



**ДО: ПРЕДСЕДАТЕЛЯ
НА НАУЧНОТО ЖУРИ**

РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. д-р Иванка Исталианова Димова, дм

Професор към Катедра по Медицинска генетика, МФ, МУ-София

Ръководител на Лаборатория по Геномна диагностика, ЦММ, МУ-София

на Дисертационния труд на д-р Зорница Богомилова Камбурова-Мартинова на тема „Проучване върху носителството на генетични дефекти за предразположение при жени с рак на гърда и рак на яйчник от Българската популация и значението на установените генетични варианти за изграждане на подход за генетично консултиране при тези заболявания“, представен за присъждане на Образователната и Научна степен „Доктор“

Докторска програма: Медицинска генетика

Професионално направление: 7.1. Медицина

Област на висшето образование: 7. Здравеопазване и спорт

Научен ръководител: проф. д-р Катя Ковачева, дм

Изборът за член на научното жури е съгласно Заповед № 3765/17.12.2024 г. на Медицински Университет - Плевен. Рецензията е съобразена с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото приложение, както и с Правилника за развитие на академичния състав на Медицински Университет - Плевен.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд озаглавен „Проучване върху носителството на генетични дефекти за предразположение при жени с рак на гърда и рак на яйчник от Българската популация и значението на установените генетични варианти за изграждане на подход за генетично консултиране при тези заболявания“ на д-р Зорница Камбурова-Мартинова, докторант към катедрата по Медицинска генетика, Факултет Фармация на Медицински

университет – Плевен, обхваща 172 стандартни машинописни страници и съдържа 20 фигури и 28 таблици. Цитирани са 465 литературни източници, от които 317 (68%) са на статии след 2010 г., а 127 (27%) - след 2020 г. Към дисертацията има и приложение, което представя клинични случаи със Синдром на наследствена мултилокусна неоплазия (Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS)).

Дисертационният труд е посветен на проучване чрез най-съвременната платформа за ново-генерационно секвениране на мутации в гени, свързани с предразположеност към развитие на рак на млечната жлеза и яйчниците в български пациентки, за изграждане на оптимален подход на генетично консултиране при тези заболявания. В последните десетилетия беше изяснена основата на генетичната предиспозиция при много ракови синдроми и в модерното здравеопазване на много страни са въведени генетични диагностични скринингови програми за изследване на високо-пенетрантни/високо-рискови гени, които са мутирали при фамилен случаи на рак. Мутационният анализ на тези гени има огромно значение за генетичното консултиране, помага да се повиши шанса за оцеляване, определя прогнозата на носителите и насочва към най-подходящите и персонализирани профилактични и терапевтични мерки.

Наследственият рак на млечната жлеза и яйчника е един от най-широко проучваните ракови синдроми. През 1994-1995 г. бяха идентифицирани високо-пенетрантните предразполагащи гени *BRCA1* и *BRCA2* за тези видове рак. Последващи генетични проучвания помогнаха за откриването на допълнителни гени с умерен риск, а цялостно-геномните асоциативни проучвания идентифицираха други ниско-пенетрантни алели, асоциирани с предразположеност към рака на гърдата. Стана ясно, че гени свързани с определени ракови синдроми носят висок риск за един определен туморен тип, но също имат ниска пенетрантност и носят нисък до умерен риск за развитието на други туморни типове. По тази причина, генетичният скрининг за наследствените ракови синдроми, базиран само на един или няколко гени, вече се счита за ограничен в търсенето на генетичната предиспозиция. Настоящата дисертация описва най-детайлно клиничните, патологични и генетични

характеристики на пациентки с рак на млечната жлеза и яйчника, подчертавайки ролята на ново-генерационното секвениране (NGS) за клиничното поведение. Ново-генерационното секвениране, основано на генни панели с фокус върху тумор-асоциирани гени, е най-често използваната платформа в момента поради по-ниската цена и значително по-пълната информация в сравнение с отделното директно секвениране на гените. Използването му в диагностичната практика изисква внимателно клинично и аналитично проучване, така както регулациите изискват за всеки един диагностичен тест.

В този смисъл, темата на дисертацията е особено актуална и с голямо значение за медико-генетичната диагностика, генетичната епидемиология, генетичното консултиране и клиничното поведение при пациентки с рак на млечната жлеза и яйчника, както и за натрупването на научни данни за генетиката на тези ракови заболявания с голямо здравно-социално значение. Докторантката Д-р Камбурова несъмнено постига приноси с научен, приложен и оригинален характер в тази посока.

Дисертационния труд е написан по общоприетия принцип и се състои от Литературен обзор (38 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и Методи (5 стр.), Резултати и Обсъждане (94 стр.), като накрая са изведени по-важните Изводи и Приноси.

Литературният обзор обхваща 38 страници и съдържа 6 фигури и 4 таблици, като първата му част е посветена на рака на гърдата, а втората – на рака на яйчника. Разглеждат се въпроси свързани с епидемиологията, етиологията и патогенезата на заболяванията, като основно са представени рисковите генетични фактори. Значително място е отделено на гените с висока и умерена пенетрантност, които повишават риска за развитие на заболяването и често се използват като прогностичен биомаркер. В последната част на литературния обзор подробно са дадени насоки за избор на подходящ генетичен тест според личната и фамилната анамнеза на пациентките. Сериозно внимание е обърнато на генетичното консултиране при наследствени форми на рак на гърдата и яйчника, като отделно са разгледани двата съществени етапа от консултирането – пред-тестовото консултиране с показанията за изследване и след-тестовото

консултиране с всички аспекти на каскадно тестване, допълнителни находки и обсъждане на репродуктивни рискове. Като цяло **обзорът е много добре написан, научно издържан и балансиран и показва отлична информираност на докторантката по темата на дисертацията.** От него логично е изведено заключението, че с навлизането на новите геномни технологии се откриват нови гени, предразполагащи за развитието на рак на гърда и яйчник, като наред с гените с висока пенетратност, все повече нараства делът и на открити гени с умерена пенетратност, както и на ниско-пенетратните генни локуси. Големият обем информация, получаван при изследването на предразположението с методите на NGS, от една страна, и от друга нуждата от интерпретирането ѝ в контекста на персоналната медицинска и фамилна история на конкретната жена, доведе до нарастване на необходимостта от генетично консултиране при пациентките, както и от изграждане на подход за генетично консултиране при тях.

Затова и **целта на дисертацията** е формулирана в посока „Проучване на честотата и профила на патогенни варианти в гените за предразположение при жени с рак на гърда или рак на яйчник, от Българската популация и изграждане на подход за генетично консултиране при тези заболявания“. В изпълнението на тези цели докторантката си поставя задачи: 1) Да се проучат при жени с рак на гърдата основните клинично-патологични характеристики; 2) Да се проучи честотата и профила (вид и молекулна характеристика) на патогенните варианти в гените за предразположение към рак при жени с рак на гърдата – в общата група, по възрастови групи, в групата с фамилен рак на гърдата и в групата с тройно-негативен рак на гърдата; 3) Да се проучат при жени с рак на яйчника основните клинично-патологични характеристики; 4) Да се проучи честотата и профила (вид и молекулна характеристика) на патогенните варианти в гените за предразположение към рак при жени с рак на яйчника; 5) Да се изгради подход за генетично консултиране при жени с рак на гърдата и яйчника в зависимост от носителския статус на патогенни варианти в гените за предразположение към рак.

В следващия раздел „Материали и методи“ са представени включените в проучването пациентки – 203 пациентки с рак на гърдата, разделени по възраст (5 групи), по критерии за фамилност (6 групи), според имунохистохимичния статус (4 групи); и 67 жени с рак на яйчника, набрани ретроспективно. В кратък вид са представени използваните методи, а именно – анкетен метод; генеалогичен метод ДНК анализ с изолиране на ДНК, масивно паралелно секвениране и анализ на данните от секвенирането; генетично консултиране; статистическа обработка на данните.

Разделът „Резултати и обсъждане“ започва с представяне на възрастови, репродуктивни, фамилни и клинични характеристики на проучваните жени с рак на гърдата и хистологични и молекулярни особености на туморите при тях. Най-голям дял имат жените, диагностицирани във възрастта между 40 и 49 години (42,9%). Докторантката дискутира необходимостта от преосмисляне на началната възраст за обхващане от скрининга за рак на гърдата в нашата популация и започването му от 40 годишна възраст, а не от 50 г., както е понастоящем. В проучването е установено, че 28,6% са с наднормено тегло ($25 \leq \text{BMI} < 30$), а 14,8% са със затлъстяване ($\text{BMI} \geq 30$), т.е. общо 43.4% от болните имат повишен индекс на телесна маса. Намерена е статистически значима връзка между повишения BMI и рака на гърдата след 50-годишна възраст. Освен това, дялът на постменопаузалните жени с хормон-позитивен рецепторен статус на туморните клетки и наднормено тегло е два пъти по-голям (64,7%) в сравнение с дялът (31,3%) на същия вид тумори при постменопаузални жени без наднормено тегло. Установената от докторантката фамилност (родственик от първа степен с рак на гърдата) е 15,8%, който се покачва на 21.2% при добавяне на асоциирани онкологични заболявания (панкреас и простата). Втората част от резултатите описва честотата на носителство и профил (вид и молекулярна характеристика) на патогенните/вероятно патогенни (П/ВП) варианти в гените за предразположение към рак сред изследваната група жени с рак на гърдата. Патогенни/вероятно патогенни варианти в предразполагащите гени за рак на гърдата са установени при 21.6% от всички изследвани пациентки – 10.8% във високопенетрантни гени

(6,4% от тях в *BRCA1*, 3,4% в *BRCA2* и 1% в гена *PALB2*). При други 10.8% са открити П/ВП варианти в 11 гени за предразположение с умерена пенетрантност (*ATM*, *BLM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *CDKN2A*, *ERCC5*, *RAD51C*, *FANCM*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL*). Установена е много силна корелация между хормоналния рецепторен статус на тумора и носителството на ПВ, като ER-позитивните тумори асоциират с ПВ в умерено пенетрантните гени, докато при жени с ER-негативните тумори, по-често се открива герминативна мутация във високопенетрантните гени. Обсъдено е, че при ER-позитивните тумори, по-ефективен е подхода за генетичен скрининг, използващ методите на NGS, поради по-често установяване на носителство на ПВ в умерено-пенетрантните гени. Всички намерени патогенни/вероятно патогенни варианти са подробно описани в дисертационния труд. Установена е статистически значимо по-висока честота на мутации при жени в млада възраст. От умерено-пенетрантните гени, най-висока е честотата на мутации в *CHEK2* гена (5,9% от всички изследвани). При жени с фамилен рак на гърдата, честота на носителство на ПВ в предразполагащите за РГ гени е 21,9% – 9,4% са носителки на мутация във високопенетрантните гени и 12,5% в умерено-пенетрантните гени. Има разлика в честотата на носителство при другите две фамилни групи: 25% в групата, която имат родственици от I степен с РГ и с РЯ; и 32.6% в групата, която имат родственици с РГ, с РЯ и др. асоциирани карциноми (РП, Рпан). По-висок дял на носителство на ПВ в *BRCA* гените е намерена, когато при анализа на фамилната анамнеза се взимат предвид и родствениците с рак на яйчника (44,4% от намерените дефекти), сравнено с дела на носителство сред жените с фамилност само за рак на гърда (28,6%). Установената обща честота на носителство на ПВ в гените за предразположение, сред жени с тройно-негативен рак на гърдата (ТНРГ) е 43,2% (32,4% в *BRCA1/2* гените и 10,8% в умерено-пенетрантните гени). Установеният дял на носителство на ПВ показва, че почти половината от случаите с ТНРГ са наследствени форми, като две трети от тези наследствени форми се дължат на носителство на ПВ в *BRCA1/2* гена.

Третата част от раздел „Резултати и обсъждане“ е посветена на възрастови, репродуктивни, фамилни, хистологични и клинични характеристики на

проучваните жени с РЯ. Установено е, че около две - трети (66,7%) от жените с РЯ са с $BMI \geq 25$, което подкрепя ролята на наднорменото тегло като рисков фактор за развитие на това заболяване. В 11,9% от случаите са намерени данни за фамилност за РГ/РЯ. Високостепенният серозен овариален карцином е най-често диагностицираният хистологичен тип РЯ, като се открива в 67,2% от изследваните жени. Следващата част от раздела коментира честотата на носителство и профил (вид и молекулна характеристика) на П/ВП варианти в гените за предразположение към рак сред изследваната група жени с РЯ. Носителство на герминативни ПВ в предразполагащите за РЯ гени е намерено при 26,9% от засегнатите жени – около половината от тях имат автозомно-доминантни наследствени ракови синдроми: 9% имат HBOC - носят мутации в *BRCA1* (не са намерени мутации в *BRCA2*); 3% са със Синдром на Линч LS (ПВ в *MSH2* и *PMS2* гените) и 3% с Lynch-like syndrome LLS (ПВ във *WRN* гена). Останалите позитивни случаи са резултат от ПВ в други предразполагащи за РЯ гени: високо-пенетрантни - *RAD51D*, и умерено-пенетрантни - *TP53*, *FANCF*, *FANCM*, *FANCL*, *FANCG*, *ERCC3*, *ATM*, *NBN*, *WRN*, *CHEK2*. Средната възраст на жените с носителство на ПВ в предразполагащите гени е 53,5г., което е с 6 години по-малко от средната възраст на диагностициране на жени без ПВ (59,5г.).

В общата група от 270 жени с РГ и РЯ е намерено носителство на ПВ в гените за предразположение в 23% от жените. Намерената честота на носителство на ПВ във *BRCA1* и *BRCA2* в общата група с РГ/РЯ е 9,6% (*BRCA1* в 7% от случаите, а *BRCA2* в 2,6%). Това е 38.8% от всички намерени генетични дефекти, които докторантката нарича наследствен рак на гърда и яйчник. Откритото носителство на ПВ в други FA гени (без *BRCA1/2*) в общата група жени с РГ/РЯ е 4,4%, което съставлява 17,9% от всички генетични дефекти. ПВ в *CHEK2* гена са втори по честота сред жените от общата група, с дял 21% от всички намерени генетични дефекти.

Открити са 6 варианта, недокладвани досега в световните геномни бази данни, в гените *FANCM*, *FANCG*, *BRIP1* (*FANCI*), *RAD51C*, *TP53* и *ERCC5*.

За първи път в дисертационен труд се коментират случаите на MINAS (Multi-locus Inherited Neoplasia Allele Syndrome) – намерен в 1.9% от всички изследвани жени с РГ и РЯ, като при 40% от тях има носителство на ПВ в *BRCA* гените, а в други 40% - в *CHEK2* гена. При рак на яйчника 16.7% от позитивните за мутации случаи спадат към тази група, а при рак на гърдата – 4.6%. Интересен е факта, че при всички случаи на смесен серозен и ендометриоиден тумор на яйчника е намерено комбинирано носителство на ПВ в повече от един предразполагащ за рак ген (MINAS), което най-вероятно се обяснява с наличието на повече от един патогенетичен път, довел до развитието на РЯ при тези пациенти.

Въз основа на получените резултати е разработен цялостен подход за генетично консултиране при наследствен рак на гърдата и рак на яйчниците. Генетичният консултант играе ключова роля, особено когато се идентифицират патогенни варианти в гени с умерена пенетрантност. Чрез анализиране на цялата налична информация – включително фамилна история, конкретния засегнат ген и идентифицирания вариант – консултантите могат да осигурят персонализирани оценки на риска и да препоръчат най-подходящите стратегии за лечение и превенция.

В резултат на дисертационния труд са изведени 9 важни извода: първите два касаят основните резултати при рак на гърдата; вторите два включват резултатите от проучването за рак на яйчника; следващите два представят обобщените резултати за двете групи; шестият извод е посветен на наследствената мутилокусна неоплазия (MINAS); последните три извода касаят генетичния скрининг и генетичното консултиране, тясно свързани с наследствените форми на рак на гърда и яйчник, при които превенцията и профилактиката играят есенциална роля за запазване живота на пациентките.

Дисертацията е с несъмнени приноси от методичен, фундаментален и приложен характер. Натрупани са данни за мутационния спектър, създаващ генетична предразположеност към рак на гърдата, в допълнение към най-честите *BRCA1* и *BRCA2* гени. Представлява интерес правени ли са анализи за големи геномни пренареждания в предразполагащите гени, които биха могли да

повишат честотата на намерените патогенни варианти? Предлага ли се сегрегационен анализ в семействата като част от предложения алгоритъм на генетичното консултиране, особено в случаите с намерени нови варианти и такива с неясно клинично значение?

Данните, включени в дисертационния труд, са представени в 4 научни статии - 2 от статиите са реферирани в Scopus. Изследванията са финансирани изцяло по проект BG05M2OP001-1.002-0010-C01 "Център за компетентност по персонализирана медицина, 3D и телемедицина, роботизирана и минимално инвазивна хирургия" от Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ и Европейския фонд за регионално развитие.

Запознах се с проекта за автореферат и считам, че той вярно отразява получените резултати и постижения на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Дисертационният труд на д-р Зорница Богомилова Камбурова-Мартинова е посветен на една много актуална тема, а именно - високотехнологичното изследване за генетични мутации, свързани с генетичната предразположеност като основен рисков фактор при рака на гърдата и яйчника и с изграждането на ефективен подход на генетично консултиране при пациентки с генетични дефекти. Получените резултати описват в най-големи детайли i) мутационният спектър при рак на гърдата и яйчника и ii) клинично-генетичните корелации, които са **безспорни приноси и имат голямо практическо значение**. Описват се също така нови патогенни мутации в тумор-асоциирани гени, което е **оригинален принос в световната наука**. Като имам пред вид всичко това, препоръчвам убедено на уважаемото жури да присъди на д-р **Зорница Богомилова Камбурова-Мартинова** научната и образователна степен **ДОКТОР**.

03.02.2025 г.

Рецензент: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Проф. д-р Иванка Димова

REVIEW

by Prof. Dr. Ivanka Istalianova Dimova, MD

Professor at the Department of Medical Genetics, Medical Faculty, Medical University of Sofia
Head of Laboratory of Genomic Diagnostics, Molecular Medicine Center, Medical University of
Sofia

of the Dissertation of Dr. Zornitsa Bogomilova Kamburova-Martinova on the topic "Study on the carriage of genetic defects for predisposition in women with breast cancer and ovarian cancer from the Bulgarian population and the importance of the identified genetic variants for building an approach for genetic counseling for these diseases", submitted for awarding the Educational and Scientific Degree "Doctor"

Doctoral Program: Medical Genetics

Professional Field: 7.1. Medicine

Field of Higher Education: 7. Healthcare and Sports

Scientific Supervisor: Prof. Dr. Katya Kovacheva, PhD, MD

The selection of a member of the scientific jury is in accordance with Order No. 3765/17.12.2024 of the Medical University - Pleven. The review complies with the requirements of the Act on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ADRB) and the Regulations for its implementation, as well as with the Regulations for the Development of the Academic Staff of the Medical University - Pleven.

The dissertation submitted for review entitled "Study on the genetic defects for predisposition in women with breast and ovarian cancer from the Bulgarian population and the importance of the identified genetic variants for creating an approach for genetic counseling for these diseases" by Dr. Zornitsa Kamburova-Martinova, doctoral student at the Department of Medical Genetics, Faculty of Pharmacy of the Medical University - Pleven, covers 172 standard typewritten pages and contains 20 figures and 28 tables. It cited 465 literary sources, of which 317 (68%) are articles after 2010, and 127 (27%) - after 2020. The dissertation also includes an appendix that presents clinical cases with Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS).

The dissertation is dedicated to a study of mutations in genes associated with predisposition to breast and ovarian cancer, using the most modern platform for next-generation sequencing in Bulgarian patients, and to develop an optimal approach to genetic counseling for these diseases.

In recent decades, the basis of genetic predisposition in many cancer syndromes has been clarified, and in modern healthcare in many countries, genetic diagnostic screening programs have been introduced to study highly penetrant/high-risk genes that are mutated in familial cases of cancer. Mutational analysis of these genes is of great importance for genetic counseling, helps to increase the chance of survival, determines the prognosis of carriers, and directs to the most appropriate and personalized preventive and therapeutic measures.

Hereditary breast and ovarian cancer is one of the most widely studied cancer syndromes. In 1994-1995, the highly penetrant predisposition genes BRCA1 and BRCA2 for these cancers were identified. Subsequent genetic studies have helped to discover additional genes with moderate risk, and genome-wide association studies have identified other low-penetrance alleles associated with breast cancer susceptibility. It has become clear that genes associated with certain cancer syndromes carry a high risk for one particular tumor type, but also have low penetrance and carry a low to moderate risk for the development of other tumor types. For this reason, genetic screening for hereditary cancer syndromes, based on only one or a few genes, is now considered limited in the search for genetic predisposition. This dissertation describes in the most detailed way the clinical, pathological and genetic characteristics of patients with breast and ovarian cancer, emphasizing the role of next-generation sequencing (NGS) for clinical management. Next-generation sequencing, based on gene panels with a focus on tumor-associated genes, is the most commonly used platform at the moment due to its lower cost and significantly more complete information compared to individual direct gene sequencing. Its use in diagnostic practice requires careful clinical and analytical study, as the regulations require for each diagnostic test. In this sense, the topic of the dissertation is particularly relevant and of great importance for medical-genetic diagnostics, genetic epidemiology, genetic counseling and clinical management of patients with breast and ovarian cancer, as well as for the accumulation of scientific data on the genetics of these cancers with great health and social importance. The doctoral student Dr. Kamburova undoubtedly achieves contributions of a scientific, applied and original nature in this direction.

The dissertation is written according to the generally accepted principle and consists of a Literature Review (38 pages), Aim and Objectives (1 page), Materials and Methods (5 pages), Results and Discussion (94 pages), and finally the most important Conclusions and Contributions are drawn.

The literature review covers 38 pages and contains 6 figures and 4 tables, with the first part dedicated to breast cancer and the second to ovarian cancer. Issues related to the epidemiology, etiology and pathogenesis of the diseases are examined, mainly presenting the genetic risk factors. A significant place is given to genes with high and moderate penetrance, which increase the risk of developing the disease and are often used as a prognostic biomarker. The last part of the literature review provides detailed guidelines for choosing an appropriate genetic test according to the personal and family history of the patients. Serious attention is paid to genetic counseling in hereditary forms of breast and ovarian cancer, and the two essential stages of counseling are separately considered - pre-test counseling with the indications for testing and post-test counseling with all aspects of cascade testing, additional findings and discussion of reproductive risks. Overall, the review is very well written, scientifically sound and balanced and shows excellent awareness of the doctoral student on the topic of the dissertation. It logically concludes that with the advent of new genomic technologies, new genes are being discovered that predispose to the development of breast and ovarian cancer, and along with genes with high penetrance, the proportion of discovered genes with moderate penetrance, as well as low-penetrance gene loci, is also increasing. The large amount of information obtained in the study of predisposition with NGS methods, on the one hand, and the need to interpret it in the context of the personal medical and family history of the particular woman, on the other, has led to an increase in the need for genetic counseling for patients, as well as the development of an algorithm for that.

Therefore, the aim of the dissertation is formulated in the direction of "Study of the frequency and profile of pathogenic variants in the genes for predisposition in women with breast and ovarian cancer, from the Bulgarian population and development of an approach for genetic counseling in these diseases". In the implementation of these goals, the doctoral student sets the following tasks: 1) To study the main clinicopathological characteristics in women with breast cancer; 2) To study the frequency and profile (type and molecular characteristics) of pathogenic variants in the genes for predisposition to cancer in women with breast cancer - in the general group, by age groups, in the group with familial breast cancer and in the group with triple-negative breast cancer; 3) To study the main clinicopathological characteristics in women with ovarian cancer; 4) To study the frequency and profile (type and molecular characteristics) of pathogenic variants in the genes for predisposition to cancer in women with ovarian cancer; 5) To

develop an approach for genetic counseling in women with breast and ovarian cancer depending on the carrier status of pathogenic variants in cancer predisposition genes.

The following section “Materials and Methods” presents the patients included in the study – 203 patients with breast cancer, divided by age (5 groups), by family criteria (6 groups), according to immunohistochemical status (4 groups); and 67 women with ovarian cancer, recruited retrospectively. The methods used are briefly presented, namely – questionnaire method; genealogical method, DNA analysis with DNA isolation, massively parallel sequencing and analysis of sequencing data; genetic counseling; statistical data processing.

The section “Results and Discussion” begins with a presentation of age, reproductive, family and clinical characteristics of the studied women with breast cancer and histological and molecular features of their tumors. The largest group includes women diagnosed between the ages of 40 and 49 years (42.9%). The doctoral student discusses the need to rethink the starting age for breast cancer screening in our population and start it at 40 years of age, rather than 50, as is currently the case. The study found that 28.6% were overweight ($25 \leq \text{BMI} < 30$), and 14.8% were obese ($\text{BMI} \geq 30$), i.e. a total of 43.4% of patients had an elevated body mass index. A statistically significant association was found between elevated BMI and breast cancer after the age of 50. In addition, the proportion of postmenopausal women with hormone-positive tumor cell receptor status and overweight was twice as high (64.7%) compared to the proportion (31.3%) of the same type of tumors in postmenopausal women without overweight. The familial incidence (first-degree relative with breast cancer) established by the doctoral student is 15.8%, which increases to 21.2% when associated oncological diseases (pancreas and prostate) are added. The second part of the results describes the carrier frequency and profile (type and molecular characteristics) of pathogenic/likely pathogenic (P/LP) variants in cancer predisposition genes among the studied group of women with breast cancer. Pathogenic/probably pathogenic variants in breast cancer predisposition genes were identified in 21.6% of all studied patients – 10.8% in highly penetrant genes (6.4% of them in BRCA1, 3.4% in BRCA2 and 1% in the PALB2 gene). In another 10.8%, P/LP variants were found in 11 genes for predisposition with moderate penetrance (ATM, BLM, CHEK2, BRIP1, CDKN2A, ERCC5, RAD51C, FANCM, FANCG, FANCI, FANCL). A very strong correlation was found between the hormone receptor status of the tumor and the carriage of PV, with ER-positive tumors associating with PV in moderately penetrant genes, while in women with ER-negative tumors, a germline mutation in highly penetrant genes was more often

found. It was discussed that in ER-positive tumors, the approach for genetic screening using NGS methods is more effective, due to the more frequent detection of PV carriage in moderately penetrant genes. All pathogenic/probably pathogenic variants found are described in detail in the dissertation. A statistically significantly higher frequency of mutations was found in young women. Of the moderately penetrant genes, the highest frequency of mutations is in the CHEK2 gene (5.9% of all studied). In women with familial breast cancer, the frequency of carriage of PV in the genes predisposing to BC is 21.9% - 9.4% are carriers of mutations in highly penetrant genes and 12.5% in moderately penetrant genes. There is a difference in the frequency of carriage in the other two family groups: 25% in the group that has first-degree relatives with BC and with OC; and 32.6% in the group that has relatives with BC, OC and other associated carcinomas (prostate, pancreas). A higher proportion of BRCA gene mutations was found when the family history included relatives with ovarian cancer (44.4% of the defects found) compared with the proportion of mutations among women with a family history of breast cancer only (28.6%). The overall prevalence of BRCA mutations in the susceptibility genes among women with triple-negative breast cancer (TNBC) was 43.2% (32.4% in BRCA1/2 genes and 10.8% in moderately penetrant genes). The prevalence of BRCA mutations indicates that almost half of the cases of TNBC are hereditary, with two-thirds of these hereditary forms due to mutations in the BRCA1/2 gene.

The third part of the section “Results and Discussion” is devoted to age, reproductive, family, histological and clinical characteristics of the studied women with OC. It was found that about two-thirds (66.7%) of women with OC had a BMI ≥ 25 , which supports the role of overweight as a risk factor for the development of this disease. In 11.9% of cases, data on familial OC were found. High-grade serous ovarian carcinoma is the most frequently diagnosed histological type of OC, being found in 67.2% of the studied women. The next part of the section comments on the carrier frequency and profile (type and molecular characteristics) of P/LP variants in cancer predisposition genes among the studied group of women with OC. Germline mutations in the genes predisposing to OC were found in 26.9% of affected women – about half of them had autosomal dominant hereditary cancer syndromes: 9% had HBOC – carrying mutations in BRCA1 (no mutations were found in BRCA2); 3% had Lynch syndrome LS (mutations in MSH2 and PMS2 genes) and 3% had Lynch-like syndrome LLS (mutations in the WRN gene). The remaining positive cases were the result of mutations in other genes predisposing to OC: highly penetrant - RAD51D, and moderately penetrant - TP53, FANCF, FANCM, FANCL, FANCG,

ERCC3, ATM, NBN, WRN, CHEK2. The average age of women with mutations in the genes predisposing to OC was 53.5 years, which was 6 years younger than the average age of diagnosis of women without mutations (59.5 years).

In the total group of 270 women with BC and OC, carriership of PV in the predisposition genes was found in 23% of women. The found frequency of carriership of PV in BRCA1 and BRCA2 in the total group with BC/OC was 9.6% (BRCA1 in 7% of cases, and BRCA2 in 2.6%). This is 38.8% of all found genetic defects, which the doctoral student calls hereditary breast and ovarian cancer. The detected carriership of PV in other FA genes (excluding BRCA1/2) in the total group of women with BC/OC was 4.4%, which constitutes 17.9% of all genetic defects. PV in the CHEK2 gene is the second most frequent among women in the total group, with a share of 21% of all found genetic defects.

6 variants, previously unreported in the world's genomic databases, were discovered in the genes FANCM, FANCG, BRIP1 (FANCF), RAD51C, TP53 and ERCC5.

For the first time, a dissertation discusses the cases of MINAS (Multi-locus Inherited Neoplasia Allele Syndrome) - found in 1.9% of all women with BC and OC, with 40% of them carrying the PV in the BRCA genes, and another 40% - in the CHEK2 gene. In ovarian cancer, 16.7% of mutation-positive cases fall into this group, and in breast cancer - 4.6%. It is interesting that in all cases of mixed serous and endometrioid ovarian tumors, combined carriage of PV in more than one cancer-predisposing gene (MINAS) was found, which is most likely explained by the presence of more than one pathogenetic pathway leading to the development of OC in these patients.

Based on the results obtained, a comprehensive approach to genetic counseling in hereditary breast and ovarian cancer has been developed. The genetic counselor plays a key role, especially when pathogenic variants in genes with moderate penetrance are identified. By analyzing all available information – including family history, the specific affected gene and the identified variant – counselors can provide personalized risk assessments and recommend the most appropriate treatment and prevention strategies.

As a result of the dissertation work, 9 important conclusions have been drawn: the first two concern the main results in breast cancer; the second two include the results of the ovarian cancer study; the next two present the summarized results for both groups; the sixth conclusion is

dedicated to hereditary multilocus neoplasia (MINAS); the last three conclusions concern genetic screening and genetic counseling, closely related to hereditary forms of breast and ovarian cancer, in which prevention and prophylaxis play an essential role in preserving the lives of patients.

The dissertation has undoubted contributions of a methodological, fundamental and applied nature. Data have been accumulated on the mutation spectrum creating a genetic predisposition to breast cancer, in addition to the most common BRCA1 and BRCA2 genes. It is of interest whether analyses have been performed for large genomic rearrangements in the predisposing genes, which could increase the frequency of the pathogenic variants found? Is segregation analysis in families offered as part of the proposed genetic counseling algorithm, especially in cases with new variants found and those with unclear clinical significance?

The data included in the dissertation work are presented in 4 scientific articles - 2 of the articles are referenced in Scopus. The research was fully funded under project BG05M2OP001-1.002-0010-C01 "Center of Competence in Personalized Medicine, 3D and Telemedicine, Robotic and Minimally Invasive Surgery" by the Operational Program "Science and Education for Smart Growth" and the European Regional Development Fund.

I have read the abstract project and believe that it faithfully reflects the results and achievements of the dissertation work.

CONCLUSION: The dissertation work of Dr. Zornitsa Bogomilova Kamburova-Martinova is dedicated to a very important topic, namely - high-tech research on genetic mutations related to genetic predisposition as a major risk factor in breast and ovarian cancer and the development of an effective approach to genetic counseling for patients with genetic defects. The results obtained describe in the greatest detail i) the mutation spectrum in breast and ovarian cancer and ii) the clinical-genetic correlations, which are indisputable contributions and have great practical significance. New pathogenic mutations in tumor-associated genes are also described, which is an original contribution to world science. Having all this in mind, I strongly recommend that the esteemed jury award Dr. Zornitsa Bogomilova Kamburova-Martinova the scientific and educational degree of DOCTOR (PhD).

03.02.2025

Reviewer: **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

Prof. Dr. Ivanka Dimova, MD, PhD