



РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Радослава Василева Въжарова, дм

Доцент към Катедра по биология, медицинска генетика и микробиология, Медицински факултет, СУ Св. Климент Охридски

Относно: Дисертационен 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

Избрана съм за член на научното жури е съгласно Заповед № 3765/17.12.2024 г. на ректора 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.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

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 182 стандартни машинописни страници и съдържа 20 фигури и 28 таблици. Цитирани са 479 литературни източници, от които са приблизително една четвърт са от последните 5 години. Дисертационния труд е написан според изискванията и включва следните основни раздели: литературен обзор (38 стр.), цел и задачи (1 стр.), материали и методи (5 стр.), резултати и дискусия (93 стр.), като в заключение са изведени по-важните изводи и приноси. Към дисертацията има и 6 приложения, които

предоставят допълнителна информация относно методиката на проучването и клиничните случаи със Синдром на наследствена мултилокусна неоплазия (Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS)).

Дисертационният труд е фокусиран върху проучване на мутации в тумор-асоциирани гени, при български пациентки с рак на гърдата и яйчниците, чрез прилагане на модерни методи за масивно паралелно секвениране (NGS). Целта е да се изгради оптимален модел за генетично консултиране на засегнатите пациенти и семействата им. През последните десетилетия познанията ни за етиологията и патогенезата на злокачествените туморни заболявания се разшириха значително, включително по отношение ролята на генетичната предиспозиция, което доведе до въвеждането на генетични скринингови програми в здравните системи на много държави. Анализът на мутациите във високо-пенетрантни / високорискови гени, свързани с фамилни форми на рак, е ключов елемент от генетичното консултиране. Фамилният рак на гърдата и яйчниците (НВОС) е един от най-задълбочено изследваните ракови синдроми. В средата на 90-те години на миналия век бяха идентифицирани гените *BRCA1* и *BRCA2*, мутации в които носят висок риск за НВОС. По-късни изследвания откриха и гени с умерен риск, а широкомащабни геномни асоциативни проучвания идентифицираха и ниско-пенетрантни алели, предразполагащи към рак. Същевременно се установи, че тумори с различна органна локализация, споделят обща генетична предиспозиция, като пенетрантността на патологичните алели може да не е еднаква по отношение на засегнатите органи / тъкани. Всичко това мотивира все по-широкото прилагане в клиничната практика на едновременното изследване на мултигенни панели чрез масивно паралелно секвениране вместо традиционните методи за търсене на мутации в единични гени. Подобен подход не само снижава цената на изследването, но също скъсява пътя за поставяне на диагнозата и предоставя по-адекватна информация за нуждите на генетичното консултиране. Настоящата работа изследва в дълбочина клиничните и генетични особености на пациентки с рак на гърдата и яйчниците, като използва мултигенен панел, насочен към идентифициране на мутации в тумор-асоциирани гени. В своя труд д-р Камбурова подробно разглежда комплексната етиология и патогенеза на РГ/РЯ, хистологичните, имунохистохимични и молекулни характеристики на туморите и тяхната класификация, изследва спектъра на герминативните П/ВП варианти в тумор-асоциирани гени при пациентките и очертава специфичната роля на генетичното консултиране в процеса на клинично обследване на пациентите и семействата им. Актуалността на темата се подсилва и от факта, че генетичните изследвания позволяват прецизиране на подходите за управление на риска, подобрявайки здравните резултати и качеството на живот на засегнатите лица.

Литературният обзор обхваща 38 страници и включва 5 фигури и 4 таблици. В обзора докторантката представя подробна и структурирана информация за етиологията, патогенезата

и епидемиологията на раковите заболявания. Текстът дава изчерпателен преглед на генетичните механизми, водещи до ракова трансформация, както и важноста на ДНК репарацията за предотвратяване на натрупването на мутации, което го прави ценна част от дисертационния труд. Първата част на обзора е посветена на рака на гърдата, а втората на рак на яйчниците. Подробно е разгледана епидемиологията, етиологията, патоанатомичната класификация и връзката на туморния фенотип с подлежащите генетични промени, както за РГ така и за РЯ. Особено внимание е отделено на предразполагашите генетични фактори – разгледани са в детайли основните гени с висока и умерена пенетрантност, които често се ползват като прогностични биомаркери. Последният раздел от обзора е посветен на генетичното консултиране при тези заболявания, като е подчертана важната роля на генетичния консултант през различните етапи в хода на обследване на пациентите: претестова консултация с оценка на показанията и избор на генетичен тест и след-тестовото консултиране във всички аспекти – интерпретация на резултати, каскаден скрининг при други членове на семейството, обсъждане на допълнителни находки и репродуктивни рискове. Като цяло обзорът е много добре написан и показва задълбочения подход на д-р Камбурова към обекта на нейната дисертация, като демонстрира нейната способност с лекота да обобщава големи масиви от информация и да ги представя в структуриран и разбираем вид. Въз основа на обзора логично е изведено заключението, че с навлизането на новите технологии в медицинската практика наред със шанса да разполагаме с нова и повече информация се изправяме и пред повече предизвикателства. Големият обем информация, получаван при изследването на предразположението към РГ/РЯ с методи като NGS, от една страна, и от друга нуждата от интерпретирането на тази информация в контекста на личната медицинска и фамилна история на конкретната жена, води до нарастваща необходимост от изграждане на персонализиран подход за генетично консултиране при пациентите с РГ/РЯ.

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана: 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. За постигане на целта са формулирани следните 5 основни задачи: 1) Да се проучат при жени с рак на гърдата основните демографски и 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 демографски и 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 раздел „Материал и методи“ са описани изследваните кохорти пациентки с рак на гърдата и с рак на яйчника. В групата с РГ са включени общо 203 пациентки, набрани про- и ретроспективно, разделени по възраст (6 групи), по критерии за фамилност (6 групи) и според имунохистохимичния статус на туморите (4 групи). В групата с РЯ са включени общо 67 пациентки също набрани про- и ретроспективно. Накратко са описани използваните методи: анкетен метод, генеалогичен метод, ДНК анализ с масивно паралелно секвениране на мултигенен панел включващ 94 тумор-асоциирани гени, анализ на данните от секвенирането, генетично консултиране и статистическа обработка на данните. Методите са подбрани адекватно на поставените цели и задачи. Ограничение на използваната методика за ДНК анализ е, че не е оптимална за детекция на структурни пренареждания и копийни варианти в изследваните гени. Това не намалява достойнствата на дисертационния труд и би могло да е обект на бъдещи изследвания при тази кохорта пациенти.

Разделът „Резултати и дискусия“ последователно представя получените резултати в изследваните групи пациентки с РГ и РЯ по отношение на демографски и клинично-патологични характеристики и установените патологични/вероятно патологични варианти в тумор-асоциирани гени с висока и умерена пенетрантност, както и спецификите на генетичното консултиране при тези пациенти. Разделът започва с представяне на възрастовите, репродуктивни, фамилни и клинични характеристики на жените с рак на гърдата, както и с хистологични и молекулярни особености на туморите. Най-голямата част от пациентките са диагностицирани на възраст между 40 и 49 години (42,9%). Докторантката разглежда нуждата от преоценка на възрастта, на която започва скринингът за рак на гърдата в България, като предлага той да започва от 40 години, вместо от 50, както е по настоящем. В проучването е установено, че 28,6% от пациентките имат наднормено тегло ($BMI\ 25 \leq 30$), а 14,8% са със затлъстяване ($BMI \geq 30$), което означава, че общо 43,4% от жените имат повишен индекс на телесна маса (BMI). Открита е статистически значима връзка между повишения BMI и рака на гърдата диагностициран след 50-годишна възраст. Освен това, делът на постменопаузалните жени с хормон-позитивен рецепторен статус на туморите и наднормено тегло е два пъти по-голям (64,7%) в сравнение с този на постменопаузални жени с нормално тегло (31,3%). Проучването установява фамилна предразположеност към РГ при 15,8% от жените, която нараства до 21,2%, ако се вземат предвид и други асоциирани онкологични заболявания като рак на панкреаса и простатата при родствениците. Втората част от резултатите разглежда честотата на носителство и профила на патогенните/вероятно патогенни (П/ВП) варианти в гените, свързани с предразположеност към рак на гърдата. П/ВП варианти са установени при 21,6% от изследваните пациентки. От тях 10,8% са в гени с висока пенетрантност (6,4% в

BRCA1, 3,4% в *BRCA2* и 1% в *PALB2*). Други 10,8% са в гени с умерена пенетрантност (*ATM*, *BLM*, *CHEK2*). Намерена е значима корелация между хормоналния рецепторен статус на туморите и наличието на герминативни П/ВП варианти – ER-позитивните тумори са асоциирани с носителство на П/ВП варианти в гени с умерена пенетрантност, докато при жените с ER-негативни тумори по-често се откриват мутации в гени с висока пенетрантност. Докторантката обсъжда, че при ER-позитивни тумори генетичният скрининг с методи като NGS би бил по-ефективен, тъй като по-често се откриват герминативни П/ВП варианти в гени с умерена пенетрантност. Всички идентифицирани П/ВП варианти са подробно описани в дисертационния труд. Установено е, че честотата на герминативни мутации е значително по-висока при жени диагностицирани в по-млада възраст. От умерено-пенетрантните гени, най-висока честотата на мутации е установена в *CHEK2* гена (5,9% от изследваните). Сред жените с фамилна история за рак на гърдата честотата на носителство на П/ВП варианти е 21,9%, от които 9,4% са в гени с висока пенетрантност, а 12,5% – в умерено пенетрантни гени. Сред жените с родственици от първа степен, диагностицирани с рак на гърдата и/или яйчниците, честотата на П/ВП носителство достига 25%, а при добавяне на асоциирани ракови заболявания, като рак на простатата и панкреаса, тя се увеличава до 32,6%. Носителството на П/ВП в *BRCA1/2* гените е значително по-често при жените с фамилност, чиито родственици имат и рак на яйчниците (44,4%), в сравнение с тези, които имат само рак на гърдата (28,6%). Честотата на носителство на П/ВП варианти сред жените с тройно-негативен рак на гърдата (ТНРГ) е 43,2%, като 32,4% са в *BRCA1/2* гените, а 10,8% – в гени с умерена пенетрантност. Резултатите показват, че почти половината от случаите на ТНРГ са фамилни, като две трети от тях се дължат на носителство на П/ВП в *BRCA1/2* гените. Третата част на раздела е посветена на демографските, клинични и хисто-патологични характеристиките на жените с рак на яйчниците. Установено е, че около 66,7% от жените с рак на яйчниците имат $BMI \geq 25$, което подчертава ролята на наднорменото тегло като рисков фактор за заболяването. Фамилност за рак на гърдата или яйчниците е намерена в 11,9% от случаите. Най-често диагностицираният хистологичен тип е високостепенен серозен овариален карцином (67,2%). Проучването открива носителство на П/ВП варианти в гени, свързани с рак на яйчниците, при 26,9% от жените. Около половината от тях имат автозомно-доминантни наследствени ракови синдроми: 9% имат НВОС - носят мутации в *BRCA1* (не са открити мутации в *BRCA2*); 3% са със Синдром на Линч LS (ПВ в *MSH2* и *PMS2*) и 3% с Lynch-like syndrome (ПВ във *WRN*). Други П/ВП варианти, установени при единични пациенти от тази група, са в гени с висока (*RAD51D*) и умерена (*TP53*, *FANCE*, *FANCM*, *FANCL*, *FANCG*, *ERCC3*, *ATM*, *NBN*, *WRN*, *CHEK2*) пенетрантност. Средната възраст на диагностициране при жените с герминативни П/ВП варианти е 53,5 години, като е с 6 години по-ниска от тази при жени без П/ВП. В общата кохорта от 270 пациентки с РГ и РЯ, носителство на герминативни П/ВП варианти е установено при 23% от жените. Честотата на носителство на П/ВП варианти в *BRCA1/2* гени е 9,6%, а в други гени

участващи в механизма за хомоложна рекомбинация (FA-асоциирани без BRCA1/2) – 4,4%. Най-често наблюдаваните мутации след тези в BRCA1/2 са тези в *CHEK2*, с дял от 21% от всички генетични дефекти. Открити са шест нови варианта в гените *FANCM*, *FANCG*, *BRIP1*, *RAD51C*, *TP53* и *ERCC5*, които досега не са докладвани в световните геномни бази данни. В дисертацията си докторантката отделя специално внимание на генетичното консултиране при пациенти със Синдром на наследствена мултилокусна неоплазия (Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS)). Такива са били 1,9% от изследваните жени с РГ/РЯ. Интересен е фактът, че носителство на повече от един герминативен П/ВП вариант е установено при всички случаи на РЯ със смесен серозен и ендометриоиден хистологичен тип, което най-вероятно се обяснява с наличието на повече от един патогенетичен път довел до развитието на РЯ при тези пациенти. Независимо, че MINAS е с относително малка честота, представлява предизвикателство не само от диагностична гледна точка, но и като обект за каскадно изследване в засегнатите семейства, терапия, проследяване и планиране на репродукцията. На базата на тези резултати е разработен систематичен подход за генетично консултиране при жени с наследствен риск от рак на гърдата и яйчниците. Генетичният консултант играе ключова роля в този процес, като анализира цялата налична информация, включително лична и фамилна медицинска история, конкретния засегнат ген и идентифицирания патогенен вариант. Чрез този персонализиран подход консултантът може да осигури по-точна оценка на риска за развитие на заболяването и да предложи подходящи стратегии за превенция и лечение, особено при пациенти с герминативни мутации в гени с умерена пенетрантност или MINAS.

По важните резултати от дисертацията са обобщени в девет извода: първите два касаят основните резултати при рак на гърдата; вторите два включват резултатите от проучването за рак на яйчника; петият е посветен на синдрома на наследствената мултилокусна неоплазия (MINAS); шестият представя обобщени резултати за цялата кохорта; изводи от 7 до 9 се отнасят до особеностите на генетичното консултиране при пациенти с фамилен РГ/РЯ. Дисертацията безспорно има значителни приноси от методичен, фундаментален и приложен характер.

Публикации по темата на дисертационния труд

Резултатите от дисертацията са представени в 4 научни статии, като две от тях са индексирани в Scopus. Изследванията във връзка с дисертационния труд са изцяло финансирани по проект BG05M2OP001-1.002-0010-C01 "Център за компетентност по персонализирана медицина, 3D и телемедицина, роботизирана и минимално инвазивна хирургия", част от Оперативната програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ и Европейския фонд за регионално развитие.

Проектът на автореферат е изготвен в съответствие с получените резултати и вярно отразява същността на дисертацията.

Заключение:

В заключение смятам, че научната разработка на д-р Камбурова отразява задълбочените и познания и умения в областта на медицинската генетика. Дисертацията отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане (ППЗ) и Правилник за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински Университет – Плевен, убедено давам своя **положителен** вот и препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на д-р Зорница Богомилова Камбурова-Мартинова научната и образователна степен „Доктор“ по Медицинска генетика.

05.02.2025

На основание чл. 59 от ЗЗЛД

доц. д-р Радослава Вържарова, дм

REVIEW

by Associate Professor Radoslava Vuzharova, MD, Ph.D.

Associate Professor at the Department of Biology, Medical Genetics, and Microbiology, Faculty of Medicine, Sofia University "St. Kliment Ohridski"

Regarding: Dissertation thesis of Zornitsa Bogomilova Kamburova-Martinova, MD on the topic "*Study on the inheritance of genetic predispositions in women with breast and ovarian cancer in the Bulgarian population and the importance of the identified genetic variants for the development of a genetic counselling approach for these diseases*" submitted for the award of the Educational and Scientific Degree "Doctor of Philosophy."

Doctoral Program: Medical Genetics

Professional field: 7.1. Medicine

Higher Education Area: 7. Health Care and Sports

Scientific Supervisor: Prof. Dr. Katya Kovacheva, Ph.D.

I was selected as a member of the scientific jury under Order No. 3765/17.12.2024 of the Rector of the Medical University - Pleven. This review is in accordance with the requirements of the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria Act (DASRBA), the Regulations for its application, as well as the Rules for the Development of the Academic Staff at the Medical University - Pleven.

Characteristics and Evaluation of the Dissertation Thesis

The presented dissertation, entitled "**Study on the inheritance of genetic predispositions in women with breast and ovarian cancer in the Bulgarian population and the importance of the identified genetic variants for the development of a genetic counselling approach for these diseases**", by Dr. Zornitsa Kamburova-Martinova, Ph.D. student in the Department of Medical Genetics, Faculty of Pharmacy at the Medical University – Pleven, covers 182 standard typewritten pages and contains 20 figures and 28 tables. A total of 479 references are cited, about one-quarter of which are from the last five years. The dissertation is structured according to the established requirements and includes the following main sections: literature review (38 pages), aim and objectives (1 page), materials and methods (5 pages), results and discussion (93 pages), and a conclusion summarizing the key findings and contributions. Six appendices provide additional

information on the study's methodology and clinical cases of Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS).

The dissertation focuses on studying mutations in tumor-associated genes in Bulgarian women with breast and ovarian cancer using modern next-generation sequencing (NGS) methods. The goal is to develop an optimal genetic counseling model for affected patients and their families. Over recent decades, significant advances have been made in understanding the etiology and pathogenesis of malignancies, particularly regarding the role of genetic predisposition, which has led to the introduction of genetic screening programs in many healthcare systems. The analysis of mutations in high-penetrance, high-risk genes associated with familial cancer forms is a key element of genetic counseling. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) is one of the most extensively studied cancer syndromes. In the mid-1990s, the *BRCA1* and *BRCA2* genes were identified as major players in HBOC risk. Subsequent studies discovered genes associated with moderate risk, while large-scale genomic association studies identified low-penetrance alleles predisposing to cancer. It was also established that tumors in different organs share common genetic predispositions, with varying penetrance of pathological alleles depending on the affected organs/tissues. This has driven the increasing application of multi-gene panel testing through NGS in clinical practice, replacing traditional methods that targeted individual genes. Such an approach reduces the cost of testing and shortens the time to diagnosis, providing more comprehensive information for genetic counseling needs. This dissertation investigates the clinical and genetic characteristics of women with breast and ovarian cancer, using a multi-gene panel targeting tumor-associated genes. Dr. Kamburova's work delves into the complex etiology and pathogenesis of breast/ovarian cancer, the histological, immunohistochemical, and molecular characteristics of the tumors, and their classification, examines the spectrum of germline P/PP variants in tumor-associated genes in the patients, emphasizing the role of genetic counseling in clinical follow-up and family management. The relevance of the topic is further underscored by the fact that genetic testing allows for a more precise approach to risk management, improving health outcomes and the quality of life for affected individuals.

The literature review spans 38 pages and includes 5 figures and 4 tables. Dr. Kamburova presents a detailed and structured analysis of the etiology, pathogenesis, and epidemiology of cancer. The text provides a comprehensive overview of the genetic mechanisms leading to cancer transformation, as well as the importance of DNA repair in preventing the accumulation of mutations, making it a valuable part of the dissertation. The first part of the review is dedicated to breast cancer, while the second focuses on ovarian cancer. Detailed discussions cover the epidemiology, etiology, pathological classification, and the relationship between tumor phenotype and underlying genetic changes for both breast and ovarian cancer. Particular attention is given to genetic predisposition factors, with a thorough review of the main high- and moderate-penetrance genes commonly used as prognostic biomarkers. The final section discusses genetic counseling in these diseases, highlighting

the key role of genetic counselors throughout the patient evaluation process, from pre-test counseling with recommendations for testing to post-test counseling, which covers interpretation of results, cascade screening of family members, and reproductive risk discussions. Overall, the review is well-written and demonstrates Dr. Kamburova's in-depth knowledge of her dissertation topic, showcasing her ability to summarize large amounts of information and present it in a coherent and accessible manner. Based on the review, it is logically concluded that with the introduction of new technologies in medical practice, along with the opportunity to access new and more information, we also face more challenges. The large volume of data obtained when studying the predisposition to breast and ovarian cancer through methods like NGS, on the one hand, and the need to interpret this information in the context of the personal medical and family history of the individual woman, on the other hand, highlights the growing necessity to develop a personalized approach to genetic counseling for patients with breast and ovarian cancer.

The aim of the dissertation is clearly defined: To study the frequency and profile of pathogenic variants in predisposition genes in Bulgarian women with breast or ovarian cancer and to develop a genetic counseling approach for these diseases. To achieve this aim, the following five main objectives have been formulated: 1) To study the main demographic and clinicopathological characteristics of women with breast cancer; 2) To investigate the frequency and profile (type and molecular characteristics) of pathogenic variants in predisposition genes in women with breast cancer – in the overall 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 demographic and clinicopathological characteristics of women with ovarian cancer; 4) To investigate the frequency and profile (type and molecular characteristics) of pathogenic variants in predisposition genes in women with ovarian cancer; 5) To develop a genetic counseling approach for women with breast and ovarian cancer based on their carrier status for pathogenic variants in cancer predisposition genes.

The "Materials and Methods" section describes the studied cohorts of patients with breast cancer and ovarian cancer. The breast cancer group includes a total of 203 patients, recruited both prospectively and retrospectively, divided by age (6 groups), family history criteria (6 groups), and immunohistochemical status of the tumors (4 groups). The ovarian cancer group consists of 67 patients, also recruited both prospectively and retrospectively. The methods used are briefly described: survey method, genealogical method, DNA analysis using next-generation sequencing (NGS) of a multi-gene panel including 94 tumor-associated genes, sequencing data analysis, genetic counseling, and statistical data processing. The methods are appropriately chosen to address the set goals and objectives. A limitation of the DNA analysis methodology is that it is not optimal for detecting structural rearrangements and copy number variants in the studied genes. However, this does not diminish the merits of the dissertation and could be the subject of future research in this cohort of patients.

The "Results and Discussion" section sequentially presents the results obtained in the studied groups of patients with breast cancer (BC) and ovarian cancer (OC), focusing on demographic and clinicopathological characteristics and the identified pathogenic/probably pathogenic variants in tumor-associated genes with high and moderate penetrance, as well as the specifics of genetic counseling for these patients. The section begins by presenting the age, reproductive, family, and clinical characteristics of women with breast cancer, along with the histological and molecular features of the tumors. The largest portion of patients were diagnosed between the ages of 40 and 49 (42.9%). The doctoral candidate discusses the need to reassess the starting age for breast cancer screening in Bulgaria, suggesting that screening should begin at 40 years, rather than the current 50 years. The study found that 28.6% of the patients had overweight (BMI $25 \leq 30$), and 14.8% were obese (BMI ≥ 30), meaning that a total of 43.4% of the women had an increased body mass index (BMI). A statistically significant association was found between elevated BMI and breast cancer diagnosed after the age of 50. Additionally, the proportion of postmenopausal women with hormone receptor-positive tumors and overweight was twice as high (64.7%) compared to postmenopausal women with normal weight (31.3%). The study identified a familial predisposition to breast cancer in 15.8% of the women, which increased to 21.2% when other associated oncological diseases, such as pancreatic and prostate cancer among relatives, were taken into account. The second part of the results examines the frequency of pathogenic/probably pathogenic (P/PP) variant carriers and the profile of these variants in genes associated with breast cancer predisposition. P/PP variants were identified in 21.6% of the examined patients. Of these, 10.8% were in high-penetrance genes (6.4% in *BRCA1*, 3.4% in *BRCA2*, and 1% in *PALB2*). Another 10.8% were found in moderate-penetrance genes (*ATM*, *BLM*, *CHEK2*). A significant correlation was found between the hormonal receptor status of the tumors and the presence of germline P/PP variants – ER-positive tumors were associated with P/PP variants in moderate-penetrance genes, while women with ER-negative tumors more often had mutations in high-penetrance genes. The doctoral candidate discusses that for patients with ER-positive tumors, genetic screening using methods like NGS would be more effective, as germline P/PP variants in moderate-penetrance genes are more frequently detected. All identified P/PP variants are described in detail in the dissertation. It was found that the frequency of germline mutations was significantly higher in women diagnosed at a younger age. Among the moderate-penetrance genes, the highest frequency of mutations was found in the *CHEK2* gene (5.9% of those studied). Among women with a family history of breast cancer, the frequency of P/PP variant carriers was 21.9%, of which 9.4% were in high-penetrance genes and 12.5% in moderate-penetrance genes. Among women with first-degree relatives diagnosed with breast and/or ovarian cancer, the frequency of P/PP variant carriers reached 25%, and when associated cancers such as prostate and pancreatic cancer were considered, the rate increased to 32.6%. Carrier rates for P/PP variants in the *BRCA1/2* genes were significantly higher among women with relatives who also had ovarian cancer (44.4%) compared to those with only breast cancer (28.6%). The carrier frequency of P/PP variants among women with triple-negative breast

cancer (TNBC) was 43.2%, with 32.4% in *BRCA1/2* genes and 10.8% in moderate-penetrance genes. The results indicate that nearly half of the TNBC cases are familial, with two-thirds of these due to P/PP variants in the *BRCA1/2* genes. The third part of the section is dedicated to the demographic, clinical, and histopathological characteristics of women with ovarian cancer. It was found that about 66.7% of women with ovarian cancer have a BMI ≥ 25 , highlighting the role of overweight as a risk factor for the disease. Family history of breast or ovarian cancer was found in 11.9% of the cases. The most commonly diagnosed histological type is high-grade serous ovarian carcinoma (67.2%). The study identified the presence of P/PP variants in genes associated with ovarian cancer in 26.9% of women. About half of them have autosomal-dominant hereditary cancer syndromes: 9% have HBOC—carrying mutations in *BRCA1* (no mutations were found in *BRCA2*); 3% have Lynch syndrome (LS) (P/PP in *MSH2* and *PMS2*); and 3% have Lynch-like syndrome (P/PP in *WRN*). Other germline P/PP variants, found in individual patients from this group, are in genes with high (*RAD51D*) and moderate (*TP53*, *FANCE*, *FANCM*, *FANCL*, *FANCG*, *ERCC3*, *ATM*, *NBN*, *WRN*, *CHEK2*) penetrance. The average age at diagnosis for women with germline P/PP variants is 53.5 years, which is six years lower than for women without P/PP variants. In the overall cohort of 270 women with breast and/or ovarian cancer, germline P/PP variants were found in 23% of the women. The carrier frequency of P/PP variants in *BRCA1/2* genes is 9.6%, and in other genes involved in the homologous recombination mechanism (FA-associated without *BRCA1/2*) – 4.4%. The most frequently observed mutations after those in *BRCA1/2* are in *CHEK2*, accounting for 21% of all genetic defects. Six new variants were identified in the *FANCM*, *FANCG*, *BRIP1*, *RAD51C*, *TP53*, and *ERCC5* genes, which have not been previously reported in global genomic databases. In her dissertation, the doctoral candidate pays special attention to genetic counseling of patients with Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS). Such cases were found in 1.9% of the women studied with breast and ovarian cancer. It is noteworthy that germline P/PP variants in more than one gene were identified in all cases of ovarian cancer with mixed serous and endometrioid histological type, likely due to the presence of multiple pathogenic pathways leading to the development of ovarian cancer in these patients. Although MINAS has a relatively low prevalence, it poses challenges not only from a diagnostic perspective but also as a target for cascade testing in affected families, as well as for therapy, follow-up, and reproductive planning. Based on these results, a systematic approach to genetic counseling for women with hereditary risk for breast and ovarian cancer was developed. The genetic counselor plays a key role in this process, analyzing all available information, including personal and family medical history, the specific affected gene, and the identified pathogenic variant. Through this personalized approach, the counselor can provide a more accurate risk assessment for disease development and suggest appropriate prevention and treatment strategies, particularly for patients with germline P/PP variants in moderate-penetrance genes or MINAS.

The key results of the dissertation are summarized in nine conclusions: the first two concern the main findings related to breast cancer; the next two cover the results of the study on ovarian cancer; the fifth is focused on the Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS); the sixth presents summarized results for the entire cohort; and conclusions 7 to 9 address the specifics of genetic counseling for patients with familial breast and ovarian cancer. The dissertation undoubtedly makes significant contributions in methodological, fundamental, and applied aspects.

Publications on the Dissertation Topic

The results of the dissertation are presented in four scientific articles, two of which are indexed in Scopus. The research related to the dissertation was fully funded by project BG05M2OP001-1.002-0010-C01 "Center for Competence in Personalized Medicine, 3D and Telemedicine, Robotic and Minimally Invasive Surgery," part of the Operational Program "Science and Education for Smart Growth" and the European Regional Development Fund.

The abstract was prepared in accordance with the obtained results and accurately reflects the essence of the dissertation.

Conclusion:

In conclusion, I believe that Dr. Kamburova's research reflects her in-depth knowledge and skills in the field of medical genetics. The dissertation meets the requirements of the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria Act (DASRBA), the Regulations for its application, and the rules of the Medical University of Pleven for acquiring academic degrees and positions.

I confidently give my **positive** vote and recommend that the esteemed scientific jury award Dr. Zornitsa Bogomilova Kamburova-Martinova the academic and educational degree "Doctor of Philosophy" in Medical Genetics.

На основание чл. 59 от ЗЗЛД

05.02.2025

Assoc. Prof. Radoslava Vuzharova, MD, Ph.D.