален карцином“

Автор: д-р Зорница Богомилова Камбурова – Мартинова, дм

Представеният труд на тема „Сравнителен анализ на герминативни и соматични генетични варианти при овариален карцином“ разглежда един от най-актуалните и клинично значими проблеми в съвременната онкогенетика. Овариалният карцином се характеризира с неблагоприятна дългосрочна преживяемост, свързана с липсата на ефективен скрининг и късната поява на клинични симптоми. Анализирани са ключови аспекти като епидемиология, рискови фактори, включително ролята на хроничното възпаление като канцерогенен стимул, както и генетичните механизми – нарушаване на клетъчния цикъл, сигнални пътища и епигенетични процеси. Акцент е поставен върху носителството на мутации във високо пенетрантни гени и тяхното значение за патогенезата, както и върху съвременните терапевтични подходи, включително платинова чувствителност, синтетична леталност и приложението на PARP инхибитори, имунотерапия и антиангиогенни агенти. Изследването задълбочено разглежда ролята на соматичните мутации при овариалния карцином, като анализира различните хистологични подтипове и тяхната молекулярна характеристика. Особено внимание е отделено на клоналната и вътретуморната хетерогенност като ключов фактор за туморна прогресия, рецидив и терапевтична резистентност. Обсъдени са механизмите на възникване на резистентност, включително появата на реверсивни мутации и възстановяване на хомоложната рекомбинация при лечение с PARP инхибитори, което подчертава необходимостта от динамично и многократно молекулярно профилиране в хода на заболяването.

Съществен принос на труда е приложението на съвременни NGS-базирани диагностични подходи и използването на таргетни генни панели за овариален карцином. Подробно са разгледани ограниченията при интерпретацията на генетичните варианти, както и методологичните предизвикателства, свързани с разграничаването на герминативни от соматични изменения при анализ на периферна кръв, включително влиянието на клонална хематопоеза, cfDNA и ctDNA. Правилно се отбелязва, че сравнението между панели с различен генен обхват ограничава възможността за директна съпоставимост на резултатите.

Въпреки относително малкия брой изследвани пациентки (33), проучването има стойност на пилотен анализ и поставя основите на бъдещи по-мощни изследвания

в българската популация. Поставени са високи критерии за качество на секвенирането, включително по отношение на дълбочината на прочитите, което гарантира надеждността на получените данни.

Резултатите от извършените анализи демонстрират ясно изразени различия между серозните и несерозните подтипове на овариалния карцином. Най-изразен е сигналят при мутациите в TP53, които се установяват при приблизително 64% от случаите и доминират при високостепенния серозен карцином. За разлика от тях, измененията в PIK3CA (12,1%) показват по-хетерогенно разпределение. Допълнително са идентифицирани мутации в гени от RAS/RAF/MAPK каскадата, както и в PI3K/AKT/mTOR сигналния път, включително класически варианти като E542K, E545K и H1047Y.

Особено ценен аспект е представянето на реални клинични случаи, което придава практическа стойност на анализа. Подробно са разгледани както соматичните, така и герминативните мутации, включително чести изменения в BRCA1/2 и по-редки варианти в гени като WRN, NBN и FANCL. Наблюдаваните комбинирани герминативно-соматични профили подкрепят модела на натрупване на геномна нестабилност, при който герминативната предиспозиция създава предпоставка за последващи соматични „second hit“ събития.

Разгледано е и значението на генетичното консултиране преди и след провеждане на изследванията, включително необходимостта от каскадно тестване на родственици. Подчертава се, че отсъствието на фамилна обремененост не изключва наследствена етиология, което има важно практическо значение. Интерес представлява и хипотезата, че наличието на повече от един предразполагащ ген може да има кумулативен ефект върху туморната биология, без да води до различен хистологичен фенотип.

В заключение, трудът представлява задълбочено и добре структурирано изследване, което допринася за по-доброто разбиране на молекулярната патогенеза на овариалния карцином. Подчертава се значението на интегрирания анализ на герминативна и туморна ДНК, ролята на NGS технологиите и необходимостта от висока експертиза при интерпретацията на резултатите. Въпреки ограниченията, свързани с размера на извадката, изследването поставя стабилна основа за бъдещи разработки, включително в областта на епигенетиката, лекарствената резистентност и развитието на персонализирана медицина в България.

Доц. Драгомира Николова, дм

СЪДЪРЖАНИЕ

Предговор

1. Увод

- 1.1. Актуалност на проблема
- 1.2. Историческо развитие на познанията за овариалния карцином
- 1.3. Съвременни концепции за произхода и биологията на заболяването
- 1.4. Цел и задачи на монографията
- 1.5. Методологичен подход и структура на изложението

2. Епидемиология на овариалния карцином

3. Етиология, рискови фактори и патогенетични механизми за развитие на овариалния карцином

- 3.1. Овариалният карцином като мултифакторно заболяване
- 3.2. Рискови фактори
- 3.3. Патогенетични механизми за възникване на ОК

4. Хистологична и молекулярна класификация на овариалния карцином

- 4.1. Традиционна хистопатологична класификация
 - 4.1.1. Серозни тумори
 - 4.1.2. Ендометриоидни тумори
 - 4.1.3. Светлоклетъчни тумори
 - 4.1.4. Муцинозни тумори
- 4.2. Двухипен модел на овариалния карцином (Type I и Type II)
- 4.3. Молекулярна класификация и интегративни модели
- 4.4. Корелация между хистологични и молекулярни подтипове
- 4.5. Клинично значение на молекулярната класификация

5. Генетични механизми в патогенезата на овариалния карцином

- 5.1. Геномна нестабилност като основен патогенетичен механизъм
- 5.2. Нарушения в репарацията на ДНК
 - 5.2.1. Хомоложна рекомбинация
 - 5.2.2. Mismatch репарация
- 5.3. Дисрегулация на клетъчния цикъл и апоптозата
- 5.4. Сигнални пътища, участващи в туморогенезата
- 5.5. Епигенетични механизми и регулация на генната експресия

6. Роля на герминативните генетични варианти

- 6.1. Гени за предиспозиция към ОК, според пенетрантността им
 - 6.1.1. Гени с висока пенетрантност
 - 6.1.2. Гени с умерена пенетрантност
 - 6.1.3. Генни локуси с ниска пенетрантност

7. Роля на соматичните мутации и туморна еволюция при овариалния карцином

- 7.1. Соматични драйвърни събития
- 7.2. Подтип-специфични соматични изменения
- 7.3. Клонална хетерогенност
- 7.4. Туморна еволюция и селективен натиск
- 7.5. Механизми на терапевтична резистентност
- 7.6. Клинични приложения на туморната еволюция

8. Молекулярно-генетична диагностика и NGS подходи

- 8.1. Принципи на масивно паралелно секвениране
- 8.2. Видове NGS панели при овариален карцином
- 8.3. Анализ на герминативна и туморна ДНК
- 8.4. Интерпретация и класификация на генетичните варианти

8.5. Ограничения и предизвикателства на NGS диагностиката

8.6. Препоръчителен минимален генетичен панел при овариален карцином (практически обзор)

9. Терапевтични приложения и персонализирана медицина

9.1. Генетични биомаркери за терапевтичен отговор

9.2. HRD статус и таргетна терапия

9.3. Роля на генетичните фактори при избор на лечение

9.4. Молекулярно насочени терапии

9.5. Персонализирани терапевтични стратегии

10. Генетично консултиране при наследствени форми на ОК

10.1. Генетични тестове – насоки за избор на подходящ тест

10.2. Генетично консултиране преди извършване на теста (пред-тестово консултиране)

10.2.1. Оценка на персоналната и фамланата история

10.2.2. Показания за провеждане на генетичен тест за предиспозиция

10.3. Генетично консултиране след извършване на генетичен тест – анализ на резултатите от теста, препоръки на генетичната консултация (прогноза, терапевтично поведение, репродукция)

10.3.1. Генетично консултиране на изследвания пациент

10.3.2. Генетично консултиране на родственици на изследвания пациент. Каскадно тестване.

10.3.3. Допълнителни ваходки от генетичния тест

10.3.4. Обсъждане на репродуктивни рискове

11. Представяне на резултати от собствено проучване

11.1. Дизайн и цели на проучването

11.2. Материали и методи

11.2.1. Пациентска кохорта и дизайн на проучването

11.2.2. Изолиране на герминативна ДНК и NGS анализ

11.2.3. Изолиране на туморна ДНК и NGS анализ

11.2.4. Анализ и класификация на вариантите

11.2.5. Биоинформатичен анализ и детекция на големи геномни пренареждания

11.2.6. Статистически анализ

11.3. Ограничения на проучването

11.4. Резултати и обсъждане

11.4.1. Клинична и хистологична характеристика на пациентите

11.4.2. Установени герминативни варианти в изследваната кохорта

11.4.3. Разпределение на герминативните варианти според хистологични подтип

11.4.4. Разпределение на герминативните варианти според възрастта на

диагностициране

11.4.5. Анализ на соматичните варианти в изследваната кохорта

11.4.6. Анализ на разпределението на соматичните варианти по хистологичен

подтип

11.4.7. Сравнителен анализ на комбинирания герминативно-соматичен профил в изследваната кохорта

11.5. Клинични случаи

12. Заключение

12.1. Основни изводи

12.2. Принос на монографията

12.3. Насоки на бъдещи изследвания

Литература

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА КИРИЛИЦА

АК – аминокиселина

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

ИХХ – имунохистохимия

КРК – колоректален карцином

МОК – муцинозен овариален карцином

ОК – овариален карцином

ОР – относителен риск

ПВ – патогенен вариант

П/ВП – патогенен/вероятно патогенен

РГ – рак на гърда

РДЧ – рак на дебело черво

СЕОК – синхронен ендометриален и овариален карцином

СОК – светлоклетъчен овариален карцином

УЗД – ултразвукова диагностика

ХЗТ – хормонозаместителна терапия

ХР- хомоложна рекомбинация

ЯМР – ядрено-магнитен резонанс

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА ЛАТИНИЦА

APC – Adenomatosis polyposis coli
AT – Ataxia teleangectasia
CDK – циклин зависими кинази
ClinVar – База данни за клинично значими генетични варианти
DSB – двойно-верижни разкъсвания
FA – Fanconi anemia
FIGO – Международна организация по гинекология и акушерство
GnomAD – The Genome Aggregation Database
GWAS – Genome Wide Association Study
HDAC – хистон-ацетилтрансфераза и хостон-деацетилаза
HR – хомоложна рекомбинация
HRD – дефицит на хомоложна рекомбинация
LFL – Синдром на Li Fraumeni – like
LFS – Синдром на Li Fraumeni
LOF – loss of function
LOH – loss of heterozygosity
LS – Синдром на Lynch
LST – large-scale state transition
MAPK – митоген-активираща протеин киназа
MINAS - Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome
MMR – mismatch репарация на ДНК
MS – микросателити
MSI – микросателитна нестабилност
NCCN – National Comprehensive Cancer Network
NER – нуклеотид ексцизионно възстановяване
NGS – секвениране от следващо поколение
NHEJ – нехомоложно свързване на краищата
NSGC – National Society of Genetic counselor
OR – odds ratio
PCR – Polimerase chain reaction
PGT – Preimplantation genetic test
SBS – sequencing by synthesis
TAI – telomeric allelic imbalance
VUS – варианти с неясно клинично значение
WES – пълно екзомно секвениране
WGS – пълно геномно секвениране
WHO – световната здравна организация

Всички включени в монографията изследвания са извършени в Център за компетентност „Леонардо Да Винчи“ към Медицински университет-Плевен

Настоящите изследвания са финансирани изцяло по проект BG05M2OP001-1.002-0010-C01 "ЦЕНТЪР ЗА КОМПЕТЕНТНОСТ ПО ПЕРСОНАЛИЗИРАНА МЕДИЦИНА, 3D И ТЕЛЕМЕДИЦИНА, РОБОТИЗИРАНА И МИНИМАЛНО ИНВАЗИВНА ХИРУРГИЯ" към Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ и Европейския фонд за регионално развитие.

ПРЕДГОВОР

Овариалният карцином е едно от най-сериозните предизвикателства в съвременната онкогинекология поради късната диагностика, агресивния клиничен ход и сложната му биологична хетерогенност. През последното десетилетие молекулярната онкология трансформира разбирането за това заболяване, като разкри, че зад общата клинична диагноза се крие спектър от генетично и функционално различни подтипове, определяни от специфични герминативни и соматични изменения.

Настоящата монография е посветена на сравнителния анализ на герминативни и тумор-специфични генетични варианти при овариален карцином, базиран на клинично-молекулярно изследване на 33 пациентки чрез масивно паралелно секвениране (NGS). Основната цел е да се интегрират данните от наследствената предиспозиция и туморната геномна еволюция в единна аналитична рамка, която да подпомогне персонализирания диагностичен и терапевтичен подход.

Особено внимание е отделено на ролята на хомоложната рекомбинация, HR-дефицита и TP53-доминантните механизми на геномна нестабилност, както и на подтип-специфичните мутационни профили при високостепенни серозни и несерозни карциноми. Чрез съпоставянето на герминативни и соматични варианти се демонстрира моделът на взаимодействие между наследствената предиспозиция и клоналната туморна еволюция, който има пряко отражение върху терапевтичните решения и фамилното консултиране.

Монографията има за цел не само да представи резултати, но и да предложи приложима рамка за интерпретация на NGS данни в клиничната практика. В условията на бързо развиваща се геномна медицина става все по-осезаема необходимостта от стандартизирани подходи към молекулярната диагностика, правилна вариантна класификация и мултидисциплинарна интерпретация.

Трудът е предназначен за лекари по медицинска генетика, онколози, патолози, гинеколози, специализанти и студенти по медицина, както и за всички специалисти, ангажирани в областта на персонализираната онкогенетика.

В контекста на съвременната молекулярна онкология овариалният карцином се очертава като моделно заболяване, при което интеграцията на герминативната и соматичната геномика открива нови възможности за диагностика, лечение и превенция.

1. Увод

1.1. Актуалност на проблема

Овариалният карцином заема особено място сред злокачествените заболявания при жените поради диспропорцията между честотата му и високата смъртност, която го характеризира. Макар да се диагностицира по-рядко в сравнение с други онкологични заболявания на женската репродуктивна система, той остава водеща причина за летален изход в рамките на онкогинекологията (1). Този факт отразява не толкова агресивността на всички форми на заболяването, колкото съвкупността от биологични и клинични особености, които затрудняват ранното му разпознаване.

Клиничната изява на овариалния карцином често е неспецифична и се развива постепенно, което води до късно диагностициране и ограничени възможности за радикално лечение. В този контекст заболяването се превръща не само в медицински, но и в значим социален проблем, свързан с продължително лечение, високи разходи за здравната система и сериозно отражение върху качеството на живот на пациентките и техните семейства (2). Хетерогенността на заболяването допълнително усложнява терапевтичния подход и налага интеграция на клинични, хистологични и молекулярно-генетични данни в процеса на вземане на решения (3).

1.2. Историческо развитие на познанията за овариалния карцином

Развитието на научните представи за овариалния карцином преминава през няколко основни етапа, отразяващи напредъка на медицинската наука като цяло. В продължение на десетилетия заболяването е било възприемано като хомогенна нозологична единица, дефинирана основно чрез морфологични характеристики и клинично протичане. Този подход е ограничавал възможностите за диференцирана диагностика и индивидуализирано лечение (4).

Постепенното въвеждане на хистопатологични и имунхистохимични методи позволява разграничаването на различни хистологични подтипове и поставя началото на по-прецизна класификация. Паралелно с това епидемиологичните наблюдения водят до формулиране на ключови хипотези относно ролята на репродуктивните фактори,

включително идеята, че кумулативният ефект от повтарящите се овулационни цикли може да допринася за канцерогенезата (5).

С навлизането на молекулярната генетика се осъществява фундаментална промяна в разбирането за заболяването. Идентифицирането на наследствени форми и на специфични генетични пътища в патогенезата трансформира овариалния карцином от морфологично дефинирано заболяване в молекулярно стратифицирана група неоплазми (6)

1.3. Съвременни концепции за произхода и биологията на заболяването

Съвременният научен консенсус разглежда овариалния карцином като сбор от биологично различни заболявания, които споделят анатомична локализация, но се различават по произход, молекулярен профил и клинично поведение. Натрупаните данни показват, че за част от най-агресивните подтипове първичният туморен процес възниква извън самия яйчник, като фалопиевата тръба се утвърждава като ключов източник на високостепенния серозен карцином (7).

За други хистологични форми се предполага връзка с хронични възпалителни състояния и патологични процеси като ендометриозата, което подчертава значението на тъканната микросреда и локалния имунен отговор. От биологична гледна точка овариалният карцином се характеризира с динамична геномна архитектура, изразена клонална хетерогенност и способност за адаптация под селективен натиск, включително в условията на системна терапия (8)

Тези характеристики определят заболяването като еволюираща система, при която генетичните изменения не са статични маркери, а активни участници в процесите на прогресия и терапевтична резистентност (9).

1.4. Цел и задачи на монографията

Целта на настоящата монография е да предложи интегративен и задълбочен анализ на овариалния карцином, който обединява клинични, хистологични и молекулярно-генетични аспекти в единна концептуална рамка. Чрез критично осмисляне на съвременните научни данни трудът цели да допринесе за по-доброто разбиране на биологичната хетерогенност на заболяването и за усъвършенстване на диагностичните, прогностичните и терапевтичните подходи.

Наред с обзорния и аналитичен характер, монографията има и изразен **изследователски фокус**, като в нея се представят и анализират **резултати от собствено проучване**, насочено към **сравнителен анализ на герминативни и соматични генетични варианти при пациенти с овариален карцином**. Генетичните изследвания са проведени чрез **масивно паралелно секвениране (next-generation sequencing, NGS)**, което позволява детайлна молекулярна характеристика както на туморната, така и на герминативната ДНК и осигурява основа за прецизна интерпретация на генетичните находки в клиничен контекст.

Основните задачи на монографията включват:

- систематизиране на съвременните епидемиологични и етиологични данни за овариалния карцином;
- представяне и критичен анализ на хистологичните и молекулярните класификации;
- изследване на ролята на герминативните и соматичните генетични изменения в патогенезата и туморната еволюция;
- анализ и интерпретация на резултатите от собственото NGS-базирано проучване;
- оценка на клиничните и терапевтичните приложения на молекулярно-генетичните находки;
- обсъждане на възможностите за персонализирана медицина, генетично консултиране и превенция.

1.5. Методологичен подход и структура на изложението

Монографията е разработена чрез аналитичен и синтетичен подход, базиран на критичен преглед на международната научна литература и актуалните клинични препоръки. Използваният интердисциплинарен модел съчетава данни от клиничната практика, патологичната диагностика и медицинската генетика.

Структурата на труда следва логиката на постепенно задълбочаване – от общите епидемиологични и етиологични аспекти към молекулярните механизми и клиничните приложения. Този подход позволява разглеждането на овариалния карцином като комплексно, динамично и биологично хетерогенно заболяване, чието разбиране изисква интеграция на знания от различни области (3,9).

2. Епидемиология на овариалния карцином

Овариалният карцином (ОК) представлява значимо онкологично заболяване с относително ниска честота на диагностициране, но с висока смъртност. По последни глобални оценки, публикувани от Международната агенция за изследване на рака (IARC), през 2022 г., в света са диагностицирани **324 398 нови случая на овариален карцином**, заболяването заема водещо място сред гинекологичните злокачествени тумори по отношение на леталитет (10,11).

В същия период **смъртните случаи в световен мащаб възлизат на 206 839 жени**, което подчертава неблагоприятната прогноза на заболяването въпреки напредъка в съвременната онкология. Изчисленият **кумулятивен популяционен риск за развитие на ОК до 74-годишна възраст** за жените в общата популация е приблизително **0,7–1,0%**, като съществуват съществени географски различия (10,11).

За България, според данните от **European Cancer Inequalities Registry** и моделните оценки на GLOBOCAN, **очакваният брой на новодиагностицираните случаи на ОК е приблизително 750–820 годишно**, което съответства на **по-висок кумулативен риск в сравнение със средните световни стойности** (11). Общият популяционен риск за развитие на ОК при българските жени се оценява на около **1,1–1,3%**, което поставя страната сред държавите с относително неблагоприятен епидемиологичен профил за това заболяване (12).

Смъртността от ОК остава висока, главно поради **липсата на ефективен скрининг и късната поява на клинични симптоми**: при над 70% от пациентките диагнозата се поставя в **III или IV клиничен стадий** (1,10). Това обуславя ограничените терапевтични възможности и неблагоприятната дългосрочна преживяемост въпреки въвеждането на таргетни терапии и персонализиран подход в лечението.

3. Етиология, рискови фактори и патогенетични механизми за развитие на овариален карцином

3.1. Овариалният карцином като мултифакторно заболяване

Овариалният карцином представлява типичен пример за мултифакторно онкологично заболяване, при което злокачествената трансформация е резултат от продължително и сложно взаимодействие между генетични, хормонални, репродуктивни, възпалителни и средови фактори. Заболяването не може да бъде обяснено чрез единичен етиологичен механизъм, а се развива като крайна изява на кумулативни биологични процеси, действащи синергично и вариращи по интензитет между отделните пациентки и хистологични подтипове (3).

Генетичната предразположеност формира базисния индивидуален риск за развитие на овариален карцином, като определя чувствителността на клетките към допълнителни етиологични въздействия. Герминативните и соматичните изменения в гени, участващи в поддържането на геномната стабилност, репарацията на ДНК и контрола на клетъчния цикъл, не действат изолирано, а модифицират ефекта на други рискови фактори. В този контекст генетичните фактори могат да бъдат разглеждани като „модификатори на риска“, които понижават прага за злокачествена трансформация при наличие на хормонални или възпалителни стимули (13).

3.2. Рискови фактори

Репродуктивни и хормонални фактори

Репродуктивната история е сред най-добре установените компоненти на мултифакторната етиология на овариалния карцином. Продължителният овулаторен живот, ранната менархе и късната менопауза са асоциирани с повишен риск, което подкрепя хипотезата, че повтарящите се овулационни цикли водят до хронично тъканно увреждане и регенерация. Тези процеси увеличават вероятността за натрупване на ДНК увреждания, особено при наличие на генетично предразположение (5).

Хормоналната регулация действа в тясна връзка с репродуктивните фактори, като естрогените стимулират клетъчната пролиферация, а прогестеронът има по-скоро диференциращ и протективен ефект. Дисбалансът между тези хормонални влияния може да засили ефекта на генетичните дефекти и да ускори прехода към неопластичен фенотип (14).

Хронично възпаление и тъканна микросреда

Хроничното възпаление представлява ключов посредник в мултифакторната етиология на овариалния карцином. Повтарящата се овулация, ендометриозата и локалните възпалителни процеси водят до освобождаване на проинфламаторни цитокини, растежни фактори и реактивни кислородни радикали. Тези медиатори индуцират ДНК увреждания, епигенетични промени и ремоделиране на тъканната микросреда, което създава условия за селекция на трансформирани клетки (15).

Особено ясно този механизъм се наблюдава при ендометриоидния и светлоклетъчния овариален карцином, където хроничното възпаление, асоциирано с ендометриоза, действа като дългосрочен канцерогенен стимул в присъствието на специфични генетични изменения (16).

Средови и метаболитни фактори

Средовите фактори допълват мултифакторния риск, като модифицират системния хормонален и възпалителен фон. Затлъстяването и метаболитните нарушения са свързани с хронично възпаление и повишена естрогенна експозиция, които могат да усилят ефекта на локалните тъканни увреждания. В този модел средовите фактори не са първопричина, а усилващи елементи, които взаимодействат с генетичната и репродуктивната предразположеност (8).

Тъканен произход и етиологична хетерогенност

Съвременните концепции за тъканния произход на овариалния карцином допълнително подчертават неговия мултифакторен характер. Различните хистологични подтипове произлизат от клетки с различен произход, включително фалопиевата тръба, ендометриума и повърхностния яйчников епител. Всяка от тези тъкани е подложена на

специфична комбинация от генетични, хормонални и възпалителни въздействия, което води до различни етиологични пътища, завършващи с клинично сходен, но биологично хетерогенен туморен фенотип (14).

Интегративен модел на мултифакторната етиология

В рамките на интегративния модел овариалният карцином се разглежда като резултат от натрупване на субклинични увреждания, които постепенно преодоляват компенсаторните механизми на клетката. Генетичната уязвимост определя чувствителността към тези увреждания, репродуктивните и хормоналните фактори влияят върху интензитета на клетъчната пролиферация, а възпалителната и метаболитната среда определят селективните условия за клонална еволюция (17).

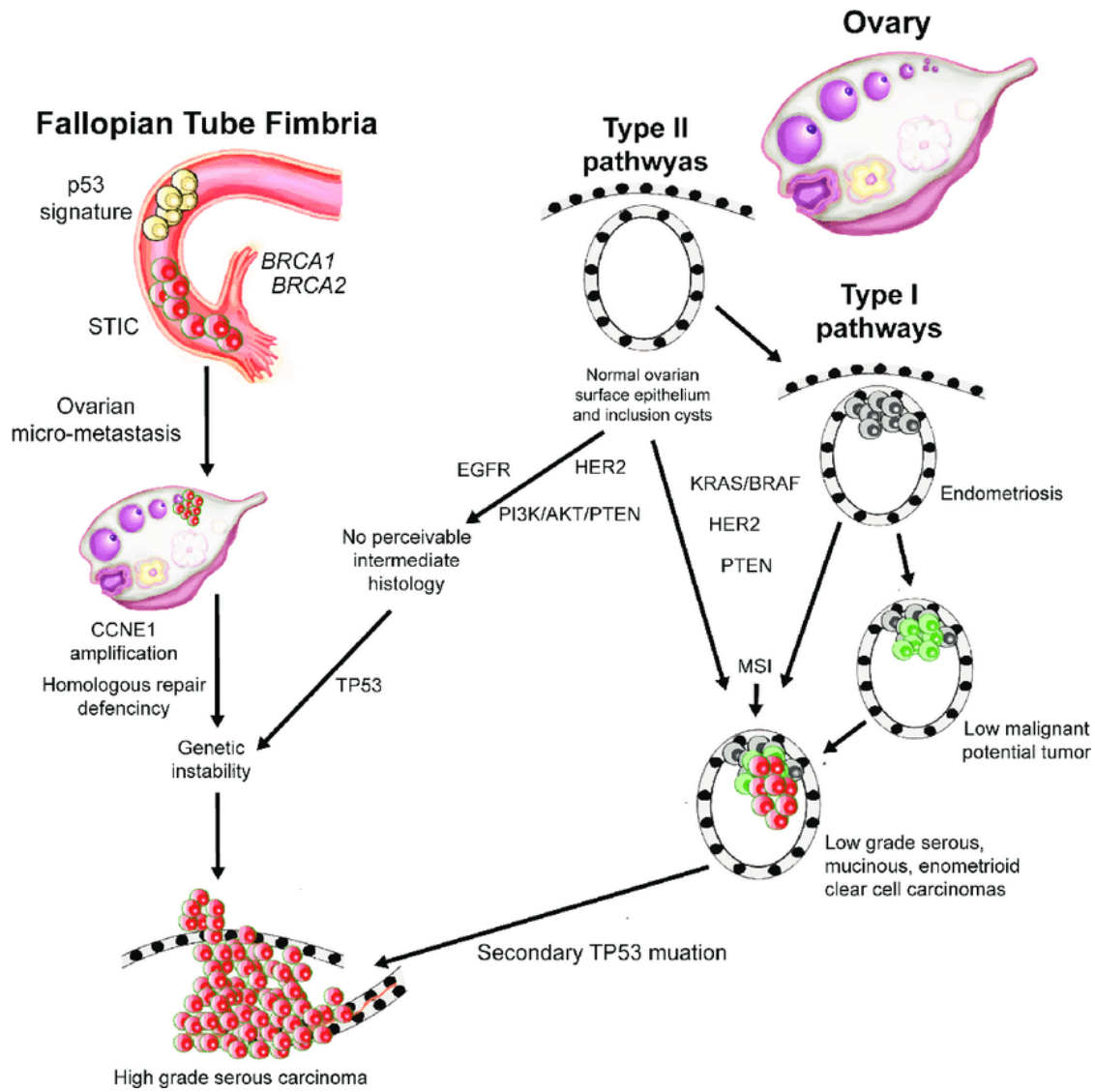
В заключение, разглеждането на овариалния карцином като мултифакторно заболяване позволява по-дълбоко разбиране на неговата етиологична хетерогенност и вариабилно клинично протичане. Интеграцията на генетични, хормонални, възпалителни и средови фактори в единна концептуална рамка създава основа за персонализирани стратегии за профилактика, ранна диагностика и терапия, съобразени с индивидуалния риск и биологията на тумора (1).

3.3. Патогенетични механизми за възникване на ОК

Години наред се смяташе, че ОК възниква главно от епителните клетки на повърхността на яйчниците. Предложени са обаче две нови хипотези за патогенезата на ОК. При първия механизъм, генетичните промени, възникващи в нормалния повърхностен яйчников епител или яйчниковите кисти, са подложени на изменения по два пътя: единият е ниско-диференциран, чиято еволюция води до създаване на ниско-диференцирани клетки, без да преминава през забележима междинна хистология и другият – високо-диференциран път, чиято еволюция минава през ясно различими хистологични етапи от доброкачествени и неинвазивни лезии до злокачествени клетки със склонност към инвазия. Тази първа хипотеза от 1970 г. изказва твърдението, че епителните клетки на повърхността на яйчниците претърпяват повтарящ се стрес през множество овулационни цикли, което довежда до възпаление, увреждане на ДНК и инициране на туморогенеза (18). Тази

хипотезата беше частично подкрепена от доказателства за намаления риск от ОК с употребата на орални контрацептиви, които инхибират овулацията (19,20). Други доказателства в подкрепа на тази хипотеза е доказаната връзка между броя на циклите на овулацията през целия живот и увеличението на случаите на ОК (21). В допълнение е установено, че ОК е рядък при други примати с по-малък броя овулационни цикли от хората (22) и по-чест при кокошки, които са били индуцирани към честа овулация (23). Годуин и колеги са едни от първите изследователи. Те са създали епителни култури от повърхността на яйчниците от плъх и човек и използвали модела на непрекъсната овулация *in vitro*, като механизъм за трансформация и туморогенеза (24).

Втората теория, която придоби голяма популярност през последното десетилетие, описва модел на прогресия, при който прекурсорите на ОК се развиват във фимбриите от окултен серозен тубарен интраепителен карцином и метастазират в яйчника (25,26). Поради агресивната природа на ниско-диференцираните серозни овариални карциноми (*high-grade serous ovarian cancer*, HGSC) и наличието на ранна геномна нестабилност, се предполага, че HGSC са метастатични лезии от епителните клетки на фалопиевите тръби (Фигура 1).



Фигура 1. Патогенетични механизми за еволюция на ОК (27).

Според приетите препоръки за профилактика на HGSC, при жени носителки на *BRCA* мутация се препоръчва да се подложат на двустранна салпингоофоректомия (отстраняване на двата яйчника заедно с фалопиевите тръби), вместо само оофоректомия (отстраняване само на яйчници) (28, 29). Въпреки това съществуват някои доказателства, показващи независима клонална еволюция между тубулни лезии и синхронни тумори при някои пациентки, показващи, че част от лезиите във фалопиевите тръби представляват микрометастази от ендометриален ендометроиден карцином (30).

Други изследвания доказват различен патогенетичен път на карциномите, при който соматичните прекурсорни (стволови) клетки претърпяват онкогенна трансформация и се превръщат в ракови клетки, даващи начало на туморогенезата (31,32). Този механизъм се оспорва с доказателствата, че раковите клетки притежават висока изменчивост и мога да покажат фенотип на стволови клетки поради претърпяни генетични изменения във вече диференцираните клетки (33). Въпреки това е известно, че на повърхността на яйчниците, както и по епитела на фалопиевите тръби има ниши със стволови клетки (клетки с регенеративни свойства), които биха могли да служат като прогениторни клетки за ОК (34).

Някои доказателства подкрепят съществуването на стволови клетки в мястото между повърхността на яйчниците и фалопиевите тръби, което помага за възстановяването на увреждането на повърхността на яйчниците след освобождаването на зрелия фоликул (35). Тъй като, тези ниши със стволови клетки са разположени в близост до зоните на възстановяване на повърхността на яйчниците и фалопиевите лезии, прекурсорните лезии могат да бъдат горещи точки за развитието на тумори от мутации в соматичните стволови клетки.

Взети заедно, всички тези данни са в подкрепа на това, че патогенезата на рака на яйчниците е сложна и по този начин допринася за клиничните трудности при ранното откриване на заболяването.

*За целите на представянето на настоящото проучване, въпреки, че съществуват определени различия, ще бъдат използвани термините мутация, патогенен генетичен вариант, и генетични изменения като синоними, имайки предвид генетични дефекти с клинично значение.

4. Хистологична и молекулярна класификация на овариалния карцином

Хистологичната и молекулярната класификация на овариалния карцином представлява фундаментален елемент за разбирането на биологичната хетерогенност на заболяването и за изграждането на съвременни диагностични и терапевтични стратегии. Дълго време овариалният карцином се е разглеждал като единно заболяване с морфологични вариации. Натрупването на молекулярно-генетични данни обаче ясно показва, че под общото наименование се обединяват биологично различни неоплазми, възникващи от различен тъканен произход, с отделни пътища на канцерогенеза и клинично поведение (3).

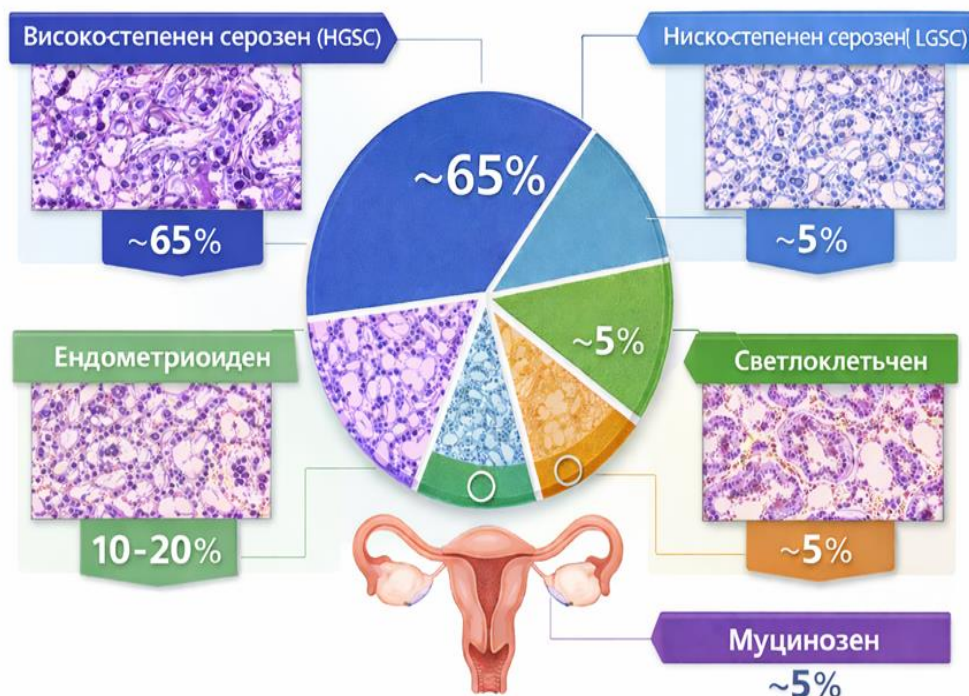
Интегрирането на морфологичните характеристики с молекулярните профили позволява по-прецизна стратификация на пациентките, по-добра оценка на прогнозата и оптимизиране на персонализирания терапевтичен подход.

4.1. Традиционна хистопатологична класификация

Традиционната хистопатологична класификация на овариалния карцином се основава на морфологичното сходство на туморните клетки с епителите на различни части от женската репродуктивна система. Този подход, въведен още в първите систематични класификации, остава в основата на диагностичната практика, въпреки че не винаги отразява пълноценно молекулярната хетерогенност на заболяването (36).

Обобщение на основните хистологични типове овариален карцином са представени на Фигура 2.

Основни хистологични типове овариален карцином



Фигура 2. Хистологични подтипове на овариален карцином – морфология и честота.
Фигура генерирана от AI.

4.1.1. Серозни тумори

Серозните карциноми са най-често срещаният хистологичен подтип на овариалния карцином и се характеризират с папиларна, солидна или смесена архитектура и клетки, наподобяващи епитела на фалопиевата тръба. В клиничната практика те се подразделят на нискостепенни (low grade serous ovarian cancer – LGSC) и високостепенни серозни карциноми (high grade ovarian cancer – HGSC), които демонстрират съществени различия в биологията и клиничния ход (37).

Високостепенният серозен ОК се характеризира с изразена клетъчна и ядрена атипия, висока митотична активност и масивна геномна нестабилност. Този подтип обикновено се диагностицира в напреднал стадий и е отговорен за по-голямата част от смъртността, свързана със заболяването. Натрупващите се данни подкрепят концепцията, че той произхожда не от повърхностния яйчников епител, а от епитела на дисталната

фалопиева тръба, което има съществено значение за разбирането на патогенезата и превантивните стратегии (38).

Нискостепенният серозен карцином демонстрира по-умерена атипия, по-бавна еволюция и често се развива на фона на серозни гранични тумори. Клиничното му протичане е по-продължително, но често се характеризира с относителна резистентност към стандартна химиотерапия (39)

4.1.2. Ендометриоидни тумори

Ендометриоидните овариални карциноми морфологично наподобяват ендометриалния епител и често са асоциирани с ендометриоза. Те обикновено се диагностицират в по-ранен стадий и имат по-благоприятна прогноза в сравнение със серозните карциноми (40).

Хистологично се наблюдава жлезиста архитектура, като степента на диференциация варира. Този подтип често се развива поетапно – от доброкачествени и прекурсорни лезии към инвазивен карцином, което го отличава от де ново възникващия характер на високостепенния серозен карцином. Наличието на синхронен ендометриален карцином при част от пациентките допълнително подкрепя общия патогенетичен фон (16).

4.1.3. Светлоклетъчни тумори

Светлоклетъчните овариални карциноми представляват биологично и клинично отделен подтип с характерна морфология, включваща клетки с обилна, светла цитоплазма и хобнейл конфигурация. Те са тясно свързани с ендометриозата и хроничното възпаление в малкия таз (41).

Клиничното значение на този подтип се определя от относителната му резистентност към платинова химиотерапия и по-неблагоприятната прогноза при напреднало заболяване. Тези характеристики отразяват дълбоки молекулярни и метаболитни различия спрямо останалите овариални карциноми.

4.1.4. Муцинозни тумори

Муцинозните овариални карциноми се характеризират с продукцията на муцин и жлезиста архитектура, наподобяваща гастроинтестиналния епител. Те са сравнително редки и често водят до диагностични затруднения, свързани с разграничаването им от метастатични тумори с екстраовариален произход (42).

Техният хистологичен и биологичен профил предполага различен път на развитие, като клиничното поведение варира значително в зависимост от стадия и молекулярните характеристики.

4.2. Двухипен модел на овариалния карцином (Type I и Type II)

Двухипният модел представлява концептуална рамка, която обединява морфологичните и молекулярните различия между овариалните карциноми. Туморите от тип I се характеризират с относителна геномна стабилност, бавна прогресия и наличие на прекурсорни лезии, докато туморите от тип II демонстрират висока геномна нестабилност, агресивен клиничен ход и липса на ясно дефинирани прекурсори (43).

Този модел позволява по-добро разбиране на различните пътища на канцерогенеза и има важно клинично значение при интерпретацията на молекулярните находки.

4.3. Молекулярна класификация и интегративни модели

Съвременната молекулярна класификация на овариалния карцином се основава на анализ на геномни, транскриптомни и епигенетични характеристики. Тези подходи позволяват идентифициране на молекулярни подтипове, които отразяват активирането на специфични сигнални пътища, степента на геномна нестабилност и взаимодействието с туморната микросреда (44).

Интегративните модели комбинират данни от различни молекулярни нива и осигуряват по-пълна биологична картина на заболяването. Тези модели често имат по-голяма прогностична стойност от изолираните хистологични критерии.

4.4. Корелация между хистологични и молекулярни подтипове

Въпреки че определени молекулярни характеристики са типични за конкретни хистологични подтипове, между тях съществува значително припокриване. Това подчертава необходимостта от комбиниран подход, който интегрира морфологични, имунохистохимични и молекулярни данни за постигане на прецизна класификация (45).

В световен мащаб разпределението на яйчниковите тумори следва подобно разпределение, с изключение на Азия, където светлоклетъчните и ендометриоидните тумори са по-чести (46). Всеки подтип се характеризира с различия в симптомите, прогресията, мутационния профил, връзката с наследствените ракови синдроми и влияние на химиотерапията (47). Данните за 10-годишната преживяемост за всеки подтип варира: при муцинозния е 87%, при ендометриоиден - 59,7%, при светлоклетъчен - 58,7%, а при серозния - 24,4% (48,49). Всеки подтип има различни хистологични модели на експресия на протеини, мутации и дори епигенетични сигнатури. Допълнителна класификация, базирана на молекулярни профили, може да даде по-пълна представа за молекулната характеристика на тумора и да даде възможност за подобряване на избора на терапия (50,51). Последните проучвания помогнаха за по-нататъшното стратифициране на геномните разлики между отделните подтипове, където е показано, че 12 локуса допринасят за предразположение към серозни (3q28, 4q32.3, 8q21.11, 10q24.33, 18q11.2, 22q12.1, 2q13, 8q24.1 и 12q24.31), муцинозни (3q22.3 и 9q31.1) и ендометриоидни (5q12.3) подтипове ОК (52).

Всеки хистологичен подтип на ОК се диагностицира и определя след първична циторедуктивна хирургия, която се стреми да отстрани всяка видима маса в перитонеалната кухина. Международната федерация по гинекология и акушерство (FIGO) създаде насоки за стадиране на ОК. Тези насоки се установяват въз основа на локализацията на тумора: само в яйчниците (Стадий I), разпространение в таза (Стадий II), разпространение в перитонеума (Стадий III), наличие на далечни метастази (Стадий IV). Докато 5-годишната преживяемост при локализирано заболяване (стадий I) е над 90%, по-голямата част от пациентите – 15% и 60% са диагностицирани съответно с регионално (Стадий II) или отдалечено (Стадий III) заболяване, където 5-годишната преживяемост е съответно 73% и 28,9% (53).

4.5. Клинично значение на молекулярната класификация

Молекулярната класификация има съществено клинично значение, тъй като подпомага прогнозната оценка и избора на терапия. Идентифицирането на специфични молекулярни профили позволява по-добра селекция на пациентки за таргетни терапии и улеснява интегрирането на генетичното тестване в клиничната практика (54).

Глава 5. Генетични механизми в патогенезата на овариалния карцином

5.1. Геномна нестабилност като основен патогенетичен механизъм

Геномната нестабилност представлява фундаментален молекулярен белег на злокачествената трансформация и е централен патогенетичен механизъм при овариалния карцином. Тя обхваща натрупването на бройни и структурни хромозомни аберации, точкови мутации, инсерции и делеции, както и нарушения в микросателитните последователности, които водят до прогресивна дерегулация на клетъчната хомеостаза (44, 55). В контекста на овариалния карцином геномната нестабилност не е хомогенен феномен, а варира значително в зависимост от хистологичния подтип и молекулярния профил на тумора.

При HGSC геномната нестабилност е изразена и доминираща характеристика. Този подтип се отличава с хромозомни преустройства, чести copy number variations (CNV) и комплексни структурни аберации, което е подробно демонстрирано в интегративните геномни анализи на The Cancer Genome Atlas (TCGA) (44). Тези изменения отразяват дълбоко нарушената репарация на двуверижните разкъсвания на ДНК, често в контекста на дефицит на хомоложната рекомбинация (56,57). Почти универсалната инактивация на TP53 в HGSC води до загуба на контрол върху клетъчния цикъл и апоптозата, което позволява преживяемостта и клоналната експанзия на генетично нестабилни клетки (55). В този контекст геномната нестабилност се разглежда не като вторичен феномен, а като движеща сила на туморната еволюция и вътретуморната хетерогенност.

За разлика от това, LGSC, както и ендометриоидните и муцинозните овариални тумори, демонстрират относително по-стабилен геном. При тези подтипове туморогенезата често се иницира от ограничен брой драйвърни мутации в ключови сигнални пътища, като MAPK и PI3K/AKT, без наличие на хромозомни аберации (55). Геномната нестабилност при тях се развива по-късно и има по-умерен характер, което корелира с по-бавната клинична прогресия и различния терапевтичен отговор.

Съществено значение има разграничаването между хромозомна нестабилност (chromosomal instability, CIN) и микросателитна нестабилност (microsatellite instability,

MSI). CIN е характерна за преобладаващата част от високостепенните серозни карциноми и е тясно свързана с дефекти в хомоложната рекомбинация и други пътища за репарация на ДНК (57). MSI, от друга страна, се наблюдава при малък процент овариални карциноми, предимно с ендометриoidна хистология, и отразява нарушения в mismatch репарацията, често асоциирани със синдрома на Lynch (58, 59).

Геномната нестабилност има и пряко клинично значение. От една страна, тя допринася за развитието на вътретуморна хетерогенност и за възникването на първична или придобита лекарствена резистентност (57). От друга страна, високото ниво на ДНК увреждания създава специфични терапевтични таргети, които могат да бъдат експлоатирани чрез принципа на синтетичната леталност, както е показано при приложението на PARP инхибитори при тумори с дефицит на хомоложната рекомбинация (58). По този начин геномната нестабилност се утвърждава не само като патогенетичен, но и като предиктивен и прогностичен биомаркер.

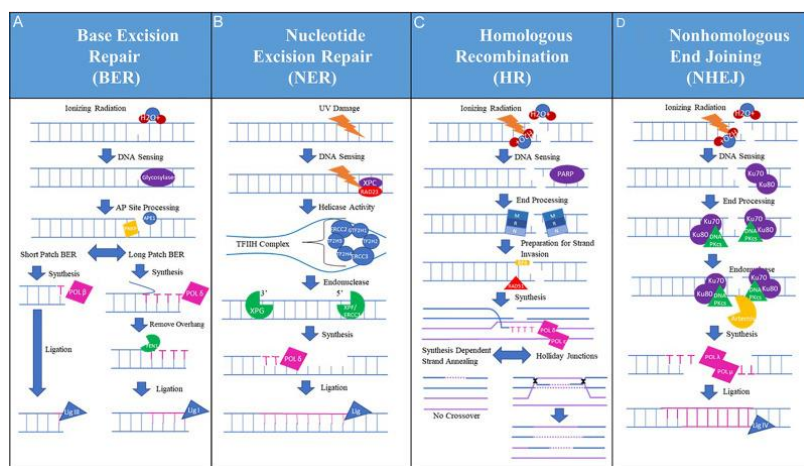
В обобщение, геномната нестабилност представлява ключов интегративен механизъм в патогенезата на овариалния карцином, който свързва молекулярните дефекти в ДНК репарацията, контрола на клетъчния цикъл и сигналните пътища с клиничното поведение на заболяването (54, 57, 58). Разбирането на нейните форми и биологични последици е основа за съвременния молекулярно ориентиран подход към диагностиката и персонализираното лечение на овариалния карцином.

5.2. Нарушения в репарацията на ДНК

Целостта на генома се поддържа чрез сложна мрежа от взаимосвързани механизми за поправка (репарация) на ДНК, които осигуряват своевременното разпознаване и коригиране на ендогенни и екзогенни увреждания. Тези механизми са от ключово значение за предотвратяване на натрупването на генни мутации и хромозомни аберации и играят централна роля в подтискане на абнормата туморна пролиферация (60). При ОК нарушенията в ДНК репарацията представляват молекулярна основа на геномната нестабилност и туморната прогресия.

Различните пътища за репарация на ДНК са специализирани за корекция на конкретни типове увреждания, включително едноверижни и двуверижни разкъсвания, грешки при репликация и неправилно сдвоени бази. Дисфункцията дори на един от тези

пътища може да доведе до каскадно натрупване на генетични дефекти, което ускорява клоналната еволюция на туморните клетки (61). Има пет ключови механизма за репарация на увредената ДНК: възстановяване чрез изрязване на нуклеотидната база, изрязване на нуклеотиди и поправка, поправка на неправилно сдвоени бази, хомоложна рекомбинация, и поправка чрез нехомоложно свързване на крайщата (Фигура 3) (62).



Фигура 3. Видове механизми за ДНК репарация (62).

Гените, отговорни за ДНК репарацията чрез ексцизия на база, ексцизия на нуклеотиди и поправка на неправилно сдвоени бази участват в поправката на едноверижни нарушения на ДНК, при което другата ДНК верига е без дефект. Обратно, гените, отговорни за хомоложната рекомбинация и главно на нехомоложното свързване на краищата участват при поправката на двойноверижни разкъсвания и нарушения.

При овариалния карцином най-добре охарактеризирани са нарушенията в хомоложната рекомбинация и mismatch репарацията, които имат ясно изразено клинично и терапевтично значение.

Дефицитът на хомоложната рекомбинация (homologous recombination deficiency, HRD) е характерен за значителна част от високостепенните серозни овариални карциноми (HGSC) и е пряко свързан с герминативни или соматични промени в гени, участващи в репарацията на двуверижните разкъсвания на ДНК (63). HRD не само обуславя висока степен на хромозомна нестабилност, но и определя чувствителността на туморите към

платинови производни и PARP инхибитори, което превръща този механизъм в ключов терапевтичен таргет (64).

От друга страна, нарушенията в mismatch репарацията водят до микросателитна нестабилност и хипермутационен фенотип, който се среща при ограничен подтип овариални карциноми, предимно с ендометриоидна хистология (65). Този механизъм има особено значение в контекста на наследствената предразположеност, най-вече при синдрома на Lynch, и е свързан със специфични прогностични и терапевтични характеристики, включително потенциален отговор към имунотерапия.

В обобщение, нарушенията в репарацията на ДНК представляват централна молекулярна ос в патогенезата на овариалния карцином, която интегрира геномната нестабилност, хистологичната хетерогенност и индивидуалния терапевтичен отговор. Подробното разглеждане на отделните репарационни пътища е от съществено значение за разбирането на съвременния персонализиран подход в диагностиката и лечението на това заболяване (56, 64, 65).

5.2.1. Хомоложна рекомбинация

Хомоложната рекомбинация (homologous recombination, HR) е изключително прецизен механизъм за репарация на двуверижни разкъсвания (double-strand breaks, DSB) на ДНК, който използва хомоложна матрица (обикновено сестринска хроматида) за възстановяване на първичната нуклеотидна последователност. HR е активна предимно в S/G2 фазите на клетъчния цикъл и представлява ключов „страж“ на геномната стабилност. При HGSC нарушенията в HR са сред най-важните молекулярни събития, определящи хромозомната нестабилност, естествения ход на заболяването и терапевтичната чувствителност, което е утвърдено както от интегративни геномни анализи, така и от съвременните клинични алгоритми за молекулярно тестване и таргетна поддържаща терапия (66, 67).

Молекулярна логика и етапи на HR репарацията

Двойно-верижните разкъсвания (DSB) могат да възникнат при репликационен стрес, оксидативни увреждания или под влияние на цитостатици. При наличие на функционална HR процесът протича в последователни етапи: разпознаване на увреждането, контролирана

5'→3' резекция на краищата с формиране на 3'-едноверижни участъци, покриването им от RPA (Replication Protein A), последвано от замяна с RAD51 нуклеопротеинови филаменти, „гърсене“ на хомоложна последователност и синтез на ДНК по матрицата, с последващи рекомбинативни процеси. Нарушение във всеки от тези модули (сензори, медиатори, ефектори) компрометира точността на възстановяване и насочва клетката към грешни репарационни пътища, което ускорява натрупването на структурни аберации и copy-number промени – характерен фенотип при HGSC (68).

Ключови гени и функционални модули

HR е организирана като мрежа от функционални възли.

BRCA1/BRCA2 ос.

BRCA1 участва в контрола на репарацията, сигнализацията при ДНК увреждане и избора на репарационен път, докато BRCA2 е критичен медиатор за зареждането на RAD51 върху едноверижната ДНК. Дефекти в BRCA1/2 представляват класическия модел за HR дефицит (HRD) и имат пряко предиктивно значение за ефекта от PARP инхибитори (66,69).

Партньорни и медиаторни гени (напр. *PALB2*) и *RAD51* паралози.

Тези гени стабилизират формирането на RAD51 филаменти и координират рекомбинационния процес; функционални нарушения могат да индуцират HRD фенотип дори при липса на *BRCA* мутация (66,69).

Комплексни дефекти в пътя на Fanconi anemia и репликационния стрес.

В клиничната практика HRD се разглежда като континуум от дефекти в широка мрежа за DNA damage response (DDR), а не само като бинарно BRCA-състояние (56,70).

HR дефицит като фенотип: концепция за „BRCAness“

При значителна част от HGSC се наблюдава HRD фенотип без доказана *BRCA1/2* мутация – т.нар. „BRCAness“. Това включва соматични ПВ в HR/DDR гени, епигенетична инактивация (например промоторна хиперметилация на *BRCA1*), структурни

преустройства, както и комбинирани ефекти на репликационен стрес и дефекти в контролните точки на клетъчния цикъл (71,72). От клинична гледна точка „BRCAness“ разширява популацията пациенти, които могат да имат полза от таргетна поддържаща терапия, но изисква прецизна диагностична стратификация (66,71).

Геномни „белези“ на HRD и методи за лабораторно доказване

За разлика от директното генотипиране на единичен ген, HRD често се доказва чрез функционални сурогати, отразяващи „историческия отпечатък“ на дефектната репарация. Най-широко използваната концепция е геномното „scar“ профилиране, базирано на:

- LOH (loss of heterozygosity),
- TAI (telomeric allelic imbalance),
- LST (large-scale state transitions),

които се интегрират в композитни HRD-скорове (71–73). Тези подходи идентифицират HRD фенотип дори при липса на откриваем BRCA вариант, но имат ограничения, тъй като „scar“ показателите са кумулативни и може да не отразяват текущото функционално състояние при вторични „reversion“ събития (72,73).

Съвременните консенсусни публикации препоръчват паралелно използване на:
(1) BRCA/HRR генетично тестване (герминативно и туморно) и
(2) едновременно с това - диагностика за HRD чрез NGS-базирани платформи, с ясно дефинирани прагове и интерпретация в терапевтичен контекст (66,74).

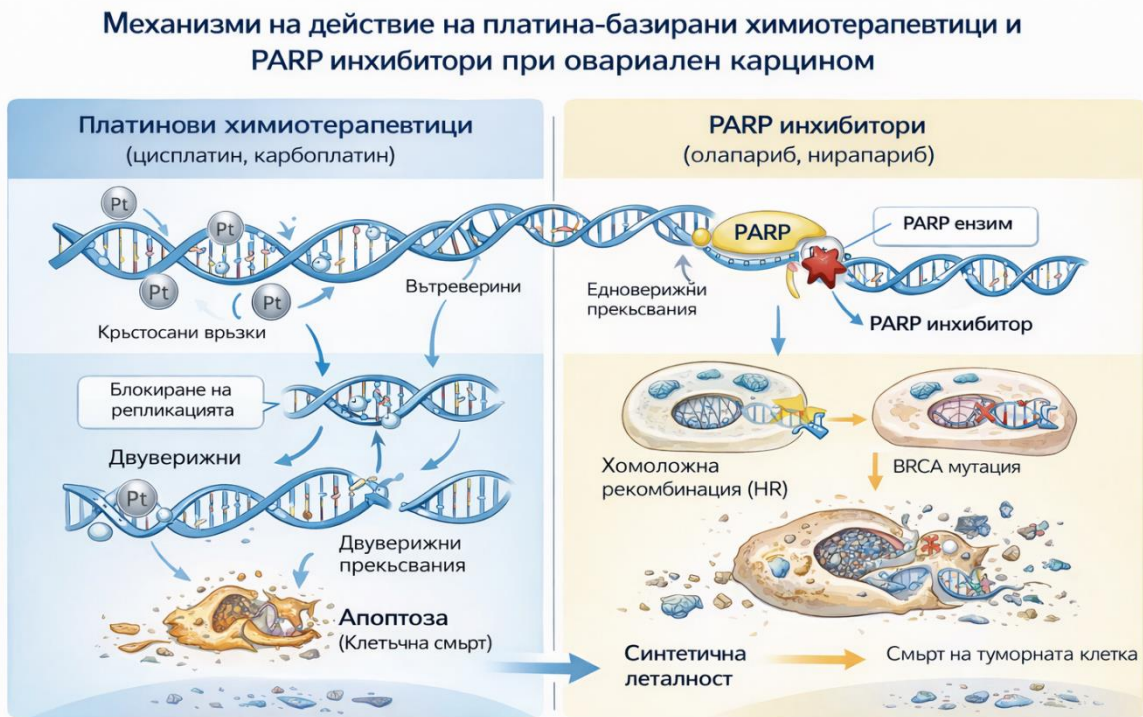
Терапевтични приложения: платинова чувствителност и синтетична леталност

HRD е биологичната основа за повишена чувствителност към платинови производни, тъй като туморните клетки не могат ефективно да репарират индуцираните DSB и колапса на репликационните вилки (67,68). Най-значимият клиничен пробив е използването на синтетичната леталност чрез PARP инхибитори, при която блокирането на PARP-медираната репарация на едноверижни увреждания води до натрупване на DSB и клетъчна смърт при HRD тумори (69,75).

Рандомизирани клинични проучвания в първа линия показват, че поддържащата терапия с PARP инхибитори подобрява преживяемостта без прогресия, като ефектът е най-

изразен при BRCA-мутирани и HRD-позитивни тумори (67,76). Комбинацията olaparib+ bevacizumab демонстрира значим клиничен ефект, включително ясно изразена полза при HRD-позитивните случаи, която е потвърдена в дългосрочни анализи (67,75). Паралелно, данните за niraparib подкрепят концепцията за поддържаща PARP инхибиция в по-широка популация, с диференцирана величина на ползата според HRD/BRCA статуса (77).

Механизмът на действие на платина базирани химиотерапевтици и PARP инхибитори при лечение на овариален карцином е представен на Фигура 4.



Фигура генерирана от AI.

Фигура генерирана от AI.

Фигура 4. Механизми на действие на платина-базирани химиотерапевтици и PARP инхибитори при овариален карцином: молекулярна основа на синтетичната леталност.

Фигура генерирана от AI.

Фигурата представя молекулярните механизми на действие на платина-базирани химиотерапевтици и PARP инхибиторите при овариален карцином, както и тяхната синергия чрез механизма на синтетична леталност.

Ляв панел – Платинови химиотерапевтици (цисплатин, карбоплатин)

Платиновите агенти се свързват ковалентно с ДНК и индуцират **вътреверижни и междуверижни кръстосани връзки**, които нарушават нормалната структура на двойната спирала. Това води до:

- **блокиране на ДНК репликацията,**
- **двуверижни прекъсвания,**
- активация на ДНК damage response.

Когато уврежданията надхвърлят репаративния капацитет на клетката, се задейства **апоптоза (програмирана клетъчна смърт)**. По този начин платиновата химиотерапия упражнява директен цитотоксичен ефект върху туморните клетки.

Десен панел – PARP инхибитори (олапариб, нирапариб)

PARP ензимът участва в **репарацията на едноверижни ДНК прекъсвания** чрез base excision repair. Инхибирането му води до:

- натрупване на едноверижни лезии,
- конвертиране им в **двуверижни прекъсвания по време на репликация,**
- необходимост от възстановяване чрез **хомоложна рекомбинация (HR)**.

При тумори с **BRCA/HR дефицит** този механизъм е нарушен, което води до **натрупване на летални ДНК увреждания** и загиване на клетката.

Синтетична леталност (комбиниран ефект)

Комбинирането на:

- директно ДНК увреждане от платиновите препарати
- и
- блокиране на репарацията чрез PARP инхибитори

създава състояние на **синтетична леталност**, при което туморните клетки, особено HR-дефицитните, **не могат да възстановят геномната стабилност и загиват селективно**, докато нормалните клетки със запазена HR функция имат по-голям репаративен капацитет.

Фигурата илюстрира, че **платиновите агенти индуцират ДНК увреждане, а PARP инхибиторите блокират неговото възстановяване**, което обуславя повишената терапевтична ефективност при овариален карцином с дефекти в хомоложната рекомбинация.

Тестове и клинична стратификация

Поради директните терапевтични последствия, съвременните клинични подходи акцентират върху систематичното молекулярно профилиране на пациентките с епителен овариален карцином, включващо герминативно BRCA1/2 изследване, туморно (соматично) BRCA/HRR профилиране и HRD тестиране при липса на герминативна BRCA мутация, когато резултатът би повлиял избора на поддържаща терапия (66,68). Подчертава се, че HRD не е абсолютна категория и резултатът трябва да се интерпретира в контекста на качеството на пробата, използваната платформа и клиничния сценарий (72,74).

Механизми на резистентност и динамика на HR статуса

Въпреки първоначалната клинична полза, резистентността към платина и PARP инхибитори е съществен проблем. Най-добре описани са вторични „reversion“ събития в BRCA1/2 или други HR гени, които възстановяват функционалността на протеина и частично ре-конституират HR капацитета (68). Допълнителни механизми включват промени в репликационния стрес, алтернативни пътища за стабилизиране на репликационните вилки и селекция на субклони с различен HR капацитет (71,72).

В заключение, хомоложната рекомбинация е основния прецизен механизъм за репарация на DSB, а HRD – един от най-важните молекулярни фенотипове при овариалния карцином, особено при HGSC. Клиничната значимост на HRD е двупосочна: тя обяснява характерната хромозомна нестабилност и биологията на тумора и определя терапевтични таргети, използвани от PARP инхибиторите и комбинираните поддържащи схеми (66,67,72,75,77).

5.2.2. Mismatch репарация

Mismatch репарацията (mismatch repair, MMR) е еволюционно консервативен механизъм за корекция на грешки, възникващи по време на ДНК репликацията, включително неправилно сдвоени бази и малки инсерции или делеции. Чрез MMR се предотвратява фиксирането на точкови мутации и се поддържа високата точност на геномното възпроизводство. Дефицитът на този механизъм води до микросателитна нестабилност (microsatellite instability, MSI) и хипермутационен фенотип, който има специфично биологично и клинично значение при определени подтипове на овариалния карцином (78,79).

Молекулярна организация и функции на MMR системата

MMR се осъществява чрез координираното действие на няколко ключови протеинови комплекса. Хетеродимерите **MSH2–MSH6 (MutSa)** и **MSH2–MSH3 (MutSβ)** разпознават неправилно сдвоените бази и малките инсерционно-делеционни бримки, докато комплексът **MLH1–PMS2 (MutLa)** медира последващата ексцизия на грешния участък и иницира ресинтез на ДНК (80). Загубата на функция на който и да е от тези компоненти компрометира репарационния процес и води до прогресивно натрупване на мутации, особено в микросателитните региони на генома.

MMR дефицит и микросателитна нестабилност при овариалния карцином

За разлика от високостепенния серозен овариален карцином, където доминира хромозомната нестабилност, MMR-дефицитът и MSI се срещат при относително малък, но клинично значим подтип овариални карциноми. MSI се наблюдава най-често при **ендометриодни** и в по-малка степен при **светлоклетъчни** овариални карциноми, докато при HGSC тя е изключително рядка (7, 81). Тези тумори се характеризират с висок мутационен товар, но относително запазена хромозомна архитектура, което отразява различен път на туморогенеза в сравнение с HR-дефицитните карциноми (63).

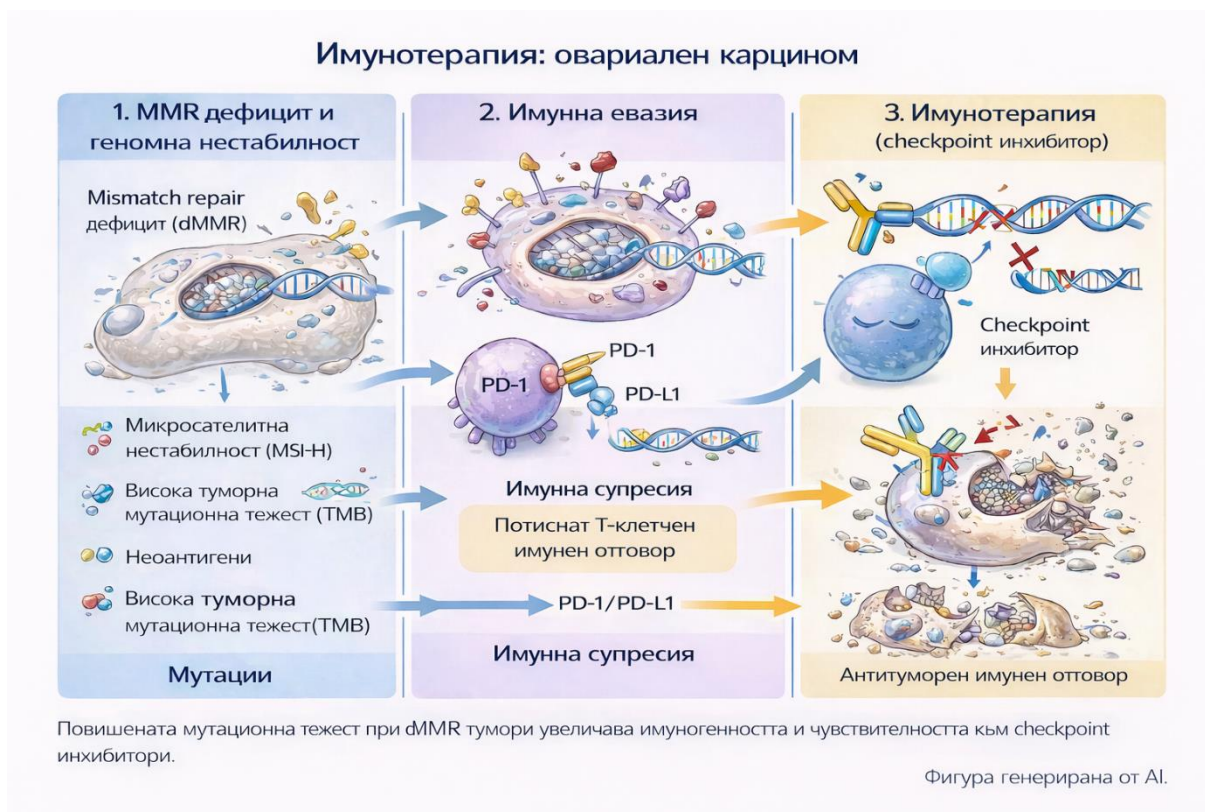
Връзка със синдрома на Lynch

Особено клинично значение има асоциацията между MMR дефицита и **синдрома на Lynch**, при който герминативни ПВ в **MLH1, MSH2, MSH6** или **PMS2** водят до повишен риск от колоректален, ендометриален и ОК (82). Овариалните карциноми при синдром на Lynch обикновено се диагностицират в по-млада възраст, често са с ендометриоиден хистотип и демонстрират MSI-high фенотип (83). Идентифицирането на MMR дефицит при овариален тумор има директни последици за генетичното консултиране, каскадното тестване на родственици и дългосрочната онкологична профилактика.

Клинични и терапевтични приложения

От терапевтична гледна точка, MMR-дефицитните овариални карциноми се отличават съществено от HRD туморите. Те не демонстрират специфична чувствителност към платинови производни или PARP инхибитори, но високия мутационен товар води до повишена експресия на неоантигени и засилена туморна имуногенност (84). Това обуславя клиничния отговор към **инхибитори на имунните контролни точки**, особено PD-1/PD-L1 блокада, при MSI-high/MMR-дефицитни солидни тумори, включително овариални карциноми (85). Макар честотата на този подтип да е ниска, терапевтичната значимост е висока, тъй като MMR статусът може да насочи към ефективна персонализирана имунотерапия.

Механизмът на имунотерапията при туморни клетки на ОК с дефицит в MMR системата е представен на Фигура 5.



Фигура 5. Механизъм на действие на имуноterapiaта с checkpoint инхибитори при овариален карцином с mismatch repair дефицит (dMMR/MSI-H). Фигура генерирана от AI.

Фигурата илюстрира последователните молекулярни и клетъчни събития, чрез които имуноterapiaта с checkpoint инхибитори възстановява антитуморния имулен отговор при овариален карцином с mismatch repair дефицит (dMMR/MSI-H).

Панел 1 – Геномна нестабилност при dMMR

Дефектът в системата за mismatch repair води до неефективна корекция на репликационните грешки, което причинява **натрупване на соматични мутации, микросателитна нестабилност (MSI-H) и висока туморна мутационна тежест (ТМВ)**. В резултат се формират **неоантигени**, експресирани на повърхността на туморните клетки, които увеличават тяхната имуногенност и потенциалната разпознаваемост от имунната система.

Панел 2 – Имуна евазия

Въпреки повишената имуногенност, туморните клетки активират механизми за **имуна супресия** чрез експресия на **PD-L1**, който се свързва с **PD-1 рецептора** върху Т-лимфоцитите. Това взаимодействие индуцира функционално изчерпване на Т-клетките и води до **потиснат Т-клетъчен имуен отговор**, позволявайки на тумора да избегне имунното унищожаване.

Панел 3 – Ефект на имунотерапията

Прилагането на **checkpoint инхибитори (anti-PD-1/anti-PD-L1 моноклонални антитела)** блокира връзката PD-1/PD-L1, което **възстановява Т-клетъчната активация**, засилва цитотоксичността и води до **разрушаване и апоптоза на туморните клетки**. Крайният резултат е **антитуморен имуен отговор**.

Обобщение

Фигурата демонстрира, че **повишената мутационна тежест при dMMR/MSI-H тумори създава биологична предпоставка за повишена чувствителност към checkpoint инхибитори**, което обяснява клиничната ефективност на имунотерапията в тази подгрупа пациентки.

Диагностични подходи за определяне на MMR статуса

В клиничната практика MMR статусът се определя чрез **имунохистохимично изследване** за експресията на MLH1, MSH2, MSH6 и PMS2, както и чрез **молекулярни методи за оценка на MSI (86)**. Имунохистохимията е широко използвана поради своята достъпност и възможността да насочи към конкретен засегнат ген, докато молекулярните методи осигуряват функционална оценка на репарационния дефицит. Комбинираният подход увеличава диагностичната точност и е препоръчван в съвременните клинични насоки (87).

В заключение, mismatch репарацията представлява отделна и биологично специфична ос в патогенезата на овариалния карцином. Макар и значително по-рядко засегната в сравнение с хомоложната рекомбинация, MMR дисфункцията има ключово значение за идентифициране на наследствени случаи, за разбиране на туморната биология и за селекция на пациентки, които биха имали полза от имунотерапия. По този начин MMR

пътят допълва молекулярния пейзаж на овариалния карцином и подчертава необходимостта от интегриран, персонализиран диагностично-терапевтичен подход (81,84,87).

5.3. Дисрегулация на клетъчния цикъл и апоптозата

Строгийт контрол на клетъчния цикъл и програмираната клетъчна смърт (апоптоза) е фундаментален механизъм за поддържане на тъканната хомеостаза и за предотвратяване на злокачествената трансформация. При овариалния карцином тези регулаторни системи са системно нарушени, което позволява преживяемостта и клоналната експанзия на клетки с натрупани генетични и епигенетични увреждания. Дисрегулацията на клетъчния цикъл и апоптозата са тясно свързани с геномната нестабилност и дефектите в ДНК репарацията и представлява централен компонент на патогенезата, особено при HGSC (63,88).

Контролни точки на клетъчния цикъл и тяхното нарушение

Клетъчният цикъл се регулира чрез последователно активиране на циклин-зависими кинази (CDK) и техните регулаторни циклини, както и чрез контролни точки (checkpoints), които осигуряват време за репарация на ДНК преди преминаване към следваща фаза. Най-значими са G1/S и G2/M контролните точки, които предотвратяват репликацията или митозата на клетки с ДНК увреждания (89).

При овариалния карцином тези механизми често са компрометирани. Загубата на функционален контрол върху G1/S прехода позволява навлизането в S-фаза на клетки с непоправени увреждания, докато дефектите в G2/M контролната точка позволяват митотично делене на генетично нестабилни клетки. Този процес допринася за акумулиране на хромозомни аберации и ускорява туморната еволюция (90).

***TP53* като централен регулатор**

Генът *TP53* кодира тумор-супресорния протеин p53, който функционира като „пазител на генома“ чрез интегриране на сигналите за ДНК увреждане, репликационен стрес и онкогенна активация. Активираният p53 индуцира клетъчен циклов арест, ДНК репарация или апоптоза в зависимост от тежестта на увреждането (91).

При HGSC мутации в *TP53* се установяват в над 95% от случаите и представляват практически универсален молекулярен белег на този подтип (63). Загубата на p53 функция елиминира ключовата бариера срещу клетъчно делене при наличие на ДНК увреждания, което обяснява екстремната геномна нестабилност, характерна за HGSC. Освен това някои *TP53* мутации имат доминантно-негативен или gain-of-function ефект, който допълнително подпомага туморната прогресия и химиорезистентност (92).

RB път и регулация на G1/S прехода

Друг критичен регулатор на клетъчния цикъл е ***RB1*** тумор-супресорният път. Хипофосфорилираният RB протеин инхибира транскрипционните фактори от семейството E2F и блокира прехода от G1 към S фаза. Дисрегулацията на този път може да настъпи чрез директна инактивация на RB1 или чрез аберантна активация на CDK4/6–циклин D комплекса (93).

При овариалния карцином нарушенията в RB пътя често са резултат от *TP53* дефекти и допринасят за неконтролирана пролиферация. Комбинираната загуба на TP53 и RB контрол създава условия за бърза клетъчна експанзия въпреки наличието на значителни генетични увреждания (93).

Апоптоза и туморна преживяемост

Апоптозата е ключов механизъм за елиминиране на клетки с необратими увреждания. Тя се регулира чрез вътрешния (митохондриален) и външния апоптотичен път, като балансът между про- и антиапоптотични фактори определя клетъчната съдба (94).

При овариалния карцином често се наблюдава повишена експресия на антиапоптотични протеини (напр. BCL-2 фамилията) и потискане на проапоптотичните сигнали, което позволява преживяемостта на клетки с тежки геномни увреждания (95). Загубата на p53 функция допълнително отслабва апоптотичния отговор към ДНК увреждания и химиотерапия, което има директно значение за терапевтичния отговор (91,94).

Връзка с терапевтичната резистентност

Дисрегулацията на клетъчния цикъл и апоптозата е ключов фактор за развитието на резистентност към химиотерапия. Клетки с дефектни контролни точки могат да преживеят цитотоксичното увреждане, индуцирано от платинови производни, и да възстановят пролиферацията си след селекция на резистентни субклони (96). Това явление е особено изразено при HGSC и е в основата на честите рецидиви.

В заключение, дисрегулацията на клетъчния цикъл и апоптозата представлява ключов патогенетичен механизъм при овариалния карцином, който функционира в тясна връзка с геномната нестабилност и дефектите в ДНК репарацията. Универсалната инактивация на TP53 при HGSC, съчетана с нарушения в RB пътя и апоптотичните механизми, създава биологична среда, благоприятстваща натрупването на генетични дефекти, туморната хетерогенност и терапевтичната резистентност. Разбирането на тези процеси е основа за разработване на нови таргетни стратегии, насочени към възстановяване на клетъчния контрол и повишаване на терапевтичната ефективност.

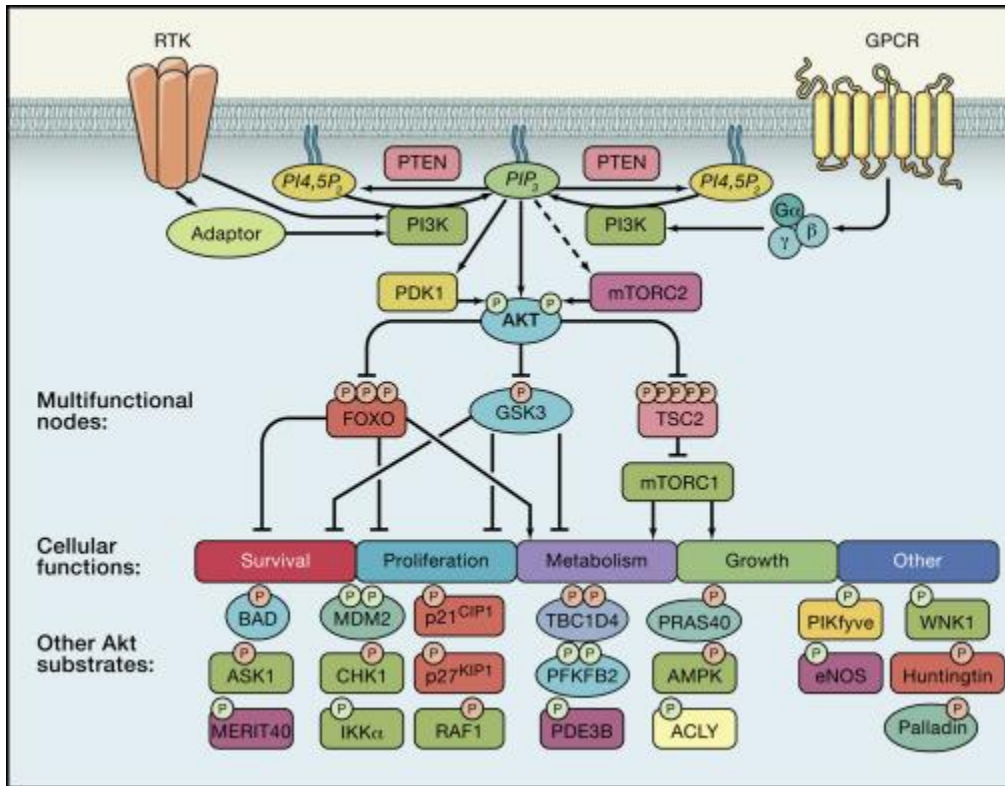
5.4. Сигнални пътища, участващи в туморогенезата

Сигналните пътища, регулиращи клетъчната пролиферация, диференциация, преживяемост и клетъчна миграция, играят централна роля в патогенезата на овариалния карцином. Дисрегулацията на тези пътища може да бъде резултат от точкови мутации, copy number промени, епигенетични механизми или вторичен ефект от дефекти в ДНК репарацията и контрола на клетъчния цикъл. За разлика от високостепенния серозен овариален карцином, при който доминира геномната нестабилност, при редица други хистологични подтипове активирането на конкретни онкогенни сигнални каскади представлява основен драйвър на туморогенезата (63).

PI3K/AKT/mTOR сигнален път

PI3K/AKT/mTOR пътят е един от най-често активираните онкогенни пътища при овариалния карцином. Той регулира клетъчния растеж, метаболизма, ангиогенезата и преживяемостта чрез фосфорилиране на ключови клетъчни ефектори (97), (Фигура 6). Активацията на този път може да настъпи чрез мутации или амплификации в *PIK3CA*,

загуба на функция на тумор-супресора *PTEN* или чрез сигнална крос-регулация с други онкогенни пътища (98).



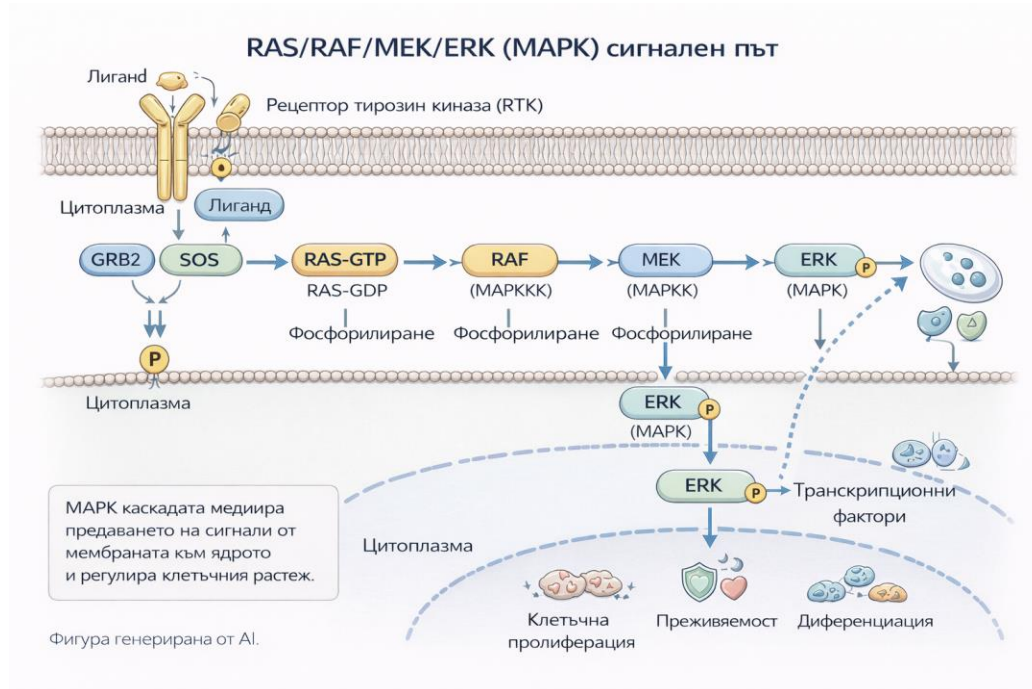
Фигура 6. Субстрати и биологични функции на АКТ сигналния път (97)

При ендометриоидния и светлоклетъчния ОК нарушенията в PI3K/AKT/mTOR пътя са особено чести и се разглеждат като ранно събитие в туморогенезата (99). При HGSC, макар директните мутации да са по-редки, функционалната активация на пътя често се наблюдава като вторичен ефект от TP53 инактивация и геномна нестабилност (63). Този път представлява потенциална терапевтична мишена, като в клинични проучвания се оценяват mTOR и PI3K инхибитори, самостоятелно или в комбинация с други таргетни агенти (100).

RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) сигнален път

MAPK пътят е ключов регулатор на клетъчната пролиферация и диференциация. Активира се чрез мутации в **KRAS**, **BRAF** или **NRAS**, които водят до конститутивна сигнализация независимо от екстрацелуларните стимули (101) (Фигура 7).

При нискостепенния серозен ОК (LGSC) активиращите мутации в **KRAS** и **BRAF** са често срещани и се считат за основни драйвърни събития (102). За разлика от това, при HGSC тези мутации са редки, което подчертава различния молекулярен произход на отделните серозни подтипове. Клиничното значение на MAPK пътя е потвърдено от наблюдавания терапевтичен ефект на MEK инхибитори при LGSC, което представлява пример за успешна таргетна терапия, базирана на молекулярната характеристика на тумора (103).

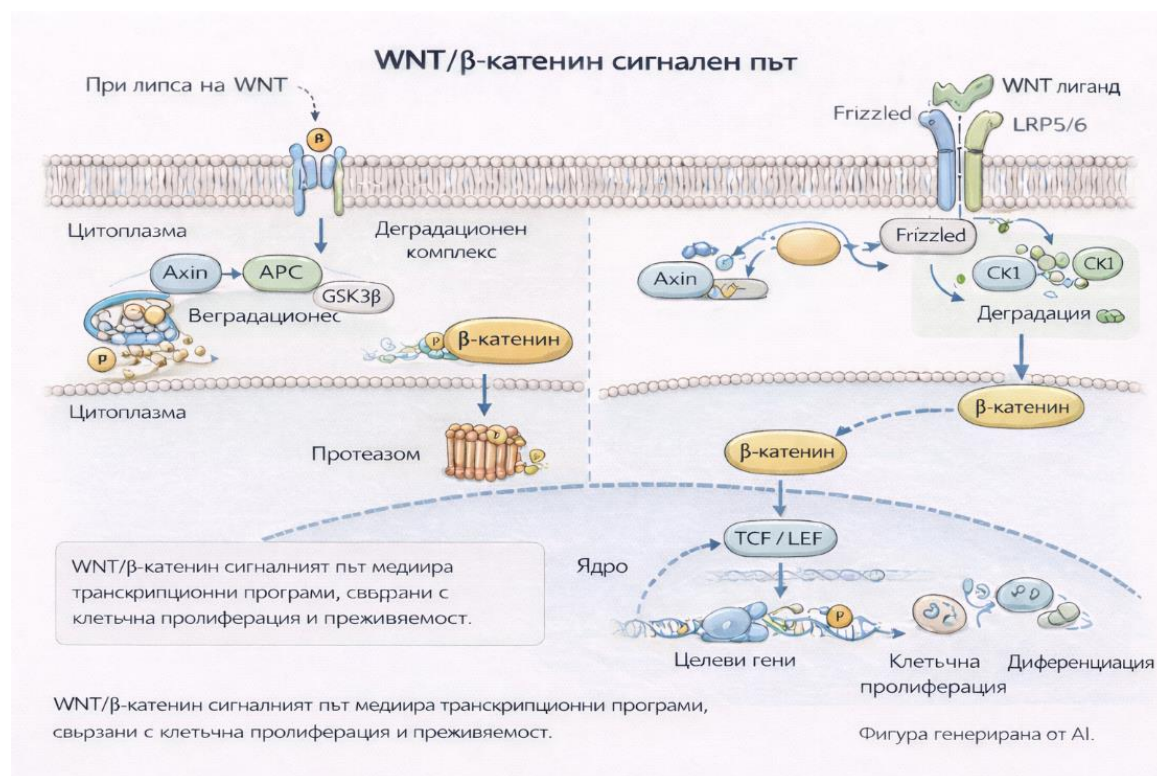


Фигура 7. RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) сигнален път: молекулярна каскада на фосфорилиране, медираща предаването на сигнали от рецепторите тирозин кинази към ядрото и регулираща клетъчната пролиферация, преживяемост и диференциация. *Фигура генерирана от AI.*

WNT/ β -catenin сигналел път

WNT/ β -catenin пътят контролира клетъчната полярност, диференциация и поддържането на стволовите клетъчни свойства. Активацията му води до натрупване на β -catenin в ядрото и транскрипционна активация на гени, свързани с пролиферация и преживяемост (104) (Фигура 8).

При овариалния карцином този път е най-често активиран при **ендометрионидния подтип**, където се наблюдават мутации в *CTNNB1* или други компоненти на WNT каскадата (105). Активирането на WNT сигнализацията е свързано с по-добра диференциация на тумора, но също така може да допринася за терапевтична резистентност и поддържане на туморни стволови клетки (104,106).



Фигура 8. Активация на WNT рецепторния комплекс, инхибиране на β -катенин деградиционния комплекс и транслокация на β -катенин в ядрото с последваща активация на целеви гени. Фигура генерирана от AI.

NOTCH сигнализация

NOTCH пътят е критичен за клетъчната комуникация и определяне на клетъчната съдба. При ОК, особено при HGSC, се наблюдава хиперактивация на NOTCH сигнализацията, често в резултат на амплификация или свръхекспресия на *NOTCH3* (107). Активираният NOTCH път подпомага клетъчната преживяемост, ангиогенезата и взаимодействието между туморните клетки и микросредата. Някои експериментални и ранни клинични данни предполагат, че инхибирането на NOTCH сигнализацията може да потенцира ефекта на химиотерапията и да намали туморната агресивност (108).

TGF- β сигнален път и туморна микросреда

TGF- β сигнализацията има двойствена роля в онкогенезата. В ранните етапи тя действа като тумор-супресор, потискайки клетъчната пролиферация, докато в напредналите стадии подпомага епително-мезенхимния преход, инвазията и метастазирането (109)

При овариалния карцином дисрегулацията на TGF- β пътя е тясно свързана с ремоделирането на туморната микросреда, имунната супресия и развитието на резистентност към терапия (110). Този път се разглежда като потенциална мишена за комбинирани терапевтични подходи, насочени както към туморните клетки, така и към микросредата.

Сигнална крос-регулация и клинично значение

Сигналните пътища, участващи в туморогенезата на овариалния карцином, не функционират изолирано, а формират сложна мрежа от крос-регулации. Например, активацията на PI3K/AKT може да модифицира MAPK сигнализацията, докато дефекти в TP53 усилват ефектите на няколко онкогенни пътя едновременно (89). Тази сложност обяснява ограничената ефективност на монотерапиите и подкрепя развитието на комбинирани таргетни стратегии.

В заключение, дисрегулацията на ключови сигнални пътища представлява съществен механизъм в патогенезата на овариалния карцином и допринася за неговата хистологична и молекулярна хетерогенност. PI3K/AKT/mTOR, MAPK, WNT, NOTCH и

TGF- β сигнализацията участват в различни етапи на туморогенезата и имат ясно изразено клинично значение като потенциални терапевтични мишени. Интеграцията на данни за активирани сигнални пътища с генетичния и епигенетичния профил на тумора е ключова за развитието на персонализирани терапевтични подходи при овариалния карцином.

5.5. Епигенетични механизми и регулация на генната експресия

Епигенетичните механизми представляват съществен компонент на туморогенезата, като осигуряват стабилни, но потенциално обратими промени в генната експресия без промяна в първичната ДНК последователност. При ОК епигенетичната дерегулация функционира в тясна връзка с генетичните изменения и допринася за инициацията, прогресията и терапевтичната резистентност на заболяването. Тези механизми включват ДНК метилиране, хистонова модификации и регулация чрез некодиращи РНК. Тяхната комбинация формира специфичен епигенетичен ландшафт, характерен за различните хистологични подтипове (111,112).

ДНК метилиране и инактивация на тумор-супресорни гени

Най-добре проученият епигенетичен механизъм при овариалния карцином е **метирирането на CpG острови** в промоторните региони на гени, което води до транскрипционна репресия. Хиперметирирането на тумор-супресорни гени може функционално да имитира ефекта на инактивирани мутации и по този начин да допринесе за туморната трансформация (113).

При HGSC промоторната хиперметиляция на *BRCA1* е класически пример за епигенетично индуциран дефицит на хомоложната рекомбинация, който води до HRD фенотип без наличие на структурна генна мутация (114). Аналогично, епигенетична инактивация е описана и за други тумор-супресорни гени, участващи в клетъчния цикъл, апоптозата и адхезията, което подчертава централната роля на ДНК метилирането в патогенезата на ОК (115).

Хистонни модификации и хроматинова динамика

Хистонните модификации, включително ацетилиране, метилиране, фосфорилиране и убиквитиниране, регулират достъпността на ДНК за транскрипционния апарат чрез ремоделиране на хроматиновата структура. Дисбалансът между хистон-ацетилтрансферази и хистон-деацетилази (HDAC) води до аберантна експресия на гени, свързани с пролиферация и преживяемост (116).

При овариалния карцином е установена свръхекспресия на някои HDAC изоформи, което корелира с агресивно клинично поведение и неблагоприятна прогноза (117). Това е довело до интерес към HDAC инхибиторите като потенциални терапевтични агенти, особено в комбинация с химиотерапия или други таргетни подходи, макар че клиничните резултати до момента са ограничени (118).

Роля на микроРНК и дълги некодиращи РНК

Некодиращите РНК, включително **микроРНК (miRNA)** и **дълги некодиращи РНК (lncRNA)**, представляват важна част на посттранскрипционна регулация на генната експресия. miRNA регулират стабилността и транслацията на таргетни мРНК, като дисрегулацията им може да доведе до онкогенна активация или загуба на тумор-супресорни функции (119).

При овариалния карцином са идентифицирани специфични miRNA профили, асоциирани с хистологичния подтип, стадия на заболяването и терапевтичния отговор. Например, понижената експресия на тумор-супресорни miRNA или повишената експресия на онкогенни miRNA допринасят за инвазия, метастазиране и химиорезистентност (120). lncRNA, от своя страна, участват в хроматиновото ремоделиране и в регулацията на транскрипционни комплекси. Някои от тях са асоциирани с неблагоприятна прогноза при овариалния карцином (121).

Епигенетична хетерогенност и терапевтични приложения

Епигенетичните промени са динамични и могат да варират както между различни тумори, така и в рамките на един и същ тумор. Тази епигенетична хетерогенност допринася за адаптивността на туморните клетки и за развитието на терапевтична резистентност (122).

За разлика от генетичните мутации, епигенетичните изменения са потенциално обратими, което ги прави привлекателна мишена за терапевтична интервенция.

Въпреки това, клиничното приложение на епигенетични терапии при ОК остава предизвикателство. Най-голям потенциал се очертава при комбинирани подходи, при които епигенетични модулатори се използват за възстановяване на чувствителност на туморите към химиотерапия или таргетни агенти (123).

В заключение, епигенетичните механизми представляват интегрален компонент на патогенезата на овариалния карцином и допълват генетичните изменения, като осигуряват допълнителен слой на регулация на генната експресия. ДНК метилирането, хистонните модификации и некодиращите РНК участват в инициацията и прогресията на заболяването, формират туморната хетерогенност и влияят върху терапевтичния отговор. По-задълбоченото разбиране на епигенетичния ландшафт на овариалния карцином е ключово за разработването на нови, комбинирани персонализирани терапевтични стратегии.

6. Роля на герминативните генетични варианти

Независимо от патогенетичния механизъм на туморогенеза при ОК, етиологията му от генетична гледна точка, подобно на останалите онкологични заболявания, е мултифакторна, резултат от взаимодействието на генетични и негенетични фактори. В зависимост от това кои фактори преобладават в етиологията на канцерогенезата различаваме наследствена, фамилна и спорадична форма на ОК. При спорадичните форми не се открива генетично изменение в предразполагащите гени, като това е най-честата форма на ОК и засяга около 70 % от случаите на това онкологично заболяване. Генетичните фактори, които са унаследени от родителите и създават предразположение за ОК стоят в основата на канцерогенезата при наследствените форми на ОК. Наследственият ОК (НОК) представлява приблизително 5–15% от всички случаи (124) и се характеризира с някои клинично-хистологични особености: млада възраст на диагностициране, по-често с хистология на ниско-диференциран серозен карцином (125). Фамилните случаи на ОК (ФОК) са при пациенти, при които не се открива патогенен вариант в предразполагащите гени, но фамилната им анамнеза се характеризира с наличие на родственици от първа или втора степен с ОК. Тези пациенти имат повишен емпиричен риск от развитие на

заболяването - 2,5% при засегнатата сестра и 9% при засегнатата майка (126). Фамилният овариален карцином е описан за първи път през 1970 г. при синдрома на Lynch (заболяване, свързано с фамилен рак, дължащо се на наследствени мутации в гените, отговорни за репарацията на ДНК) (127,128).

6.1. Гени за предиспозиция към ОК, според пенетрантността им

Генетичните фактори създаващи риск за развитие на ОК, различни от *BRCA1* или *BRCA2* не са толкова добре проучени, но често при пациенти с ОК се откриват герминативни ПВ в гени, участващи в поддържането на геномната цялост. Проучване, което използва панел за секвениране на 12 гена за предразположение при пациенти с ОК, открива в 24% от 360-те включени пациенти, носителство на герминативна мутация в гените: *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *MRE11*, *MSH6*, *NMN*, *PALB2*, *RAD51C* и *TP53* (129).

Изчисленият общ популационен доживотен риск за развитие на ОК е 0,7%. Индивиди, носители на високо-пенетрантни алели обикновено имат доживотен риск за развитие на ОК по висок от 5%, тези с междинна пенетрантност – доживотен риск между 1,5-5% и тези с ниска пенетрантност – доживотен риск между 0,7-1,5% (130). Появата на симптоми при ОК, предимно в късните стадии на развитие на заболяването и липсата на ефективна терапия в тези случаи обяснява неспирация интерес и продължаващите проучвания върху гени, които имат роля за създаване на предразположение към ОК, тъй като това е основа за избор на определена стратегия за профилактика при този вид рак.

В етиологията на всички видове рак (в т.ч. НОК) основна роля играят гени (според функцията на кодираните от тях протеини), участващи в репарацията на ДНК.

Роля в етиологията на наследствените форми на ОК играят гени, свързани основно с два механизма за репарация. Първите са гени, които кодират белтъци, осъществяващи процесите на репарация на двойноверижни ДНК нарушения (*BRCA1/2*, *RAD51C*, *RAD51D* и др.), а втората група са гени, участващи в репарацията на ендоууклеотидните нарушения на ДНК (MMR гените – *MSH2*, *MSH6*, *PMS* и др.). Всички те имат различна пенетрантност и създават различен по величина риск за развитие на ОК.

6.1.1. Гени с висока пенетрантност

Към гените създаващи висок риск за развитие на ОК спадат *BRCA1/2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *MSH2*, *MSH6* и др.

BRCA1* и *BRCA2

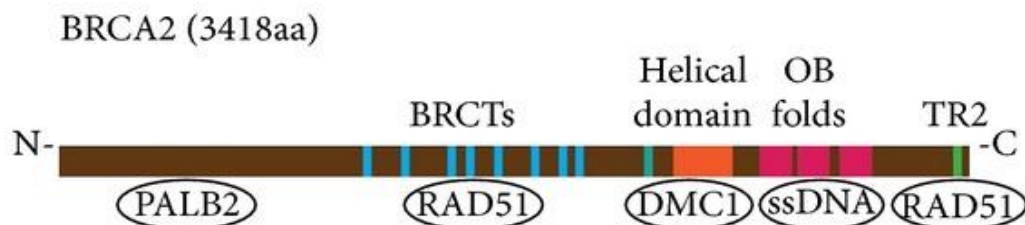
Много проучвания сред фамилии с повече засегнати родственици с рак на гърда (РГ) и/или ОК, в крайна сметка доведоха до клонирането и картирането на *BRCA1* (131) и по-късно на *BRCA2* (132,133).

През 1990 г. локусът 17q21.2 се свързва със случаи на фамилен РГ (ФРГ) (134). При фамилни случаи на РГ и ОК често се установява делеция на 17q в едното копие на хромозомата (хетерозиготно състояние) (135). Чрез позиционно клониране през 1994г. е клониран и картиран *BRCA1* гена в 17q21(131). През 1995г. е клониран и картиран и *BRCA2* в локус 13q12.35 (136). Генът *BRCA1* (Фигура 9) съдържа 24 екзона и кодира протеин, съставен от 1863 аминокиселини (АК). Екзоните са организирани в три домейна: централен N- терминален RING (екзон 2-7), C-терминален BCRT домейн (екзони 16-24) и домейн, включващ екзони 11-13. *BRCA1* се свързва чрез N-терминален RING домейн с *BRCA1* – асоциирания RING домейн белтък 1 (BARD1) (137), а C-терминалният домейн се свързва с фосфорелирани протеини (138,139). Генът *BRCA2* (Фигура 10) съдържа 27 екзони и кодира белтък, съдържащ 3418 АК. N-терминалният домейн на *BRCA2* съдържа транскрипционно активен домейн, средната част включва осем консервативни мотиви наречени BRC, които се свързват с *RAD51*, и C-терминалния участък съдържа ДНК-свързващ домейн, два ядро-локализиращи сигнали и един TR2 (C-терминален *RAD51* свързащ участък) (140). Гените *BRCA1* и *BRCA2* участват в *RAD51* медираната хомоложна рекомбинация (HR), част от репарационните механизми на ДНК. В случай на двойноверижна увреда на ДНК, *BRCA1* може внимателно да се локализира и фосфорилира в увредения участък, *BRCA2* създава комплекс с *RAD51*, за да го премести от мястото, където осъществява синтез на ДНК, към увредения участък и да се извърши поправката на двойноверижната повреда на ДНК (141). По-нататък *PALB2* играе ролята на мост и свързва *BRCA1* с *BRCA2*. Неговият N-терминален участък се свързва с мотив на *BRCA1*, кодиран от екзон 11, а неговия C-терминален участък WD40 се свързва с N-терминалния участък на *BRCA2* и по този начин се формира

комплекса *BRCA1/PALB2/BRCA2*. Този комплекс е критично важен за правилното протичане на HR при двуверижни повреди в ДНК (142). При липса на *BRCA1* и *BRCA2* HR не може да се осъществява. В тези случаи поправката на двойноверижните повреди на ДНК се поемат от процесите на нехомоложната край с край поправка, която е несъвършена, неточна и води до акумулиране на грешки и до геномна нестабилност (136,143). По тази причина *BRCA1* и *BRCA2* играят ключова роля в поддържането на целостта на генома (144).



Фигура 9: Структура на BRCA1 протеина (145)



Фигура 10: Структура на BRCA2 протеина (145)

На нивото на белтъка BRCA1 структурата е: ZINC finger в азотния край (N-терминален участък), C3HC4 (RING finger), които създава примковидна структура, свързваща два атома Zn с 8 аминокиселини (АК); въглеродния край (C-терминален участък) на BRCA1 белтъка (BRCT участък); ядрени-локализиращи сигнали; ядрени-експортиращи сигнали. Всички белтъци, съдържащи RING finger, играят роля в убиквитирането, като лигаза на E3 убиквитина. Убиквитинът е малък белтък, характерен за всички еукариотни клетки и притежава сигнални функции. Посредством многостепенна ензимно-катализирана реакция може да се прикачва към други клетъчни белтъци, модифицирайки ги и променяйки тяхната метаболитна съдба. Структурата на ZINC finger съдържа Cys3HisCys4 АК мотив, който е високо-консервативен и всяка промяна в АК последователност нарушава

свързването на BRCA1 протеина. BRCA1 протеинът участва в регулацията на транскрипцията, чрез взаимодействие с хистон-деацетилазния комплекс чрез участъка си BRCT. Подобен на BRCT участък е друг участък – BRC е открит при всички протеини като BRCA2, които участват във функционирането на пропускателните пунктове (check points) на клетъчния цикъл, както и при отговора на клетката към ДНК повреди. Това е свързано с участък за свързване с едноверижната ДНК и регион от 26 АК наречен PhePP мотив, който свързва мейоза-специфичната рекомбиназа DMC1. Участъкът, свързващ едноверижната ДНК, съдържа 3 свързващи, нагънати, олигонуклеотида (ОВ1-3) и участъка „верига към верига“, който се свързва с двойноверижната ДНК са разположени в С-терминалния участък на BRCA2. В 3` края на BRCA2, в екзон 11, се намира участък, наречен регион на натрупване на овариален карцином, при който възникнали мутации в него увеличават многократно риска за ОК (146).

Много проучвания доказват, че честотата на носителството на мутации в BRCA1 and BRCA2 сред здрави индивид от европейската раса варира в границите съответно между 0.1 до 0.3% и между 0.1 до 0.7% (147–149). Мащабно проучване сред австралийската популация установява, че общата за двата гена честота на носителство на ПВ е 0.65% (1:153), като носителството за BRCA1 мутации е 0.20% (1:500), а за BRCA2 мутации - 0.45% (1:222) (150). Установените от Exome Aggregation Consortium (ExAC) носителства за общата световна популация са подобни, с честота на BRCA1 мутациите 0.21% (1:480), а за BRCA2 мутациите 0.31% (1:327), или комбинираната честота на носителство на мутации в някой от BRCA1/2 гените е 0.51% (1:195) (151). Тъй като в тази честота не се включват големите геномни пренареждания се предполага, че истинската честота на носителство сред здрави индивиди е по-висока.

Много изследвания доказват, че в някои страни и етнически групи, BRCA1/2 мутационният спектър е ограничен до няколко най-чести мутации – „founder effect” (ефект на основателя). Този ефект, касаещ най-често срещаните мутации, е най-добре изявен в популации, при които действат изолатни фактори (географски, културен или религиозен) и които произхождат от сравнително ограничен брой основатели. Така, като последица от ниската генетична дивергенция, някои алели се запазват в поколения наред и се оказват често срещани – „ефект на основателя “.

Въпреки, че в базата данни съществуват много мутации в тези гени, около 53%-55% от вариантите са открити само в единични семейства, което показва, че разпределението на дефектите в двата гена е пръснато и няма горещи точки за възникването им по дължината на гена. Най-честите като вид, мутации в *BRCA1/2* са мононуклеотидна замяна и делеции/инсерции на няколко бази (indels). Те се откриват най-често в кодиращата част на двата гена и представляват около 80% от всички герминативни мутации, отговорни за наследствения ОК. Освен тях съществуват и т.нар. големи геномни пренареждания (large genomic rearrangements - LGR), които могат да достигнат до 20% дял от герминативните мутации (152). Последните са резултат от неравна хомоложна рекомбинация (неравен crossing-over) и обикновено са патогенни, защото засягат големи последователности в кодиращите участъци на гените и водят до променена структура или функция на белтъчния продукт.

Герминативни мутации в *BRCA1* и *BRCA2* се откриват в приблизително 9–13% от пациенти с НОК (153–155). За носители на герминативни мутациите в *BRCA1* изчисления среден риск за ОК варира от 20 до 50% (156–158). За *BRCA2*, средният изчислен риск за ОК варира от 5 до 23% (156–160). Въпреки, че имат по-висок риск за развитие на ОК, носителите на *BRCA1/2* имат по-добър клиничен резултат по отношение на преживяемостта, като носителите на *BRCA2* имат по-благоприятен резултат от носителите на *BRCA1* (161). Счита се, че този феномен се дължи на това, че носителите на *BRCA2* реагират по-добре на базирана на платина химиотерапия (162). Показателят преживяемост обаче намалява, когато се изследва в продължение на 10 години вместо 5 години при HGSC (163). С течение на времето в туморните клетки възникват вторични мутации в *BRCA1* и *BRCA2*, които могат да доведат до възстановяване на дивия тип на гена (преобразуването обратно във функционална *BRCA*) и в следствие до загуба на благоприятен отговор на химиотерапия (164). Асоциативни проучвания са идентифицирали няколко единични нуклеотидни полиморфизма (SNP), свързани с риска за ОК при жените в общата популация (165). Четири от тези SNP (rs10088218, rs2665390, rs717852, rs9303542) са свързани с риск за ОК при носители на *BRCA2*, докато два локуса (rs10088218 и rs2665390) са свързани с риска за ОК при *BRCA1* носители (166). Едновременното носителство на унаследени варианти в други локуси и ПВ в *BRCA1* или *BRCA2* могат по-точно да определят персоналният риск за карцином на гърдата или яйчниците (167). Носителство на мутации в

1p36 (*WNT4*), 4q26 (*SYNPO2*), 9q34.2 (*ABO*) и 17q11.2 (*ATAD5*) води до повишен риск за всички подтипове ЕОК, докато носителството на мутации в 1q34.3 (*RSPO1*) и 6p22.1 (*GPX6*) повишава риска само за серозен овариален карцином при носители на *BRCA* мутация (168). Установено е, че носителите на *BRCA1* мутация и вариант в гена *CASP8*, т.е. полиморфизъм D302H, имат по-нисък риск за развитие на ОК в сравнение с чистото носителство на *BRCA1* мутация (169). Други генетични маркери на риска, като вариант в гена *KRAS* (rs61764370), който разрушава let-7 miRNA свързващо място в този онкоген, се свързва със спорадичен и фамилен ОК без *BRCA1/2* мутации (170). *PALB2*, кодиращ *BRCA2* взаимодействиящ протеин, при наличие на хиперметиране на промотора, води до намалена функция на *BRCA2* и повишен риск от ОК (171). Скорошни данни показват, че вариациите в броя на копията на определени гени също могат да модифицират риска за ОК при носители на *BRCA1* или *BRCA2* мутация – да повишават риска (копийни варианти в *OR2A*) или намаляват риска (копийни варианти в *CYP2A7*) (172). По-пълното разбиране на генетична етиология при носителите на *BRCA1/2* мутации може да помогне за определяне на най-подходящия, персонализиран клиничен подход за определяне на риска за това заболяване и за избора на най-ефективна стратегия за профилактика.

Генетичните фактори, които повишават риска за развитие на овариален карцином, различни от патогенните варианти в *BRCA1* и *BRCA2*, все още не са напълно изяснени. Въпреки това, при значителна част от пациентките се установяват изменения в гени, участващи в поддържането на геномната стабилност, най-често в пътищата на **репарация на неправилно сдвоени нуклеотиди на ДНК (mismatch repair, MMR)**.

MSH2

Генът *MSH2* е един от гените, участващ в MMR и носителството на герминативна мутация в него причинява автозомно-доминантен раков синдром на Lynch. Синдромът на Lynch (LS) е най-често срещаната наследствена форма на колоректален карцином (КПК), представляващ приблизително 3-5% от всички случаи на КПК. LS се нарича наследствен неполипозен колоректален карцином (НПКПК), за да се подчертае липсата на полипи на дебелото черво и да се разграничи от другите наследствени КПК, които се характеризират с наличието на полипи – adenomatous polyposis coli (APC) и синдром на хамартоматозна полипоза. Изчислено е, че LS е вероятно най-често срещаният наследствен раков синдром,

с общо разпространение от 1/100 до 1/180 в общата популация (173). LS е свързан с висок риск от няколко вида рак през целия живот, главно колоректален карцином (КРК) (риск 20-70% със средна възраст на диагностициране 44-61 години), рак на ендометриума (15-70%, 44-61 години), овариален карцином (4-12%, 42,5 години), рак на стомаха (6-13%, 56 години) и за други видове рак (тънко черво, мозък, кожа, хепатобилиарен и пикочен тракт, с общ риск 15%) (174). Етиологията на LS е свързана герминативна мутация в един от гените за репарация на еднонуклеотидни ДНК дефекти (MMR) - *MLH1* (3p22), *MSH2* (2p21), *MSH6* (2p16), *PMS2* (7p22), *MLH3* (14q24), *MSH3* (5q14), *MSH5* (6p21), *MLH2* (2q32). Този тип репарация на ДНК е отговорна за поправянето на несъответствия на една база и малки инсерции и делеции (индели), които възникват главно по време на репликация. Според "дву-ударната" хипотеза на Knudson, дефектната MMR е следствие от двуалелно инактивиране на MMR гени (класически туморни супресорни гени). Следователно индивиди, които са носители на герминативна мутация в тези гени, са предразположени към рак. Ако по време на живота на носителя възникне соматичната мутация и във втория див алел, рактът ще се развие. Соматичната мутация в съответния див алел е главно точкова мутация (175).

Дефицитът на MMR комплекса води до усилване на възникването на мутации, особено в повтарящи се ДНК последователности (пръснати ДНК последователности, които съставляват ~3% от нашия геном и обикновено са полиморфни), така наречените микросателити (MS) (176). Това състояние се нарича микросателитна нестабилност (MSI) и е специфична характеристика на свързаните с LS ракови заболявания (в около 95 % от всички случаи).

6.1.2. Гени с умерена пенетрантност

Към гените, създаващи умерен риск за развитие на ОК, спадат *PALB2*, *ATM*, *PMS2*, други гени от групата на Анемията на Fanconi (FA) и др.

Други гени от групата на FA

Анемията на Fanconi (FA) е рядко генетично заболяване, описано за първи път от швейцарския педиатър Guido Fanconi през 1927 г. FA е рядък генетичен синдром (1 на 100 000), дължащо се на дефектна ДНК репарация, който се характеризира с изявата на костно-мозъчна недостатъчност средно на около 7 годишна възраст, вродени аномалии и предразположеност към рак. Анемията на Фанкони обикновено се унаследява автосомно рецесивно, въпреки че е описвано X-свързано унаследяване и доминантно унаследяване. Досега са описани 22 гена като FA гени: *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG/XRCC9*, *FANCI*, *FANCI/BRIP1*, *FANCL/PHF9*, *FANCM*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51C*, *FANCP/SLX4*, *FANCQ/ERCC4*, *FANCR/RAD51*, *FANCS/BRCA1*, *FANCT/UBE2T*, *FANCU/XRCC2*, *FANCV/REV7* и *FANCW/RFWD3*. Протеините, кодирани от тези гени участват в пътя на FA, включващ репарацията на ДНК и процесите на поддържане на геномна стабилност, при нарушаване целостта на ДНК. Тези белтъци са от съществено значение за възстановяването на междуверижните връзки и те също участват в хомоложна рекомбинация и нехомоложно свързване на краищата на ДНК. *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL* и *FANCM* гените кодират протеини, образуващи основния комплекс, който моноубиквитинира *FANCI/FANCD* комплекса (формиран от димера на *FANCD2* и *FANCI*). Останалите протеини са надолу по веригата и играят ролята на ефектори в пътя на FA. Освен заболяванията, причинени от двуалелни мутации в FA гени, е добре известно, че моноалелните мутации в определени FA гени (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2* и *RAD51C*) асоциират с наследствена предразположеност към РГ и/или ОК и тези гени принадлежат към спектъра от гени за предиспозиция към РГ/ОК. Ролята на моноалелните мутации в останалите FA гени по отношение на предразположението към рак все още се проучва. През последните няколко години проучвания върху моноалелните *FANCM* трункиращи мутации показват, че те са рискови фактори за РГ. В контекста на тези проучвания, ключова роля изигра имплементирането на масивното паралелно секвениране (NGS) в проучванията, което хвърли светлина върху ролята на FA гените в контекста на наследствения рак (177). Проучвания с цялостно геномно секвениране впоследствие установиха соматично моноалелно инактивиране на FA гени при спорадични ракови заболявания.

ATM

Генът *Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM)* е разположен на хромозома 11q и кодира серин/треонин киназа, която играе ключова роля в сигналния отговор при двойноверижни повреди на ДНК чрез функционално взаимодействие с TP53, BRCA1 и CHEK2 (178). Мутации в *ATM* се асоциират с рядкото автозомно-рецесивно невродегенеративно заболяване **атаксия-телеангиектазия (АТ)**, което възниква при хомозиготно (биалелно) носителство на ПВ и се характеризира с прогресивна церебеларна атаксия, имунен дефицит, свръхчувствителност към йонизиращо лъчение и повишен риск от злокачествени заболявания (178,179).

Честотата на АТ варира между 1:40 000 и 1:300 000 живородени, докато **моноалелното носителство на ПВ в *ATM*** в общата популация се среща приблизително при 1% от индивидите (180). Хетерозиготните носители имат повишен риск от развитие на различни видове рак (13). При овариалния карцином *ATM* се класифицира като ген с умерен риск, със стойности между 2% - 3%, като герминативните мутации се откриват по-често при пациентки с HGSC, особено при отсъствие на ПВ в *BRCA1/2* (180). Загубата на *ATM* функция води до дефектна репарация на двойноверижни ДНК повреди и формиране на HRD-фенотип, с потенциални терапевтични приложения, включително повишена чувствителност към платинова химиотерапия и PARP-инхибитори (64).

NBN

Генът *NBN* е локализиран на хромозома 8q21.3 и кодира протеина Nibrin, ключов компонент на MRN-комплекса (MRE11–RAD50–NBN), участващ в разпознаването и иницирането на репарацията на двойноверижни ДНК повреди. Хетерозиготните носители на герминативни мутации в *NBN* имат повишен риск от злокачествени заболявания, включително рак на гърдата и ОК. По отношение на ОК, носителите на герминативни мутации в *NBN* имат приблизително 3,1-кратно повишен риск в сравнение с общата популация. Макар честотата на тези мутации при пациентки с ОК да е сравнително ниска, *NBN* се класифицира като **ген с умерен риск**, особено при фамилни случаи с негативен *BRCA1/2* мутационен статус (181).

RAD51C* и *RAD51D

Гените *RAD51C* и *RAD51D* кодират белтъци, участващи в хомоложната рекомбинация и репарацията на двойноверижни повреди на ДНК. Герминативните мутации в тези гени са добре установени като рисков фактор за развитие на овариален карцином, като рискът е по-изразен в сравнение с този за РГ. Проучвания показват, че трукращите мутации в *RAD51C* и *RAD51D* са силно асоциирани с фамилен овариален карцином, като изчислените относителни рискове за ОК са приблизително 1,99 за *RAD51C* и 1,83 за *RAD51D*. Поради това двата гена се класифицират като гени с умерен до нисък риск, но с ясно изразена клинична значимост. При ОК герминативни мутации в *RAD51C* и *RAD51D* се откриват най-често при HGSC и водят до изразен HRD-фенотип, което има директни терапевтични последици, включително повишена чувствителност към платинова химиотерапия и PARP-инхибитори (181).

TP53

Генът *TP53* е тумор-супресорен и е един от най-често мутиралите гени сред всички видове тумори при човека (182). Локализиран е в късото рамо на 17-та хромозома и е съставен от около 20 000 нуклеотида, съдържа 11 екзона (183). Генът е наречен „пазител на генома“, защото белтъчния му продукт е ключов транскрипционен фактор, участващ в процесите на възстановяването на ДНК, програмираната клетъчна смърт (апоптозата), клетъчното стареене и отговора на клетъчния стрес (увреда на теломерите, хипоксия, клетъчен глад, увреждане на ДНК, онкогенна активация) (184,185).

Унаследяване на герминативна мутация в *TP53* е рядко и е причина за автозомно-доминантния Синдром на Li-Fraumeni (LFS). За разлика от другите високо-пенетрантни гени, при които най-честия тип мутации са тези, които водят до скъсяване на белтъчния продукт, при *TP53* най-често откриваният тип герминативна мутация е миссенс в ДНК-свързващия участък. В допълнение миссенс мутациите се свързват с по-ранно начало, в сравнение с мутациите водещи до скъсен белтъчен продукт. Това се дължи на доминантно-негативния ефект, който оказва мутантният върху дивия алел на *TP53* (186). Пациенти с LFS, развиват тумори в детството (саркоми, остеосаркоми, глиоми и адренални карциноми), РГ в много ранна възраст (30% от жените, носители на герминативна мутация в *TP53* развиват РГ до 30 г. възраст). Ракът на гърдата, саркома, рак на мозък и

адренкортикалният карцином представляват около 77–80% от туморите, свързани с LFS. По-рядко в носителите се откриват други злокачествени заболявания, свързани с LFS, като левкемия и рак на бял дроб, кожа, стомах, яйчници и те представляват 15% от туморите. Има достатъчно *in-vitro* доказателства, че пациенти с LFS имат абнормна реакция спрямо ниски дози радиация, като отговарят с дефектна апоптоза. Разпознаването на синдрома е изключително важно, за да се избягва лъчетерапия, поради риск от развитие на други първични огнища (187). Рискът при пациенти с LFS да развият РГ е между 18-60 пъти по-висока от тази на общата популация (188).

Рискът от развитие на ОК при носителки със синдром на Li-Fraumeni е значително по-нисък в сравнение с риска за РГ, но остава клинично релевантен, особено при ранна възраст. Поради високата чувствителност към йонизираща радиация при тези пациенти, образните диагностични методи и терапевтичните подходи трябва да бъдат внимателно подбрани, а лъчетерапията – избягвана, когато е възможно.

6.1.3. Генни локуси с ниска пенетрантност

Досега с методите на асоциативните геномни проучвания са установени около 27 генни локуса (rs9870207, rs13113999, rs150293538, rs7902587, rs8098244, rs6005807 и др.) с ниска пенетрантност по отношение развитието на ОК, но допринасящи за полигенната етиология на това заболяване (189).

Глава 7. Роля на соматичните мутации и туморна еволюция при овариалния карцином

Соматичните генетични изменения представляват фундаментален механизъм в патогенезата на овариалния карцином и определят както биологичното поведение на тумора, така и неговия терапевтичен отговор. За разлика от герминативните варианти, които отразяват наследствената предиспозиция, соматичните мутации възникват по време на живота и се натрупват прогресивно в резултат на дефекти в ДНК репарацията, екзогенни канцерогенни фактори и ендогенен репликативен стрес. Тези изменения не са статични: те участват в динамичен еволюционен процес, при който туморът се адаптира към селективния натиск на микрооколната среда и системната терапия (190).

Овариалният карцином, и по-специално високостепенният серозен карцином (HGSC), се характеризира с изключително сложен геномен ландшафт, доминиран от копийно-числови изменения, структурни реаранжировки и ограничен брой повтарящи се драйвърни мутации. Тази геномна архитектура е пряко свързана с изразената клонална хетерогенност, честата поява на терапевтична резистентност и неблагоприятната прогноза на заболяването (63).

7.1. Соматични драйвърни събития

Соматичните драйвърни събития се дефинират като генетични изменения, които осигуряват селективно предимство на туморните клетки и допринасят пряко за инициацията, прогресията и поддържането на неопластичния процес. Те засягат ключови гени и сигнални пътища, контролиращи клетъчния цикъл, ДНК репарацията, апоптозата и геномната стабилност, и формират основата на туморната биология при овариалния карцином. В контекста на високостепенния серозен овариален карцином (HGSC) соматичните драйвърни събития не се ограничават до отделни точкови мутации, а включват сложен спектър от структурни реаранжировки и копийно-числови изменения, отразяващи изключително нестабилния геном на този подтип (191).

Най-характерният и практически универсален соматичен драйвър при HGSC е инактивацията на *TP53*, установявана в над 95% от случаите. Мутациите в *TP53* обхващат широк спектър от missense, nonsense, frameshift и splice-site изменения, като значителна част

от missense вариантите водят до стабилен, но нефункционален p53 протеин с доминантно-негативен или gain-of-function ефект. Загубата на нормалната p53 функция нарушава контрола върху G1/S и G2/M преходите на клетъчния цикъл, компрометираща апоптотичния отговор при ДНК увреждане и позволява преживяването на клетки с натрупващи се генетични дефекти. В резултат се създава „разрешителна“ среда за акумулиране на допълнителни драйвърни и пасажерни изменения, което ускорява туморната еволюция и допринася за изразената хетерогенност на HGSC (191).

Особено важен клас соматични драйвърни събития при овариалния карцином засягат гени, участващи в ДНК репарацията чрез хомоложна рекомбинация, най-вече *BRCA1* и *BRCA2*. Докато герминативните мутации в тези гени определят наследствен риск, соматичната им инактивация играе ключова роля при спорадичните форми на заболяването. Тези изменения могат да бъдат резултат от точкови мутации, големи делеции, загуба на хетерозиготност или епигенетично заглушаване на промоторните региони. Функционалният резултат е фенотип на дефицит в хомоложната рекомбинация (HRD), характеризиращ се с невъзможност за прецизна репарация на двуверижни ДНК прекъсвания и последващо натрупване на хромозомни аберации (192).

HRD фенотипът има съществено биологично и клинично значение. От една страна, той допринася за геномната нестабилност и ускорената еволюция на тумора, а от друга – създава специфична терапевтична уязвимост. Туморите с HRD показват повишена чувствителност към ДНК-увреждащи агенти, като платиновите препарати, както и към PARP инхибитори, които експлоатират принципа на синтетичната леталност. По този начин соматичните изменения в *BRCA1/2* и други гени от пътя на хомоложната рекомбинация функционират едновременно като драйвърни събития и като предиктивни биомаркери за терапевтичен отговор (192).

Освен точковите мутации, HGSC се характеризира с изключително висока честота на копийно-числови изменения, които често имат по-голямо функционално значение от отделните нуклеотидни промени. Амплификациите на онкогени като *CCNE1*, *MYC*, *NOTCH3* и *KRAS*, както и делециите на тумор-супресорни региони, представляват ключови драйвърни механизми, водещи до засилена пролиферация, нарушена клетъчна диференциация и агресивен клиничен ход. По-специално, амплификацията на *CCNE1*, кодиращ циклин E1, води до дисрегулация на G1/S прехода и неконтролирана клетъчна

пролиферация, като е асоциирана с неблагоприятна прогноза и резистентност към стандартна химиотерапия (193).

От еволюционна гледна точка е от особено значение наблюдението, че *CCNE1* амплификацията обикновено е взаимно изключваща се с HRD фенотипа. Това предполага съществуването на различни молекулярни и еволюционни траектории на туморно развитие при HGSC. Докато HRD-позитивните тумори разчитат на дефекти в ДНК репарацията като основен двигател на геномната нестабилност, *CCNE1*-амплифицираните тумори изглежда следват алтернативен път, базиран на ускорена клетъчна пролиферация и репликативен стрес. Тези различия имат директни терапевтични импликации, тъй като обуславят различна чувствителност към платинови препарати и таргетни терапии и подчертават необходимостта от прецизна молекулярна стратификация на пациентките (193).

В обобщение, соматичните драйвърни събития при овариалния карцином представляват сложна и взаимосвързана мрежа от точкови мутации, структурни и копийно-числови изменения. Те не само инициират туморния процес, но и определят неговата еволюция, биологично поведение и терапевтична уязвимост, което ги прави централен фокус на съвременната молекулярна онкология и персонализираната медицина.

7.2. Подтип-специфични соматични изменения

Соматичният мутационен профил при овариалния карцином е тясно и последователно свързан с хистологичния подтип, което отразява различния клетъчен произход, етиопатогенетични механизми и еволюционни пътища на туморно развитие. Натрупаните молекулярни данни показват, че овариалният карцином не представлява едно хомогенно заболяване, а група биологично различни неоплазии, всяка от които се характеризира със специфичен спектър от соматични изменения, различна степен на геномна нестабилност и отчетлив клиничен ход (63).

Високостепенният серозен овариален карцином (HGSC) се отличава с екстремна геномна нестабилност, доминирана от копийни варианти, хромозомни преустройства и анеуплоидии, при относително ниска честота на повтарящи се точкови мутации извън *TP53*. Този подтип се асоциира с произход от епитела на фалопиевата тръба и с ранна загуба на геномен контрол, което обуславя натрупването на масивни структурни аберации още в ранните етапи на туморогенезата. Амплификациите и делециите в HGSC засягат множество

онкогени и тумор-супресорни региони, като формират сложен и динамичен геномен ландшафт, който подпомага бързата туморна еволюция и развитието на терапевтична резистентност (68,194).

За разлика от HGSC, нискостепенният серозен карцином (LGSC) демонстрира относително стабилен геном и се характеризира с ограничен брой добре дефинирани драйвърни мутации. Най-често засегнат е MAPK сигналният път, с активиращи мутации в *KRAS*, *BRAF* и *NRAS*. Тези изменения водят до конститутивна активация на клетъчната пролиферация и преживяемост, но без изразена геномна нестабилност. LGSC често се развива поетапно от серозни гранични тумори, което отразява по-бавна и линейна туморна еволюция в сравнение с HGSC. Биологичните различия между двата серозни подтипа имат ясно клинично отражение, като LGSC обикновено протича с по-бавна прогресия, но показва ограничена чувствителност към стандартна химиотерапия (39).

Ендометриоидният овариален карцином се характеризира с различен соматичен мутационен профил, който отразява неговата връзка с ендометриозата и сходството с ендометриоидните карциноми на ендометриума. Чести са мутациите в *ARID1A*, компонент на SWI/SNF комплекса за хроматиново ремоделиране, както и изменения в *PIK3CA* и *PTEN*, водещи до дисрегулация на PI3K/AKT сигналния път. Загубата на *ARID1A* функция нарушава епигенетичния контрол на генната експресия и създава предпоставки за малигнена трансформация в контекста на хронично възпаление и хормонално влияние, характерни за ендометриозата (195).

Clear cell овариалният карцином споделя част от тези молекулярни характеристики, включително висока честота на *ARID1A* мутации и активиране на PI3K/AKT сигнализацията, но се отличава с допълнителни специфични изменения, свързани с адаптация към хипоксична и оксидативно-стресова среда. Този подтип демонстрира относителна резистентност към платинова химиотерапия и специфичен транскрипционен профил, отразяващ метаболитна реорганизация и засилени механизми за клетъчно оцеляване. Молекулярната връзка между clear cell карцинома и ендометриозата подкрепя хипотезата за общ предраков субстрат, от който се развиват тези неоплазии (195).

Муцинозните овариални тумори представляват отделна молекулярна и клинична категория. Те често носят активиращи мутации в *KRAS* и показват сравнително ниска степен на геномна нестабилност. Молекулярният им профил в значителна степен наподобява този

на гастроинтестиналните аденокарциноми, включително по отношение на сигналните пътища и мутационните подписи. Това сходство поставя диагностични предизвикателства, особено при разграничаването на първични овариални муцинозни тумори от метастатични лезии с гастроинтестинален произход, и има съществени терапевтични импликации (196).

Обобщени характеристики на основните хистологични типа на ОК са представени в таблица 1.

Таблица 1. Хистологични типове ОК, честота, характерни генетични изменения и клинична прогноза

Хистологичен тип на ОК	Характерни генетични изменения	Клинична прогноза	Честота
Високо-степенен серозен (HGSC)	<i>TP53, BRCA1, BRCA2, CDK12</i>	Често се диагностицират в късни стадии и са геномно нестабилни	~65%
Ниско-степенен серозен (LGSC)	<i>BRAF, KRAS, NRAS, ERBB2</i>	Често се диагностицират при млади пациенти, по-малко агресивен ход, геномно стабилни	~5%
Ендометриоиден	<i>PTEN, CTNNB1, PPP2R1a, MMR</i>	Добра прогноза и отговор на терапия	10-20%
Светло-клетъчен (clear cell)	<i>PIK3CA, KRAS, PTEN, ARID1A</i>	Лош отговор на химиотерапия и междинна прогноза	~5%
Муцинозен	<i>KRAS, HER2</i> - амплификация	Лош отговор на терапия	~5%

В обобщение, подтип-специфичните соматични изменения при овариалния карцином отразяват фундаментални биологични различия между отделните хистологични форми. Тези различия определят не само патогенезата и еволюцията на тумора, но и клиничното му поведение, прогнозата и отговора към системна терапия. Разпознаването и интегрирането на подтип-специфичните молекулярни профили е ключов елемент в развитието на персонализирани диагностични и терапевтични стратегии при овариалния карцином.

7.3. Клонална хетерогенност

Клоналната хетерогенност представлява фундаментална характеристика на злокачествените тумори и се дефинира като наличие на множество генетично и фенотипно различни клетъчни популации в рамките на един и същи тумор или между първичния тумор и неговите метастатични депа. Тя възниква в резултат на последователното натрупване на соматични мутации, съчетано с процеси на клонална експанзия и селекция, и отразява динамичната природа на туморната еволюция под въздействието на вътрешни и външни селективни фактори (197). В контекста на овариалния карцином, клоналната хетерогенност е особено изразена и допринася съществено за агресивното клинично поведение и честата поява на терапевтична резистентност.

Клоналните мутации възникват в ранните етапи на туморогенезата и обикновено засягат ключови драйвърни гени, които инициират злокачествената трансформация. Тези изменения се откриват във всички туморни клетки и формират т.нар. „стволов клон“, който определя основните биологични характеристики на неоплазията. За разлика от тях, субклоналните мутации се появяват на по-късни етапи от развитието на тумора и са ограничени до определени клетъчни популации. Те отразяват адаптивния отговор на тумора към променящата се микрооколна среда и към селективния натиск, упражняван от системната терапия, и често са отговорни за функционални различия между отделните туморни клони (197).

При овариалния карцином клоналната хетерогенност се проявява както в пространствен, така и във времеви аспект. Пространствената хетерогенност се отнася до различията в мутационния профил между различни туморни огнища в рамките на един пациент, включително между първичния тумор, перитонеалните импланти и отдалечените метастази. Мултирегионните секвениращи проучвания показват, че макар ранните драйвърни мутации да се споделят между всички депа, значителна част от субклоналните изменения са специфични за отделни анатомични локализации. Това предполага паралелна еволюция на различни туморни клони и подчертава ограничената представителност на единична туморна биопсия за пълната геномна архитектура на заболяването (198).

Времовата клонална хетерогенност, от своя страна, отразява динамичните промени в туморния геном между първоначалната диагноза и рецидивите. Под въздействието на

химиотерапията и таргетните терапии се наблюдава елиминиране на чувствителните клонове и селективно предимство за субпопулации с първична или придобита резистентност. В резултат рецидивиращите тумори често демонстрират различен мутационен профил и по-агресивен фенотип в сравнение с първичната неоплазия. Този процес на клонален подбор и експанзия е ключов механизъм за терапевтичен неуспех и прогресия на заболяването (198).

Клоналната хетерогенност има директни клинични импликации, особено по отношение на диагностиката, прогностичната оценка и терапевтичния избор. Наличието на субклонални драйвърни изменения може да доведе до подценяване на клинично значими мутации при анализ на ограничен туморен материал, докато динамичните промени във времето налагат повторно молекулярно профилиране при рецидив. В този контекст, интегрирането на мултирегионно секвениране и течна биопсия в клиничната практика се разглежда като перспективен подход за по-пълно улавяне на клоналната архитектура и за адаптиране на терапевтичните стратегии към еволюционната динамика на овариалния карцином.

7.4. Туморна еволюция и селективен натиск

Туморната еволюция при ОК представлява динамичен и многоетапен процес, в рамките на който неопластичните клетки натрупват генетични и епигенетични изменения и се подлагат на постоянен селективен натиск. Съвременните геномни изследвания показват, че развитието на овариалния карцином може да следва различни еволюционни модели – линейна, разклонена, неутрална или т.нар. „пунктуирана“ еволюция, характеризираща се с кратки епизоди на масивни геномни промени, последвани от относителна генетична стабилност (199). Тези модели не са взаимно изключващи се и често съжителстват в рамките на един и същи тумор, отразявайки сложната и адаптивна природа на заболяването.

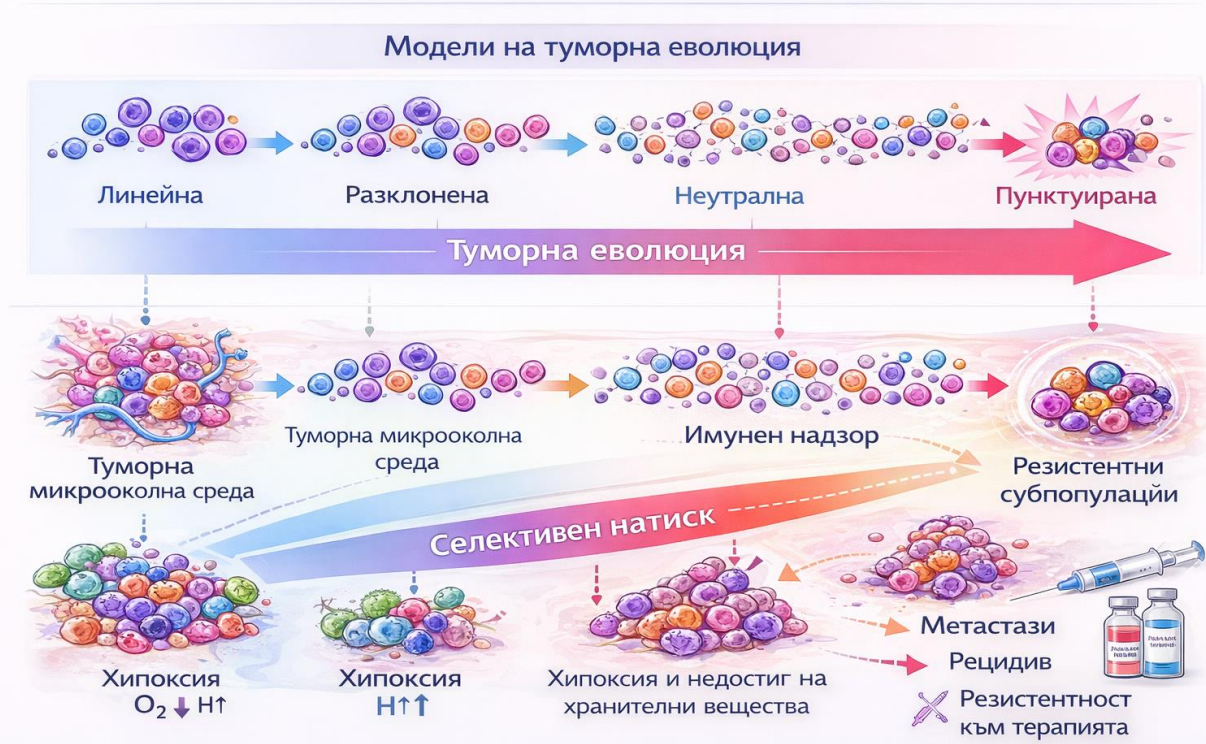
Линейният модел на туморна еволюция предполага последователно натрупване на драйвърни мутации в доминиращ клон, който постепенно измества предходните клетъчни популации. Този модел е по-характерен за тумори с относително стабилен геном и бавна прогресия. За разлика от него, разклонената еволюция, която се наблюдава често при високостепенния серозен овариален карцином, се характеризира с паралелно развитие на

множество клонове, произхождащи от общ предшественик. Всеки от тези клонове натрупва специфични субклонални изменения, което води до изразена вътре- и интертуморна хетерогенност. Неутралният модел предполага акумулиране на мутации без ясно селективно предимство, докато „пунктуираната“ еволюция включва ранни катастрофични събития, като хромотрипсис или масивни копийно-числови промени, които оформят основния геномен ландшафт още в началните етапи на туморогенезата (199).

Селективният натиск играе централна роля в оформянето на туморната еволюция. Той се създава от множество фактори, включително туморната микрооколна среда, имунния надзор, хипоксичните условия, хранителните ограничения и в по-късните етапи, от системната противотуморна терапия. Взаимодействията между туморните клетки и стромалните, имунните и ендотелните компоненти на микрооколната среда създават селективни „ниши“, които благоприятстват оцеляването и експанзията на определени клонови с адаптивни предимства. Иmunният отговор, от своя страна, може да елиминира високоимуногенни клетъчни популации и да селектира клонове с механизми за имуно избягване, което допълнително допринася за туморната прогресия.

Системната терапия представлява един от най-мощните еволюционни фактори при овариалния карцином. Химиотерапията и таргетните агенти действат като селективен филтър, който ефективно елиминира чувствителните туморни клетки, но същевременно създава условия за оцеляване и експанзия на резистентни субпопулации. Тези резистентни клонове могат да бъдат налични още преди началото на лечението или да възникнат в резултат на терапевтично индуцирани генетични и епигенетични промени. В резултат, рецидивиращите тумори често демонстрират по-агресивен биологичен профил, засилена геномна нестабилност и ограничена чувствителност към последващи терапевтични линии (200).

Туморна еволюция и селективен натиск



Фигура 11. Модели на туморна еволюция и селективен натиск при овариалния карцином.
Фигура генерирана от AI.

Еволюционната динамика под влияние на селективния натиск обяснява честата поява на рецидиви при овариалния карцином, въпреки първоначалния добър отговор към терапията (Фигура 11). Тя подчертава необходимостта от преосмисляне на терапевтичните стратегии, включително използване на адаптивни режими, комбинирани подходи и динамично молекулярно проследяване. В този контекст, разбирането на туморната еволюция и селективния натиск не само допринася за по-задълбочено биологично познание, но и има пряко значение за развитието на персонализирани и по-ефективни лечебни стратегии при овариалния карцином.

7.5. Механизми на терапевтична резистентност

Терапевтичната резистентност при овариалния карцином представлява един от основните фактори, ограничаващи дългосрочната ефективност на системното лечение и е тясно свързана с процесите на туморна еволюция и клонална селекция. Въпреки че голяма част от пациентките демонстрират първоначален добър отговор към платинова химиотерапия и таргетни агенти, включително PARP инхибитори, при значителен процент от случаите се развива първична или придобита резистентност, водеща до рецидив и прогресия на заболяването. Молекулярните механизми, стоящи в основата на този процес, са хетерогенни и отразяват адаптивния потенциал на туморните клетки (201)(Фигура 12).

При HRD-позитивни тумори, лекувани с PARP инхибитори, един от най-добре характеризирани механизми на придобита резистентност са вторичните т.нар. „reversion“ мутации в *BRCA1* и *BRCA2*. Тези изменения възстановяват рамката на четене на гена и частично или напълно възвръщат функционалната хомоложна рекомбинация, което елиминира синтетичната леталност, на която се базира терапевтичният ефект на PARP инхибиторите. В резултат туморните клетки придобиват способност за ефективна репарация на ДНК уврежданията и демонстрират значително намалена чувствителност както към PARP инхибитори, така и към платинови препарати. Тези reversion мутации често възникват субклонално и се селектират под въздействието на терапевтичния натиск, което ги прави трудни за откриване при стандартно еднократно молекулярно профилиране (201).

Освен възстановяването на хомоложната рекомбинация, резистентността може да бъде медирана и чрез алтернативни механизми за ДНК репарация и стабилизиране на репликационните вилици. Активирането на компенсаторни пътища, включително нехомоложното свързване на краища (NHEJ) или промени в регулаторите на репликационния стрес, позволява на туморните клетки да преживяват в условия на интензивно ДНК увреждане. Тези адаптивни промени допринасят за функционална резистентност, дори при отсъствие на директни reversion мутации в *BRCA* гените.

Клоналният подбор на първично резистентни клетъчни популации представлява друг ключов механизъм на терапевтична неефективност. В хетерогенния туморен масив могат да съществуват субпопулации с вродена резистентност към определени терапевтични агенти, които оцеляват по време на лечението и впоследствие доминират туморната маса.

Този процес е особено релевантен при продължителна системна терапия и подчертава ролята на вътретуморната хетерогенност като предпоставка за рецидив.



Фигура 12. Основни механизми на терапевтична резистентност при ОК. Фигура генерирана от AI.

Епигенетичните промени също заемат важно място сред механизмите на терапевтична резистентност. Динамичните модификации на хроматина и промените в метилирането на ДНК могат да доведат до заглушаване или реактивация на гени, участващи в лекарствения транспорт, апоптозата и ДНК репарацията. Тези процеси са потенциално обратими и създават възможности за терапевтична интервенция чрез комбиниране на стандартни схеми с епигенетични модулатори (202).

Взаимодействията между туморните клетки и микрооколната среда допълнително модулират терапевтичния отговор. Стромалните клетки, имунните компоненти и екстрацелуларният матрикс могат да осигурят защитни сигнали, които подпомагат

преживяемостта на туморните клетки и намаляват ефективността на системната терапия. Хипоксичните условия и метаболитният стрес в туморната микрооколна среда допринасят за селекцията на по-адаптивни и резистентни клетъчни популации.

В обобщение, терапевтичната резистентност при овариалния карцином е резултат от сложна взаимовръзка между генетични, епигенетични и микрооколно-медирирани механизми. Тази комплексност подчертава необходимостта от динамично молекулярно проследяване, включително чрез течна биопсия, както и от разработване на адаптивни и комбинирани терапевтични стратегии, насочени към ограничаване на туморната еволюция и удължаване на клиничната полза от лечението (202).

7.6. Клинични приложения на туморната еволюция

Разбирането на соматичните мутации и туморната еволюция има съществени клинични приложения. Анализът на NGS данни от туморна тъкан и течна биопсия позволява идентифициране на клонални и субклонални драйвърни събития, мониториране на минималната остатъчна болест и ранно откриване на резистентни клонове.

Интегрирането на еволюционната перспектива в клиничната онкология създава предпоставки за персонализиран терапевтичен подход, насочен не само към елиминиране на доминиращия клон, но и към ограничаване на бъдещата клонална еволюция.

Глава 8. Молекулярно-генетична диагностика и NGS подходи

Молекулярно-генетичната диагностика заема централно място в съвременния мултидисциплинарен подход към ОК, като осигурява фундаментална основа за прецизна диагноза, надеждна прогностична оценка и индивидуализиран терапевтичен избор. Интегрирането на геномната информация в клиничния алгоритъм позволява по-детайлна биологична характеристика на тумора, надхвърляща традиционната хистопатологична класификация, и допринася за по-точна стратификация на пациентките според риска, прогнозата и очаквания терапевтичен отговор. В този контекст молекулярно-генетичният анализ се утвърждава като ключов инструмент както в диагностиката, така и в дългосрочното клинично управление на заболяването.

Масивно паралелното секвениране (next-generation sequencing, NGS) представлява технологичен пробив, който позволява едновременното изследване на голям брой гени и

геномни региони с висока чувствителност, специфичност и аналитична дълбочина. За разлика от традиционните методи, насочени към анализ на единични гени, NGS осигурява цялостен поглед върху генетичния ландшафт на тумора, включително точкови мутации, малки инсерции и делеции, копийно-числови изменения и, при определени платформи, структурни реаранжировки. Това превръща NGS в основен метод за молекулярна диагностика при епителния овариален карцином и значително трансформира диагностичния и терапевтичния алгоритъм на заболяването.

В клиничната практика NGS се използва както за откриване на герминативни варианти, асоциирани с наследствен риск, така и за идентифициране на соматични изменения с директни терапевтични импликации. Анализът на герминативната ДНК позволява диагностициране на наследствени синдроми, като тези, свързани с мутации в *BRCA1*, *BRCA2* и други гени от пътя на хомоложната рекомбинация, което има значение не само за пациентката, но и за фамилното консултиране и превантивните стратегии при родствениците. От друга страна, туморно-специфичното NGS профилиране предоставя информация за соматични драйвърни мутации и молекулярни подтипове, които могат да бъдат използвани за избор на таргетна терапия, включително приложение на PARP инхибитори, както и за прогнозиране на чувствителността към платинова химиотерапия.

Допълнително предимство на NGS е възможността за оценка на сложни молекулярни фенотипове, като дефицит в хомоложната рекомбинация (HRD), мутационен товар и специфични геномни подписи, които имат както прогностично, така и предиктивно значение. По този начин молекулярно-генетичната диагностика не се ограничава до статично описание на генетични изменения, а се превръща в динамичен инструмент за проследяване на туморната еволюция и адаптиране на терапевтичната стратегия във времето. В съвкупност, внедряването на NGS в клиничната практика представлява ключова стъпка към реализацията на принципите на прецизната онкология при овариалния карцином и съществено подобрява възможностите за персонализирано лечение и оптимизиране на клиничните резултати (203).

8.1. Принципи на масивно паралелно секвениране

Масивното паралелно секвениране (next generation sequencing, NGS) представлява високопроизводителна секвенираща технология, при която милиони до милиарди ДНК фрагменти се анализират паралелно, което позволява бързо, мащабно и икономически ефективно генериране на големи обеми секвенционни данни. Тази парадигма бележи съществено отклонение от класическото Sanger секвениране, като осигурява значително по-висока чувствителност, резолюция и възможност за едновременно изследване на множество гени или цели геномни региони. В клиничната онкогенетика NGS се утвърди като стандартен метод за молекулярно профилиране на тумори, включително при овариалния карцином, където се изисква детекция на хетерогенни и често соматични варианти с ниска алелна честота (204).

Методологично, масивно паралелното секвениране включва няколко последователни и строго контролирани етапа. Процесът започва с изолиране на ДНК от подходящ биологичен материал – туморна тъкан (прясна или FFPE), периферна кръв или други източници. Изолираната ДНК се подлага на фрагментация до фрагменти с дефинирана дължина, обикновено в диапазона 150–300 bp, чрез механични (ултразвукови) или ензимни методи. Следва библиотечната подготовка, при която към краищата на ДНК фрагментите се лигират специфични адаптери, съдържащи последователности, необходими за амплификация, секвениране и биоинформатично разпознаване на пробите. На този етап често се включват и индексни (barcode) последователности, позволяващи мултиплексиране на множество проби в една секвенираща реакция (204).

Платформите на Illumina (Фигура 13) представляват най-широко използваната технология за NGS в клиничната и научната практика и се базират на принципа „sequencing by synthesis“ (SBS). След библиотечната подготовка ДНК фрагментите се хибридизират към олигонуклеотиди, фиксирани върху повърхността на flow cell, където всеки фрагмент се подлага на локална клъстерна амплификация чрез т.нар. bridge PCR. В резултат се образуват клъстери от идентични копия на единичен ДНК фрагмент, което увеличава сигнала и позволява надеждно оптично отчитане по време на секвенирането. Този етап е критичен за качеството на данните, тъй като прекомерната или недостатъчната плътност на клъстерите може да доведе до понижена точност на секвенирането. Секвенирането при Illumina платформите се осъществява чрез циклично добавяне на флуоресцентно маркирани,

обратимо терминаторни нуклеотиди. При всеки цикъл се инкорпорира един нуклеотид към нарастващата ДНК верига, след което се извършва оптично отчитане на флуоресцентния сигнал, определящ вида на включената база. След отчитането терминаторната група и флуорофорът се отстраняват, което позволява следващ цикъл на синтез. Този процес се повтаря стотици пъти, в зависимост от дължината на прочита (read length), като резултатът е точна нуклеотидна последователност за всеки клъстер. В клиничната практика често се използва paired-end секвениране, при което се анализират и двата края на ДНК фрагмента, което подобрява подравняването към референтния геном и улеснява детекцията на инсерции, делеции и структурни варианти. Ключово предимство на NGS, и по-специално на Illumina-базираните платформи, е възможността за детекция на широк спектър от генетични изменения в рамките на един анализ. Това включва точкови мутации (single nucleotide variants), малки инсерции и делеции (indels), copy number вариации, както и – при подходящ дизайн на панела и аналитичния pipeline – структурни реаранжировки. Тази универсалност е от особено значение при овариалния карцином, където клинично релевантните изменения могат да бъдат както точкови мутации в *TP53* или *BRCA1/2*, така и по-големи геномни аберации. Дълбочината на покритие (coverage) представлява критичен параметър при NGS анализа и се дефинира като средният брой прочити, покриващи дадена нуклеотидна позиция. При туморна ДНК високата дълбочина на покритие е особено важна, тъй като соматичните варианти често се откриват с ниска алелна честота поради вътретуморна хетерогенност, наличие на нормални клетки в пробата или субклонален характер на измененията. В клиничните онкологични панели обикновено се цели средно покритие от $\geq 500\times$, а при някои приложения – значително по-високо, за да се осигури надеждна детекция на варианти с алелна честота под 5% (205).



Фигура 13. Масивно паралелно секвениране (NGS) – основни етапи и принципи на Illumina-базираната технология. Фигура генерирана от AI.

В заключение, масивно паралелното секвениране, и по-специално Illumina-базираната технология, предоставя високонадежден, чувствителен и гъвкав метод за комплексен молекулярен анализ при овариалния карцином. Детайлното разбиране на методиката, нейните технически параметри и ограничения е от съществено значение за правилната интерпретация на резултатите и за ефективното ѝ интегриране в клиничната диагностика и персонализирания терапевтичен подход.

8.2. Видове NGS панели при овариален карцином

В клиничната практика при овариалния карцином се използват няколко основни типа NGS панели (Фигура 14), които се различават по своя обхват, аналитична дълбочина, диагностична цел и клинично предназначение. Изборът на конкретен тип панел се определя от редица фактори, включително клиничната индикация, стадия и хистологичния подтип на тумора, наличния биологичен материал, както и необходимостта от прогностична и

предиктивна информация. В контекста на прецизната онкология тези панели представляват ключов инструмент за интегриране на молекулярно-генетичните данни в индивидуализирания диагностичен и терапевтичен подход.

Най-широко приложение в рутинната клинична диагностика намират таргетните генно-специфични NGS панели, които включват ограничен, но клинично валидиран набор от гени с доказано значение за патогенезата, прогнозата и терапевтичния отговор при овариалния карцином. Типично тези панели обхващат гени като *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *RAD51C*, *RAD51D*, *PALB2*, както и други гени, участващи в ДНК репарацията чрез хомоложна рекомбинация и ключови сигнални пътища (206). Основното им предимство е възможността за постигане на много висока дълбочина на покритие, което позволява надеждна детекция на герминативни и соматични варианти с ниска алелна честота, включително при проби с ограничено качество или нисък процент туморни клетки.

Таргетните панели са особено подходящи за анализ на формалин-фиксирана парафин-вградена (FFPE) туморна тъкан, която е най-често използваният материал в клиничната практика. Благодарение на оптимизирания си дизайн и ограничен обхват, те демонстрират висока аналитична чувствителност, кратко време за обработка и относително по-ниска цена в сравнение с по-широкообхватните подходи. Това ги прави предпочитан избор за първична молекулярна диагностика, за определяне на HRD статус и за идентифициране на пациентки, потенциално подходящи за лечение с PARP инхибитори или други таргетни терапии.

Разширените онкологични NGS панели представляват следващо ниво на молекулярна характеристика и обхващат десетки до стотици гени, асоциирани с онкогенеза, туморна прогресия и терапевтичен отговор. Те позволяват по-задълбочен анализ на соматичния мутационен профил, включително идентифициране на по-редки, нетипични или подтип-специфични генетични изменения, които могат да имат прогностично значение или потенциална терапевтична приложимост (206,207). При овариалния карцином тези панели са особено полезни при тумори с нетипичен клиничен ход, при първична или придобита терапевтична резистентност, както и при включване на пациентки в клинични проучвания с експериментални таргетни агенти.

Въпреки своите предимства, разширените панели генерират значително по-голям обем данни и изискват по-сложен биоинформатичен анализ и експертна клинична

интерпретация. Често се идентифицират варианти с неясна клинична значимост, което налага участието на мултидисциплинарен екип, включващ клинични генетици, молекулярни патолози и онколози, за правилното интегриране на резултатите в клиничното решение.



Фигура 14. Видове NGS панели и техният аналитичен обхват при овариален карцином.
Фигура генерирана от AI.

Екзомното секвениране (whole-exome sequencing, WES) и цялогеномното секвениране (whole-genome sequencing, WGS) предоставят най-широкия възможен обхват на генетичен анализ, като обхващат съответно всички кодиращи региони или целия геном. Тези подходи позволяват идентифициране на нови или неочаквани драйвърни мутации, сложни структурни преустройства и глобални геномни подписи, включително мутационни подписи и показатели за геномна нестабилност. Поради по-високата цена, по-дългото време за анализ, по-ниската средна дълбочина на покритие и значителните изисквания към биоинформатичната инфраструктура, WES и WGS се използват предимно в изследователски контекст или при сложни клинични случаи, при които стандартните

таргетни или разширени панели не предоставят достатъчна диагностична информация (206).

В обобщение, различните видове NGS панели при овариалния карцином представляват комплементарни инструменти, които отговарят на различни клинични и изследователски нужди. Рационалният избор между таргетни генно-специфични панели, разширени онкологични панели и геномно-обхватни подходи е от съществено значение за оптимизиране на диагностичната ефективност, коректната интерпретация на резултатите и прилагането на персонализирани терапевтични стратегии в съвременната онкологична практика.

8.3. Анализ на герминативна и туморна ДНК

Съществен аспект на NGS диагностиката при овариалния карцином е прецизното разграничаване между герминативни и соматични генетични варианти, тъй като техният биологичен произход, клинично значение и последствия за пациентката и нейното семейство се различават съществено. Това разграничение е критично за правилната интерпретация на резултатите от молекулярно-генетичния анализ и за вземането на информирани клинични решения в контекста на прецизната онкология.

Герминативната ДНК, най-често изолирана от периферна кръв, но в определени случаи и от други източници като слюнка или нормална тъкан, отразява наследствения генетичен профил на пациента. Установяването на патогенни или вероятно патогенни герминативни варианти, особено в гени като *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D* и други гени, асоциирани с наследствени синдроми на рак, има ключово значение за оценка на фамилия онкологичен риск. Тези резултати са основа за генетично консултиране, насочено както към самата пациентка, така и към нейните родственици, с цел информирано вземане на решения относно профилактични мерки, скрининг и превантивни хирургични интервенции (208).

От друга страна, туморната ДНК, изолирана от формалин-фиксираны парафиново-вградени (FFPE) тъкани или от свеж туморен материал, отразява соматичния мутационен пейзаж на неоплазията. Този пейзаж е резултат от натрупването на придобити генетични изменения в хода на туморната еволюция и е силно хетерогенен както между различни

пациенти, така и в рамките на един и същи тумор. Анализът на туморна ДНК чрез NGS позволява идентифициране на клинично и терапевтично значими соматични изменения, включително соматични мутации в *BRCA1* и *BRCA2*, както и други маркери, асоциирани с дефицит в хомоложната рекомбинация (HRD), които имат директно значение за избора на таргетна терапия с PARP инхибитори (207,209).

Важно предизвикателство при анализа на туморна ДНК представляват техническите и биологичните особености на материала, включително деградацията на ДНК при FFPE проби, наличието на нормални клетки и изразената вътретуморна хетерогенност. Тези фактори могат да доведат до ниска алелна честота на соматичните варианти и да затруднят разграничаването им от герминативните изменения, особено при липса на съпътстващ анализ на нормална тъкан. Поради това интерпретацията на туморните NGS резултати изисква висок аналитичен стандарт и интеграция на клинична, хистопатологична и молекулярна информация.

Сравнителният анализ между герминативна и туморна ДНК се счита за златен стандарт за коректно определяне на произхода на установените генетични варианти. Чрез директно сравнение на вариантите в двете проби може надеждно да се разграничат наследствените от придобитите изменения, да се идентифицират случаи на загуба на хетерозиготност и да се избегне погрешна интерпретация на соматични варианти като герминативни или обратно. Този подход е особено важен при гени с двойна клинична роля – както за наследствен риск, така и за таргетна терапия – каквито са *BRCA1* и *BRCA2* (210).

В заключение, разграничаването между герминативни и соматични варианти при NGS диагностиката на овариалния карцином е ключов елемент за правилната клинична интерпретация, персонализирания терапевтичен избор и адекватното генетично консултиране. Интегрираният анализ на герминативна и туморна ДНК не само повишава диагностичната точност, но и осигурява цялостен поглед върху биологичната основа на заболяването, което е предпоставка за оптимизиране на грижите за пациентките и техните семейства.

8.4. Интерпретация и класификация на генетичните варианти

Интерпретацията на резултатите от масивното паралелно секвениране (Next-Generation Sequencing, NGS) представлява един от най-критичните, методологично сложни и отговорни етапи в молекулярно-генетичната диагностика. Този процес изисква интегриране на биоинформатичен анализ, молекулярно-генетична експертиза и клиничен контекст, тъй като крайната интерпретация има пряко отражение върху диагностичните, прогностичните и терапевтичните решения, както и върху генетичното консултиране на пациентите и техните семейства.

Класификация на герминативните варианти

Герминативните генетични варианти се класифицират съгласно международно приетите препоръки на American College of Medical Genetics and Genomics и Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) в пет категории: патогенни, вероятно патогенни, варианти с неопределено клинично значение (Variants of Uncertain Significance, VUS), вероятно бенигнни и бенигнни (211). Тази стандартизирана рамка има за цел да осигури възпроизводимост и унифициран подход между различните лаборатории, като минимизира интерпретационната вариабилност.

Класификацията се основава на мултипараметричен модел, включващ тип на варианта (missense, nonsense, frameshift, splice-site, CNV), локализация в гена и засегнатия функционален домен, честота в популационни бази данни (напр. gnomAD), резултати от функционални изследвания, сегрегационни данни във семейства и съответствие с клиничния фенотип. При овариалния карцином тези параметри се интерпретират в контекста на хистологичния подтип, възрастта при диагностициране и семейната анамнеза, което е особено важно при оценка на наследствени синдроми, свързани с гени като *BRCA1/2*, *RAD51C/D*, *BRIP1* и др.

Вариантите с неопределено клинично значение (VUS) представляват съществено предизвикателство, особено при използване на разширени панели и екзомно секвениране. Поради липса на достатъчно доказателства, те не могат да служат като основа за клинични решения, включително профилактични интервенции или предиктивно тестване на родственици. Поради това се препоръчва тяхната периодична преоценка при натрупване на нови функционални, популационни и клинични данни (212).

Класификация на соматичните варианти

Паралелно с интерпретацията на герминативните варианти, анализът и класификацията на соматичните генетични изменения имат ключово значение в онкологичната практика, особено във връзка с персонализираната терапия. За разлика от герминативните варианти, соматичните изменения не се унаследяват и се оценяват основно в контекста на туморната биология, прогнозата и терапевтичната предсказуемост.

Соматичните варианти се класифицират най-често съгласно препоръките на AMP/ASCO/CAP в четири клинични нива (tiers), базирани на тяхната клинична значимост (213):

- **Tier I** – варианти със силна клинична значимост, за които съществуват утвърдени терапевтични, диагностични или прогностични импликации;
- **Tier II** – варианти с потенциална клинична значимост, подкрепени от ограничени клинични данни или текущи клинични проучвания;
- **Tier III** – варианти с неопределено клинично значение в соматичен контекст;
- **Tier IV** – вероятно доброкачествени или доброкачествени соматични варианти.

При овариалния карцином особено клинично значение имат соматичните ПВ в гени, участващи в хомоложната рекомбинация и ДНК репарацията, включително *BRCA1/2*, които могат да предсказват чувствителност към PARP-инхибитори. Интерпретацията на соматичните варианти включва допълнителни параметри като вариантна алелна честота (VAF), туморна клетъчност, клоналност, както и възможни технически артефакти, особено при анализ на FFPE материал.

Важно е да се подчертае, че част от установените соматични варианти могат да представляват недиагностицирани герминативни изменения, което налага внимателна оценка и при необходимост – последващо изследване на периферна кръв. По този начин интерпретацията на NGS резултатите при овариалния карцином следва да се разглежда като интегративен и динамичен процес, обединяващ герминативната и соматичната генетична информация с цел оптимизиране на клиничното поведение.

8.5. Ограничения и предизвикателства на NGS диагностиката

Въпреки значителните си предимства и широкото внедряване в съвременната онкологична практика, NGS диагностиката има редица съществени ограничения, които следва да бъдат ясно отчетени при анализа и клиничната интерпретация на резултатите. Тези ограничения обхващат както техническите и аналитичните аспекти на метода, така и интерпретационните и клиничните предизвикателства, които могат да повлияят върху точността и практическата приложимост на получената генетична информация.

От техническа гледна точка, качеството на изходния материал представлява ключов лимитиращ фактор. Анализът на формалин-фиксирана и парафиново-включена (FFPE) тъкан често е съпроводен с деградация и фрагментация на ДНК, химични модификации и секвениращи артефакти, които могат да доведат до фалшиво положителни или фалшиво отрицателни резултати. Това е особено критично при идентифициране на нискочестотни соматични варианти и при коректната оценка на вариантната алелна честота, която има значение за клоналността на тумора и потенциалния терапевтичен отговор (211,213).

Допълнително предизвикателство представлява неравномерното покритие на определени геномни региони, свързано с GC-богати участъци, повтарящи се последователности или ограничения в дизайна на таргетните панели. В резултат някои клинично значими екзони или splice-сайтове могат да останат с недостатъчна дълбочина на покритие, което налага използване на допълнителни методи за верификация. Освен това стандартните NGS подходи имат ограничена чувствителност за откриване на структурни реаранжировки, балансиранни транслокации и някои типове copy number вариации, което може да доведе до непълна молекулярна характеристика на тумора.

От интерпретационна гледна точка, разграничаването между клинично значими драйвърни мутации и пасажерни генетични изменения представлява сериозно предизвикателство. При тумори с висока мутационна тежест броят на установените соматични варианти може да бъде значителен, което усложнява тяхната приоритизация и изисква задълбочено познаване на туморната биология и наличните клинични доказателства. Управлението на вариантите с неопределено клинично значение (VUS) както в герминативен, така и в соматичен контекст, допълнително усложнява процеса, тъй като тези варианти не могат да бъдат използвани като основа за клинични решения и изискват периодична преоценка (211,213).

Не на последно място, резултатите от NGS задължително трябва да се интерпретират в интеграция с клиничните, хистологичните и образните данни за пациента. Изолираната молекулярна находка, без адекватна клинична корелация, крие риск от свръхинтерпретация и приписване на клинична значимост на генетични изменения без доказана роля за заболяването. Това налага мултидисциплинарен подход и тясно сътрудничество между молекулярни генетици, онколози и патолози.

8.6. Препоръчителен минимален генетичен панел при овариален карцином (практически обзор)

Изборът на **препоръчителен минимален генетичен панел** при овариален карцином (Таблица 2) е ключов практически аспект на молекулярната диагностика, тъй като той трябва да балансира между клинична информативност, аналитична надеждност и икономическа ефективност. Минималният панел следва да включва гени с **доказана клинична значимост** за диагностика, прогнозиране на терапевтичния отговор, избор на таргетна терапия и фамилно генетично консултиране, като същевременно се избягва ненужно разширяване с гени с ограничена или несигурна клинична стойност (211,212).

Международните ръководства и консенсусни препоръки (ESMO, NCCN, ASCO, ACMG) са единодушни, че **всички пациентки с епителен овариален карцином**, независимо от възрастта и фамилната анамнеза, следва да бъдат изследвани за мутации в *BRCA1* и *BRCA2*, както в герминативен, така и в соматичен контекст (214–216). Тези гени са не само ключови за идентифициране на наследствени форми на заболяването, но и представляват утвърдени предиктивни биомаркери за чувствителност към платинова химиотерапия и PARP-инхибитори.

Натрупаните данни показват, че ограничаването на анализа единствено до *BRCA1/2* е недостатъчно за пълна оценка на хомоложния рекомбинационен дефицит (HRD). Поради това минималният панел следва да включва и други гени от пътя на хомоложната рекомбинация, като *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1* и *PALB2*, за които е доказана връзка както с наследствен риск от овариален карцином, така и с потенциална терапевтична значимост (214,215). Включването на тези гени повишава диагностичния добив и позволява по-прецизна стратификация на пациентките.

В практичен аспект минималният панел трябва да бъде приложен както върху периферна кръв (герминативен анализ), така и върху туморна тъкан (соматичен анализ), като осигурява адекватно покритие на всички кодиращи екзони и splice-сайтове. Особено внимание следва да се отдели на възможността за откриване на малки индели и големи делеции/дупликации, които са чести в *BRCA1/2* и изискват допълващи методи (напр. MLPA) (217).

Таблица 2: Препоръчителен минимален NGS панел според хистологичния подтип на овариалния карцином (практически ориентиран подход)

Подтип (клиничен контекст)	Минимални гени / мишени (туморно NGS)	Клинична употреба (най-често)
HGSC (високостепенен серозен карцином)	BRCA1, BRCA2; по възможност ключови HRR гени (<i>RAD51C/D, PALB2, BRIP1</i>); TP53; CNA/CCNE1 (ако панелът и аналитиката позволяват)	HRD и PARP стратификация; подкрепа на молекулярната класификация; прогностични маркери; оценка на платинова чувствителност
Ендометриоиден овариален карцином	PIK3CA, PTEN, KRAS, ARID1A; по показания BRCA1/2 / HRR гени	Подтипова и прогностична стратификация; идентифициране на PI3K/AKT/mTOR-осеви терапевтични възможности; селекция за клинични проучвания
Clear cell овариален карцином	ARID1A, PIK3CA; по показания PTEN; BRCA1/2 / HRR гени при клинична необходимост	Биологична стратификация; потенциал за синтетична леталност; PI3K-насочени подходи; включване в клинични изпитвания
Муцинозен овариален карцином	KRAS; ERBB2 (HER2) – амплификация/варианти; по показания други MAPK гени	Идентифициране на възможни HER2-насочени стратегии; молекулярна подкрепа на диагнозата; диференциация от метастатични муцинозни тумори

В заключение, препоръчителният минимален панел при овариален карцином следва да бъде **фокусиран, клинично релевантен и стандартизиран**, като осигурява надеждна идентификация на ключови герминативни и соматични варианти с директни терапевтични

и консултативни импликации. Такъв подход улеснява интеграцията на NGS в рутинната практика, намалява честотата на VUS и подпомага ефективното прилагане на персонализираната медицина.

9. Терапевтични приложения и персонализирана медицина

През последното десетилетие терапевтичният подход при овариалния карцином претърпя съществена трансформация, обусловена от напредъка в молекулярната онкология и внедряването на високопроизводителни геномни технологии. Натрупването на данни за генетичните и молекулярните механизми, участващи в туморната инициация, прогресия и терапевтична резистентност, създаде предпоставки за преход от унифицирани терапевтични схеми към персонализирани стратегии, базирани на индивидуалния молекулярен профил на тумора и пациента (218,219). В този контекст NGS анализът се утвърди като ключов инструмент за идентифициране на прогностични и предиктивни биомаркери, които насочват избора на лечение и оптимизират клиничния резултат (220).

9.1. Генетични биомаркери за терапевтичен отговор

Генетичните биомаркери за терапевтичен отговор представляват основен елемент на прецизната онкология при овариалния карцином. Те позволяват прогнозиране на чувствителността или резистентността към определени медикаменти и подпомагат стратификацията на пациентките в клинично релевантни подгрупи (216). Сред най-добре утвърдените биомаркери са герминативните и соматичните мутации в гени, участващи в механизмите на ДНК репарация, клетъчния цикъл и апоптозата.

Мутациите в *BRCA1* и *BRCA2* са класически пример за предиктивни биомаркери, асоциирани с повишена чувствителност към платинова химиотерапия и PARP-инхибитори (161). Освен тях, клинично значение придобиват и изменения в други гени от пътя на хомоложната рекомбинация, като *RAD51C*, *RAD51D*, *PALB2* и *BRIP1*, които също корелират с подобрен терапевтичен отговор (221). Паралелно с това се проучват и допълнителни молекулярни показатели, включително туморна мутационна тежест (ТМВ) и микросателитна нестабилност (MSI), които имат потенциално значение за предсказване на отговора към имунотерапия при подбрани пациентки (222).

9.2. HRD статус и таргетна терапия

Хомоложният рекомбинационен дефицит (Homologous Recombination Deficiency, HRD) заема централно място в съвременната терапевтична парадигма при овариалния карцином. HRD отразява функционално нарушение в репарацията на двуверижни ДНК разкъсвания и води до геномна нестабилност и натрупване на мутации. Този фенотип може да бъде резултат от герминативни или соматични мутации в *BRCA1/2*, но и от нарушения в други гени или епигенетични механизми, засягащи пътя на хомоложната рекомбинация (223).

Клиничната значимост на HRD статуса е най-ясно демонстрирана във връзка с ефективността на PARP-инхибиторите, които прилагат принципа на синтетичната леталност. Множество клинични проучвания показват, че пациентките с HRD-позитивни тумори имат значително удължена преживяемост без прогресия при лечение с PARP-инхибитори, както в поддържаща терапия, така и при рецидивиращо заболяване. Методите за определяне на HRD са хетерогенни, а липсата на универсално приети диагностични критерии изисква внимателна интерпретация на резултатите в клиничен контекст (224).

9.3. Роля на генетичните фактори при избор на лечение

Генетичните фактори оказват съществено влияние върху избора на терапевтична стратегия при овариалния карцином, включително при първа линия на лечение, поддържаща терапия и управление на рецидивите. Наличието на асоциирани с повишена чувствителност към платинови препарати мутации може да обоснове използването на интензифицирани химиотерапевтични режими, докато идентифицирането на молекулярни механизми на резистентност насочва към алтернативни или комбинирани подходи (225). Генетичният профил има значение и за оценка на риска от лекарствена токсичност, особено при продължително таргетно лечение, което подчертава ролята на фармакогенетиката в персонализираната онкология (226). Освен това установяването на герминативни ПВ има отражение върху фамилното консултиране и профилактичните стратегии при родственици с повишен онкологичен риск (3).

9.4. Молекулярно насочени терапии

Молекулярно насочените терапии са ключов компонент на съвременното лечение на овариалния карцином. PARP-инхибиторите са най-утвърденият пример за успешна таргетна терапия, интегрирана в стандартните терапевтични алгоритми при HRD-позитивни тумори. В допълнение, насочените антиангиогенни агенти към VEGF сигналния път показват клинична ефективност в определени подгрупи пациентки, особено в комбинация със стандартна химиотерапия (227).

Развитието на нови молекулярно насочени подходи (включително терапии, насочени към PI3K/AKT/mTOR пътя, check-point инхибитори и други механизми на синтетична леталност) разширява терапевтичния арсенал при овариалния карцином (228). Успехът на тези терапии е тясно свързан с прецизното молекулярно профилиране и адекватната селекция на пациентките.

9.5. Персонализирани терапевтични стратегии

Персонализираната медицина при овариалния карцином представлява интегративен модел, който обединява клинични, хистологични и молекулярно-генетични данни с цел индивидуализиране на лечението. Вместо прилагане на универсални терапевтични алгоритми се използват адаптирани стратегии, съобразени с туморната биология, генетичния риск и очаквания терапевтичен отговор. Мултидисциплинарният подход, включващ онколози, молекулярни генетици, патолози и генетични консултанти, е от съществено значение за коректната интерпретация на данните и вземането на информирани клинични решения. В перспектива се очаква персонализираните терапевтични стратегии да се развиват към динамично адаптиране на лечението въз основа на молекулярния отговор и еволюцията на тумора, което има потенциал да подобри дългосрочната прогноза и качеството на живот на пациентките с овариален карцином.

10. Генетично консултиране при наследствени форми на ОК

10.1. Генетични тестове – насоки за избор на подходящ тест

Идентифициране на патогенни и вероятни ПВ (П/ВП*) в гени с висока и умерена пенетрантност могат да повлияят на стратегиите за лечение, наблюдението и превантивните мерки. През 2013 г. Обществото на Генетичните консултанти на САЩ (National Society of Genetic Counselors, NSGC) публикува практически насоки за оценка на риска за наследствен ОК, свързано с патогенни/вероятно ПВ (П/ВП) в *BRCA1* и *BRCA2* гените (229).

По-голямата част от предразположеността към рак възниква, като резултат от комбинация на варианти в последователността на ДНК, като всеки вариант сам по себе си се незначително увеличава риска. П/ВП варианти в гените с висока пенетрантност обаче често водят до значителни промени във функциите на кодираните от тях белтъчни продукти и се свързват с по-висок риск от развитие на рак в носителите, сравнено с индивидите от общата популация. Генетичните тестове за носителство на герминативни мутации във високо-пенетрантните гени имат клинична полза за взимането на информирано решение, по отношение предотвратяването и намаляването на риска от развитие на рака (230). Приблизително 10% от случаите на ОК са наследствени, като генетичните фактори в етиологията на това заболяване са унаследени герминативни П/ВП варианти в гените за предразположение, като *BRCA1* и *BRCA2* (231,232). Различни проучвания показват, че мултигенните панели за предразположение към ОК увеличават откриваемостта на П/ВП в гените за предразположение (233). В неселектирани кохорти, приблизително 0,5% от пациентите, тествани с мултигенен панел за предиспозиция за рак, се оказват *BRCA1/2* носители (234,235). Около 18% от всички малигнени заболявания на яйчниците са свързани с откриването на П/ВП в *BRCA1* или *BRCA2*, докато в други 6% се откриват варианти в други гени. Първоначално се смяташе, че П/ВП в *BRCA1* и *BRCA2* са предразполагащи само за рак на гърдата, яйчниците и фалопиевите тръби (236). Раковият спектър обаче се разшири и в него се включва РГ при мъже (237), рак на простатата (238), рак на панкреаса (239) и меланом (240).

*- За улеснение на изказа, вместо патогенни и вероятно ПВ (П/ВП, ПВ), в настоящото изложение ще говорим само за ПВ (ПВ), имайки предвид и двете категории, защото клиничната им значимост е еднаква

Резултати от мета-анализ за разпространението на *BRCA* ПВ показват, че 0,2 – 0,3% индивиди от общата популация са носители, включително 3% от жените с РГ, 6% от жените с ранно начало (преди 40-годишна възраст) на РГ, 10% от жените с ОК на всяка възраст и 20% от семействата с висок риск за развитие на рак (241). За евреите ашкенази, носителството на такива варианти се изчислява на 2% в неселектирани кохорти и на 10% във високорискови фамилии (241). Рисковете, които се изчисляват за развитието на рак, са резултат от множество проучвания сред различни популации и групи и са емпирични, не могат да бъдат изчислени с точност, поради наличието на други генетични и негенетични модифициращи фактори (характеристика на мултифакторните заболявания). Жените с носителство на герминативна мутация в *BRCA1* имат емпиричен доживотен (до 70г.) риск за развитие на РГ 60%–72%, докато тези с *BRCA2* имат риск 55%–88%. Рискът за развитие на ОК до 70-годишна възраст е 44%–59% при *BRCA1* носители и 17%–35% при *BRCA2* носители (242). Тези проучвания показват, че с намаляване на възрастта на диагностициране, рискът за рак на контралатералната гърда се увеличава (243–245). От критично значение е да се отчитат и други фамилни ракови синдроми, при които гърдата също може да е засегнат орган, като синдрома на Cowden (свързани с П/ВП предимно в *PTEN*) (ОР/относителен риск/ за РГ 2,0–5,0), Li–Fraumeni (*TP53* ген) (ОР за РГ 4,3–9,3), Peutz–Jeghers (ген *STK11*) (ОР за РГ 2,0–4,0) и наследствен дифузен рак на стомаха (*CDH1* ген) (ОР за РГ 5,9–7,3) (246). Тези синдроми по-често се характеризират с различна комбинация от ракови локализации в сравнение с тези при носителство на *BRCA* герминативни мутации.

Ракът на гърдата може да бъде свързан също с П/ВП в някои умерено- и нископенетрантни гени (247), като *PALB2*, *CHEK2* и *ATM*. Въз основа на две мащабни проучвания от типа случай-контрол, Easton et al. (248) изчислява приблизителна относителна стойност на риск за развитие на РГ на 2,8 за П/ВП в *ATM* и 3,0 за П/ВП в *CHEK2*. Наследственият РЯ е свързан главно с П/ВП в *BRCA1* и *BRCA2*, но могат да се открият и П/ВП и в други гени, известни вече като предразполагащи за РГ, като *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* и *TP53* (249).

Напредъкът в развитието на технологията за геномно секвениране – масивно паралелно секвениране (NGS), предостави възможност за рутинно едномоментно тестване на повече гени, които да обяснят персоналната и фамилна анамнеза за РГ и/или ОК.

Използването на мултигенни панели за генетичен анализ е изключително полезно в случаи с фамилна анамнеза за онкологични заболявания, предполагащи раков синдром. Също така NGS е ефективен, когато предишно, по-ограничено генетично изследване за носителство на герминативни мутации е с неинформативен резултат, въпреки оценката на генетичния консултант за наличие на висока предразположеност към рак в конкретния случай. Използването на мултигенни панели може да доведе до по-голяма откриваемост на П/ВП във всеки от предразполагащите гени, които вече са били изследвани с по-малко информативен генетичен тест (250,251). Освен това увеличава вероятността за откриване на необичаен ПВ в други включени в панела гени (252,253). Ролята на генетичните фактори в етиологията на наследствените форми на рака не се ограничават само до високо и умерено-пенетрантни гени, а включва и генни дефекти с ниска пенетрантност-единични нуклеотидни полиморфизми.

Друго предимство на съвременните геномни технологии е, че голям брой едно-нуклеотидни полиморфизми (SNP) са идентифицирани с методите на пълно геномно секвениране (254–256). Отделните SNP създават нисък индивидуален риск (ОР - 1,05 до 1,3), но в комбинация, тези SNP могат да обяснят част от останалите случаи на наследствени форми на ОК и да се използват за оценка на риска за тези заболявания при жени, които не носят високо- или умерено-пенетрантни генни варианти (257–259).

10.2. Генетично консултиране преди извършване на теста (пред-тестово консултиране)

10.2.1. Оценка на персоналната и фамилната история

Има няколко важни епидемиологични, клинични и фамилни характеристики, които е необходимо да се оценят, при съмнение за наличието на наследствена предразположеност към рак. Те включват, но не се ограничават до (260–262):

- ранна възраст на диагностициране на рак, по-ранна от средната възраст (напр. пременопаузален ОК);
- мултифокално развитие на рак в един орган и/или двустранно развитие на рак в чифтни органи;
- развитие на повече от едно първично огнище, свързан с гени за предразположение към рак, в един индивид;

- множество родственици от една фамилия, засегнати от един вид рак (по една и съща линия в семейството);
- определени етнически групи, за които е известно, че са изложени на по-висок риск от наследствен рак (напр. *BRCA1/2* П/ВП в популацията на евреите ашкенази);
- фамилни ракови синдроми, предполагащи автозомно-доминантен тип унаследяване;
- редки тумори със силна връзка със специфични ракови синдроми;
- наличие на наследствен фактор, увеличаващ емпиричния риск, като РГ при мъже, и др.

Докато дълго време най-важният фактор за оценка на риска за наследствена форма на рак беше наличието на фамилна анамнеза и сегрегацията на определен вид рак в семейството. Въвеждането на мултигенно тестване разкри други клинични и хистологични фактори, независими от фамилната анамнеза, които предполагат наличие на наследствен компонент в етиологията на това заболяване. Овариален карцином, рак на гърдата при мъже, рак на гърдата с ранно начало (възраст по-млада от 45 години), рак на панкреаса и метастатичен рак на простатата, диагностицирани на всяка възраст, независимо от семейната история, са част от препоръките на National Comprehensive Cancer Network (NCCN) като единствена достатъчна индикация за генетичен тест за предразположение (263).

Въпреки това оценката и подробното документиране на всички случаи на рак в едно семейство остава един от задължителните етапи на генетичното консултиране при онкологични заболявания, тъй като подпомага разбирането за ролята на по-малко известни гени в етиологията на рака, както и за генотип-фенотип корелацията при вече известни генетични фактори. Друга важна причина за пълна оценка на фамилната анамнеза е доказателството, че тежестта на семейната обремененост може да повлияе на риска, свързан с определени генетични варианти предразполагащи към рак (264).

Друго важно предимство при оценката на фамилната история е възможността да се идентифицират членовете на семейството, които са изложени на риск и на които е препоръчително провеждането на генетичен тест за предиспозиция (при вече открит патогенен вариант при засегнатия родственик), т.нар. каскадно тестване.

И накрая, семейната история е от особено значение при тълкуването на отрицателни резултати от тестове за носителство на мутации в предразполагащите гени, тъй като в този

случай рискът при пациента може да бъде оценен емпирично като висок въз основа само на фамилната анамнеза.

10.2.2. Показания за провеждане на генетичен тест за predisposition

Постигнат е значителен напредък в наличните молекулярно-диагностични тестове за predisposition към рак, консултирането, и налични възможности за терапия и профилактика.

Първоначално генетичното изследване на гените *BRCA1* и *BRCA2* се е предлагало само на пациенти с висока вероятност да носят П/ВП.

В такива семейства резултатите от генетичните тестове често са потвърждавали наследствената етиология на рака в семейството и са откривали родственици в риск, които да бъдат доказани чрез генетичен тест за известния фамилен ПВ. Въпреки това пациентите без или с не толкова изявена фамилна история за рак, също могат да бъдат подходящи кандидати за генетично изследване (263), тъй като откриването на патогенен вариант може драстично да промени стратегията за лечение при пациента. При липса на критерии, включени в препоръките за генетичен анализ за предразположение, генетичният консултант трябва да приложи други, популационно-базирани емпирични модели, за да не пропусне пациенти, които са рискови за носителство на ПВ (265–267). Патогенните варианти във високо- и умерено-пенетрантните гени за предразположение към рак, отчитат част от риска, защото поради мултифакторната етиология на рака може да има допълнителни фактори, модифициращи риска при конкретния пациент. Допълнителните фактори включват фамилна анамнеза, репродуктивна история, фактори, свързани с начина на живот и предишна експозиция на радиационно облъчване.

10.3. Генетично консултиране след извършване на генетичния тест – анализ на резултатите от теста, препоръки на генетичната консултация (прогноза, терапевтично поведение, репродукция)

10.3.1. Генетично консултиране на изследвания пациент

Препоръките на генетичния консултант трябва да бъдат изградени въз основа на оценката на клиничните особености при пациента, величината на риска, фамилната анамнеза и резултат от генетичните тестове (когато са налични). Профилактиката на пациенти с повишен риск за ОК остава предизвикателство за здравните специалисти. Съществуват публикувани различни препоръки относно профилактиката на пациенти в повишен риск за ОК (268–271). Всяка от препоръките е резултат на задълбочени и мащабни проучвания за ефикасността на различни възможности за профилактика при лица с ПВ, като се взема предвид тяхната лична клинична и фамилна история.

При пациентите с повишен риск профилактичните мерки включват активно наблюдение от лекар-специалист в съответната област, както и обсъждане на операции, намаляващи риска. Следователно при липса на *BRCA* мутации или фамилна анамнеза за ОК няма основание да се препоръча риск редуциращата салпингофоректомия (PPCO) или скрининг за ОК. Въпреки това проучванията показват, че при носители на ПВ в други предразполагащи гени като *RAD51C*, *RAD51D* и *BRIP1* и гените отговорни за LS, PPCO на възраст 45–50 има положително влияние върху намаляване на риска от развитие на ОК (269). Към момента световните препоръки (на NCCN и European Society for Medical Oncology - ESMO) гласят, че няма достатъчно доказателства, за да се препоръча PPCO при жени, носители на П/ВП варианти в гените *ATM*, *NBN* или *PALB2*, както и няма доказателства за повишен риск за ОК при носители на такива варианти в *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*. Последните проучвания показват, че пациенти с LS и с мутации в *MSH6* и *PMS2* имат повишен риск за развитие на РЯ (272–274). Данни от дългогодишни проучвания подкрепят връзката на носителство на ПВ в *BRCA* гените с рака на простатата, меланома и рак на панкреаса (275). Понастоящем скринингът за рак на простатата се поддържа за мъже носители на мутация в *BRCA2*, като започва от 40-годишна възраст и е препоръчителен при мъже с *BRCA1* ПВ (269). Консенсусните насоки подкрепят скрининга на панкреаса при индивиди с мутации в специфични гени, включително *BRCA1* и *BRCA2*, когато има родственик от първа или втора степен с рак на панкреаса (239,269). Не съществуват

специфични препоръки за скрининг за меланома, но общите насоки са за целотелесен дерматологичен преглед веднъж годишно и минимизиране на експозицията (269).

10.3.2. Генетично консултиране на родствениците на изследвания пациент. Каскадно тестване

Откриването на П/ВП вариант в някой от гените за предразположение към ОК има значение за всички родственици от фамилията на пациента. Ролята на генетичния консултант е да определи кои от родствениците имат риск да носят същия вариант (фамилен вариант) и да препоръча най-подходящия генетичен тест за доказването му сред родствениците в риск. Рискът за развитие на ОК при родствениците, при които не се доказва носителство, намалява до общопопулационните стойности на риска за това заболяване и могат да избегнат ненужни профилактични мерки (вкл. риск-редуциращи хирургични интервенции), докато при родствениците с доказано носителство се следват приетите препоръки (269) за профилактика, ранна диагностика и лечение.

10.3.3. Допълнителни находки от генетичния тест

С навлизането на новите технологии на секвениране и използването на мултигенни панели за предиспозиция се увеличи откриваемостта, както на нови варианти във вече известни гени за предиспозиция, така и се откриват нови гени с роля в предразположените за ОК. Заедно с това се откриват и варианти в гени, които нямат пряка връзка с това заболяване. Генетичният консултант има задължението да обсъди намерените варианти и ако има нужда да направи съответните препоръки.

10.3.4. Обсъждане на репродуктивни рискове

За лица в репродуктивна възраст с намерен П/ВП вариант е необходимо генетичното консултиране да включи и възможностите за пренатална диагностика и/или асистирана репродукция, включително предимплантационен генетичен тест (PGT), които са важни. Използване на резултатите от генетични тестове за вземане на репродуктивни решения може да включва използването на донорски гамети, осиновяване и PGT. Много мултигенни ракови панели включват гени, които са свързани с редки автозомно - рецесивни състояния, които се проявяват когато П/ВП вариант в този ген е наследен от двамата родители (т.е хомозиготно състояние). Това включва, но не се ограничава до: атаксия телеангиектазия, причинена от биалелни *ATM* мутации; анемия на Fanconi, причинени от биалелни мутации в *BRCA2*, *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D* или *PALB2* гени; Синдром на Nijmegen, причинен от биалелна мутация в *NBN*; конституционален дефицит на ДНК mismatch репарацията, в резултат на биалелни мутации в гените, свързани със синдрома на Lynch (276,277). Индивидите, носители на мутации в тези гени трябва да бъдат информирани за този риск, тъй като той може да подпомогне вземането на репродуктивни решения за тях самите и/или за членовете на семейството, и изисква обсъждане на необходимостта от генетичен тест на същия ген в техните партньори (278,279).

В заключение генетичното консултиране, превенцията и проследяването са фундаментални компоненти на персонализираната медицина при овариалния карцином. Чрез систематично идентифициране на носители на ПВ, прецизна оценка на риска и прилагане на индивидуализирани превантивни стратегии е възможно значително намаляване на заболяемостта и подобряване на дългосрочната прогноза. Интегрираният подход, включващ пациентката и нейното семейство, превръща генетичното консултиране от диагностичен инструмент в активна стратегия за онкологична профилактика и контрол.

11. Представяне на резултати от собствено проучване

11.1. Дизайн и цели на проучването

Настоящото проучване има за цел цялостно и систематично да интегрира данни от **герминативно и соматично секвениране** при български пациентки с овариален карцином. Акцентът е поставен върху идентифицирането и анализа на **клинично значими и потенциално терапевтично насочени молекулярни пътища**. Проучването е замислено в контекста на нарастващата роля на прецизната онкология и необходимостта от локално валидирани молекулярни данни, които да отразяват генетичните характеристики на българската популация и спецификите на клиничната практика в страната.

Дизайнът на изследването се основава на **двуслоен NGS подход**, включващ паралелен анализ на герминативна ДНК, изолирана от периферна кръв, и соматична ДНК, извлечена от туморна тъкан (FFPE материал). Този интегративен модел позволява едновременно характеризиране на **наследствената генетична предразположеност и тумор-специфичните молекулярни изменения**, които възникват в хода на канцерогенезата. По този начин се осигурява по-пълна картина на генетичния спектър на овариалния карцином, която не може да бъде постигната чрез изолирано изследване само на един от двата геномни компонента.

Една от основните цели на проучването е да се **идентифицират патогенни и вероятно патогенни герминативни варианти**, свързани с повишен риск от развитие на овариален карцином, с пряко значение за генетичното консултиране, фамилната оценка на риска и профилактичните стратегии. Паралелно с това се цели откриване и анализ на **соматични драйвърни изменения**, които имат значение за туморната биология, прогресията на заболяването и потенциалния терапевтичен отговор. Специално внимание е отделено на гени и пътища, участващи в ДНК репарацията, контрола на клетъчния цикъл и ключови онкогенни сигнални каскади.

Допълнителна цел на изследването е **оценка на съпадението и разминаването между герминативните и соматичните находки**.

Проучването също така цели да анализира **потенциалната терапевтична приложимост** на установените генетични изменения, включително тяхната роля като предиктивни или прогностични биомаркери. В този контекст резултатите се интерпретират спрямо актуалните международни препоръки и класификационни системи за генетични

варианти, като се избягва свръхинтерпретация на находки без доказана клинична значимост.

Наред с това, дизайнът на изследването ясно отчита **ограниченията, наложени от използването на таргетни NGS панели**, включително невъзможността за пълно покриване на целия геном и ограничената детекция на някои типове структурни варианти. Въпреки тези ограничения, таргетният подход е избран съзнателно поради своята висока аналитична чувствителност за клинично релевантни гени, практическа приложимост и съвместимост с рутинната диагностична среда.

В обобщение, настоящото изследване е проектирано като **интегративно, клинично-ориентирано молекулярно проучване**, чиято основна цел е да допринесе за по-доброто разбиране на генетичната архитектура на овариалния карцином в българската популация. Чрез комбинирания анализ на герминативни и соматични данни то цели да подпомогне развитието на персонализирани диагностични и терапевтични стратегии, както и да създаде основа за бъдещи по-широки геномни и функционални изследвания в тази област.

11.2. Материали и методи

11.2.1. Пациентска кохорта и дизайн на проучването

В настоящото проучване са включени **33 неродствени български жени** с диагноза епителен овариален карцином, диагностицирани в периода **2017–2024 г.** Включените в проучването жени са събрани ретроспективно от регистъра на Онкологичния център към „УМБАЛ – Д-р Георги Странски“ – гр. Плевен. Всички пациентки са приели покана да се включат в проучването доброволно.

Проучването е насочено към интегративен анализ на герминативни и соматични молекулярно-генетични данни, в съответствие със съвременните принципи на прецизната онкология (219). Включването на пациентките е извършено независимо от възрастта при диагностициране, фамилната анамнеза или хистологичния подтип, с цел отразяване на реалната клинична практика.

Всички пациентки са с **хистологично потвърдена диагноза**, поставена съгласно актуалните критерии за класификация на Световната здравна организация (WHO) (280). Клиничните данни, включително възраст при диагностициране, хистологичен подтип и

налична терапевтична информация, са събрани ретроспективно от медицинската документация.

От всяка пациентка са взети **две биологични проби**: периферна венозна кръв за изолиране на герминативна ДНК и формалин-фиксираны парафиново-вградени (FFPE) туморни блокчета за соматичен анализ. Всички FFPE препарати са прегледани от опитен патолог, като за молекулярния анализ са селектирани зони с **висок процент туморни клетки**, в съответствие с препоръките за молекулярна диагностика при солидни тумори (281).

Проучването е одобрено от **Комисията по етика към Медицински университет – Плевен** (решение № 574-КЕНИД/04.07.2019 г.). Всички участнички са подписали писмено информирано съгласие за участие в изследването и за извършване на генетичен анализ, в съответствие с Декларацията от Хелзинки и приложимото национално законодателство (282).

11.2.2. Изолиране на герминативна ДНК и NGS анализ

Герминативната ДНК е изолирана от периферна венозна кръв, събрана в EDTA вакутейнери, чрез **MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (MagCore)**, съгласно инструкциите на производителя. Процедурите са извършени при спазване на добрата лабораторна практика за предотвратяване на контаминация и деградация на нуклеиновите киселини.

Количеството и качеството на изолираната ДНК са оценени чрез **флуорометричната система Qubit**, като всички проби са измерени **преди подготовка на библиотеката** с цел осигуряване на стандартизирано въвеждане на материал в NGS анализа и намаляване на вариабилността между пробите.

Таргетното секвениране от ново поколение е извършено с **TruSight Hereditary Cancer Panel (Illumina Inc.)**, който обхваща кодиращите екзони и екзон-интронните граници на **113 гена**, асоциирани с наследствени онкологични синдроми (Пълният списък на включениет в панела гени е представен в Приложение 1 към настоящата монография.). Подготовката на библиотеките е извършена съгласно протокола на производителя, а секвенирането е осъществено на платформа **Illumina MiSeq** в конфигурация **2 × 150 bp**,

осигуряваща висока дълбочина на покритие и надеждна детекция на SNV и малки индели (283). Получените прочити са подравнени към референтния човешки геном **hg19**.

11.2.3. Изолиране на туморна ДНК и NGS анализ

Туморната ДНК е изолирана от FFPE тъкан с **QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Германия)**, съгласно протокола на производителя. Процесът включва депарафинизация и протеиназна обработка, като са предприети мерки за минимизиране на артефакти, характерни за FFPE материал.

Количеството и качеството на ДНК са оценени чрез **Qubit 2.0 Fluorometer** с **Qubit dsDNA HS Assay Kit**, позволяващ надеждна квантификация при ниски концентрации и фрагментирана ДНК.

Соматичното таргетно NGS секвениране е извършено с **TruSight Tumor 15 Panel (Illumina Inc.)**, включващ 250 ампликона в 15 гена, асоциирани със солидни тумори (*AKT1, BRAF, EGFR, ERBB2, FOXL2, GNA11, GNAQ, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET*). Изборът на панела е съобразен с неговата клинична приложимост при туморно профилиране (284). Библиотеките са секвенирани на платформа **Illumina MiSeq (2 × 150 bp)** и подравнени към **hg19**.

11.2.4. Анализ и класификация на вариантите

Секвениращите данни (gVCF файлове) са анализирани чрез платформата **Franklin (Genoox)**, която интегрира автоматизирана анотация и клинична интерпретация (285). Приложени са филтри за **минимално покритие $\geq 20\times$** за герминативни и **$\geq 500\times$** за соматични варианти, като синонимните промени без предполагаем функционален ефект са изключени от анализа.

Герминативните варианти са класифицирани съгласно **ACMG/AMP критериите** (211), а соматичните – по **AMP/ASCO/CAP** в четири нива според клиничната им значимост (281). Всички варианти са проверени ръчно в базите данни **ClinVar, COSMIC и OncoKB**, а алелната честота (VAF) за всички соматични изменения е документирана.

11.2.5. Биоинформатичен анализ и детекция на големи геномни пренареждания

Анализ за копийно-числови вариации (CNV)

Паралелно със стандартния анализ за SNV/indel варианти беше проведена оценка за големи геномни пренареждания (екзонни делеции и дупликации) чрез софтуера **ExomeDepth**.

Принцип на метода

ExomeDepth е R-базиран инструмент за откриване на CNV, който използва сравнителен анализ на дълбочината на покритие (read depth) на таргетираните региони. Методът се основава на:

- количествено определяне на броя прочити за всеки екзон;
- изграждане на оптимален референтен набор от контролни проби със сходен профил на покритие;
- прилагане на байесов статистически модел за сравнение между наблюдаваното и очакваното покритие.

Алгоритъмът изчислява **Bayes Factor**, който отразява вероятността дадено отклонение да представлява реална хетерозиготна делеция или дупликация.

Критерии за валидност на CNV сигналите

В анализа бяха приложени следните филтриращи критерии:

- адекватна средна дълбочина на покритие на съответния екзон;
- статистически значим Bayes Factor;
- консистентност на отклонението в последователни екзони;
- визуална инспекция на графичния изход от ExomeDepth;
- съответствие с клиничния фенотип и останалите молекулни находки.

Само събития, покриващи горните изисквания, се разглеждат като потенциално клинично значими и подлежащи на допълнителна верификация (при необходимост чрез MLPA или qPCR).

Диагностична стойност

Интегрирането на ExomeDepth в биоинформатичния пайплайн позволява значително повишаване на аналитичната чувствителност на NGS изследването. По този начин, освен точкови мутации и малки инсерции/делеции, се идентифицират и:

- еднокзонни делеции;
- мултиекзонни делеции;

Този комбиниран подход осигурява цялостна оценка на генетичния статус на изследваните гени и минимизира риска от пропускане на структурни варианти, които имат доказано клинично значение при наследствените онкологични синдроми.

11.2.6. Статистически анализ

Описателната статистика и визуализацията на данните са извършени с помощта на **програмния език Python**, включително анализ на честоти, разпределения и визуализации под формата на топлинни карти.

Статистическият анализ на получените данните е извършван с помощта на следните методи:

- Честотен анализ на промени, включващ абсолютни честоти в проценти
- Графичен анализ
- Определяне на статистическа значима връзка между две променливи е извършено с помощта на χ^2 тест за асоциация (Chi-square test of association).
- Силата на зависимост между две променливи е оценявано с коефициентите *Phi* на *Pearson* (*при кръстосани таблици 2x2*) и *V* на *Cramer* (*при кръстосани таблици по големи от 3x3*). *При таблици с размерност 2x3 или 3x2 са използвани или коефициента Phi на Pearson или V на Cramer (дават еднаква величина на силата на зависимост).*

При статистическата обработка на данните за честота е изчислен интервалът на доверителност (95% CI). Определена е стойност на *p* (*p-value*) за статистическа значимост на данните, като за сигнификантни са отчитани стойности на $p < 0.05$. Статистическата обработка е направена чрез използване на програмата SPSS for Windows, v.29.0.2.0

11.3. Ограничения на проучването

Както всяко клинично-молекулярно изследване, и настоящото проучване има определени ограничения, които следва да бъдат отчетени при интерпретацията на резултатите. В същото време тези ограничения отразяват реалните условия на рутинната диагностична практика и не компрометират основните цели и изводи на изследването.

Използването на **таргетни NGS панели** ограничава анализа до предварително дефиниран набор от гени, което изключва възможността за идентифициране на редки или нови генетични изменения извън включените региони. Този подход обаче е съзнателно избран, тъй като осигурява висока аналитична чувствителност и клинична релевантност за гени с доказано значение при овариалния карцином. По този начин се постига оптимален баланс между дълбочина на анализа и практическа приложимост, като се минимизира рискът от откриване на голям брой находки с ограничена или неясна клинична стойност.

Друго ограничение е **невъзможността за систематично включване на HRD статуса**. В рамките на настоящото изследване **не беше проведено изследване на туморната тъкан за HRD статус**, поради обективни организационни и логистични ограничения, свързани с достъпа до данните. В клиничната практика в България HRD тестването (геномни „scar“ тестове/композиции HRD алгоритми) се осъществява **в рамките на пациентски програми**, при които заявяването, лабораторната обработка и интерпретацията се извършват по отделен, външен за нашия изследователски протокол маршрут. Резултатите от HRD анализа не се предоставят рутинно като структурирани данни към лабораторията/изследователския екип, поради което **не разполагахме с унифициран достъп** до HRD статус за включените пациентки. Това създава невъзможност за систематично включване на HRD като променлива в статистическите анализи и ограничава възможността за коректно сравнение между пациентките в една обща аналитична рамка. Освен това HRD тестването е силно **зависимо от използваната платформа и критерии за позитивност**, които варират между различни търговски решения и протоколи (напр. различни прагове, включване на LOH/TAI/LST, композиция алгоритми и др.). При липса на достъп до първичните параметри и унифицирана методология за всички случаи, включването на налични единични резултати (ако има такива) би създавало **рискове от методологична нееднородност** и потенциално некоректни интерпретации.

Въпреки това, отсъствието на HRD тестуване в настоящия проект **не намалява значимостта на молекулярния анализ**, тъй като целта на изследването беше да се постигне **по-широка и задълбочена молекулярна характеристика извън рамката на HRD**. HRD, макар и ключов терапевтичен биомаркер (особено във връзка с PARP-инхибитори), отразява предимно дефекти в хомоложната рекомбинация и геномна нестабилност. Овариалният карцином обаче е биологично хетерогенно заболяване, при което клиничното поведение и терапевтичният отговор се влияят и от редица **не-HRD механизми**, включително:

- алтерации в онкогенни сигнални пътища (напр. PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK),
- промени в тумор-супресорни гени и контрол на клетъчния цикъл,
- варианти, свързани с апоптоза и репарация извън HR пътя,
- молекулярни характеристики с прогностично значение (напр. специфични профили на CNV, амплификации/делеции, туморна хетерогенност).

Поради това изследователската стратегия беше насочена към анализ на **герминативни и соматични варианти с потенциална клинична значимост**, включително такива, които могат да допринасят за: (i) по-точна подтипова и прогностична стратификация, (ii) идентифициране на допълнителни терапевтични мишени и (iii) генериране на хипотези за механизми на резистентност и прогресия, които не се обясняват единствено чрез HRD. Този подход цели да разшири приложимостта на молекулярното профилиране отвъд стандартния „HRD/PARP“ модел и да подпомогне развитието на по-комплексни персонализирани стратегии при овариален карцином.

Накратко, **HRD не беше изследван поради липса на достъп до данните, генерирани по пациентска програма и извън нашия контрол**, както и поради необходимост от методологично единен набор от резултати. В същото време, проектът целенасочено търсеше **по-задълбочен молекулярен анализ извън HRD**, за да допринесе към по-широко разбиране на генетичния ландшафт на овариалния карцином и потенциалните терапевтични импликации.

Размерът на изследваната кохорта и нейният ретроспективен характер могат да ограничат статистическата мощ за установяване на по-фини асоциации между отделни генетични изменения и клиничните параметри. Въпреки това дизайнът на проучването позволява детайлен качествен и описателен анализ, който е особено подходящ за

изследване на редки варианти и за генериране на хипотези, които могат да бъдат валидирани в бъдещи, по-мощни и проспективни изследвания.

От интерпретационна гледна точка, наличието на **варианти с неопределено клинично значение (VUS)** е неизбежно при NGS-базираните анализи. В настоящото изследване тези варианти са интерпретирани в съответствие с международно приетите критерии и не са използвани за клинични заключения, което ограничава риска от свръхинтерпретация и подчертава клинично отговорния подход на изследователския екип.

Накрая, резултатите отразяват спецификите на българската пациентска популация и локалната диагностична практика, което може да ограничи директната им екстраполация към други популации. В същото време именно тази характеристика представлява добавена стойност на проучването, тъй като допринася с оригинални данни за слабо представена в литературата популация и създава основа за бъдещи международни сравнения.

11.4. Резултати и обсъждане

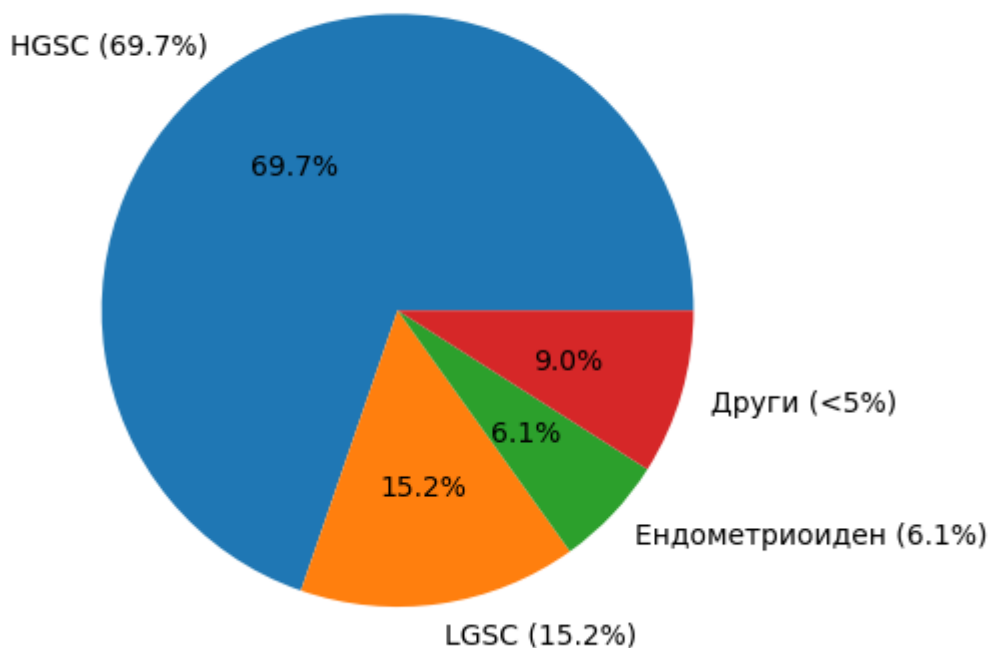
11.4.1. Клинична и хистологична характеристика на пациентите

Проучваната от нас кохорта включва 33 жени с епителен овариален карцином. Средната възраст при поставяне на диагнозата е 59,2 години (от 20г. до 83 г.), което е в очаквания диапазон за епителен овариален карцином и е близка до литературните данни, според които медианната възраст е около началото/средата на 60-те години в големи серии, като честотата на заболяването нараства с възрастта. Това подкрепя представителността на проучването по отношение на възрастовия профил, въпреки малкия размер на извадката (286).

HGSC е установен при 69,7% (23/33), което е в пълно съвпадение с данните, че високостепенният серозен карцином е най-честият и клинично най-значим подтип на епителния овариален карцином и доминира по принос към смъртността. (286,287) Делът на LGSC 15,2% (5/33) е относително по-висок в изследваната от нас кохорта от типично цитирания „рядък“ характер на LGSC в общите популации, което може да се обясни с малката извадка (287,288). Ендометриоидният карцином 6,1% (2/33) съвпада с докладваната в литературата честота (287). Доминирането на HGSC предопределя, че общите прогностични и терапевтични изводи за кохортата ще бъдат силно „повлияни“ от

биологията на HGSC (честа асоциация с дефекти в хомоложната рекомбинация, чувствителност към платина и потенциална полза от PARP-инхибитори при подходящ молекулярен профил) (286,287). По-високият относителен дял на LGSC (ако се потвърди и в по-голяма серия) би имал значение за различни терапевтични стратегии и очаквана химиочувствителност (LGSC често се отличава с по-ниска чувствителност към стандартна химиотерапия и различен таргетен профил) (288). Останалите подтипове (светлоклетъчен и муцинозен) са представени с честота под 5% (Фигура 15).

Разпределение на хистологичните подтипове (n=33)



Фигура 15: Разпределение на хистологичните типове ОЖ в изследваната кохорта

Високият дял на намерените в проучването нискодиференцирани тумори (G3) – 75,8% – се свързва с факта, че HGSC по дефиниция са високостепенни (висок грейд) и в практиката често „изтласква“ разпределението към G3 в смесени кохорти с доминиращ HGSC (287). Наличието на G1 и G2 по 12,1% вероятно отразява включване на по-нискостепенни или несерозни подтипове, при които грейдингът има по-ясна прогностична

и понякога терапевтична стойност (например при ендометриоидни карциноми и др.) (289,290). В популационни и регистрови анализи грейдът остава независим прогностичен фактор, макар влиянието му да варира по хистологичен подтип и стадий (290). При HGSC „високият грейд“ е очакван и по-малко дискриминиращ в рамките на самия подтип; по-голяма прогностична стойност често имат стадий, резидуална болест след циторедукция, чувствителност към платина и молекулярни подгрупи/HRD статус (290).

Двустранна локализация на тумора е установена при 3 пациентки (9%). Положителна фамилна анамнеза за онкологично заболяване е съобщена при 8 пациентки (24,2%). Тя е очаквано по-висока от дела на доказуемите герминативни BRCA1/BRCA2 мутации сред всички случаи на овариален карцином, който в много източници е приблизително 10–15% (291). Това несъответствие не е парадоксално, тъй като фамилната анамнеза обикновено включва широк спектър неоплазии (не само овариален/млечна жлеза карцином) и може да отразява споделени рискови фактори, малки фамилии/непълна информация или случайност. Заедно с това наследственият принос при епителния овариален карцином включва и други гени освен BRCA1/2 (напр. гени на HR пътя), които могат да повишат фамилния товар без задължително наличие на „класическа“ BRCA-наследственост. Дори при липса на фамилна анамнеза, значим процент пациентки могат да имат герминативен ПВ; затова съвременните световни препоръки подкрепят герминативно тестване на всички случаи на епителен овариален карцином, без предварителна селекция по фамилна анамнеза (и/или комбиниран герминативен + туморен подход) (291).

11.4.2. Установени герминативни варианти в изследваната кохорта

Патогенни или вероятно патогенни герминативни варианти* са идентифицирани при 9 от 33 пациентки (27,3%), което показва дял почти една трета на наследствения ОК сред изследваните жени. Най-често засегнатият ген е BRCA1, като ПВ са открити при 3 пациентки (9,1% от цялата кохорта). Освен това са установени единични ПВ в гените ATM, RAD51D, NBN, FANCL и WRN. При една пациентка е установено наличие на патогенни герминативни варианти в два гена, асоциирани с онкологична предразположеност (TP53 и FANCE), покриващо критериите за синдром на мутилокусна наследствена неоплазия (MINAS). Всички идентифицирани герминативни варианти са обобщени в Таблица 4.

Таблица 4. Пълен списък на открити герминативни варианти в жените от изследваната кохорта

Gene	Transcript (RefSeq)	Nucleotide change (cDNA)	Protein change	rs number	Variant type	Exon	ACMG classification	Associated cancer risk / syndrome
ATM	NM_000051.3	c.8147T>C	p.(Val2716Ala)	rs56128736	Missense	55/63	Вероятно патогенен	Breast, ovarian, pancreatic cancer
BRCA1	NM_007294.3	c.5266dup	p.(Gln1756ProfsTer74)	rs80357906	Frameshift	19/23	Патогенен	Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC)
BRCA1	NM_007294.3	c.5533dup	p.(Tyr1845LeufsTer35)	<i>NA (ClinVar-reported variant)</i>	Frameshift	23/23	Патогенен	HBOC
BRCA1	NM_007294.3	c.181T>G	p.(Cys61Gly)	rs28897672	Missense	4/23	Патогенен	HBOC
FANCL	NM_001114636.1	c.1048_1051del	p.(Gln350fs)	<i>NA (ClinVar-reported variant)</i>	Frameshift / stop gained	14/14	Патогенен	Fanconi anemia pathway; predisposition to cancer
TP53	NM_000546.5	c.1148_1149del	p.(Leu383HisfsTer8)	<i>NA (ClinVar-reported variant)</i>	Frameshift	11/11	Патогенен	Li-Fraumeni syndrome, multiple cancers
FANCE	NM_021922.2	c.1239dup	p.(Pro414SerfsTer54)	<i>NA (ClinVar-reported variant)</i>	Frameshift / splice	7/10	Патогенен	Fanconi anemia pathway
NBN	NM_002485.4	c.2140C>T	p.(Arg714Ter)	rs587781298	Stop gained	14/16	Патогенен	Nijmegen breakage syndrome; breast/ovarian cancer risk
RAD51D	NM_002878.3	c.803G>A	p.(Trp268Ter)	rs879254418	Stop gained	9/10	Патогенен	Ovarian cancer predisposition
WRN	NM_000553.4	c.1105C>T	p.(Arg369Ter)	rs121908446	Stop gained	9/35	Патогенен	Werner syndrome; cancer predisposition

В изследваната кохорта от 33 пациентки с епителен овариален карцином са идентифицирани герминативни ПВ при 9 жени (27,3%), което очертава висок дял на наследствения компонент – приблизително една трета от случаите. Този резултат е по-висок от класически цитирания дял за BRCA1/2-асоцииран овариален карцином (приблизително 10–15% в различни популации), но е съпоставим с честоти, докладвани при използване на разширени мултигенни панели, какъвто е използван и при настоящото проучване (243,249).

Най-често засегнатият ген е **BRCA1**: ПВ са установени при 3 пациентки (9,1% от цялата кохорта). И трите варианта представляват функционално значими изменения – два frameshift (c.5266dup; c.5533dup) и един добре документиран патогенен missense вариант (c.181T>G; p.Cys61Gly), водещи до нарушена функция на протеина и дефект в хомоложната рекомбинация. Доминирането на *BRCA1* е в съответствие с публикуваните данни, според които именно *BRCA1* е най-честият ген при наследствен овариален карцином. Клиничното значение на тези находки е многопластово – от каскадно фамилно тестване до терапевтични импликации, включително чувствителност към платина и потенциална ефективност на PARP-инхибитори при подходящ клиничен контекст (249).

Освен *BRCA1* са установени единични ПВ в гени, участващи в ДНК-поправката и пътя на хомоложната репарация – **RAD51D**, **NBN** и **ATM**. Генът *RAD51D* многократно е съобщаван в литературата като един от честите гени свързани с наследствена предразположеност към овариален карцином (292), а откритият от нас вариант p.(Trp268Ter) (stop-gain) в него е класически loss-of-function дефект. Вариантът в *NBN* (p.Arg714Ter) също представлява трункиращ вариант, асоцииран с повишен риск за солидни тумори, включително рак на гърдата и яйчника(293). Генът *ATM* се разглежда като носещ умерен риск, а клиничната интерпретация при овариален карцином изисква интеграция с фамилна анамнеза и допълнителни доказателства. Общият спектър на засегнатите гени подчертава значимостта на HR-дефицитния механизъм в наследствената канцерогенеза на яйчника (294).

Особен интерес представляват вариантите във Fanconi-анемия пътя – **FANCL** и **FANCE**, и двата frameshift варианти. Fanconi пътят е функционално свързан с хомоложната рекомбинация и поддържането на геномната стабилност; хетерозиготни дефекти в отделни гени от този път са свързани с повишен онкологичен риск, макар и с различна степен на доказателственост. Тези резултати подкрепят концепцията, че наследственият овариален

карцином представлява молекулно хетерогенна група, обединена от дефекти в ДНК-репарационните механизми (295).

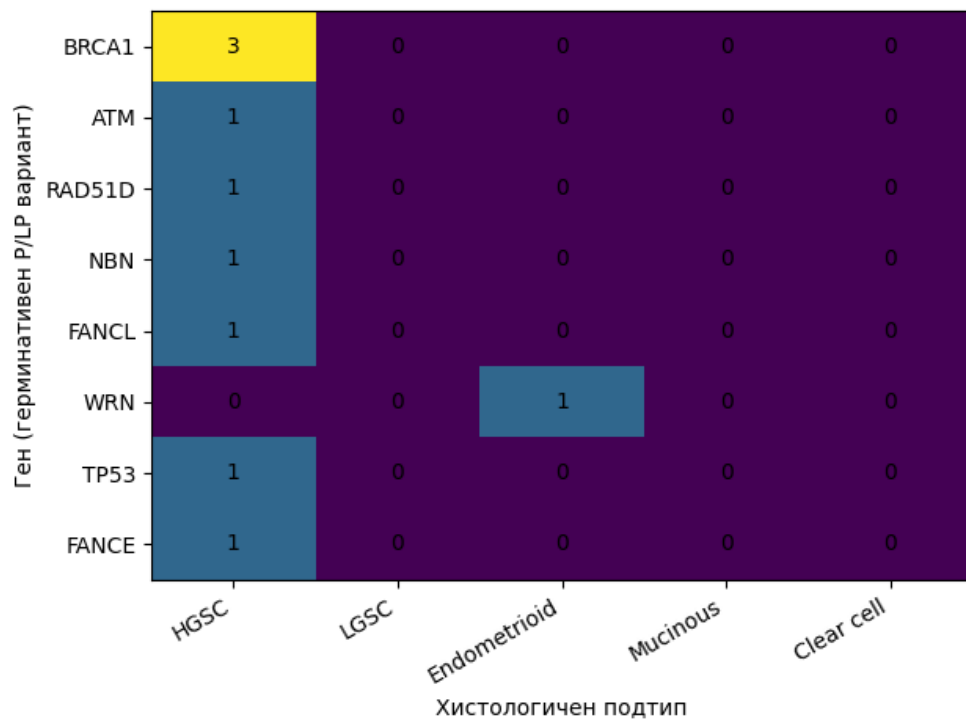
Установен е и труктиращ вариант в *WRN* (p.Arg369Ter). *WRN* е класически ген за синдрома на Werner (автосомно-рецесивен), а клиничното значение на единичен хетерозиготен вариант за риск от овариален карцином трябва да бъде определен въз основа на допълнителните данни от фамилната анамнеза (296).

Най-значимият клиничен резултат е идентифицирането на пациентка с два независими патогенни герминативни варианта – в *TP53* и *FANCF*, покриващи критериите за синдром на мултилокусна наследствена неоплазия (MINAS). *TP53* frameshift вариантът съответства на Li-Fraumeni спектър и предполага високорисков онкологичен фенотип (297). Наличието на два патогенни алела в различни гени усложнява генетичното консултиране и налага индивидуализирана стратегия за каскадно тестване и проследяване в семейството. Подобни случаи, макар и редки, подчертават значението на цялостния геномен подход при оценка на наследствения риск.

В обобщение, резултатите демонстрират, че 27,3% от пациентките в изследваната кохорта носят клинично значим герминативен вариант, като доминират гени от пътя на хомоложната рекомбинация. Този профил е биологично консистентен с молекулярната патогенеза на ОК и подкрепя препоръките за универсално генетично тестване при пациентки с епителен овариален карцином (249). Идентифицирането на *BRCA1*-асоциирани случаи, HR-гени извън *BRCA* и един MINAS случай илюстрира както клиничната релевантност на мултигенния анализ, така и необходимостта от експертна интерпретация съгласно ACMG/AMP критериите (211).

11.4.3. Разпределение на герминативните варианти според хистологичния подтип

В изследваната кохорта от 33 пациентки с епителен овариален карцином герминативни ПВ са установени при 9 жени (27,3%). За целите на статистическия анализ хистологичните подтипове бяха групирани в две категории: високостепенен серозен карцином (HGSC, n=23) и несерозни форми (в това число LGSC, ендометриоиден и други подтипове; общо n=10).



Фигура 16: Heatmap на разпределението на герминативните P/LP варианти по гени и хистологичен подтип (n=33). Heatmap представя броя пациентки с ПВ по гени (редове) и хистологичен подтип (колони). Стойностите в клетките са абсолютен брой носителки в съответната категория.

Сред пациентките с HGSC герминативни ПВ бяха установени при 8 от 23 случая (34,8%), докато в групата на несерозните тумори подобни варианти бяха идентифицирани при 1 от 10 пациентки (10%) (Фигура 16).

Абсолютната разлика в честотите възлиза на 24,8 процентни пункта. Анализът чрез χ^2 тест за независимост показва стойност $\chi^2 = 3,07$ (df = 1), при $p = 0,079$. Поради наличието на малка очаквана честота в една от клетките бе приложен и Fisher exact test, който даде $p = 0,092$. При приет праг на статистическа значимост $\alpha = 0,05$ не се установява формално статистически значима зависимост между хистологичния тип и наличието на герминативен ПВ.

Изчисленият odds ratio (OR) възлиза на 4,8, което означава приблизително петкратно по-висока вероятност за наличие на клинично значим герминативен вариант при пациентки

с HGSC в сравнение с несерозните подтипове. 95% доверителен интервал е широк (0,53–43,4), което отразява ограничения размер на извадката. Размерът на ефекта, оценен чрез Cramér's V, е 0,30, което съответства на умерена сила на асоциация.

Получените резултати демонстрират ясно изразена тенденция към по-висока честота на клинично значими герминативни варианти при високостепенния серозен карцином в сравнение с останалите хистологични форми. Макар статистическата значимост да не достига класическия праг $\alpha = 0,05$, стойностите на odds ratio и размерът на ефекта подкрепят наличието на биологично релевантна асоциация.

Този модел е напълно съгласуван със съвременната молекулярна концепция за овариалния карцином. HGSC представлява молекулярно отделна нозологична единица, характеризираща се с дефекти в пътя на хомоложната рекомбинация, включително BRCA1/2 мутации и други HR-гени. Наличието на повишена честота на герминативни варианти именно в тази група е очаквано и подкрепя концепцията за HR-дефицит като централен патогенетичен механизъм.

От друга страна, несерозните подтипове (включително LGSC и ендометриоидни карциноми) демонстрират различен молекулярен профил, често характеризиращ се с MAPK-път активация, PIK3CA мутации или други соматични драйвъри, без задължителна връзка с наследствен HR-дефицит. Следователно по-ниската честота на герминативни варианти в тази група е биологично логична.

Важно е да се подчертае, че липсата на статистическа значимост не означава липса на клинична значимост. В настоящата кохорта вероятността пациентка с HGSC да носи герминативен ПВ вариант е приблизително пет пъти по-висока, което има пряко значение за диагностичната стратегия. Данните подкрепят практиката за универсално генетично тестване при пациентки с HGSC, независимо от фамилната анамнеза.

Освен това, наблюдаваният модел има терапевтични приложения. Герминативните дефекти в HR-пътя са свързани с повишена чувствителност към платинова химиотерапия и към PARP-инхибитори. Следователно хистологичната стратификация, комбинирана с генетичното профилиране, може да подпомогне за по-прецизна терапевтична селекция.

От методологична гледна точка анализът е ограничен от ретроспективния характер на данните и относително малкия размер на кохортата. Не е извършен подгрупов анализ по отделни гени поради малките абсолютни числа. В бъдещи проучвания с по-голяма извадка

би било уместно да се анализира отделно разпределението на BRCA1/2 спрямо non-BRCA HR гени, както и да се приложат мултивариантни модели, включващи възраст, стадий и фамилна анамнеза.

В заключение, макар статистическата значимост да не е достигната, резултатите демонстрират умерена асоциация между високостепенния серозен хистологичен тип и наличието на клинично значими герминативни варианти. Тази тенденция е в съответствие със съвременните молекулярни модели на овариалната канцерогенеза и има пряко клинично значение за генетичното консултиране, терапевтичната стратификация и оценката на наследствения риск.

11.4.4. Разпределение на герминативните варианти според възрастта на дигностициране

С цел оценка на връзката между възрастта при поставяне на диагнозата и носителството на клинично значим герминативен вариант бе извършен сравнителен статистически анализ между носителките ($n = 9$) и пациентките без установен ПВ вариант ($n = 24$).

Разпределението на възрастта в общата кохорта не показва статистически значимо отклонение от нормалност (Shapiro–Wilk, $p > 0,05$), което позволява използването на параметрични тестове. Средната възраст при диагноза при носителките на герминативен вариант е по-ниска в сравнение с неносителките, като се наблюдава тенденция към по-ранна изява на заболяването при наследствените случаи. Разликата между двете групи обаче не достига статистическа значимост (t-test за независими извадки, $p > 0,05$). Непараметричният Mann–Whitney U тест потвърждава липсата на статистически значима разлика ($p > 0,05$), което изключва ефект на разпределението върху резултата.

За допълнителна оценка бе приложен логистичен регресионен модел със зависима променлива „носителство на герминативен ПВ вариант“ (да/не) и независима променлива „възраст при диагноза“. Моделът показва обратна зависимост между възрастта и вероятността за носителство ($OR < 1$), което означава, че с увеличаване на възрастта вероятността за установяване на герминативен вариант намалява. Въпреки това асоциацията не достига статистическа значимост ($p > 0,05$), а доверителният интервал включва стойност 1, което ограничава възможността за категорично заключение.

При категоризиране на възрастта (<50 години срещу ≥50 години) се установява по-висока честота на носителство в по-младата възрастова група, но и тук разликата не достига статистическа значимост (Fisher exact test, $p > 0,05$). Размерът на ефекта съответства на малък до умерен ефект, което предполага наличие на тенденция, но недостатъчна статистическа сила.

Настоящият анализ демонстрира последователна, макар и статистически недоказана тенденция към по-ранна възраст на диагностициране при носителките на герминативни ПВ варианти. Този модел е в съответствие с биологичната концепция за наследствена канцерогенеза, при която вроденият дефект в ДНК-репарационните механизми води до ускорено натрупване на соматични събития и по-ранна клинична изява на неоплазията.

При овариалния карцином е добре известно, че носителките на BRCA1/2 и други гени от пътя на HR често се диагностицират в по-млада възраст в сравнение със спорадичните случаи. Въпреки това възрастовият диапазон остава широк, а значителна част от наследствените случаи могат да се проявят и след менопауза, което ограничава предиктивната стойност на възрастта като самостоятелен скринингов критерий.

Липсата на статистическа значимост в настоящата кохорта вероятно се дължи на малкия брой носителки ($n=9$), което води до широки доверителни интервали и намалена сила на теста. При подобен размер на извадката дори клинично релевантни разлики могат да останат статистически недоказани. Наблюдаваната тенденция обаче е последователна във всички приложени модели – както при сравнение на средни стойности, така и при логистична регресия.

От клинична гледна точка резултатите подкрепят препоръките за генетично тестване при пациентки с овариален карцином, независимо от възрастта при диагностициране. Възрастта сама по себе си не може да служи като достатъчен критерий за селекция на пациентки за генетично изследване, тъй като част от носителките се диагностицират и в по-късна възраст. Това съответства на съвременния подход за универсално или широко достъпно генетично тестване при епителен овариален карцином.

В заключение, възрастта при диагностициране показва тенденция към по-ниски стойности при носителките на герминативни ПВ варианти. Наблюдаваният модел е биологично консистентен с наследствената патогенеза на овариалния карцином, но ограничената

извадка не позволява категорични статистически изводи. Клинично резултатите подкрепят универсалния подход към генетичното тестване, независимо от възрастта на пациентката.

11.4.5. Анализ на соматичните варианти в изследваната кохорта

Настоящият раздел представя задълбочен анализ на втория набор от данни, включващ соматични патогенни и вероятно патогенни варианти, систематизирани по гени. Соматичните молекулярни изменения, идентифицирани в туморната тъкан (FFPE), са систематизирани в Таблица 5 и илюстрирани на Фигура 17.

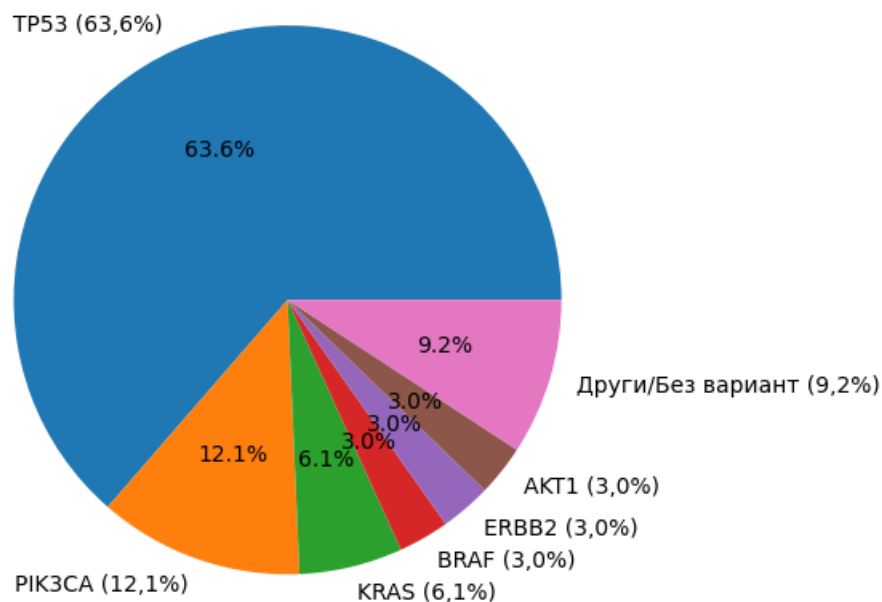
Най-често засегнатият ген е *TP53*, при който патогенни или вероятно патогенни соматични варианти са установени при 21 пациентки (63,6%). Алелната честота на тези изменения варира от 15% до 97%, което отразява хетерогенна туморна клетъчност и наличие както на клонални, така и на субклонални събития.

Втората по честота група изменения засяга *PIK3CA*, установен при 4 пациентки (12,1%). За разлика от *TP53*, тези мутации са разпределени по-хетерогенно и се срещат както при серозни, така и при несерозни подтипове.

Активиращите мутации в *KRAS* са идентифицирани при 2 пациентки (6,1%), а единични случаи са установени за *BRAF*, *ERBB2* и *AKT1* (по 3,0% всяка).

Особен интерес представлява един случай на ко-екзистенция на соматичен вариант в *TP53* и допълнителен таргетируем вариант в *PIK3CA*, което подчертава вътрешнотуморната молекулярна комплексност и потенциалната терапевтична релевантност.

Разпределение на соматичните П/В варианти в туморна тъкан (FFPE), n=33



Фигура 17:Разпределение на соматичните ПВ в туморната тъкан при всички жени от изследваната кохорта.

Този молекулярен профил потвърждава доминиращата роля на TP53 при високостепенния серозен карцином, както и наличието на подгрупи с активиращи изменения в MAPK и PI3K/AKT сигналните пътища.

Наблюдаваният молекулярен спектър демонстрира ясно структурирана биологична логика, която съответства на съвременната концепция за молекулярна стратификация на епителния овариален карцином и потвърждава валидността на дву-ударния модел на туморогенеза.

TP53 – основен молекулярен маркер на HGSC

Най-изразената характеристика на таблицата е множественото присъствие на соматични изменения в *TP53*. Идентифицирани са разнообразни типове мутации – missense, frameshift, stop-gain и сплайсингови дефекти, локализирани предимно в екзони 5–8. Именно тези екзони кодират ДНК-свързващия домейн на p53 протеина, който представлява функционалното ядро на неговата тумор-супресорна активност (63).

Особено показателно е наличието на класически „hotspot“ мутации като Arg248Trp, Arg248Gln, Arg282Trp, Tyr220Cys и Gly266Arg. Тези позиции са сред най-често мутираните в човешките неоплазии и са свързани с тежко нарушаване на ДНК-свързващата способност на p53, водещо до загуба на транскрипционен контрол върху гени, участващи в апоптоза, клетъчен цикъл и ДНК-поправка (298).

Високата честота и разнообразието на TP53 мутации в настоящата серия са напълно съвместими с данните от TCGA, според които над 95% от високостепенните серозни карциноми носят TP53 мутация (63). Това утвърждава TP53 като задължителен и ранен драйвър в патогенезата на HGSC, свързан с геномна нестабилност, хромозомни аберации и комплексни копийнобройни промени.

Допълнително, част от missense мутациите могат да демонстрират gain-of-function ефекти, допринасящи за повишена инвазивност и химиорезистентност. Frameshift и stop-gain вариантите от своя страна водят до класическа загуба на функция чрез скъсен протеин с последваща деградация.

Таблица 5: Пълен списък на откритите соматични варианти в туморната тъкан в изследваната кохорта

Gene	Transcript (RefSeq)	Nucleotide change (cDNA)	Protein change	Variant type	Exon	ACMG classification	Associated cancer risk / syndrome
AKT1	NM_001382430.1	c.49G>A	p.(Glu17Lys)	Missense	2	Патогенен	Breast, endometrial cancers
BRAF	NM_004333.6	c.1799T>A	p.(Val600Glu)	Missense	15	Патогенен	Melanoma, colorectal, thyroid, ovarian cancer
ERBB2	NM_004448.4	c.2313_2324dup	p.(Tyr772_Ala775dup)	In-frame duplication	20	Патогенен	Breast, gastric cancers
KRAS	NM_004985.5	c.35G>T / c.35G>C	p.(Gly12Val) / p.(Gly12Ala)	Missense	2	Патогенен	Colorectal, lung, pancreatic cancer
KRAS	NM_004985.5	c.37G>T	p.(Gly13Cys)	Missense	2	Патогенен	Colorectal, pancreatic cancers
PIK3CA	NM_006218.4	c.1624G>A	p.(Glu542Lys)	Missense	9	Патогенен	Breast, endometrial cancers
PIK3CA	NM_006218.4	c.1633G>A	p.(Glu545Lys)	Missense	9	Патогенен	Breast, endometrial, colorectal cancers
PIK3CA	NM_006218.4	c.3139C>T	p.(His1047Tyr)	Missense	20	Патогенен	Multiple cancers
TP53	NM_000546.6	c.380C>T	p.(Ser127Phe)	Missense	5	Вероятно патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.394A>C	p.(Lys132Gln)	Missense	5	Вероятно патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.395A>G	p.(Lys132Arg)	Missense	5	Вероятно патогенен	Cancer predisposition

TP53	NM_000546.6	c.422G>A	p.(Cys141Tyr)	Missense	5	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.452C>G	p.(Pro151Arg)	Missense	5	Вероятно патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.532del / c.839G>C	p.(His178ThrfsTer69) / p.(Arg280Thr)	Frameshift + missense	5 / 8	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.535C>G / c.1148_1149del	p.(His179Asp) / p.(Leu383HisfsTer8)	Missense + frameshift	5 / 11	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.535C>T / c.722C>G	p.(His179Tyr) / p.(Ser241Cys)	Missense	5 / 7	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.536A>G	p.(His179Arg)	Missense	5	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.659A>G	p.(Tyr220Cys)	Missense	6	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.711_719dup	p.(Asn239_Ser240insArgCysAsn)	In-frame duplication	7	Вероятно патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.730G>A	p.(Gly244Ser)	Missense	7	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.742C>T	p.(Arg248Trp)	Missense	7	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.743G>A	p.(Arg248Gln)	Missense	7	Патогенен	Li-Fraumeni syndrome, multiple cancers
TP53	NM_000546.6	c.722C>T	p.(Ser241Phe)	Missense	7	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.796G>A	p.(Gly266Arg)	Missense	8	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.844C>T	p.(Arg282Trp)	Missense	8	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.856G>A	p.(Glu286Lys)	Missense	8	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.916C>T	p.(Arg306Ter)	Stop gained	8	Патогенен	Cancer predisposition
TP53	NM_000546.6	c.920-1G>C	Splice acceptor	Splice site	9	Патогенен	Cancer predisposition

MAPK сигнален път – KRAS и BRAF като маркери на Type I тумори

Втората ключова група изменения, установени при настоящото проучване, обхваща гени от **RAS/RAF/MAPK каскадата**. Представени са класически активиращи мутации в *KRAS* (Gly12Val, Gly12Ala, Gly13Cys) и *BRAF* (Val600Glu).

KRAS мутациите в кодон 12 и 13 водят до блокиране на GTPазната активност на протеина и персистираща сигнализация към RAF-МЕК-ERK каскадата (299). Подобни изменения са типични за нискостепенния серозен карцином и за муцинозните тумори на яйчника (300). Те са характерни за т.нар. „Type I“ тумори, които се развиват постепенно от прекурсорни лезии и демонстрират относително стабилен геном.

BRAF V600E представлява класическа активираща мутация, водеща до конститутивна тирозинкиназна активност. Наличието ѝ в овариален карцином обикновено се асоциира с нискостепенни серозни неоплазии и borderline тумори (300).

Съвместното присъствие на *KRAS* и *BRAF* мутации в настоящата кохорта потвърждава молекулярната хетерогенност и съответства на дуалистичния модел на Kurman и Shih, разделящ овариалните тумори на Type I и Type II (301).

PI3K/AKT сигнален път – ключов механизъм при несерозните подтипове

Третата ясно очертана група изменения засяга **PI3K/AKT/mTOR пътя**. В таблицата са представени класическите hotspot мутации в *PIK3CA* (E542K, E545K, H1047Y), които активират каталитичната субединица p110 α и стимулират клетъчната пролиферация и преживяемост. Тези изменения са характерни за ендометриоидните и светлоклетъчните овариални карциноми, където често се наблюдават съпътстващи нарушения в *PTEN* или *ARID1A* (302). Активиращата мутация в *AKT1* (E17K) допълнително потвърждава ангажирането на този сигнален път.

ERBB2 in-frame дупликацията засяга тирозинкиназния домейн и води до конститутивна активация на HER2 рецептора. Макар HER2 амплификациите да са по-чести в рак на гърдата, подобни мутации се описват и при подгрупи от овариален карцином и имат потенциална терапевтична стойност (303).

Интегрирана биологична интерпретация

Функционалното групиране на вариантите разкрива три основни патогенетични оси:

1. **Геномна нестабилност и загуба на тумор-супресорна функция (*TP53*)**
2. **Активация на MAPK сигнализацията (*KRAS, BRAF*)**
3. **Активация на PI3K/AKT сигнализацията (*PIK3CA, AKT1, ERBB2*)**

Тази трикомпонентна структура напълно съответства на молекулярната архитектура на овариалния карцином, описана в международни консорциуми (63,301).

HGSC се характеризира с *TP53* доминиране и геномна нестабилност, докато LGSC и част от ендометриоидните карциноми демонстрират активиращи драйвър мутации в MAPK и PI3K пътищата.

Молекулярният профил има директно отражение върху терапевтичното поведение:

- ***TP53* мутациите** имат прогностично значение и са индиректен маркер за HGSC.
- ***KRAS/BRAF* мутациите** могат да предскажат по-ниска чувствителност към стандартна платинова терапия при LGSC и да насочат към MEK-инхибитори.
- ***PIK3CA* и *AKT1* измененията** отварят възможност за PI3K/AKT/mTOR-насочени терапии.
- ***ERBB2* мутациите** могат да имат значение при селектирани пациенти за HER2-насочено лечение.

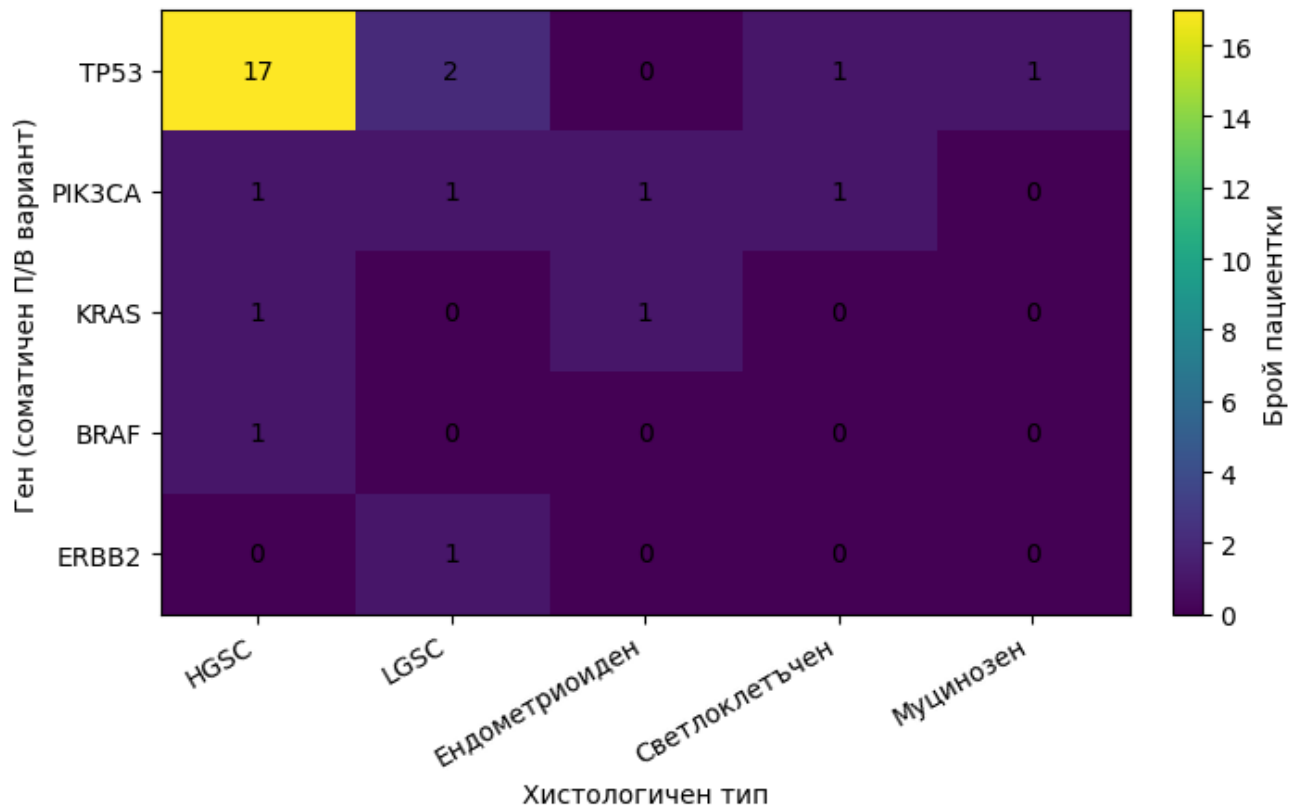
Този профил подчертава значението на NGS-базираната диагностика не само за молекулярна класификация, но и за персонализирано лечение.

Разширеният анализ на соматичните варианти демонстрира молекулярна хетерогенност, но ?и ясно организирана патогенетична структура. Доминацията на *TP53* мутации отразява преобладаването на HGSC в кохортата, докато наличието на *KRAS, BRAF* и *PIK3CA* изменения потвърждава присъствието на Type I молекулярни подтипове.

Наблюдаваният спектър е в пълно съответствие със съвременните геномни данни и подкрепя необходимостта от интегриран клиничко-молекулярен подход при овариален карцином. Резултатите демонстрират, че NGS анализът предоставя не само диагностична, но и прогностична и терапевтична информация, която е съществена за съвременната персонализирана онкология.

11.4.6. Анализ на разпределението на соматичните варианти по хистологичен подтип

Соматичните молекулярни изменения, идентифицирани в туморната тъкан (FFPE), демонстрират ясно изразен неравномерен профил на разпределение както по гени, така и по хистологичен подтип. Кръгова диаграма (Фигура 17) илюстрира относителния дял на отделните гени в рамките на цялата кохорта ($n = 33$), докато топлинната карта (Фигура 18) представя разпределението им по хистологични категории.



Фигура 18: Heatmap на разпределението на соматични П/В варианти по гени и хистологичен подтип ($n=33$). Топлинната карта представя броя пациентки с П/В по гени (редове) и хистологичен подтип (колони). Стойностите в клетките са абсолютен брой носителки в съответната категория.

Топлинната карта визуализира разпределението на соматичните патогенни и вероятно патогенни варианти по гени (редове) и хистологични подтипове (колони), като интензитетът на цвета отразява броя пациентки с установено изменение в съответната категория. Този тип представяне позволява едновременно оценяване на честотата и хистологичната специфичност на отделните молекулярни събития.

Най-изразеният сигнал в топлинната карта се наблюдава при **TP53**, където интензитетът е значително по-висок в колоната на високостепенния серозен карцином (HGSC). Това ясно демонстрира концентрацията на **TP53** мутации именно в този подтип и потвърждава неговия **TP53**-доминантен молекулярен профил. В останалите хистологични категории **TP53** се среща значително по-рядко и разпределението е спорадично, което подчертава специфичността му за HGSC.

За разлика от **TP53**, измененията в **PIK3CA** показват по-хетерогенно разпределение, с по-слабо изразен цветови интензитет, разпределен между различни подтипове. Това отразява по-ниската обща честота на **PIK3CA** мутациите, както и тяхната асоциация с несерозни форми, включително ендометриоидни и светлоклетъчни карциноми. Липсата на ясно изразена доминация в един конкретен подтип подчертава по-различния биологичен модел на тези изменения.

KRAS демонстрира ограничено, но специфично присъствие, концентрирано в отделни подтипове. Интензитетът е нисък, което съответства на малкия брой случаи, но пространственото му позициониране в топлинната карта отразява ролята му при т.нар. Туре I тумори. Подобна картина се наблюдава и при **BRAF**, който се среща изолирано и без широко разпространение в кохортата.

ERBB2 и **AKT1** са представени с единични случаи, визуализирани като изолирани клетки с нисък интензитет. Тяхната ограничена честота, но наличие в специфични подтипове, подчертава потенциалната им роля като таргетируеми събития при селектирани пациентки.

Общият визуален модел на топлинната карта разкрива ясно разграничение между:

- **TP53-доминантен профил**, характерен за HGSC
- **Сигнални активационни профили (MAPK и PI3K/AKT)**, по-често асоциирани с несерозни подтипове

Тази картина е напълно консистентна с дуалистичния модел на овариалната карциногенеза, при който високостепенните серозни карциноми (Type II) се характеризират с геномна нестабилност и *TP53* мутации, докато нискостепенните и други несерозни подтипове (Type I) демонстрират специфични драйвър мутации в *MAPK* и *PI3K* сигналните пътища.

От клинична гледна точка топлинната карта предоставя бърза визуална стратификация на молекулярните профили и подчертава необходимостта от хистологично-специфичен подход при интерпретация на NGS резултатите. Тя ясно демонстрира, че молекулярните изменения не са равномерно разпределени, а следват предвидима биологична логика, свързана с хистологичния тип и патогенетичния механизъм на заболяването.

Статистически анализ

За оценка на зависимостта между соматичните изменения и хистологичния тип бе извършен сравнителен анализ (HGSC срещу non-HGSC подтипове), като поради малките честоти бе използван Fisher exact test.

При *TP53* се наблюдава тенденция към по-висока честота при HGSC в сравнение с останалите подтипове ($OR > 1$), като статистическата стойност достига гранична значимост ($p \approx 0,05-0,06$). Това потвърждава биологично очаквания модел на *TP53*-доминантна геномна нестабилност при високостепенните серозни тумори.

За *PIK3CA* се установява тенденция към по-често откриване извън HGSC, макар без статистическа значимост при настоящия размер на извадката ($p > 0,05$). Подобна картина се наблюдава и при *KRAS/BRAF* мутациите, които демонстрират разпределение, съответстващо на Type I молекулярния профил, но без достигане на формална статистическа значимост.

Липсата на статистически значими различия при част от гените вероятно се дължи на ограничения размер на подгрупите и ниските абсолютни честоти, което редуцира статистическата мощ. Независимо от това, наблюдаваните тенденции са консистентни с утвърдените молекулярни модели.

Получените резултати ясно демонстрират молекулярната стратификация на овариалния карцином в разглежданата кохорта. Доминацията на *TP53* (63,6%) отразява

преобладаването на високостепенния серозен подтип и съответства на международните данни, според които *TP53* мутацията представлява централен и ранен драйвър в патогенезата на HGSC. Широкият диапазон на алелната честота (15–97%) предполага съществуване на клонална еволюция и вътрешнотуморна хетерогенност, което има значение за терапевтичната резистентност и прогресията на заболяването.

От друга страна, наличието на *KRAS*, *BRAF* и *PIK3CA* изменения подчертава присъствието на молекулярно различни подтипове в рамките на кохортата. Тези гени са характерни за т.нар. Туре I тумори, които се развиват по постепенно еволюционен модел и демонстрират относително стабилен геном. Наблюдаваната хетерогенност потвърждава, че овариалният карцином не е единно заболяване, а съвкупност от молекулярно разграничени единици.

Клиничното значение на тези находки е съществено. *TP53* мутациите, макар и трудно таргетируеми директно, имат диагностична и прогностична стойност и могат да служат като индиректен маркер за HGSC. Мутациите в PI3K/AKT пътя и *ERBB2* представляват потенциални терапевтични таргети, а *KRAS/BRAF* измененията имат значение при селекцията на пациенти за експериментални или таргетни подходи.

Особено показателен е случаят с ко-присъствие на *TP53* и *PIK3CA* вариант, който илюстрира възможността за комбиниран молекулярен драйвър и подчертава необходимостта от комплексна интерпретация на NGS резултатите. Подобни случаи могат да имат значение за персонализирани терапевтични стратегии, включително комбинирани таргетни подходи.

В заключение, интегрираният анализ на соматичните изменения според хистологичния тип демонстрира биологично последователна картина, съответстваща на съвременната молекулярна класификация на овариалния карцином. Доминацията на *TP53* при HGSC и по-хетерогенното разпределение на *MAPK* и *PI3K* измененията подкрепят концепцията за молекулярна стратификация и персонализирана онкологична терапия. Тези данни потвърждават значението на NGS-базираната диагностика като неразделна част от съвременния клиничен алгоритъм при овариален карцином.

11.4.7. Сравнителен анализ на комбинирания герминативно–соматичен профили в изследваната кохорта

Сравнителният анализ на герминативните и соматичните молекулярни изменения в кохортата от 33 пациентки с епителен овариален карцином разкрива комплексна и многопластова молекулярна архитектура, характеризираща се с различни модели на взаимодействие между наследствени и придобити генетични събития.

Герминативни ПВ варианти са установени при 9 пациентки (27,3%), докато соматични патогенни изменения са идентифицирани при значително по-голям дял от кохортата, доминирани от *TP53* (63,6%), както и по-рядко от *PIK3CA* (12,1%), *KRAS* (6,1%), *BRAF*, *ERBB2* и *AKT1* (по 3,0%).

Комбинирани герминативно–соматични профили се наблюдават при подгрупа от пациентките, при които наследственият дефект в ген за ДНК-поправка коекзистира със соматични драйвър мутации. Тези профили могат да бъдат систематизирани в три основни категории:

1. **HR-дефицитен герминативен профил + *TP53* соматична мутация**
2. **Герминативен вариант + активиращ сигнален соматичен драйвър (PI3K/MAPK)**
3. **Множествени молекулярни събития с таргетируем потенциал**

Най-често срещаният комбиниран модел включва герминативен вариант в ген от пътя на хомоложната рекомбинация (*BRCA1*, *RAD51D*, *NBN*, *FANCL*, *FANCE* и др.) в комбинация със соматична мутация в *TP53*. Този модел е биологично очакван, тъй като *TP53* мутацията представлява ранно събитие в развитието на високостепенния серозен карцином, докато HR-дефицитът създава среда на геномна нестабилност, благоприятстваща натрупването на вторични соматични изменения.

В единичен, но особено показателен случай се наблюдава ко-екзистенция на соматичен *TP53* вариант с допълнителен таргетируем соматичен вариант в *PIK3CA*. Този профил демонстрира вертикално натрупване на драйвър събития – от базисна загуба на тумор-супресорна функция до допълнителна активация на сигнален път, което потенциално влияе върху туморната агресивност и терапевтичния отговор.

Комбинираните профили отразяват двустепенна молекулярна динамика:

- **Герминативният дефект** създава предразполагаща геномна среда.
- **Соматичните драйвъри** осигуряват клонална експанзия и туморна прогресия.

При пациентките с HR-дефицитни герминативни варианти соматичният *TP53* профил вероятно представлява вторично, но почти неизбежно събитие в развитието на HGSC. Това съответства на модела, според който произлизащите от фимбриалния епител на маточната тръба туморит акумулират *TP53* мутация като ключово ранно събитие, върху което се надграждат допълнителни геномни нарушения.

В случаите с активиращи соматични мутации (*PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF*) при липса на герминативен HR-дефицит се очертава различен патогенетичен път, който е по-характерен за Туре I тумори. Това разграничение подчертава, че комбинираните профили не са хомогенни, а отразяват биологичната диверсификация на овариалния карцином.

Комбинираните герминативно соматични профили имат съществено клинично значение:

1. **Терапевтична стратификация**

Пациентките с герминативен HR-дефицит и соматичен *TP53* профил вероятно ще демонстрират повишена чувствителност към платинова терапия и PARP-инхибитори.

2. **Комбинирани таргетни подходи**

При наличие на допълнителни таргетируеми соматични изменения (напр. *PIK3CA*), може да се обсъждат комбинирани или последователни таргетни стратегии.

3. **Прогностична оценка**

Наличието на множествени драйвър събития може да корелира с повишена туморна хетерогенност и потенциална терапевтична резистентност.

4. **Генетично консултиране**

Комбинацията от герминативни и соматични събития изисква ясно разграничаване на наследствения риск от придобитите тумор-специфични изменения.

В рамките на изследваната кохорта се очертават три молекулярни сценария:

- **Наследствено доминиран модел** – HR-дефицит + *TP53*
- **Соматично доминиран *TP53* модел** – без установен герминативен вариант
- **Сигнално активиран модел** – MAPK/PI3K драйвър при липса на HR-дефицит

Тези модели не са взаимно изключващи се и могат да се припокриват, което отразява сложната клонална еволюция на заболяването.

В заключение, интегрираният анализ на комбинираните герминативно–соматични профили в настоящата кохорта демонстрира, че овариалният карцином представлява резултат от динамично взаимодействие между наследствени предразполагащи фактори и придобити драйвър мутации. Най-често срещаният комбиниран профил включва HR-дефицитен герминативен вариант и соматична *TP53* мутация, което съответства на класическия молекулярен модел на високостепенния серозен карцином.

Наличието на допълнителни таргетируеми соматични изменения подчертава необходимостта от комплексен молекулярен анализ и подкрепя концепцията за персонализирана терапия.

Комбинираният подход към герминативната и соматичната диагностика не само разширява разбирането за патогенезата на заболяването, но и предоставя практическа основа за индивидуализирано клинично поведение.

11.5. Клинични случаи

Клиничен случай 1

Анамнестични данни:

Касае се за жена, диагностицирана на 61-годишна възраст със серозен карцином на яйчника, хистологичен грейд G2. Заболяването е установено в постменопаузална възраст. От репродуктивната анамнеза: менархе на 14 години, първа бременност на 19-годишна възраст. Към момента на поставяне на диагнозата няма данни за билатерално ангажиране на яйчниците.

Генеалогичен анализ:

Обхванати са 45 кръвни родственика от 5 поколения по двете родителски линии. Установи се родственик от II степен (сестра на бащата) диагностициран с карцином на панкреаса, без да се знае точната възраст на диагностициране, един родственик III степен (първи братовчед по бащина линия) диагностициран също с рак на панкреаса, и още един родственик III степен (дядо по бащина линия) диагностициран с рак на простатата на 78г. възраст.

Генетичен анализ:

Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установен е патогенен герминативен вариант в следния ген:

- *ATM* – NM_000051.3:c.8147T>C, (p.Val2716Ala), missense вариант, локализиран в екзон 55 от 63.

Соматичният анализ на туморна тъкан (FFPE) установява:

- *TP53* – NM_000546.6:c.743G>A, (p.Arg248Gln), с вариантна алелна фракция (VAF) 73% и дълбочина на покритие 5109 прочита.

Интерпретация на откритите варианти:

Откритият герминативен missense вариант c.8147T>C (p.Val2716Ala) в гена *ATM* засяга регион, функционално значим за активността на *ATM* протеина, който играе централна роля в клетъчния отговор към ДНК-двуверижни разкъсвания чрез активиране на сигнални пътища, регулиращи клетъчния цикъл и ДНК-репарацията. Нарушаването на *ATM*-

медираните механизми води до повишена геномна нестабилност и е асоциирано с повишен риск от развитие на злокачествени новообразувания, включително овариален карцином, капцином на панкреаса и простатата. Вариантът е класифициран като патогенен и се свързва с дефект в ДНК-репарацията и HRD-подобен молекулярен фенотип.

В туморната тъкан е установен добре охарактеризиран *driver* вариант в *TP53* – с.743G>A (p.Arg248Gln), разположен в ДНК-свързващия домен на протеина. Високата VAF стойност (73%) е показателна за клонална мутация и предполага ранна инактивация на *TP53* като ключово събитие в туморната еволюция. Комбинацията от герминативен дефект в *ATM* и соматична *TP53* мутация илюстрира модел на натрупване на геномна нестабилност, при който наследствената предиспозиция създава фон за последващи соматични „second hit“ събития и прогресия на туморния процес.

Препоръки на генетичната консултация:

Установеният патогенен герминативен вариант в гена *ATM* потвърждава наличие на наследствена предиспозиция към злокачествени заболявания. Препоръчва се провеждане на фамилно генетично консултиране и каскадно тестване на родственици от първа линия с цел идентифициране на носители и прецизиране на индивидуалния риск.

За изследваната пациентка се препоръчва дългосрочно онкологично проследяване, съобразено с наличието на дефект в ДНК-репарацията, и поради наличието на фамилна анамнеза проследяването с по-голямо внимание, чрез ехографски прегледи, на панкреаса. Генетичните находки имат значение за индивидуализиране на терапевтичния подход, като предполагат потенциална чувствителност към ДНК-увреждащи цитотоксични агенти, включително платинови препарати.

Клиничен случай 2

Анамнестични данни:

Касае се за жена, диагностицирана на 51-годишна възраст със серозен карцином на яйчника, хистологичен грейд G3. От репродуктивната анамнеза: менархе на 14 години, първа бременност на 24-годишна възраст. Заболяването е диагностицирано в пременопаузална възраст.

Генеалогичен анализ:

Няма данни за установена фамиленост за онкологични заболявания към момента на провеждане на генетичното изследване.

Генетичен анализ:

Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установен е патогенен герминативен вариант в:

- ***BRCA1*** – NM_007294.3:c.5266dup, (p.Gln1756ProfsTer74), frameshift вариант, екзон 19/23.

Соматичен анализ (FFPE):

- ***TP53*** – NM_000546.6:c.452C>G, (p.Pro151Arg), VAF 15%, дълбочина 19 269 прочита.

Интерпретация на откритите варианти:

Frameshift вариантът в *BRCA1* води до преждевременно прекъсване на транслацията и загуба на функция на протеина, ключов за хомоложната рекомбинация. Това определя HRD-позитивен молекулярен профил и наследствена предиспозиция към овариален карцином. Соматичният *TP53* вариант с ниска VAF е вероятно субклонално събитие в хода на туморната еволюция.

Препоръки на генетичната консултация:

Потвърждава се *BRCA1*-асоцииран наследствен овариален карцином. Препоръчват се фамилен генетично консултиране, каскадно тестване на родственици от първа линия и

индивидуализирано онкологично проследяване. Генетичният профил има директно терапевтично значение, налице е повишена чувствителност към платин-съдържащи медикаменти и PARP-инхибитори.

Клиничен случай 3

Анамнестични данни:

Касае се за жена, диагностицирана на 41-годишна възраст със серозен овариален карцином, хистологичен грейд G3. Заболяването е установено в млада възраст. Данните от репродуктивната анамнеза не сочат специфични рискови фактори, различни от възрастта при диагностициране.

Генеалогичен анализ:

Към момента на провеждане на генетичното изследване няма данни за фамилна обремененост с онкологични заболявания. Въпреки това, ранната възраст на диагностициране налага разглеждане на възможна наследствена етиология.

Генетичен анализ:

Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установен е патогенен герминативен вариант в следния ген:

- ***BRCA1*** – NM_007294.3:c.5533dup, (p. Tyr1845LeufsTer35), frameshift вариант, локализиран в екзон 23.

Соматичният анализ на туморна тъкан (FFPE) установява:

- ***TP53*** – NM_000546.6:c.730G>A, p.Gly244Ser, с вариантна алелна фракция (VAF) 46.9%, съвместима с клонална мутация.

Интерпретация на откритите варианти:

Frameshift вариантът c.5533dup, (p.Tyr1845LeufsTer35) в гена *BRCA1* води до тежък loss-of-function ефект и нарушаване на хомоложната рекомбинация като основен механизъм за репарация на ДНК-двуверижни разкъсвания. Този тип генетични изменения са добре установени като причина за наследствена предиспозиция към овариален карцином, карцином на млечна жлеза, панкреас и др., като обуславят HRD-позитивен молекулярен профил.

Соматичният вариант в *TP53* (p.Gly244Ser), с междинна до висока VAF стойност, представлява клонално събитие и е типичен за високостепенния серозен овариален карцином. Комбинацията от герминативен дефект в *BRCA1* и соматична инактивация на *TP53* илюстрира класически модел на „second hit“, водещ до изразена геномна нестабилност и туморна прогресия.

Препоръки на генетичната консултация:

Установеният патогенен герминативен вариант в гена *BRCA1* потвърждава наличие на висок наследствен риск за онкологични заболявания. Препоръчва се провеждане на фамилно генетично консултиране и каскадно тестване на родственици от първа линия с цел идентифициране на носители и прецизиране на индивидуалния риск.

За изследваната пациентка се препоръчва дългосрочно онкологично проследяване, съобразено с *BRCA1*-асоцииран HRD-позитивен туморен профил. Генетичните находки имат съществено прогностично и терапевтично значение, включително по отношение на повишена чувствителност към платинови препарати и възможност за приложение на PARP-инхибитори.

Клиничен случай 4

Анамнестични данни:

Касае се за жена, диагностицирана на 59-годишна възраст със серозен карцином на яйчника, хистологичен грейд G3. Заболяването е установено в зряла възраст и протича с клинични и хистологични характеристики, типични за високостепенен серозен овариален карцином.

Генеалогичен анализ:

Обхванати са 29 кръвни родственика от 5 поколения по двете родителски линии. Установи се родственик от I степен (баща) диагностициран с тумор в мозъка на 40г. възраст, един родственик II степен (чичо по бащина линия) диагностициран с „рак в корема“, без уточнена първична локализация.

Генетичен анализ:

Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установен е патогенен герминативен вариант в следния ген:

- **BRCA1** – NM_007294.3:c.181T>G, (p.Cys61Gly), missense вариант, локализиран в екзон 4 от 23, засягащ RING-домена на BRCA1 протеина.

Соматичният анализ на туморна тъкан (FFPE) установява:

- **TP53** – NM_000546.6: c.659A>G, (p.Tyr220Cys), с вариантна алелна фракция (VAF) 96.8%, съвместима с почти хомозиготна клонална мутация.

Интерпретация на откритите варианти:

Откритият missense вариант p.Cys61Gly в гена *BRCA1* е добре охарактеризиран патогенен вариант, засягащ RING-домена на протеина, отговорен за E3-убиквитин-лигазната активност и стабилността на BRCA1-BARD1 комплекса. Нарушаването на тази функция води до тежък дефект в хомоложната рекомбинация и до HRD-позитивен молекулярен фенотип, характерен за *BRCA1*-асоциираните серозни овариални карциноми. Соматичният *TP53* вариант p.Tyr220Cys, с изключително висока VAF стойност, е показателен за ранен и доминиращ клонален дефект, настъпил като ключово събитие в туморната инициация. Комбинацията от герминативен дефект в *BRCA1* и почти пълна

инактивация на *TP53* илюстрира класически модел на „second hit“, водещ до изразена геномна нестабилност и агресивен туморен фенотип.

Препоръки на генетичната консултация:

Установеният патогенен герминативен вариант в гена *BRCA1* потвърждава наличие на наследствена предиспозиция към овариален и мамарен карцином. Препоръчва се провеждане на фамилно генетично консултиране и каскадно тестване на родственици от първа линия с цел идентифициране на носители и прецизиране на индивидуалния риск. За изследваната пациентка се препоръчва дългосрочно онкологично проследяване, съобразено с *BRCA1*-асоциирания HRD-позитивен туморен профил. Генетичните находки имат съществено прогностично и терапевтично значение, включително по отношение на повишена чувствителност към платинови препарати и възможност за приложение на PARP-инхибитори, както и обсъждане на риск-редуциращи стратегии при родствениците.

Клиничен случай 5

Анамнестични данни:

Касае се за жена, диагностицирана на 50-годишна възраст със серозен карцином на маточната тръба, хистологичен грейд G3. Заболяването е установено в активна възраст и по хистологични характеристики отговаря на високостепенен серозен карцином, типичен за тубарен произход и биологично сходен със серозния овариален карцином.

Генеалогичен анализ:

Към момента на провеждане на генетичното изследване няма данни за фамилна обремененост с онкологични заболявания. Въпреки липсата на установена фамилност, ранната възраст на диагностициране и хистологичният подтип налагат оценка за възможна наследствена генетична предиспозиция.

Генетичен анализ:

Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установен е патогенен герминативен вариант в следния ген:

- *FANCL* – c.1048_1051del, (p.Gln350fs) stop-gained/frameshift вариант, водещ до преждевременно прекъсване на транслацията и загуба на функция на протеина.

Соматичният анализ на туморна тъкан (FFPE) установява:

- *TP53* – NM_000546.6:c.844C>T, (p.Arg282Trp), с вариантна алелна фракция (VAF) 60.8%, съвместима с клонална driver мутация.

Интерпретация на откритите варианти:

Герминативният frameshift вариант в гена *FANCL* води до тежък loss-of-function ефект. *FANCL* е ключов компонент на Fanconi anemia пътя, който участва в репарацията на ДНК-междувъзржни кръстоски и координира активирането на хомоложната рекомбинация. Нарушаването на този път води до нарушена ДНК-репарация и повишена геномна нестабилност, което се асоциира с повишен риск от развитие на високостепенни серозни гинекологични карциноми.

Соматичният *TP53* вариант p.Arg282Trp засяга ДНК-свързващия домен на p53 протеина и представлява добре охарактеризиран driver вариант при серозни карциноми. Междинно високата VAF стойност е показателна за клонална мутация, настъпила рано в туморната еволюция. Комбинацията от герминативен дефект във Fanconi anemia пътя и соматична инактивация на TP53 илюстрира класически модел на натрупване на геномна нестабилност, водещ до агресивен туморен фенотип.

Препоръки на генетичната консултация:

Установеният патогенен герминативен вариант в гена *FANCL* потвърждава наличие на наследствена предиспозиция, свързана с дефект в ДНК-репарационните механизми. Препоръчва се провеждане на фамилно генетично консултиране и каскадно тестване на родственици от първа линия с цел идентифициране на носители и прецизиране на индивидуалния риск.

За изследваната пациентка се препоръчва персонализирано онкологично проследяване, съобразено с наличието на дефект във Fanconi anemia пътя. Генетичният профил предполага потенциална повишена чувствителност към ДНК-увреждащи цитотоксични агенти, включително платинови режими, което има значение за терапевтичния подход и прогнозата.

Клиничен случай 6

Анамнестични данни:

Касае се за жена, диагностицирана на 45-годишна възраст със серозен билатерален овариален карцином, хистологичен грейд G1. Заболяването е установено в активна възраст и по клинични и хистологични характеристики отговаря на високостепенен серозен карцином с агресивно протичане и двустранно ангажиране на яйчниците.

Генеалогичен анализ:

Към момента на провеждане на генетичното изследване няма данни за фамилна обремененост с онкологични заболявания. Независимо от липсата на установена фамилност, ранната възраст на диагностициране и билатералният характер на тумора налагат оценка за възможна наследствена генетична предиспозиция.

Генетичен анализ:

Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установен е патогенен герминативен вариант в следния ген:

- *NBN* – NM_002485.4:c.2140C>T, (p.Arg714Ter), stop-gained вариант, водещ до преждевременно прекъсване на транслацията и загуба на функция на p18.

Соматичният анализ на туморна тъкан (FFPE) установява:

- *BRAF* – p.Val600Glu (V600E), активиращ missense вариант с вариантна алелна фракция (VAF) 26%.

Интерпретация на откритите варианти:

Герминативният stop-gained вариант p.Arg714Ter в гена *NBN* води до loss-of-function на p18 – ключов компонент на MRN-комплекса (MRE11–RAD50–NBN), участващ в разпознаването и репарацията на ДНК-двуверижни разкъсвания. Нарушаването на MRN-комплекса води до дефект в ДНК-репарационните механизми и повишена геномна

нестабилност, което се асоциира с повишен риск от развитие на злокачествени новообразувания, включително овариален карцином.

***BRAF* V600E** е активиращ **driver** вариант в MAPK пътя. *BRAF* мутациите, включително V600E, са **характерни за LGSOC и серозни borderline тумори** и представляват ключов молекулярен механизъм в този подтип. VAF 26% е съвместима с клонална популация при стандартна туморна тъкан и потвърждава, че **BRAF** е вероятният основен онкогенен драйвер в конкретния тумор.

За ***BRAF* V600E** съществува **tissue-agnostic** ускорено одобрение на FDA за **dabrafenib + trametinib** при нерезектабилни/метастатични солидни тумори с прогресия след предходно лечение и без удовлетворяващи алтернативи (с изключения/особености за колоректалния карцином). При овариален серозен карцином практическото приложение обичайно е в **рецидив/рефрактерност**, след обсъждане в онкокомитет и при наличие на съответстващ клинично-патологичен контекст.

Препоръки на генетичната консултация:

Установеният патогенен герминативен вариант в гена *NBN* потвърждава наличие на наследствена предиспозиция, свързана с дефект в механизмите за репарация на ДНК. Препоръчва се провеждане на фамилно генетично консултиране и каскадно тестване на родственици от първа линия с цел идентифициране на носители и прецизиране на индивидуалния риск.

За изследваната пациентка се препоръчва персонализирано онкологично проследяване. С оглед наличието на *BRAF* V600E вариант може да се обсъжда потенциална роля на таргетна терапия, особено в контекста на прогресия или резистентност към стандартни терапевтични режими, в рамките на утвърдени клинични показания или клинични проучвания.

Клиничен случай 7

Анамнестични данни:

Касае се за жена, диагностицирана на 60-годишна възраст със серозен карцином на яйчника, хистологичен грейд G3. Заболяването е установено в зряла възраст и по морфологични и биологични характеристики отговаря на високостепенен серозен карцином, който споделя общ молекулярен профил със серозния овариален карцином.

Генеалогичен анализ:

Към момента на провеждане на генетичното изследване няма данни за фамилна обремененост с онкологични заболявания. Въпреки липсата на установена фамилност, хистологичният подтип и молекулярните находки налагат оценка за възможна наследствена генетична predisposition.

Генетичен анализ:

Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установен е патогенен герминативен вариант в следния ген:

- **RAD51D** – NM_002878.3:c.803G>A, (p. Trp268Ter), stop-gained вариант, водещ до преждевременно прекъсване на транслацията и загуба на функция на протеина.

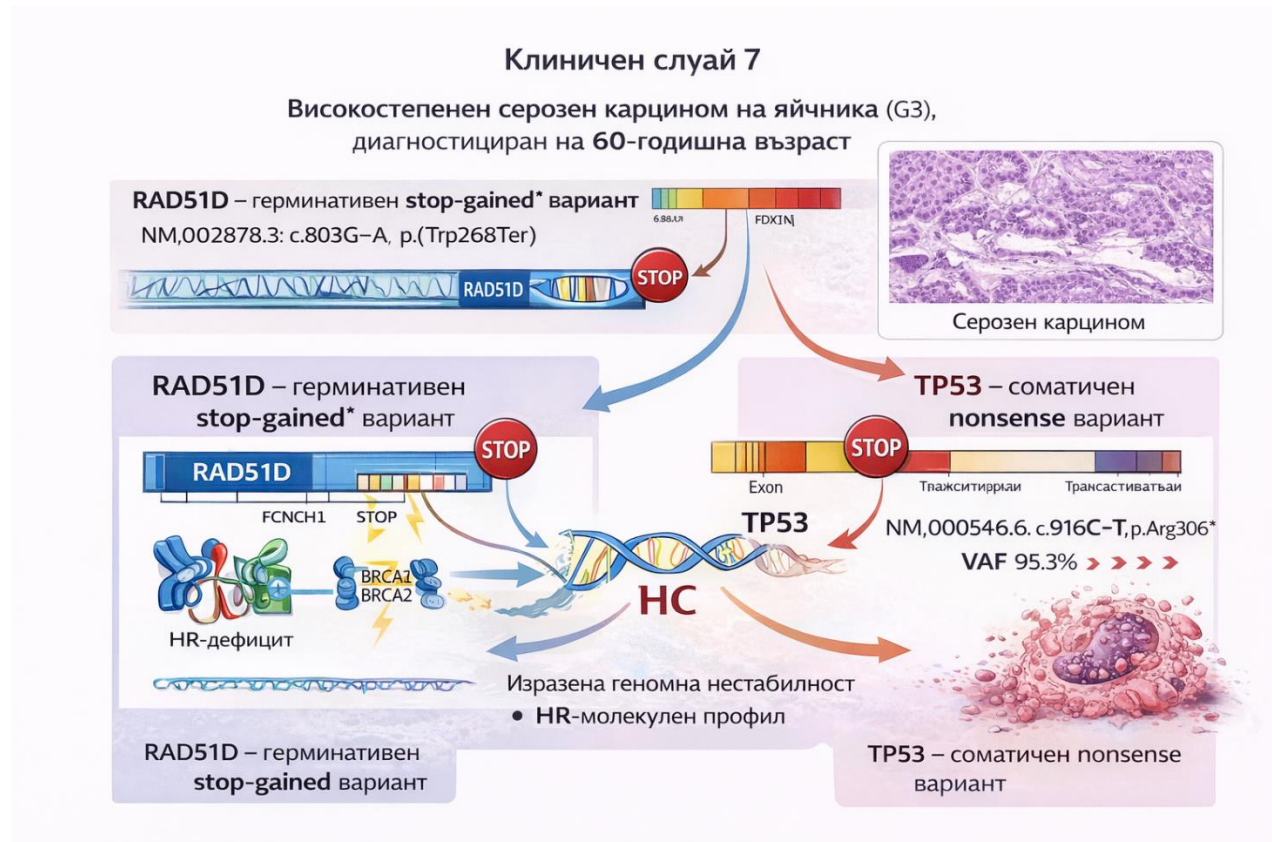
Соматичният анализ на туморна тъкан (FFPE) установява:

- **TP53** – p.Arg306*, nonsense вариант, с много висока вариантна алелна фракция (VAF) 95.3%, съвместима с почти пълна клонална инактивация.

Интерпретация на откритите варианти:

Герминативният stop-gained вариант p.Trp268Ter в гена RAD51D води до loss-of-function на ключов компонент на хомоложната рекомбинация. RAD51D участва директно в репарацията на ДНК-двуверижни разкъсвания, като патогенните варианти в този ген са добре установени като причина за умерен до висок наследствен риск от овариален и тубарен карцином и са асоциирани с HR-дефицитен молекулярен фенотип.

Соматичният nonsense вариант p.Arg306* в *TP53*, с изключително висока VAF стойност, представлява ранен и доминиращ клонален „driver“ дефект. Комбинацията от герминативен дефект в *RAD51D* и соматична инактивация на *TP53* илюстрира класически модел на „second hit“, водещ до изразена геномна нестабилност и агресивно туморно поведение.



Фигура 19: Схематично представяне на клиничен случай 7

Препоръки на генетичната консултация:

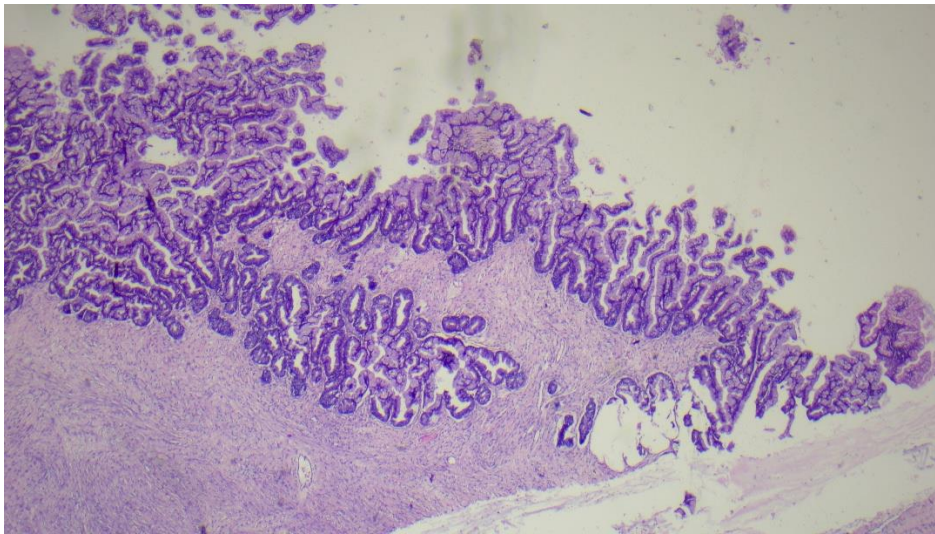
Установеният патогенен герминативен вариант в гена *RAD51D* потвърждава наличие на наследствена предиспозиция към серозен тубарен и овариален карцином. Препоръчва се провеждане на фамилно генетично консултиране и каскадно тестване на родственици от първа линия с цел идентифициране на носители и прецизиране на индивидуалния риск.

За изследваната пациентка се препоръчва персонализирано онкологично проследяване, съобразено с HR-дефицитния молекулярен профил. Генетичните находки имат прогностично и терапевтично значение, включително по отношение на повишена чувствителност към платинови препарати и възможност за приложение на PARP-инхибитори.

Клиничен случай 8

Анамнестични данни:

Касае се за жена, диагностицирана на 52-годишна възраст с ендометриоиден овариален карцином, бордерлайн, хистологичен грейд G2. Заболяването е установено в зряла възраст и по хистологични характеристики отговаря на умерено диференциран ендометриоиден подтип, отличаващ се с различен биологичен и молекулярен профил спрямо високостепенните серозни овариални карциноми.



Фигура 20: Хистологичен образ на ендометриоиден borderline тумор, характеризиращ се с комплексна папиларна и жлезиста архитектура с епителна пролиферация без данни за стромална инвазия (H&E оцветяване, $\times 2,5$).

Генеалогичен анализ:

Към момента на провеждане на генетичното изследване няма данни за фамилна обремененост с онкологични заболявания.

Генетичен анализ:

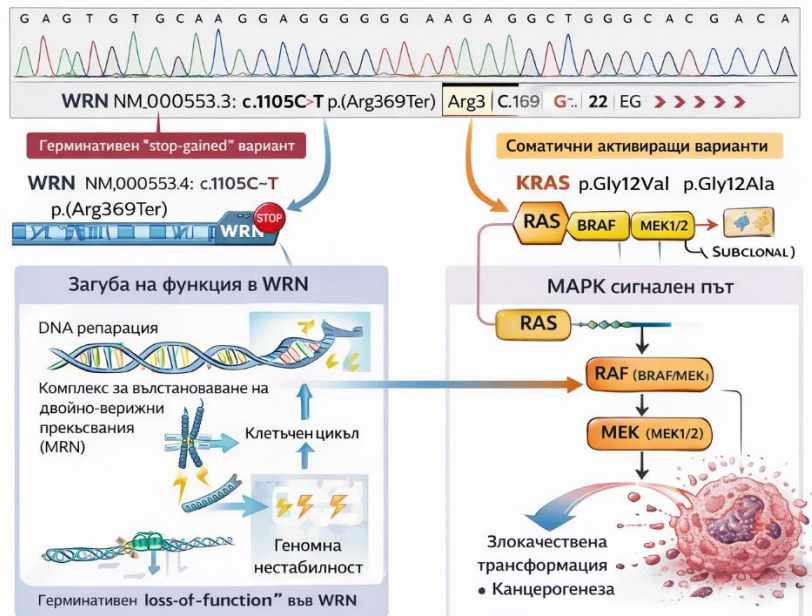
Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установен е патогенен герминативен вариант в следния ген:

- *WRN* – NM_000553.4:c.1105C>T, (p. Arg369Ter), stop-gained вариант, водещ до преждевременно прекъсване на транслацията и загуба на функция на WRN протеина.

Соматичният анализ на туморна тъкан (FFPE) установява:

- *KRAS* – p.Gly12Val и p.Gly12Ala, активиращи missense варианти с ниска вариантна алелна фракция (VAF приблизително 5%).



Фигура 21: Схематично представяне на клиничен случай 8

Интерпретация на откритите варианти:

Герминативният stop-gained вариант p.Arg369Ter в гена *WRN* води до loss-of-function на WRN хеликазата – ензим, участващ в процесите на ДНК-репарация, репликация и поддържане на теломерната стабилност. Патогенните варианти в *WRN* са класически асоциирани с автозомно-рецесивния синдром на Werner гл. При хетерозиготни носители се обсъжда възможна роля като умеренопенетрантен фактор за канцерогенна предиспозиция, без ясно дефиниран висок наследствен риск за овариален карцином. В някои литературни източници генът *WRN* се определя като част от наследствената етиология при Lynch-like синдрома (304).

Соматичните активиращи варианти в *KRAS* (p.Gly12Val и p.Gly12Ala) засягат кодон 12 и водят до конститутивна активация на RAS/MAPK сигналния път. Този молекулярен профил е типичен за ендометриоидния овариален карцином и се разглежда като ранен

онкогенен драйвър в туморогенезата. Ниската VAF стойност е показателна за субклонален характер на измененията и отразява ограничена туморна хетерогенност в сравнение със серозните подтипове.

Препоръки на генетичната консултация:

С оглед на установения герминативен вариант в WRN гена, който се разглежда като фактор с умерена пенетрантност по отношение на онкологичния риск, се препоръчва индивидуализиран подход към генетичната консултация. Тъй като генът има отношение към наследствената етиология на Lynch-like синдрома, е необходима профилактика по отношение на колоректален карцином – регулярни колоноскопии.

За изследваната пациентка се препоръчва клинично и онкологично проследяване, съобразено с ендометриоидния хистологичен подтип и умерения хистологичен грейд. Генетичните находки имат значение основно за разбирането на туморната биология, като при необходимост могат да бъдат използвани за допълнителна молекулярна стратификация и участие в клинични проучвания.

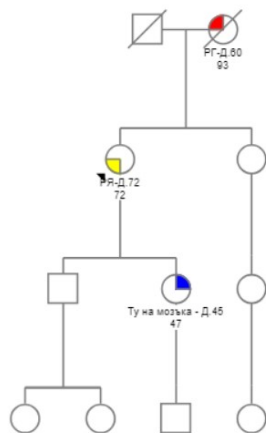
Клиничен случай 9

Анамнестични данни

Касае се за жена, диагностицирана на 72 годишна възраст със серозен овариален карцином инвазивен дуктален карцином. От репродуктивната анамнезата: менархе на 12 г., пет бременности (първата на 22 г., последната на 38 г.), две живородени деца, кърмени по 1 месец. Поводът за хоспитализацията е било рязкото редуциране на телесното тегло с около 20 кг за 2 месеца. Образните изследвания (УЗИ, ЯМР) показват туморно засягане на двата яйчника, ангажиране на парааорталните и параилиачните лимфни възли и засягане на перитонеума. Изследване на асцитната течност показва серозен овариален карцином, G3. Пациентката отказва лечение.

Генеалогичен анализ

Обхванати са 10 кръвни родственици от 4 поколения по двете родителски линии. Установи се родственик от I степен (майка) диагностициран с РГ и друг родственик от I степен (дъщеря) с Ту на мозъка (доброкачествен).

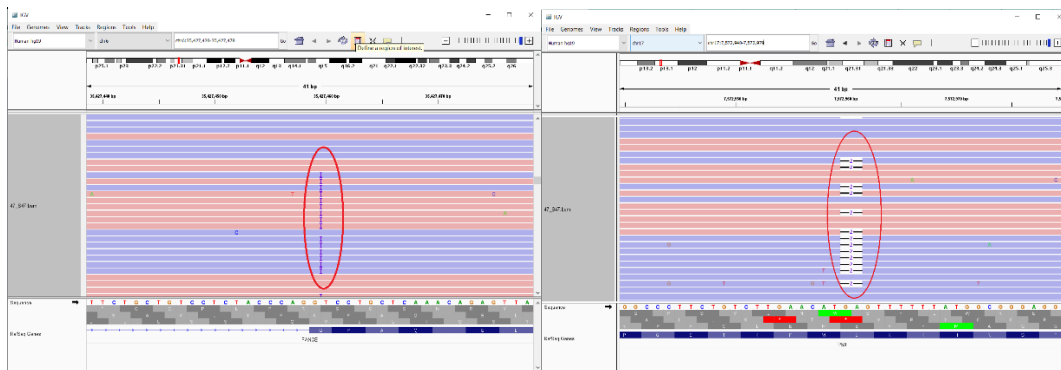


Генетичен анализ

Генетичният анализ е проведен чрез секвениране от следващо поколение (NGS).

Установени са патогенни герминативни варианти в следните гени:

- ***TP53*** - c.1148_1149del p.(Leu383HisfsTer8)
- ***FANCE*** - c.1239dup p.(Pro414SerfsTer54)



Интерпретация на откритите варианти:

В ***TP53*** – Откритият от нас вариант c.1148_1149del, (p. Leu383HisfsTer8) е нов и не е описван досега в литературата. Представлява делеция на 2 нуклеотида – GA и води до промяна на рамката на четене (frameshift вариант). Вариантът липсва в популационните база данни на здрави индивиди и не е описван досега в литературата при пациенти с ОК. Класифициран е като вероятно патогенен.

В ***FANCE*** – Откритият от нас вариант c.1239dup, (p. Pro414Serfs*54) създава преждевременен транслационен стоп сигнал (p.Pro414Serfs*54) в гена ***FANCE***. Очаква се да доведе до липсващ или нарушен протеинов продукт. Известно е, че вариантите със загуба на функция при ***FANCE*** са патогенни (PMID: 11001585, 17924555). Този вариант присъства в популационните бази данни (gnomAD 0,0009%). Вариантът е описван в литературата при пациенти с ОК (PMID: 27913932). Класифициран е като патогенен.

Соматичният анализ на туморна тъкан (FFPE) установява следните изменения:

- ***PIK3CA*** – p.Glu545Lys, активиращ missense вариант с вариантна алелна фракция (VAF) 20%;

- **TP53** – frameshift вариант c.1148_1149del, p. (Leu383HisfsTer8), идентичен с герминативния вариант на гена, с висока VAF 86.9%, водещ до загуба на функция на p53 протеина.

Интерпретация на откритите варианти:

Активиращият вариант p.Glu545Lys в гена PIK3CA засяга хеликалния домен на p110 α субединицата и е добре охарактеризиран онкогенен драйвър, водещ до конститутивна активация на PI3K/АКТ сигналния път. Този механизъм подпомага клетъчната пролиферация, преживяемост и метаболитна адаптация на туморните клетки.

Соматичният frameshift вариант в TP53, идентичен на герминативния, води до тежка инактивация на тумор-супресорната функция на p53 и допринася за натрупване на допълнителни генетични изменения. Комбинацията от активация на PI3K-пътя и TP53-дефицит отразява изразена туморна хетерогенност и напреднала туморна еволюция, характерни за високостепенните серозни овариални карциноми, диагностицирани в по-късна възраст.

Препоръки на генетичната консултация:

Препоръките на генетичната консултация, поради носителство на ПВ в два предразполагащи гена, е съобразена преди всичко с ПВ, носещ по-висок риск (в случая това е TP53). Съобразявайки се с молекулните характеристики на открития вариант в TP53 (намира се в последния екзон) и фамилната и персоналната медицинска история (овариален карцином и карцином на млечна жлеза, диагностицирани в по-зряла възраст), препоръките за изследваната пациентка са клинични прегледи на млечните жлези на всеки 6-12 месеца и всяка година мамографски прегледи или ЯМР на млечните жлези. За родствениците на изследваната пациентка (дъщеря и сестра) - с оглед прецизиране на риска при тях е необходимо изследване за носителство, на намерения при пациентката вариант и последваща генетична консултация.

Препоръчва се онкологично проследяване, съобразено с агресивния хистологичен подтип, като при прогресия на заболяването може да се обсъжда значението на PI3K/АКТ сигналния път като потенциална терапевтична мишена в рамките на клинични проучвания.

В заключение, случаят е показателен за сложен генетичен фон, при който са налице два независими механизма на предразположение:

1. **Дефект в тумор-супресорния ген *TP53*** – водещ до загуба на функция на p53, геномна нестабилност и улеснена туморна еволюция.
2. **Дефект в гена *FANCF***, участващ във Fanconi anemia/HR-пътя – компрометиращ ДНК-репарацията и способстващ натрупването на двойноверижни разкъсвания и хромозомни аберации.

Независимо от различната молекулна роля на двата гена (контрол на клетъчния цикъл и геномна стабилност при *TP53* срещу дефект в репарационния механизъм при *FANCF*), на ниво туморни клетки се наблюдава конвергентен фенотип – изразена геномна нестабилност, агресивно поведение и молекулен профил, характерен за високостепенен серозен карцином. Соматичната идентификация на същия frameshift вариант в *TP53* с висока VAF (86.9%) потвърждава механизма на двувалелна инактивация („second hit“), докато активираният *PIK3CA* вариант допълнително засилва пролиферативния потенциал чрез PI3K/AKT сигналния път.

Този случай илюстрира, че наличието на предразположение, обусловено от повече от един предразполагащ за рак ген, не води до алтернативен хистологичен подтип или различен морфологичен фенотип, а до кумулативен ефект върху туморната биология. В конкретния контекст овариалният карцином вероятно е резултат от синергичното действие на два патогенетични механизма:

- дефект в контрола на клетъчния цикъл и апоптозата (*TP53*)
- дефект в хомоложната рекомбинация и ДНК-репарацията (*FANCF*)

Комбинацията от тези нарушения създава молекулна среда, благоприятстваща ранно натрупване на генетични увреждания, ускорена клонална селекция и агресивна туморна еволюция, което съответства на клиничната картина с напреднал стадий при диагностициране.

Случаят подчертава значението на комплексния генетичен анализ при овариален карцином и демонстрира, че множествената герминативна предиспозиция може да се прояви с единен, но биологично обоснован високоагресивен туморен фенотип.

Обобщен клинико-генетичен анализ на случаи с комбинирани герминативни и соматични генетични варианти

Анализът на представената серия клинични случаи с овариален карцином, при които са идентифицирани едновременно герминативни и соматични генетични варианти чрез секвениране от следващо поколение (NGS), предоставя възможност за задълбочено разглеждане на молекулярните механизми, стоящи в основата на туморогенезата, както и на клиничните и терапевтичните последици от тези изменения. Комбинираният подход, включващ анализ на герминативната и туморната ДНК, позволява интегрирана интерпретация на наследствената предиспозиция, соматичната туморна еволюция и тяхното взаимодействие в контекста на конкретния хистологичен подтип.

В разглежданата серия случаи преобладават високостепенните серозни овариални карциноми, като са включени и отделни случаи на ендометриоиден овариален карцином. Това разпределение отразява както честотата на тези подтипове в клиничната практика, така и различията в молекулярната им патогенеза. Високостепенният серозен карцином е утвърден като заболяване, характеризиращо се с почти универсална соматична инактивация на *TP53* и честа асоциация с дефекти в ДНК-репарацията чрез хомоложна рекомбинация, докато ендометриоидният подтип демонстрира различен спектър от драйвърни събития, включително активация на RAS/MAPK и PI3K/AKT сигналните пътища (63,301).

Герминативни варианти и доминиращи молекулярни пътища

Герминативните ПВ в представената серия засягат предимно гени, участващи в ДНК-репарацията и поддържането на геномната стабилност. Най-често са засегнати гени от хомоложната рекомбинация, включително *BRCA1* и *RAD51D*, както и гени, имащи централна роля в координацията на ДНК-репарационния отговор, като *ATM* и *NBN*. Допълнително са идентифицирани дефекти във Fanconi anemia пътя (*FANCL*) и в гени, асоциирани с теломерна и геномна стабилност (*WRN*).

Патогенните варианти в *BRCA1* представляват класически пример за високопенетрантна наследствена предиспозиция към овариален карцином и карцином на млечна жлеза. Идентифицираните frameshift и missense варианти водят до загуба на функция на протеина и до тежък дефект в хомоложната рекомбинация, което определя

HRD-позитивен молекулярен фенотип (243). Подобно, stop-gained вариантите в *RAD51D*, макар и с умерена пенетрантност в сравнение с *BRCA1*, също водят до функционална недостатъчност на HRR и са асоциирани с повишен риск от серозен овариален и тубарен карцином (292).

Гените *ATM* и *NBN* заемат ключово място в ранния клетъчен отговор към ДНК-двуверижни разкъсвания. Дефектите в тези гени нарушават сигналната каскада, която координира разпознаването на уврежданията, спирането на клетъчния цикъл и активирането на репарационните механизми. Макар пенетрантността на тези варианти да е по-ниска в сравнение с *BRCA1/2*, тяхното присъствие в комбинация със соматични драйвърни мутации допринася за геномна нестабилност и канцерогенеза (181,293).

Особен интерес представляват случаите с дефекти във Fanconi anemia пътя, като *FANCL*. Fanconi anemia пътят е тясно свързан с хомоложната рекомбинация и репарацията на ДНК-междувверижни кръстоски. Загубата на функция на *FANCL* води до тежка ДНК-репарационна недостатъчност и HRD-подобен фенотип, което обяснява асоциацията с високостепенни серозни гинекологични карциноми (295).

Герминативните варианти в *WRN* се разглеждат като фактори с умерена пенетрантност по отношение на овариалния карцином. Макар *WRN* да е класически асоцииран със синдрома на Werner при хомозиготно състояние, при хетерозиготни носители се обсъжда възможна роля в поддържането на геномната стабилност и потенциално участие в канцерогенезата, особено в комбинация със соматични онкогенни събития (304).

Соматични варианти и туморна еволюция

Соматичният мутационен профил в анализираната серия е доминиран от изменения в *TP53*, които се откриват във всички случаи със серозен овариален карцином. Наблюдава се широк спектър от missense, nonsense и frameshift варианти, с вариантна алелна фракция, варираща от ниски субклонални стойности до почти хомозиготна инактивация. Тези данни са в пълно съответствие с утвърденото разбиране за *TP53* като универсален соматичен драйвър при високостепенния серозен карцином (63).

Високите VAF стойности на *TP53* вариантите в значителна част от случаите са показателни за ранно клонално събитие, настъпило в началните етапи на туморната

инициация. Това подкрепя хипотезата, че инактивацията на *TP53* представлява едно от първите ключови събития, които позволяват натрупването на допълнителни генетични аберации и бърза туморна еволюция. В случаите с по-ниска VAF може да се предполага по-късно субклонално възникване или наличие на туморна хетерогенност.

При ендометриоидния овариален карцином се наблюдава различен соматичен профил, доминиран от активиращи варианти в *KRAS*, както и от изменения в PI3K/AKT сигналния път. Активиращите мутации в *KRAS*, засягащи кодон 12, са добре установени като ранни драйвърни събития при ендометриоидния подтип и отразяват различна биология и еволюционен път спрямо серозните карциноми (102). Ниската VAF на тези варианти предполага субклонален характер и по-ограничена геномна нестабилност.

Отделни случаи демонстрират наличие на соматични онкогенни драйвъри като *BRAF* V600E и *PIK3CA* p.Glu545Lys. Тези изменения активират съответно MAPK/ERK и PI3K/AKT сигналните пътища и представляват алтернативни механизми на туморна прогресия, особено в контекста на съпътстваща ДНК-репарационна недостатъчност (302).

Взаимовръзка между герминативни и соматични изменения – моделът „second hit“

Едно от най-ясно изразените наблюдения в разглежданата серия е взаимодействието между герминативната предиспозиция и соматичната туморна еволюция, най-добре илюстрирано чрез класическия модел на „second hit“. При случаи с патогенни герминативни варианти в *BRCA1*, *RAD51D* или *FANCL*, наследственият дефект в ДНК-репарацията създава фон на геномна нестабилност, върху който соматичната инактивация на *TP53* действа като второ ключово събитие, ускоряващо туморната прогресия (298).

Този модел обяснява както агресивния фенотип на високостепенните серозни карциноми, така и високата честота на *TP53* мутации в тези тумори. От друга страна, при случаи без доминиращ високорисков герминативен вариант се наблюдава по-комплексен соматичен профил, включващ комбинация от онкогенни драйвъри и тумор-супресорни дефекти, което подчертава ролята на алтернативни пътища на канцерогенеза.

Хистологично-молекулярни корелации и клинично значение

Хистологично-молекулярните корелации в анализираната серия са ясно изразени и съответстват на данните от големи международни проучвания. Високостепенните серозни овариални и тубарни карциноми са тясно асоциирани с HRR дефекти, Fanconi anemia пътя и универсална *TP53* инактивация, докато ендометриоидният подтип се характеризира с *KRAS*-медирана онкогенна активация и относително запазена хомоложна рекомбинация (63).

От клинична и прогностична гледна точка, идентифицирането на HRD-позитивен статус има съществено значение. Туморите с дефекти в *BRCA1*, *RAD51D*, *FANCL*, *ATM* и *NBN* демонстрират повишена чувствителност към платинови режими и представляват основната целева група за терапия с PARP-инхибитори (216). От друга страна, наличието на соматични онкогенни драйвъри като *BRAF* и *PIK3CA* отваря възможности за таргетна терапия при селектирани пациенти, особено в контекста на прогресия или резистентност към стандартно лечение.

Значение на генетичната консултация и фамилия риск

Генетичната консултация заема централно място в интерпретацията на комбинираните герминативни и соматични находки. Разграничаването между високопенетрантни варианти, като тези в *BRCA1*, и варианти с ниска или умерена пенетрантност, като *WRN* или някои *ATM/NBN* изменения, е от ключово значение за правилната оценка на фамилия риск и за вземането на информирани решения относно каскадното тестване (305).

В случаите с доказан наследствен синдром генетичната информация има директни последици не само за пациентката, но и за нейните родственици, като позволява ранна идентификация на носители и прилагане на персонализирани стратегии за проследяване и превенция. Дори при липса на високорисков герминативен вариант, информацията за соматичния профил допринася за по-прецизна стратификация на риска и терапевтично планиране.

Заклучение

В заключение, интегрираният анализ на герминативни и соматични генетични варианти чрез NGS предоставя цялостна картина на молекулярната основа на овариалните и тубарните карциноми. Този подход позволява идентифициране на ключови патогенетични пътища, изяснява взаимодействието между наследствената предиспозиция и соматичната туморна еволюция и има директни диагностични, прогностични и терапевтични импликации. Получените резултати подчертават централната роля на генетичната информация в съвременната персонализирана онкогинекология и утвърждават комбинирания анализ на герминативния и соматичния геном като стандарт в клиничната практика и научните изследвания.

12. Заключение

12.1. Основни изводи

Сравнителният анализ на герминативни и соматични генетични варианти при 33 пациентки с епителен овариален карцином, изследвани чрез секвениране от следващо поколение на туморна и герминативна ДНК, очертава няколко взаимосвързани ключови закономерности, които имат едновременно биологично, клинично и организационно значение за съвременната онкогинекология.

Честота и разпределение на патогенните герминативни варианти

Герминативните патогенни и вероятно патогенни варианти се установяват като съществен компонент на генетичната предиспозиция при овариалния карцином, включително и при пациенти без отчетлива фамилна обремененост. Наблюдението потвърждава, че отсъствието на фамилност не изключва наследствена етиология, особено при високостепенни серозни подтипове и при диагноза в относително по-ранна възраст. Разпределението на герминативните изменения се концентрира в гени, свързани с репарацията на двуверижни ДНК-разкъсвания и хомоложната рекомбинация, като се открояват класически високорискови (*BRCA1/BRCA2*) и умеренорискови гени (напр. *RAD51D*), както и варианти в гени за автозомно-рецесивни синдроми на геномна нестабилност, които в хетерозиготно състояние могат да се разглеждат като модификатори с потенциално умерена пенетрантност. Тези данни подкрепят концепцията за генетична хетерогенност на наследствената предиспозиция и необходимостта от панелни подходи, надхвърлящи традиционния фокус върху *BRCA1/2*.

Спектър на соматичните „driver“ мутации и подтип-специфични модели.

Соматичният мутационен профил демонстрира очаквано подтип-специфично разслоение. При високостепенните серозни карциноми се наблюдава доминация на дефекти в TP53 като ранни и клонални „driver“ събития, често с много висока вариантна алелна фракция, отразяваща почти пълна клонална инактивация и ключова роля в туморната еволюция. В несерозните подтипове (ендометриоиден и нискостепенен серозен карцином) по-често се откриват активиращи изменения в RAS/MAPK оста (*KRAS, BRAF*), които функционират като ранни онкогенни драйвери и са в съответствие с различния биологичен

модел на туморогенеза спрямо *TP53*-доминантния високостепенен серозен карцином. Така се потвърждава, че „единен“ молекулярен модел за овариалния карцином не е приложим и че интерпретацията на NGS резултатите следва да бъде неизменно контекстуализирана спрямо хистологичния подтип.

Разлики между високостепенни серозни и несерозни подтипове.

Високостепенният серозен карцином се характеризира с висока степен на геномна нестабилност и почти универсална асоциация с *TP53* дисфункция, като в значима част от случаите се наслаждава HR-дефицитен фенотип поради герминативни и/или соматични изменения в HRR гени. За разлика от това, несерозните подтипове демонстрират по „път-специфичен“ профил с активация на RAS/MAPK сигнализацията и относително по-ограничен спектър на клонални дефекти в гени на репарацията, което отразява различен еволюционен натиск и различни терапевтични уязвимости. Тази дихотомия има практическо значение: при високостепенния серозен карцином приоритетно значение придобива оценката за HRD и възможността за PARP-инхибиторна терапия, докато при подтипове с *KRAS/BRAF* драйвери фокусът се измества към възможности за таргетиране на MAPK оста при подходящи индикации, клинични проучвания и доказателствена подкрепа.

Роля на HR-дефицита и молекулярната стратификация.

HR-дефицитът се утвърждава като централна ос за молекулярна стратификация на серозните високостепенни карциноми и на част от тубарните карциноми. Наличието на герминативни или соматични loss-of-function варианти в HRR гени определя биологичен фенотип, асоцииран с повишена чувствителност към платинови препарати и с терапевтичен потенциал за PARP-инхибитори. Тези наблюдения подкрепят необходимостта HRD оценката да се разглежда като комплексен процес, включващ едновременно: (i) детекция на патогенни варианти в HRR гени, (ii) анализ на копийни изменения и LOH, когато е наличен, и (iii) клиничен корелат (платинова чувствителност, динамика на рецидивите). Молекулярната стратификация на базата на HRD не следва да се ограничава до *BRCAl/2*, а да включва по-широк спектър от гени в хомоложната рекомбинация и свързаните пътища.

Значение на VAF при интерпретация на клоналност и биологична релевантност.

Вариантната алелна фракция се очертава като критичен параметър при разграничаването на клонални драйвери от субклонални изменения и при оценката на туморната хетерогенност. Много високите VAF стойности при *TP53* nonsense/frameshift изменения са съвместими с ранно клонално събитие и често отразяват съчетание със загуба на хетерозиготност или копийни промени. И обратно - ниските VAF при активиращи *KRAS* изменения, наблюдавани в част от ендометриоидните тумори, предполагат субклоналност, възможна пространствена хетерогенност и/или ограничена туморна клетъчност в анализирания FFPE материал. Поради това VAF следва да се интерпретира интегративно с данни за туморната клетъчност, качеството на FFPE пробата, възможни копийни изменения и биологичния контекст на подтипа. Рутинното включване на VAF в клиничната интерпретация повишава точността на заключенията и подпомага избор на последващи изследвания (напр. потвърдителни методи, допълнителни туморни блокове, разширени анализи).

Връзка между герминативен „first hit“ и соматичен „second hit“.

Кохортата демонстрира модели, съвместими с класическия механизъм на двуетапна инактивация на тумор-супресорни гени и гени на ДНК-репарацията. Герминативният дефект („first hit“) в HRR ген (напр. *RAD51D* или *BRCA1*) създава предразположение към натрупване на геномни увреждания, а последващи соматични събития („second hit“) – включително ЛОН, допълнителна патогенна мутация или съпътстваща *TP53*, стабилизират туморния фенотип и ускоряват прогресията. Този модел има висока обяснителна стойност за агресивното поведение на високостепенните серозни карциноми и за терапевтичната им уязвимост към ДНК-увреждащи агенти и PARP-инхибиране. Същевременно при несерозни подтипове драйверният модел е по-често онкогенно-активиращ (*KRAS/BRAF*), а механизмът „first/second hit“ може да бъде по-слабо изразен или да се разгръща в различни пътища.

Клинично и терапевтично значение.

Клиничната стойност на интегрирания герминативно-туморен NGS анализ се проявява в три направления: (i) идентификация на наследствена предиспозиция и оптимизиране на фамилен консултационен; (ii) определяне на терапевтични уязвимости, включително HRD-асоциирана платинова чувствителност и индикации за PARP-инхибитори; (iii) подобрена молекулярна класификация и потенциал за включване в клинични проучвания. Данните потвърждават, че паралелният анализ на герминативна и туморна ДНК е по-информативен от еднопосочен подход и позволява по-прецизна оценка на наследствен риск, разграничаване на соматични от герминативни дефекти и по-точна интерпретация на вариантите.

В обобщение, проведеното изследване потвърждава концепцията, че овариалният и тубарният карцином представляват молекулярно хетерогенни заболявания, при които интегрираната NGS диагностика позволява едновременно разкриване на наследствената компонента, определяне на туморните драйвери и идентификация на терапевтично значими фенотипове, с особена роля на HR-дефицита и TP53-доминантната туморна еволюция при високостепенните серозни подтипове.

12.2. Принос на монографията

Монографията предлага систематизирана и критична рамка за интерпретация на герминативните и соматичните генетични изменения при овариален/тубарен карцином, базирана на реални клинични данни от българска кохорта и приложена към актуалните принципи на персонализираната онкология.

Научен принос – локални популационни данни за България.

Представени са данни за спектъра на патогенните герминативни варианти и соматичните драйвер мутации в кохорта от пациентки, диагностицирани и проследявани в българска клинична среда. Това допринася за запълване на дефицита от структурирани популационни данни за България и предоставя емпирична основа за сравнение с международни серии, включително по отношение на честотата на BRCA-свързаните случаи, разпределението на HRR гените и доминиращите соматични драйвери. Локалните

данни са съществен ресурс за здравна политика, планиране на генетични услуги и оптимизация на диагностичните алгоритми.

Интегративен подход – клиничен, хистологичен и молекулярен анализ.

Монографията демонстрира модел на интегриране на клинични параметри (възраст, клиничен ход, терапевтична чувствителност), хистологична класификация и молекулярни данни от тумор и кръв. Подходът потвърждава, че молекулярната интерпретация не е самостоятелен процес, а се нуждае от морфологичен и клиничен контекст, особено при гранични фенотипове или при тумори с нетипичен мутационен профил.

Въвеждане на сравнителен модел „герминативни vs. соматични“ варианти.

Фокусът върху сравнителния анализ на два генетични слоя – наследствен и тумор-специфичен – представлява методологична и концептуална добавена стойност. Представени са практически принципи за разграничаване на герминативни и соматични варианти, оценка на клоналност чрез VAF, интерпретация на „first hit/second hit“ модели и клинична екстракция на терапевтични импликации. Този сравнителен модел има потенциал да се прилага като работна рамка в рутинната онкогенетична практика.

Практически принос за персонализирана медицина.

Резултатите подкрепят внедряването на персонализирани диагностични и терапевтични стратегии. Монографията аргументира значението на HRD-стратификацията за избор на лечение, ролята на туморните драйвери за прогнозна оценка и възможностите за участие в клинични проучвания. Подчертава се необходимостта от ранно насочване към генетично консултиране и от въвеждане на ясни клинични пътеки за тестване при високостепенни серозни карциноми и тубарни карциноми, независимо от фамилната анамнеза.

Методологичен принос – NGS панелен подход и интерпретация по ACMG/AMP.

Монографията систематизира добри практики за работа с NGS данни от герминативна и туморна ДНК, включително ограниченията на FFPE материалите, интерпретация на VAF, необходимостта от контрол на качеството и последователен процес

на вариантна класификация. Акцентира се върху приложението на ACMG/AMP принципите за герминативни варианти и върху диференцираната интерпретация на соматичните изменения с оглед на клоналност, функционална релевантност и клинична приложимост.

Значение за генетичното консултиране и фамилия скрининг.

Практическа стойност представлява изясняването на индикациите за каскадно тестване и фамилен скрининг, както и уточняването на комуникацията на резултатите към пациент и семейство. Монографията подчертава, че идентификацията на патогенен герминативен вариант има последствия отвъд индивидуалната терапия – включително риск-редуциращи стратегии, проследяване на родственици и рационално използване на ресурси в общественото здраве. Включването на случаи без фамиленост, но с доказана наследствена предиспозиция, има особено значение за оптимизация на критериите за насочване към генетично тестване.

В обобщение, приносът на монографията се състои в съчетаването на локални клинични данни с модерна молекулярна рамка, в демонстрацията на интегриран сравнителен модел на герминативни и соматични изменения и в превръщането на NGS резултатите в практични решения за диагностика, лечение и профилактика.

12.3. Насоки за бъдещи изследвания

Бъдещите направления следва да разширят доказателствената база, да подобрят предиктивната точност на молекулярните маркери и да ускорят внедряването на персонализирана онкогенетика в клиничната практика.

Разширяване на кохортата и популационна представителност.

Увеличаването на броя включени пациентки и включването на многоцентрови данни ще позволят по-стабилни изводи за честотата и спектъра на герминативните варианти в България, както и оценка на подтип-специфични модели. По-големи кохорти ще подпомогнат анализи на асоциации между генотип и клиничен фенотип, включително възраст на диагноза, терапевтичен отговор и преживяемост.

Интеграция на HRD скоринг и структурни геномни маркери.

Насочването към комбиниране на вариантно-ориентиран HRR анализ с HRD скоринг (геномни „scar“ показатели, LOH/TAI/LST) ще подобри стратификацията за PARP-инхибиторна терапия и ще позволи идентификация на HRD-позитивни случаи без очевидни патогенни варианти в HRR гени. Това направление е критично за максимално обхващане на пациентите, които могат да се възползват от таргетни терапии.

Епигенетични механизми като модификатори на туморната биология.

Епигенетичните промени (метиране на промотори, хистонова модификация, некодиращи РНК) вероятно допринасят за вариабилността на клиничното поведение, лекарствената резистентност и поддържането на туморни стволови популации. Интеграцията на епигенетични маркери може да разкрие допълнителни терапевтични възможности и да подобри прогнозната стратификация.

Transcriptomics и multi-omics подход.

РНК-секвенирането и multi-omics интеграцията (геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика) са обещаващи за разкриване на функционалните последици от установените генетични изменения и за идентификация на сигнатури, които предсказват отговор към терапия. Това е особено релевантно при варианти с неопределена клинична значимост и при сложни туморни профили, където едномерната ДНК информация е недостатъчна.

Функционални *in vitro* модели и валидиране на варианти.

Органоиди, клетъчни линии и CRISPR-базирани модели могат да бъдат използвани за функционално потвърждение на специфични варианти и за тестиране на лекарствена чувствителност. Този подход би подпомогнал превода на генетични находки към клинични решения, особено при умеренорискови гени и при нетипични комбинации от герминативни и соматични изменения.

Проспективни клинични проучвания и реална клинична ефективност.

Необходими са проспективни дизайни за оценка на клиничната полза от различни NGS стратегии (само герминативно, само туморно, паралелно), за измерване на времето до терапевтично решение и за анализ на разход-ефективност. Реалната клинична ефективност на PARP-инхибиторите, както и на потенциални таргетни стратегии при несерозни подтипове, следва да бъде оценявана в локален контекст.

AI-базирана молекулярна стратификация и интеграция на данни.

Изкуственият интелект може да подпомогне при интеграцията на комплексни данни (патология, образна диагностика, клиника, NGS, HRD, лечение) и да генерира предиктивни модели за рецидив, отговор към терапия и риск за семейни членове. Приоритетно направление е разработване на модели, които са прозрачни, валидирани и приложими в клинична среда, с ясно дефинирани входни параметри и стандарти за качество.

Разработване на национален регистър за наследствен овариален карцином.

Създаването на национален регистър би позволило проследяване на честотата на патогенните герминативни варианти, стандартизиране на консултативните практики, оптимизиране на каскадното тестване и оценка на профилактичните стратегии. Регистърът следва да обедини клинични, патологични и молекулярни данни, да поддържа механизми за дългосрочно проследяване и да подпомага научни проекти и здравна политика.

Визия за развитие на персонализираната онкогенетика.

Персонализираната онкогенетика в гинекологичната онкология се очертава като интегративна дисциплина, която трансформира диагностиката и лечението чрез молекулярна стратификация, таргетиране на ключови уязвимости и превенция на семейно ниво. Следващият етап на развитие изисква стандартизирани алгоритми за паралелно герминативно и туморно тестване, широк достъп до генетично консултиране, надеждна инфраструктура за NGS и биоинформатика, както и мултидисциплинарни онкологични комисии, които да превеждат геномните резултати в клинични решения.

Обобщение

Овариалният карцином се определя не само от морфологията, но и от геномната архитектура на заболяването. Интегрираната молекулярна онкология, базирана на NGS, превръща тумора от „единична диагноза“ в набор от биологично значими подтипове, всеки със специфични механизми на канцерогенеза, уязвимости и наследствено измерение. Съпоставянето на герминативните и соматичните генетични варианти разкрива пътя от предиспозиция към клонална еволюция и терапевтична чувствителност и очертава практическа рамка за персонализирана медицина. В тази перспектива бъдещето на гинекологичната онкология принадлежи на подход, който съчетава висококачествена патология, стандартизирана геномна диагностика и прецизно генетично консултиране, за да се постигне едновременно по-добро лечение на пациента и ефективна профилактика на заболяването в семейството и популацията.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ovarian cancer statistics, 2018 - Torre - 2018 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2026 Jan 29]. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21456>
2. Epithelial ovarian cancer - PubMed [Internet]. [cited 2026 Jan 29]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30910306/>
3. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Aug 25;2:16061.
4. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract | Springer Nature Link [Internet]. [cited 2026 Jan 29]. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4757-3889-6>
5. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? - PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4104488/>
6. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009 Apr;458(7239):719–24.
7. The American Journal of Surgical Pathology [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: https://journals.lww.com/ajsp/fulltext/2010/03000/the_origin_and_pathogenesis_of_epithelial_ovarian.18.aspx
8. Ms A, Pj Y. Endometriosis-associated Ovarian Cancers. PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 5]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28990985/>
9. Spatial and Temporal Heterogeneity in High-Grade Serous Ovarian Cancer: A Phylogenetic Analysis - PMC [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4339382/>
10. Five Facts of Ovarian Cancer – World Ovarian Cancer Coalition [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: https://worldovariancancercoalition.org/about-ovarian-cancer/five-facts/?gad_source=1&gad_campaignid=12878828812&gbraid=0AAAAACzgHJZDFKQHitRBep9FLVsFJxcze&gclid=Cj0KCQIAnJHMBhDAARIsABr7b86G1ayfmqQGpQ_PMDvIZWK6c87GChJb1DpQwxIsmdNdLW6x8jVp6qYaAkccEALw_wcB
11. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries - Bray - 2024 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21834>
12. НСИ - Национален статистически институт [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Смъртност по причини по пол, статистически райони и области. Available from: <https://www.nsi.bg/statistical-data/236/766>
13. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing | PNAS [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1115052108?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
14. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone - PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9839517/>
15. Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer | JNCI: Journal of the National Cancer Institute | Oxford Academic [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/91/17/1459/2543835?redirectedFrom=fulltext&login=false>
16. Clinical Obstetrics and Gynecology [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: https://journals.lww.com/clinicalobgyn/abstract/2017/12000/endometriosis_associated_ovarian_cancers.5.aspx
17. S L, C G, I V, Am O. Epithelial ovarian cancer. PubMed [Internet]. 2019 [cited 2026 Jan 29]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30910306/>
18. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*. 1971 Jul 17;2(7716):163.
19. Incessant ovulation and ovarian cancer – a hypothesis re-visited - PMC [Internet]. [cited 2023 Aug 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3987381/>
20. Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Mar 9;247(1–2):4–21.
21. Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer*. 1993 Jul;68(1):122–4.
22. Land JA. Ovulation, ovulation induction and ovarian carcinoma. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1993 Jun;7(2):455–72.
23. Lee JY, Song G. The Laying Hen: An Animal Model for Human Ovarian Cancer. *Reproductive and Developmental Biology*. 2013;37(1):41–9.

24. Godwin AK, Testa JR, Handel LM, Liu Z, Vanderveer LA, Tracey PA, et al. Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implications of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1992 Apr 15;84(8):592–601.
25. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol.* 2007 Jan;211(1):26–35.
26. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol.* 2007 Feb;31(2):161–9.
27. Ovarian Cancer Genetics: Subtypes and Risk Factors | IntechOpen [Internet]. [cited 2023 Nov 12]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/58601>
28. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med.* 2002 May 23;346(21):1616–22.
29. Olivier RI, van Beurden M, Lubsen MAC, Rookus MA, Mooij TM, van de Vijver MJ, et al. Clinical outcome of prophylactic oophorectomy in BRCA1/BRCA2 mutation carriers and events during follow-up. *Br J Cancer.* 2004 Apr 19;90(8):1492–7.
30. McDaniel AS, Stall JN, Hovelson DH, Cani AK, Liu CJ, Tomlins SA, et al. Next-Generation Sequencing of Tubal Intraepithelial Carcinomas. *JAMA Oncol.* 2015 Nov;1(8):1128–32.
31. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):1883–90; discussion 1895–1896.
32. Marsden CG, Wright MJ, Pochampally R, Rowan BG. Breast tumor-initiating cells isolated from patient core biopsies for study of hormone action. *Methods Mol Biol.* 2009;590:363–75.
33. Evolution of the cancer stem cell model - PubMed [Internet]. [cited 2023 Aug 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24607403/>
34. Capel B. Ovarian epithelium regeneration by Lgr5(+) cells. *Nat Cell Biol.* 2014 Aug;16(8):743–4.
35. Flesken-Nikitin A, Hwang CI, Cheng CY, Michurina TV, Enikolopov G, Nikitin AY. Ovarian surface epithelium at the junction area contains a cancer-prone stem cell niche. *Nature.* 2013 Mar 14;495(7440):241–5.
36. Board WC of TE. IARC Publications Website - Female Genital Tumours [Internet]. [cited 2026 Feb 6]. Available from: <https://publications.iarc.who.int/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Female-Genital-Tumours-2020>
37. Seidman JD, Soslow RA, Vang R, Berman JJ, Stoler MH, Sherman ME, et al. Borderline ovarian tumors: Diverse contemporary viewpoints on terminology and diagnostic criteria with illustrative images1. *Human Pathology.* 2004 Aug 1;35(8):918–33.
38. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory - PMC [Internet]. [cited 2026 Feb 6]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2841791/>
39. Gershenson DM. Low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. [cited 2026 Feb 6]; Available from: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)31614-X/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)31614-X/fulltext)
40. de Nonneville A, Kalbacher E, Cannone F, Guille A, Adelaïde J, Finetti P, et al. Endometrioid ovarian carcinoma landscape: pathological and molecular characterization. *Mol Oncol.* 2024 Jun 25;18(10):2586–600.
41. Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, et al. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer.* 2000;88(11):2584–9.
42. Yemelyanova AV, Vang R, Judson K, Wu LSF, Ronnett BM. Distinction of Primary and Metastatic Mucinous Tumors...: The American Journal of Surgical Pathology. [cited 2026 Feb 6]; Available from: https://journals.lww.com/ajsp/abstract/2008/01000/distinction_of_primary_and_metastatic_mucinous.18.aspx
43. Kurman RJ, Shih IM. Molecular Pathogenesis and Extraovarian Origin of Epithelial Ovarian Cancer. Shifting the Paradigm. *Hum Pathol.* 2011 Jul;42(7):918–31.
44. Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma. *Nature.* 2011 Jun 29;474(7353):609–15.
45. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, et al. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies. *PLoS Med.* 2008 Dec;5(12):e232.
46. Coburn SB, Bray F, Sherman ME, Trabert B. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype. *Int J Cancer.* 2017 Jun 1;140(11):2451–60.
47. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer.* 2011 Sep 23;11(10):719–25.
48. Cress RD, Chen YS, Morris CR, Petersen M, Leiserowitz GS. Characteristics of Long-Term Survivors of Epithelial Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol.* 2015 Sep;126(3):491–7.

49. Jung ES, Bae JH, Lee A, Choi YJ, Park JS, Lee KY. Mucinous adenocarcinoma involving the ovary: comparative evaluation of the classification algorithms using tumor size and laterality. *J Korean Med Sci.* 2010 Feb;25(2):220–5.
50. Bentink S, Haibe-Kains B, Risch T, Fan JB, Hirsch MS, Holton K, et al. Angiogenic mRNA and microRNA gene expression signature predicts a novel subtype of serous ovarian cancer. *PLoS One.* 2012;7(2):e30269.
51. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 15;14(16):5198–208.
52. Phelan CM, Kuchenbaecker KB, Tyrer JP, Kar SP, Lawrenson K, Winham SJ, et al. Identification of 12 new susceptibility loci for different histotypes of epithelial ovarian cancer. *Nat Genet.* 2017 May;49(5):680–91.
53. SEER [Internet]. [cited 2023 Aug 12]. Cancer Statistics Review, 1975-2015 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review. Available from: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2015/index.html
54. Barberis M, Colombo N, Cerana N. Precision medicine in ovarian cancer: disparities and inequities in access to predictive biomarkers. *Pathologica - Journal of the Italian Society of Anatomic Pathology and Diagnostic Cytopathology.* 2024 Jun 30;116:141–3.
55. Bowtell DD, Böhm S, Ahmed AA, Aspuria PJ, Bast RC, Beral V, et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015 Nov;15(11):668–79.
56. Mangogna A, Munari G, Pepe F, Maffii E, Giampaolino P, Ricci G, et al. Homologous Recombination Deficiency in Ovarian Cancer: from the Biological Rationale to Current Diagnostic Approaches. *Journal of Personalized Medicine.* 2023 Feb 2;13(2):284.
57. Am P, El C, D E, Dw G, J G, S F, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *PubMed [Internet].* 2015 [cited 2026 Feb 6]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26017449/>
58. Wessman S, Fuentes BB, Törngren T, Kvist A, Kokaraki G, Menkens H, et al. Precision Oncology of High-Grade Ovarian Cancer Defined through Targeted Sequencing. *Cancers.* 2021 Oct 19;13(20):5240.
59. Winterhoff B, Hamidi H, Wang C, Kalli KR, Fridley BL, Dering J, et al. Molecular Classification of High Grade Endometrioid and Clear Cell Ovarian Cancer using TCGA Gene Expression Signatures. *Gynecol Oncol.* 2016 Apr;141(1):95–100.
60. Jh H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *PubMed [Internet].* 2001 [cited 2026 Feb 7]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11357144/>
61. Pa J, Lh P, Am C. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *PubMed [Internet].* [cited 2026 Feb 7]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26667849/>
62. Beggs R, Yang ES. Chapter Five - Targeting DNA repair in precision medicine. In: Donev R, editor. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology [Internet].* Academic Press; 2019 [cited 2024 Mar 6]. p. 135–55. (DNA Repair; vol. 115). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876162318300671>
63. Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma - PMC [Internet]. [cited 2026 Feb 6]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3163504/>
64. Lord CJ, Ashworth A. PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy. *Science.* 2017 Mar 17;355(6330):1152–8.
65. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2073-2087.e3.
66. Ngoi NYL, Tan DSP. The role of homologous recombination deficiency testing in ovarian cancer and its clinical implications: do we need it? [cited 2026 Feb 7]; Available from: [https://www.esmoopen.com/article/S2059-7029\(21\)00103-4/fulltext](https://www.esmoopen.com/article/S2059-7029(21)00103-4/fulltext)
67. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2019 Dec 19;381(25):2416–28.
68. Devlin MJ, Miller R. Genomic testing in high-grade serous ovarian cancer: current options and future development. [cited 2026 Feb 7]; Available from: [https://www.international-journal-of-gynecological-cancer.com/article/S1048-891X\(24\)00940-X/fulltext](https://www.international-journal-of-gynecological-cancer.com/article/S1048-891X(24)00940-X/fulltext)
69. Tew WP, Lacchetti C, Ellis A, Maxian K, Banerjee S, Bookman M, et al. PARP Inhibitors in the Management of Ovarian Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2020 Oct 20;38(30):3468–93.
70. Richau CS, Scherer N de M, Matta BP, de Armas EM, de Barros Moreira FC, Bergmann A, et al. BRCA1, BRCA2, and TP53 germline and somatic variants and clinicopathological characteristics of Brazilian patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer Medicine.* 2024;13(3):e6729.
71. Wei B, Zheng J, Jiang C, Zhang H, Zhang M, Cheng T, et al. Improved detection of homologous recombination deficiency in Chinese patients with ovarian cancer: a novel non-exonic single-nucleotide polymorphism-based next-generation sequencing panel. *Mol Oncol.* 2023 Mar 16;17(8):1666–77.

72. Quesada S, Penault-Llorca F, Matias-Guiu X, Banerjee S, Barberis M, Coleman RL, et al. Homologous recombination deficiency in ovarian cancer: Global expert consensus on testing and a comparison of companion diagnostics. [cited 2026 Feb 7]; Available from: [https://www.ejcancer.com/article/S0959-8049\(24\)01776-3/fulltext](https://www.ejcancer.com/article/S0959-8049(24)01776-3/fulltext)
73. Witz A, Dardare J, Betz M, Michel C, Husson M, Gilson P, et al. Homologous recombination deficiency (HRD) testing landscape: clinical applications and technical validation for routine diagnostics. *Biomarker Research*. 2025 Feb 21;13(1):31.
74. Liu J, Berchuck A, Backes FJ, Cohen J, Grisham R, Leath CA, et al. NCCN Guidelines® Insights: Ovarian Cancer/Fallopian Tube Cancer/Primary Peritoneal Cancer, Version 3.2024. 2024 Oct 1 [cited 2026 Feb 7]; Available from: <https://jnccn.org/view/journals/jnccn/22/8/article-p512.xml>
75. Ray-Coquard I, Leary A, Pignata S, Cropet C, González-Martín A, Marth C, et al. Olaparib plus bevacizumab first-line maintenance in ovarian cancer: final overall survival results from the PAOLA-1/ENGOT-ov25 trial. [cited 2026 Feb 7]; Available from: [https://www.annalsofncology.org/article/S0923-7534\(23\)00686-5/fulltext](https://www.annalsofncology.org/article/S0923-7534(23)00686-5/fulltext)
76. PARP Inhibitors in the Management of Ovarian Cancer: ASCO Guideline - PMC [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8942301/>
77. Monk BJ, Barretina-Ginesta MP, Pothuri B, Vergote I, Graybill W, Mirza MR, et al. Niraparib first-line maintenance therapy in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer: final overall survival results from the PRIMA/ENGOT-OV26/GOG-3012 trial☆. [cited 2026 Feb 7]; Available from: [https://www.annalsofncology.org/article/S0923-7534\(24\)03762-1/fulltext](https://www.annalsofncology.org/article/S0923-7534(24)03762-1/fulltext)
78. DNA MISMATCH REPAIR* | Annual Reviews [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243>
79. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006 May;7(5):335–46.
80. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*. 2008 Jan;18(1):85–98.
81. Xiao X, Melton DW, Gourley C. Mismatch repair deficiency in ovarian cancer — Molecular characteristics and clinical implications. [cited 2026 Feb 7]; Available from: [https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258\(13\)01366-8/fulltext](https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258(13)01366-8/fulltext)
82. Hereditary Colorectal Cancer | New England Journal of Medicine [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra012242?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov
83. Lynch HT, Chapelle A de la. Hereditary Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003 Mar 6;348(10):919–32.
84. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017 Jul 28;357(6349):409–13.
85. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019 Jul 1;25(13):3753–8.
86. Shia J. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing For Screening Colorectal Cancer Patients at Risk For Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *J Mol Diagn*. 2008 Jul;10(4):293–300.
87. NCCN [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Guidelines Detail. Available from: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1453>
88. Canchi Sistla H, Talluri S, Rajagopal T, Venkatabalasubramanian S, Rao Dunna N. Genomic instability in ovarian cancer: Through the lens of single nucleotide polymorphisms. *Clinica Chimica Acta*. 2025 Jan 15;565:119992.
89. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 2009 Mar;9(3):153–66.
90. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*. 2012;226(2):352–64.
91. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Apr 1;8(4):275–83.
92. p53 mutations in cancer | Nature Cell Biology [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb2641>
93. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. [cited 2026 Feb 7]; Available from: [https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108\(02\)00102-2](https://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(02)00102-2)
94. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
95. S C, Jm A. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 7]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12209154/>
96. L G, L S, I V, J M, I M, O K, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. PubMed [Internet]. 2012 [cited 2026 Feb 7]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21892204/>
97. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. [cited 2026 Feb 7]; Available from: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(17\)30413-0](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(17)30413-0)

98. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:127–50.
99. Steinbuch SC, Lüß AM, Eltrop S, Götte M, Kiesel L. Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: From Molecular Pathologies to Clinical Relevance. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024 Apr 13;25(8):4306.
100. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? | *Nature Reviews Clinical Oncology* [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2018.28>
101. J D. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *PubMed* [Internet]. [cited 2026 Feb 7]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12509763/>
102. G S, R O, Y C, Bg W, D S, Rj K, et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *PubMed* [Internet]. 2003 [cited 2026 Feb 7]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12644542/>
103. Gershenson DM, Miller A, Brady WE, Paul J, Carty K, Rodgers W, et al. Trametinib versus standard of care in patients with recurrent low-grade serous ovarian cancer (GOG 281/LOGS): an international, randomised, open-label, multicentre, phase 2/3 trial. *Lancet.* 2022 Feb 5;399(10324):541–53.
104. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease: *Cell* [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(12\)00586-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867412005867%3Fshowall%3Dtrue#fig2](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(12)00586-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867412005867%3Fshowall%3Dtrue#fig2)
105. J P, C G. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *PubMed* [Internet]. 1998 [cited 2026 Feb 7]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9537226/>
106. Tai D, Wells K, Arcaroli J, Vanderbilt C, Aisner DL, Messersmith WA, et al. Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *Oncologist.* 2015 Oct;20(10):1189–98.
107. Park JT, Li M, Nakayama K, Mao TL, Davidson B, Zhang Z, et al. Notch3 Gene Amplification in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2006 Jun 15;66(12):6312–8.
108. Zhdanovskaya N, Firrincieli M, Lazzari S, Pace E, Scribani Rossi P, Felli MP, et al. Targeting Notch to Maximize Chemotherapeutic Benefits: Rationale, Advanced Strategies, and Future Perspectives. *Cancers.* 2021 Oct 12;13(20):5106.
109. TGF β in Cancer - *ScienceDirect* [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408008787>
110. TGF β Signaling in the Tumor Microenvironment | *Springer Nature Link* [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-47189-7_6
111. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Jan;31(1):27–36.
112. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Sep;8(9):a019505.
113. Epigenetics in Cancer | *New England Journal of Medicine* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra072067>
114. Catteau A, Morris JR. *BRCAl* methylation: a significant role in tumour development? *Seminars in Cancer Biology.* 2002 Oct 1;12(5):359–71.
115. Epigenetic Events in Ovarian Cancer | *IntechOpen* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/74697>
116. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. [cited 2026 Feb 8]; Available from: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(07\)00184-5](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(07)00184-5)
117. Weichert W, Denkert C, Noske A, Darb-Esfahani S, Dietel M, Kalloger SE, et al. Expression of Class I Histone Deacetylases Indicates Poor Prognosis in Endometrioid Subtypes of Ovarian and Endometrial Carcinomas. *Neoplasia.* 2008 Sep;10(9):1021–7.
118. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma - *PubMed* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17962618/>
119. MicroRNA signatures in human cancers - *PubMed* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17060945/>
120. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med.* 2012 Mar;4(3):143–59.
121. Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell.* 2016 Apr 11;29(4):452–63.
122. Guo M, Peng Y, Gao A, Du C, Herman JG. Epigenetic heterogeneity in cancer. *Biomark Res.* 2019 Oct 31;7:23.
123. Pa J, Jp I, S B. Targeting the cancer epigenome for therapy. *PubMed* [Internet]. 2016 [cited 2026 Feb 8]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27629931/>

124. A Z, M G, P C, D B, Th T, D S, et al. Cancer risk estimates for family members of a population-based family registry for breast and ovarian cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* [Internet]. 2000 Jan [cited 2023 Aug 11];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10667470/>
125. Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *Int J Gynecol Pathol*. 1992 Jul;11(3):180–7.
126. Ziogas A, Gildea M, Cohen P, Bringman D, Taylor TH, Seminara D, et al. Cancer risk estimates for family members of a population-based family registry for breast and ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Jan;9(1):103–11.
127. Lynch HT, Guirgis HA, Albert S, Brennan M, Lynch J, Kraft C, et al. Familial association of carcinoma of the breast and ovary. *Surg Gynecol Obstet*. 1974 May;138(5):717–24.
128. Lynch HT, Krush AJ. Carcinoma of the breast and ovary in three families. *Surg Gynecol Obstet*. 1971 Oct;133(4):644–8.
129. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 1;108(44):18032–7.
130. Ovarian cancer predisposition beyond BRCA1 and BRCA2 genes | *International Journal of Gynecologic Cancer* [Internet]. [cited 2023 Nov 26]. Available from: <https://ijgc.bmj.com/content/30/11/1803.long>
131. Y M, J S, D SE, Pa F, K H, S T, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (New York, NY)* [Internet]. 1994 Oct 7 [cited 2023 Aug 10];266(5182). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7545954/>
132. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec 21;378(6559):789–92.
133. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994 Sep 30;265(5181):2088–90.
134. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990 Dec 21;250(4988):1684–9.
135. Smith SA, Easton DF, Evans DG, Ponder BA. Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nat Genet*. 1992 Oct;2(2):128–31.
136. Prado A, Andrades P, Parada F. Recent developments in the ability to predict and modify breast cancer risk. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Oct;63(10):1581–7.
137. Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):14537–40.
138. Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):636–9.
139. Yu X, Chini CCS, He M, Mer G, Chen J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):639–42.
140. Chatterjee G, Jimenez-Sainz J, Presti T, Nguyen T, Jensen RB. Distinct binding of BRCA2 BRC repeats to RAD51 generates differential DNA damage sensitivity. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jun 20;44(11):5256–70.
141. Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, et al. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell*. 2001 Feb;7(2):273–82.
142. Zhang F, Ma J, Wu J, Ye L, Cai H, Xia B, et al. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol*. 2009 Mar 24;19(6):524–9.
143. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, et al. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res*. 1996 Nov;6(11):1029–49.
144. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2004 Nov;95(11):866–71.
145. O'Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*. 2010 Jun;31(6):961–7.
146. Karami F, Mehdipour P. A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer. *Biomed Res Int*. 2013;2013:928562.
147. Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 2;91(11):943–9.

148. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 1997 May 15;336(20):1401–8.
149. Whittemore AS, Gong G, John EM, McGuire V, Li FP, Ostrow KL, et al. Prevalence of BRCA1 mutation carriers among U.S. non-Hispanic Whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Dec;13(12):2078–83.
150. Thompson ER, Rowley SM, Li N, McInerney S, Devereux L, Wong-Brown MW, et al. Panel Testing for Familial Breast Cancer: Calibrating the Tension Between Research and Clinical Care. *J Clin Oncol.* 2016 May 1;34(13):1455–9.
151. Maxwell KN, Domchek SM, Nathanson KL, Robson ME. Population Frequency of Germline BRCA1/2 Mutations. *J Clin Oncol.* 2016 Dec;34(34):4183–5.
152. Judkins T, Rosenthal E, Arnell C, Burbidge LA, Geary W, Barrus T, et al. Clinical significance of large rearrangements in BRCA1 and BRCA2. *Cancer.* 2012 Nov 1;118(21):5210–6.
153. Rubin SC, Blackwood MA, Bandera C, Behbakht K, Benjamin I, Rebbeck TR, et al. BRCA1, BRCA2, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene mutations in an unselected ovarian cancer population: relationship to family history and implications for genetic testing. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Apr;178(4):670–7.
154. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet.* 1994 Mar 19;343(8899):692–5.
155. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. *Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet.* 1995 Jan;56(1):265–71.
156. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007 Apr 10;25(11):1329–33.
157. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA.* 2017 Jun 20;317(23):2402–16.
158. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, 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 May;72(5):1117–30.
159. King MC, Marks JH, Mandell JB, New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science.* 2003 Oct 24;302(5645):643–6.
160. Søgaard M, Kjaer SK, Gayther S. Ovarian cancer and genetic susceptibility in relation to the BRCA1 and BRCA2 genes. Occurrence, clinical importance and intervention. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2006;85(1):93–105.
161. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus SJ, Karlan BY, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA.* 2012 Jan 25;307(4):382–90.
162. Liu G, Yang D, Sun Y, Shmulevich I, Xue F, Sood AK, et al. Differing clinical impact of BRCA1 and BRCA2 mutations in serous ovarian cancer. *Pharmacogenomics.* 2012 Oct;13(13):1523–35.
163. Candido-dos-Reis FJ, Song H, Goode EL, Cunningham JM, Fridley BL, Larson MC, et al. Germline mutation in BRCA1 or BRCA2 and ten-year survival for women diagnosed with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 Feb 1;21(3):652–7.
164. Gorodnova TV, Sokolenko AP, Ivantsov AO, Iyevleva AG, Suspitsin EN, Aleksakhina SN, et al. High response rates to neoadjuvant platinum-based therapy in ovarian cancer patients carrying germ-line BRCA mutation. *Cancer Lett.* 2015 Dec 28;369(2):363–7.
165. Goode EL, Chenevix-Trench G, Song H, Ramus SJ, Notaridou M, Lawrenson K, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24. *Nat Genet.* 2010 Oct;42(10):874–9.
166. Ramus SJ, Antoniou AC, Kuchenbaecker KB, Soucy P, Beesley J, Chen X, et al. Ovarian Cancer Susceptibility Alleles and Risk of Ovarian Cancer in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Hum Mutat.* 2012 Apr;33(4):690–702.
167. Couch FJ, Wang X, McGuffog L, Lee A, Olsword C, Kuchenbaecker KB, et al. Genome-wide association study in BRCA1 mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk. *PLoS Genet.* 2013;9(3):e1003212.
168. Kuchenbaecker KB, Ramus SJ, Tyrer J, Lee A, Shen HC, Beesley J, et al. Identification of six new susceptibility loci for invasive epithelial ovarian cancer. *Nat Genet.* 2015 Feb;47(2):164–71.
169. Engel C, Versmold B, Wappenschmidt B, Simard J, Easton DF, Peock S, et al. Association of the Variants CASP8 D302H and CASP10 V410I with Breast and Ovarian Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Nov;19(11):2859–68.

170. Ratner E, Lu L, Boeke M, Barnett R, Nallur S, Chin LJ, et al. A KRAS-variant in Ovarian Cancer Acts as a Genetic Marker of Cancer Risk. *Cancer Res.* 2010 Aug 15;70(16):6509–15.
171. Potapova A, Hoffman AM, Godwin AK, Al-Saleem T, Cairns P. Promoter hypermethylation of the PALB2 susceptibility gene in inherited and sporadic breast and ovarian cancer. *Cancer Res.* 2008 Feb 15;68(4):998–1002.
172. Walker LC, Marquart L, Pearson JF, Wiggins GAR, O'Mara TA, Parsons MT, et al. Evaluation of copy-number variants as modifiers of breast and ovarian cancer risk for BRCA1 pathogenic variant carriers. *Eur J Hum Genet.* 2017 Apr;25(4):432–8.
173. Frankel W, Arends M, Frayling IM, Nagtegaal ID. Lynch Syndrome: Genetic Tumour Syndromes of the Digestive System. In: *World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System* [Internet]. IARC Press; 2019 [cited 2023 Nov 14]. Available from: <https://www.research.ed.ac.uk/en/publications/lynch-syndrome-genetic-tumour-syndromes-of-the-digestive-system>
174. Idos G, Valle L. Lynch Syndrome. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2023 Nov 14]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>
175. Liccardo R, De Rosa M, Izzo P, Duraturo F. Novel Implications in Molecular Diagnosis of Lynch Syndrome. *Gastroenterol Res Pract.* 2017;2017:2595098.
176. Payseur BA, Jing P, Haasl RJ. A genomic portrait of human microsatellite variation. *Mol Biol Evol.* 2011 Jan;28(1):303–12.
177. del Valle J, Rofes P, Moreno-Cabrera J, Lopez-Doriga A, Belhadj S, Vargas-Parra G, et al. Exploring the Role of Mutations in Fanconi Anemia Genes in Hereditary Cancer Patients. *Cancers.* 2020 Mar 30;12:829.
178. McVeigh DT. GeNotes. [cited 2026 Feb 8]. ATM-associated cancer risk — Knowledge Hub. Available from: <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/atm-associated-cancer-risk/>
179. *Frontiers | Familial Breast Cancer: Disease Related Gene Mutations and Screening Strategies for Chinese Population* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.740227/full>
180. Beyond the BRCA1/2 genes in ovarian cancer: the role of germline pathogenic variants in the ATM gene | *Molecular Biology Reports | Springer Nature Link* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-025-10357-x>
181. 394 Mutated NBN gene in patients within hereditary gynaecological cancer unit - *International Journal of Gynecological Cancer* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: [https://www.international-journal-of-gynecological-cancer.com/article/S1048-891X\(24\)07276-1/fulltext](https://www.international-journal-of-gynecological-cancer.com/article/S1048-891X(24)07276-1/fulltext)
182. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer.* 2009 Oct;9(10):701–13.
183. Cole AJ, Dwight T, Gill AJ, Dickson KA, Zhu Y, Clarkson A, et al. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Sci Rep.* 2016 May 18;6(1):26191.
184. Mutant p53 promotes ovarian cancer cell adhesion to mesothelial cells via integrin β 4 and Akt signals | *Scientific Reports* [Internet]. [cited 2024 Jul 24]. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep12642>
185. Wang Z, Sun Y. Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. *Transl Oncol.* 2010 Feb;3(1):1–12.
186. Pezzolesi MG, Zbuk KM, Waite KA, Eng C. Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome. *Hum Mol Genet.* 2007 May 1;16(9):1058–71.
187. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet.* 2012 Aug;82(2):105–14.
188. Malkin D. Germline p53 mutations and heritable cancer. *Annu Rev Genet.* 1994;28:443–65.
189. Liliac L, Amalinei C, Balan R, Grigoras A, Caruntu ID. Ovarian cancer: insights into genetics and pathogeny. *Histol Histopathol.* 2012 Jun;27(6):707–19.
190. The clonal evolution of tumor cell populations - PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 5]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/959840/>
191. Pc N. The clonal evolution of tumor cell populations. PubMed [Internet]. 1976 [cited 2026 Feb 8]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/959840/>
192. Cj, Lord, A A. BRCAness revisited. PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 8]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26775620/>
193. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer - PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26017449/>
194. Precision Oncology of High-Grade Ovarian Cancer Defined through Targeted Sequencing [Internet]. [cited 2026 Feb 6]. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/20/5240>

195. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*. 2010 Oct 14;363(16):1532–43.
196. Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA, Caramia F, Li J, Rowley SM, et al. Mutational landscape of mucinous ovarian carcinoma and its neoplastic precursors. *Genome Med*. 2015 Aug 7;7(1):87.
197. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. [cited 2026 Feb 8]; Available from: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(17\)30066-1](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(17)30066-1)
198. Schwarz RF, Ng CKY, Cooke SL, Newman S, Temple J, Piskorz AM, et al. Spatial and Temporal Heterogeneity in High-Grade Serous Ovarian Cancer: A Phylogenetic Analysis. *PLoS Med*. 2015 Feb 24;12(2):e1001789.
199. Gerstung M, Jolly C, Leshchiner I, Dentre SC, Gonzalez S, Rosebrock D, et al. The evolutionary history of 2,658 cancers. *Nature*. 2020 Feb;578(7793):122–8.
200. Liu MX, Chan DW, Ngan HY. Longdom Publishing SL | Open Access Journals. [cited 2026 Feb 8]; Available from: <https://www.longdom.org/>
201. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2 - PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18264088/>
202. Mweempwa A, Wilson MK. Mechanisms of resistance to PARP inhibitors - an evolving challenge in oncology. *Cancer Drug Resist*. 2019 Sep 19;2(3):608–17.
203. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 May 17;17(6):333–51.
204. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010 Jan;11(1):31–46.
205. Next Generation Sequencing (Illumina) - An Introduction - YouTube [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=CZeN-IgjYCo>
206. Harbin LM, Gallion HH, Allison DB, Kolesar JM. Next Generation Sequencing and Molecular Biomarkers in Ovarian Cancer—An Opportunity for Targeted Therapy. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Mar 29;12(4):842.
207. Next Generation Sequencing and Molecular Biomarkers in Ovarian Cancer—An Opportunity for Targeted Therapy - PMC [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9030726/>
208. BRCAness revisited | Nature Reviews Cancer [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc.2015.21>
209. Kummur S, Williams PM, Lih CJ, Polley EC, Chen AP, Rubinstein LV, et al. Application of Molecular Profiling in Clinical Trials for Advanced Metastatic Cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Feb 7;107(4):djv003.
210. Mandelker D, Donoghue M, Talukdar S, Bandlamudi C, Srinivasan P, Vivek M, et al. Germline-focussed analysis of tumour-only sequencing: recommendations from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2019 Aug;30(8):1221–31.
211. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405–24.
212. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat*. 2008 Nov;29(11):1282–91.
213. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists - PMC [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5707196/>
214. Colombo N, Sessa C, Bois A du, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, et al. ESMO–ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease†. [cited 2026 Feb 8]; Available from: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)31162-7/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)31162-7/fulltext)
215. NCCN Guidelines® Insights: Ovarian Cancer/Fallopian Tube Cancer/Primary Peritoneal Cancer, Version 3.2024 in: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network Volume 22 Issue 8 (2024)* [Internet]. [cited 2026 Feb 7]. Available from: <https://jnccn.org/view/journals/jnccn/22/8/article-p512.xml>
216. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. [cited 2026 Feb 8]; Available from: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)31561-3/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)31561-3/fulltext)
217. George A, Riddell D, Seal S, Talukdar S, Mahamdallie S, Ruark E, et al. Implementing rapid, robust, cost-effective, patient-centred, routine genetic testing in ovarian cancer patients. *Sci Rep*. 2016 Jul 13;6:29506.

218. Committee on the State of the Science in Ovarian Cancer Research, Board on Health Care Services, Institute of Medicine, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Ovarian Cancers: Evolving Paradigms in Research and Care [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 2016 [cited 2026 Feb 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK367618/>
219. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archiv*. 2012 Feb 10;460(3):237–49.
220. Molecular classification of high grade endometrioid and clear cell ovarian cancer using TCGA gene expression signatures - *Gynecologic Oncology* [Internet]. [cited 2026 Feb 6]. Available from: [https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258\(16\)30047-6/fulltext](https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258(16)30047-6/fulltext)
221. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 1;108(44):18032–7.
222. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair–Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol*. 2020 Jan 1;38(1):1–10.
223. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D’Andrea AD. Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discov*. 2015 Nov;5(11):1137–54.
224. Telli ML, Timms KM, Reid J, Hennessy B, Mills GB, Jensen KC, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancers. *Clin Cancer Res*. 2016 Aug 1;22(15):3764–73.
225. Epithelial ovarian cancer - *The Lancet* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(18\)32552-2/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(18)32552-2/abstract)
226. DI H, HI M. Use of pharmacogenetics for predicting cancer prognosis and treatment exposure, response and toxicity. *PubMed* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23677053/>
227. Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer | *New England Journal of Medicine* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1104390?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov
228. PI3K/AKT/mTOR Inhibitors In Ovarian Cancer | *Bentham Science* [Internet]. [cited 2026 Feb 8]. Available from: <https://www.eurekaselect.com/article/17882>
229. Berliner JL, Fay AM, Cummings SA, Burnett B, Tillmanns T. NSGC practice guideline: risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer. *J Genet Couns*. 2013 Apr;22(2):155–63.
230. Robson M, Offit K. Clinical practice. Management of an inherited predisposition to breast cancer. *N Engl J Med*. 2007 Jul 12;357(2):154–62.
231. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*. 1996 Jun 1;77(11):2318–24.
232. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med*. 2008 Nov 13;359(20):2143–53.
233. Beitsch PD, Whitworth PW, Hughes K, Patel R, Rosen B, Compagnoni G, et al. Underdiagnosis of Hereditary Breast Cancer: Are Genetic Testing Guidelines a Tool or an Obstacle? *J Clin Oncol*. 2019 Feb 20;37(6):453–60.
234. Abul-Husn NS, Soper ER, Odgis JA, Cullina S, Bobo D, Moscati A, et al. Exome sequencing reveals a high prevalence of BRCA1 and BRCA2 founder variants in a diverse population-based biobank. *Genome Med*. 2019 Dec 31;12(1):2.
235. Grzymalski JJ, Elhanan G, Morales Rosado JA, Smith E, Schlauch KA, Read R, et al. Population genetic screening efficiently identifies carriers of autosomal dominant diseases. *Nat Med*. 2020 Aug;26(8):1235–9.
236. Finch A, Shaw P, Rosen B, Murphy J, Narod SA, Colgan TJ. Clinical and pathologic findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol*. 2006 Jan;100(1):58–64.
237. Evans DGR, Susnerwala I, Dawson J, Woodward E, Maher ER, Laloo F. Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. *J Med Genet*. 2010 Oct;47(10):710–1.
238. Giri VN, Yurgelun MB, Robson ME. The Role of Genetic Counseling in Familial and Sporadic Cancer: Considerations, Challenges, and Collaboration. *Ann Intern Med*. 2017 Dec 19;167(12):884–5.
239. Goggins M, Overbeek KA, Brand R, Syngal S, Del Chiaro M, Bartsch DK, et al. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut*. 2020 Jan;69(1):7–17.
240. Hearle N, Damato BE, Humphreys J, Wixey J, Green H, Stone J, et al. Contribution of germline mutations in BRCA2, P16(INK4A), P14(ARF) and P15 to uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Feb;44(2):458–62.

241. Nelson HD, Pappas M, Zakher B, Mitchell JP, Okinaka-Hu L, Fu R. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: a systematic review to update the U.S. Preventive Services Task Force recommendation. *Ann Intern Med.* 2014 Feb 18;160(4):255–66.
242. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA.* 2017 Jun 20;317(23):2402–16.
243. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA.* 2017 Jun 20;317(23):2402–16.
244. Menes TS, Terry MB, Goldgar D, Andrulis IL, Knight JA, John EM, et al. Second primary breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: 10-year cumulative incidence in the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Jun;151(3):653–60.
245. Metcalfe K, Gershman S, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Kim-Sing C, et al. Predictors of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer.* 2011 Apr 26;104(9):1384–92.
246. Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, et al. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2016 May 1;34(13):1460–8.
247. Siraj AK, Masoodi T, Bu R, Parvathareddy SK, Al-Badawi IA, Al-Sanea N, et al. Expanding the spectrum of germline variants in cancer. *Hum Genet.* 2017 Nov;136(11–12):1431–44.
248. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, et al. Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *N Engl J Med.* 2015 Jun 4;372(23):2243–57.
249. Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, Walsh T, Lee MK, Gulsuner S, et al. Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2016 Apr;2(4):482–90.
250. Idos GE, Kurian AW, Ricker C, Sturgeon D, Culver JO, Kingham KE, et al. Multicenter Prospective Cohort Study of the Diagnostic Yield and Patient Experience of Multiplex Gene Panel Testing For Hereditary Cancer Risk. *JCO Precis Oncol.* 2019 Mar;3:PO.18.00217.
251. Yurgelun MB, Allen B, Kaldate RR, Bowles KR, Judkins T, Kaushik P, et al. Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. *Gastroenterology.* 2015 Sep;149(3):604-613.e20.
252. Marcus RK, Geurts JL, Grzybowski JA, Turaga KK, Clark Gamblin T, Strong KA, et al. Challenges to clinical utilization of hereditary cancer gene panel testing: perspectives from the front lines. *Fam Cancer.* 2015 Dec;14(4):641–9.
253. Slavin TP, Niell-Swiler M, Solomon I, Nehoray B, Rybak C, Blazer KR, et al. Clinical Application of Multigene Panels: Challenges of Next-Generation Counseling and Cancer Risk Management. *Front Oncol.* 2015;5:208.
254. Mavaddat N, Michailidou K, Dennis J, Lush M, Fachal L, Lee A, et al. Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes. *Am J Hum Genet.* 2019 Jan 3;104(1):21–34.
255. Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J, Milne RL, et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet.* 2013 Apr;45(4):353–61.
256. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PDP, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature.* 2007 Jun 28;447(7148):1087–93.
257. Dite GS, MacInnis RJ, Bickerstaffe A, Dowty JG, Allman R, Apicella C, et al. Breast Cancer Risk Prediction Using Clinical Models and 77 Independent Risk-Associated SNPs for Women Aged Under 50 Years: Australian Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016 Feb;25(2):359–65.
258. Mealiffe ME, Stokowski RP, Rhees BK, Prentice RL, Pettinger M, Hinds DA. Assessment of clinical validity of a breast cancer risk model combining genetic and clinical information. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Nov 3;102(21):1618–27.
259. Yang X, Leslie G, Gentry-Maharaj A, Ryan A, Intermaggio M, Lee A, et al. Evaluation of polygenic risk scores for ovarian cancer risk prediction in a prospective cohort study. *Journal of Medical Genetics.* 2018 Aug 1;55(8):546–54.
260. Banks KC, Moline JJ, Marvin ML, Newlin AC, Vogel KJ. 10 rare tumors that warrant a genetics referral. *Fam Cancer.* 2013 Mar;12(1):1–18.
261. Forman A, Schwartz S. Guidelines-Based Cancer Risk Assessment. *Semin Oncol Nurs.* 2019 Feb;35(1):34–46.
262. Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, Pearlman R, Wiesner GL, Guideline Development Group, American College of Medical Genetics and Genomics Professional Practice and Guidelines Committee and National Society of

Genetic Counselors Practice Guidelines Committee. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. *Genet Med*. 2015 Jan;17(1):70–87.

263. breast-screening.pdf [Internet]. [cited 2023 Jul 19]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast-screening.pdf

264. Cybulski C, Wokołarczyk D, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3747–52.

265. Adams-Campbell LL, Makambi KH, Palmer JR, Rosenberg L. Diagnostic accuracy of the Gail model in the Black Women’s Health Study. *Breast J*. 2007;13(4):332–6.

266. Gail MH, Costantino JP, Pee D, Bondy M, Newman L, Selvan M, et al. Projecting individualized absolute invasive breast cancer risk in African American women. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Dec 5;99(23):1782–92.

267. Matsuno RK, Costantino JP, Ziegler RG, Anderson GL, Li H, Pee D, et al. Projecting individualized absolute invasive breast cancer risk in Asian and Pacific Islander American women. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Jun 22;103(12):951–61.

268. Bevers TB, Anderson BO, Bonaccio E, Buys S, Daly MB, Dempsey PJ, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer screening and diagnosis. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009 Nov;7(10):1060–96.

269. breast_risk.pdf [Internet]. [cited 2023 Jul 24]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast_risk.pdf

270. Tung NM, Boughey JC, Pierce LJ, Robson ME, Bedrosian I, Dietz JR, et al. Management of Hereditary Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology, American Society for Radiation Oncology, and Society of Surgical Oncology Guideline. *J Clin Oncol*. 2020 Jun 20;38(18):2080–106.

271. Sessa C, Balmaña J, Bober SL, Cardoso MJ, Colombo N, Curigliano G, et al. Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline. *Annals of Oncology*. 2023 Jan;34(1):33–47.

272. Espenschied CR, LaDuca H, Li S, McFarland R, Gau CL, Hampel H. Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome. *J Clin Oncol*. 2017 Aug 1;35(22):2568–75.

273. Stoll J, Rosenthal E, Cummings S, Willmott J, Bernhisel R, Kupfer SS. No Evidence of Increased Risk of Breast Cancer in Women With Lynch Syndrome Identified by Multigene Panel Testing. *JCO Precis Oncol*. 2020 Nov;4:51–60.

274. Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR, Zeinomar N, Ma X, Marshall ML, et al. MSH6 and PMS2 germline pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med*. 2018 Oct;20(10):1167–74.

275. Lowery MA, Kelsen DP, Stadler ZK, Yu KH, Janjigian YY, Ludwig E, et al. An emerging entity: pancreatic adenocarcinoma associated with a known BRCA mutation: clinical descriptors, treatment implications, and future directions. *Oncologist*. 2011;16(10):1397–402.

276. Rainville I, Hatcher S, Rosenthal E, Larson K, Bernhisel R, Meek S, et al. High risk of breast cancer in women with biallelic pathogenic variants in CHEK2. *Breast Cancer Res Treat*. 2020 Apr;180(2):503–9.

277. Walsh MF, Chang VY, Kohlmann WK, Scott HS, Cunniff C, Bourdeaut F, et al. Recommendations for Childhood Cancer Screening and Surveillance in DNA Repair Disorders. *Clin Cancer Res*. 2017 Jun 1;23(11):e23–31.

278. Mets S, Tryon R, Veach PM, Zierhut HA. Genetic Counselors’ Experiences Regarding Communication of Reproductive Risks with Autosomal Recessive Conditions found on Cancer Panels. *J Genet Couns*. 2016 Apr;25(2):359–72.

279. Offit K, Levran O, Mullaney B, Mah K, Nafa K, Batish SD, et al. Shared genetic susceptibility to breast cancer, brain tumors, and Fanconi anemia. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Oct 15;95(20):1548–51.

280. Höhn AK, Brambs CE, Hiller GGR, May D, Schmoeckel E, Horn LC. 2020 WHO Classification of Female Genital Tumors. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2021 Oct;81(10):1145–53.

281. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. *J Mol Diagn*. 2017 Jan;19(1):4–23.

282. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013 Nov 27;310(20):2191–4.

283. TruSight Hereditary Cancer Panel | Target 113 cancer-associated genes [Internet]. [cited 2026 Feb 9]. Available from: <https://emea.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-cancer-hereditary.html>

284. TruSight Tumor 15 Reference Guide [Internet]. [cited 2026 Feb 9]. Available from: <https://emea.support.illumina.com/downloads/trusight-tumor-15-reference-guide-1000000001245.html>
285. Franklin [Internet]. [cited 2025 Jul 23]. Available from: <https://franklin.genoox.com/clinical-db/home?popup=registration>
286. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao Z hua, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 22;20(4):952.
287. Hatano Y, Hatano K, Tamada M, Morishige K ichirou, Tomita H, Yanai H, et al. A Comprehensive Review of Ovarian Serous Carcinoma. *Adv Anat Pathol*. 2019 Sep;26(5):329–39.
288. Cappuccio S, Marchetti C, Altıntaş DA, Oliva R, Russo SA, Costantini B, et al. Low-grade versus high-grade serous ovarian cancer: comparison of surgical outcomes after secondary cytoreductive surgery. [cited 2026 Feb 14]; Available from: [https://www.international-journal-of-gynecological-cancer.com/article/S1048-891X\(24\)22163-0/fulltext](https://www.international-journal-of-gynecological-cancer.com/article/S1048-891X(24)22163-0/fulltext)
289. Parra-Herran C, Bassiouny D, Vicus D, Olkhov-Mitsel E, Cesari M, Ismiil N, et al. FIGO Versus Silverberg Grading Systems in Ovarian... : The American Journal of Surgical Pathology. [cited 2026 Feb 14]; Available from: https://journals.lww.com/ajsp/abstract/2019/02000/figo_versus_silverberg_grading_systems_in_ovarian.2.aspx
290. Chen S, Lu H, Jiang S, Li M, Weng H, Zhu J, et al. An analysis of clinical characteristics and prognosis of endometrioid ovarian cancer based on the SEER database and two centers in China. *BMC Cancer*. 2023 Jul 1;23:608.
291. Negri S, De Ponti E, Sina FP, Sala E, Dell’Oro C, Roversi G, et al. Evaluation of family history in individuals with heterozygous BRCA pathogenic variants diagnosed with breast or ovarian cancer in a single center in Italy. *Mol Genet Genomic Med*. 2022 Oct 28;10(12):e2071.
292. Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, Frankum JR, et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet*. 2011 Aug 7;43(9):879–82.
293. An inherited NBN mutation is associated with poor prognosis prostate cancer | *British Journal of Cancer* [Internet]. [cited 2026 Feb 14]. Available from: <https://www.nature.com/articles/bjc2012486>
294. BRCAness revisited - PubMed [Internet]. [cited 2026 Feb 14]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26775620/>
295. Nepal M, Che R, Zhang J, Ma C, Fei P. Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends Cancer*. 2017 Dec;3(12):840–56.
296. Werner Syndrome - GeneReviews® - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2026 Feb 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1514/>
297. Malkin D. Li-Fraumeni Syndrome. *Genes Cancer*. 2011 Apr;2(4):475–84.
298. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jan;2(1):a001008.
299. H D, Gr B, C C, P S, S E, S C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *PubMed* [Internet]. 2002 [cited 2026 Feb 14]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12068308/>
300. Mayr D, Hirschmann A, Löhrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: A comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. [cited 2026 Feb 14]; Available from: [https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258\(06\)00425-2/abstract](https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258(06)00425-2/abstract)
301. Kurman RJ, Shih IM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2016 Apr;186(4):733–47.
302. Gasparri ML, Bardhi E, Ruscito I, Papadia A, Farooqi AA, Marchetti C, et al. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Ovarian Cancer Treatment: Are We on the Right Track? *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2017 Oct;77(10):1095–103.
303. (PDF) HER2 as a Therapeutic Target in Ovarian Cancer [Internet]. [cited 2026 Feb 14]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/221924822_HER2_as_a_Therapeutic_Target_in_Ovarian_Cancer
304. Kamburova ZB, Dimitrova PD, Dimitrova DS, Kovacheva KS, Popovska SL, Nikolova SE. Lynch-like syndrome with germline WRN mutation in Bulgarian patient with synchronous endometrial and ovarian cancer. *Hered Cancer Clin Pract*. 2023 Jul 14;21:13.
305. Genetic counseling and cascade genetic testing in Lynch syndrome | *Familial Cancer* | Springer Nature Link [Internet]. [cited 2026 Feb 15]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10689-016-9893-5>