

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.500>

<https://orcid.org/0000-0001-8381-1551>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Diana Žilovič

Kiaušidžių vėžio genetiniai žymenys

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2018–2022 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute ir Nacionaliniame vėžio institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Nacionalinio vėžio instituto mokslo fondas.

Moksliniai vadovai: –

prof. dr. **Sonata Jarmalaitė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010). Nuo 2019-10-01 iki 2022-09-30.

prof. dr. **Gražina Slapšytė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010). Nuo 2018-10-01 iki 2019-09-30.

Gynimo taryba:

Pirmininkė – dr. **Daiva Baltriukienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija - N 004).

Nariai:

dr. **Pluvio Jesús Coronado Martín** (Madrido Complutense universitetas, Ispanija, gamtos mokslai, biologija – N 004);

prof. dr. **Saulius Paškauskas** (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. **Diana Ramašauskaitė** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. **Kęstutis Sužiedelis** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. rugsėjo mėn. 7 d. 13 val. Gyvybės mokslų centre, Vilniaus universitete. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.500>

<https://orcid.org/0000-0001-8381-1551>

VILNIUS UNIVERSITY

Diana Žilovič

Genetical Biomarkers of Ovarian Cancer

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2018 and 2023 in Institute of Biosciences, Life Sciences Center of Vilnius University and National Cancer Institute

This research received funding by the Lithuanian National Cancer institute research fund.

Academic supervisor – Prof. Dr. **Sonata Jarmalaitė** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010). From 2019-10-01 till 2022-09-30.

Prof. dr. **Gražina Slapšytė** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010). From 2018-10-01 till 2019-09-30.

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Dr. **Daiva Baltriukienė** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Dr. **Pluvio Jesús Coronado Martín** (Universidad Complutense de Madrid, Natural Sciences, Biology – N 010),

Prof. Dr. **Saulius Paškauskas** (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. **Diana Ramašauskaitė** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. **Kęstutis Sužiedelis** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13 on the 7th of September, 2023 in Institute of Biosciences, Vilnius University.

Address: Sauletekio Avenue 7, Vilnius, Lithuania

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	8
1. ĮVADAS.....	10
1.1 Darbo tikslas.....	11
1.2 Darbo uždaviniai	11
1.3 Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė	12
1.4 Autoriaus indėlis	12
2. LITERATŪROS APŽVALGA	13
2.1 Kiaušidžių vėžio epidemiologija	13
2.2 Kiaušidžių vėžio rizikos veiksniai.....	14
2.3 Kiaušidžių vėžio histologija	15
2.5 Kiaušidžių vėžio patogenezė ir tipai	18
2.6 II tipo navikų molekulinė patogenezė	23
2.6.1 <i>TP53</i> mutacijos II tipo kiaušidžių navikuose.....	23
2.6.2 Kiti genetiniai pokyčiai II tipo KV	25
2.7 Skysčių biopsija	26
2.8 Sinchroniniai gimdos kūno ir kiaušidžių navikai	29
3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI	31
3.1 Tiriamieji ir tyrimo eiga	31
3.2 Tyrimo metodika	34
3.2.1 Gimdos ertmės nuoplovos	34
3.2.2 Kiaušidžių audinio biopsija	35
3.2.3 DNR gryninimas.....	36
3.2.4 Naujos kartos sekoskaita	36
3.2.6 Statistinė analizė	37
4. REZULTATAI	38
4.1 Tiriamosios grupės apibūdinimas.....	38
4.2 Mutacijų analizė gimdos ertmės nuoplovose	39

4.3 Mutacijų analizė audinyje	42
4.4 Tyrimo rezultatų atitikimas	42
4.5 Gimdos ertmės nuoplovų mėginių mutacijų koreliacija su klinikiniais duomenimis	44
4.6 Mutacijų, nustatomų gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose, diagnostinė vertė.....	46
4.7 Gimdos nuoplovų analizė SEOC atvejais	49
5. REZULTATŲ APTARIMAS	52
6. IŠVADOS.....	56
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	57
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	58
10. SUMMARY	71
10.1 Introduction	71
10.1.1 Relevance of the study.....	71
10.1.2 Aim of the dissertation	72
10.1.3 Objectives	72
10.1.4 Novelty and practical relevance	73
10.2 Materials and methods	73
10.2.1 Patient cohort.....	73
10.2.2 Uterine cavity lavage and ovarian tissue sample collection and DNA extraction	74
10.2.3 Targeted next-generation sequencing.....	75
10.2.4 Statistical analysis	76
10.3 Results of the study	76
10.3.1 Mutation analysis in uterine cavity lavage samples	76
10.3.2 Mutation analysis in ovarian tissue samples.....	77
10.3.3. Uterine lavage mutation correlation with clinical features..	78
10.3.4. Clinical performance of uterine lavage mutations in type II OC.....	79
10.3.5 Analysis of uterine lavage in SEOC cases.....	81
10.4 Discussion	82

10.5 Conclusions	83
10.6 Curriculum vitae.....	85
10.7 List of publications and presentations	86
10.7.1 Articles on the topic of the dissertation	86
10.7.2 Articles other than on the subject of the dissertation.....	86
10.7.3 Presentations on the topic of the dissertation	87
10.8 Financial support.....	87
11. PADĚKA.....	88
12. PRIEDAI.....	89
UŽRAŠAMS	95

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

(vartojamos tekste daugiau negu vieną kartą)

- AUC** – plotas po kreive (angl. *area under the curve*)
- ACMG** – Amerikos medicinos genetikos ir genomikos koledžas (angl. *American College of Medical Genetics and Genomics*)
- ASPP** – apoptozę stimuliuojantis baltymas P53 (angl. *apoptosis-stimulating protein of p53*)
- CA-125** – karbohidratų antigenas 125 (angl. *cancer antigen 125*)
- ctDNR** – cirkuliuojanti naviko deoksiribonukleorūgštis (angl. *circulating tumor DNA*)
- cfDNR** – cirkuliuojanti deoksiribonukleorūgštis (angl. *cell-free DNA*)
- DNR** – deoksiribonukleorūgštis (angl. *deoxyribonucleic acid*)
- ddPCR** – skaitmeninė lašelių polimerazės grandininė reakcija (angl. *digital droplet polymerase chain reaction*)
- DSBR** – dvigubų trūkių taisymo procesas (angl. *double-strand break repair*)
- FIGO** – Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija (angl. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)
- G** – naviko diferenciacijos laipsnis (angl. *tumor differentiation grade*)
- G1** – gerai diferencijuotas navikas
- G2** – vidutiniškai diferencijuotas navikas
- G3** – blogai diferencijuotas navikas
- HGSOC** – aukšto piktybiškumo serozinis kiaušidžių vėžys (angl. *high-grade serous ovarian carcinoma*)
- HE4** – žmogaus epidermio baltymas 4
- HRD** – homologinės rekombinacinės taisymo sistemos nepakankamumas (angl. *homologous recombination deficiency*)
- KT** – kompiuterinė tomografija
- KV** – kiaušidžių vėžys
- kPGR** – kiekybinė polimerazės grandininė reakcija, arba tikro laiko PGR
- mikroRNR** – mažos nekoduojančios ribonukleorūgštys (20–23 nt)
- mRNR** – informacinė ribonukleorūgštis
- MAPK** – mitogenų aktyvuojamos baltymų kinazės
- MMR** – klaidingai suporuotų nukleotidų deoksiribonukleorūgščių pažaidų taisymo (angl. *Mismatch Repair*) sistema
- MDM** – pelės dvigubų fragmentų 2 homologas (angl. *mouse double minute 2*)
- MRT** – magnetinio rezonanso tyrimas
- nt** – nukleotidas

NPV – neigiamoji prognostinė vertė (ang. *negative predictive value*)
p – proporcija
p – reikšmingumo lygmuo
PSO – pasaulio sveikatos organizacija
PI – pasikliautinis intervalas
PIP3 – fosfatidilinozitolio (3,4,5)-trifosfatas
TP53 – baltymas 53 (angl. *protein 53*)
PBS – fosfatinis buferinis druskos tirpalas
PGR – polimerazės grandininė reakcija
PPV – teigiamoji prognostinė vertė (ang. *positive predictive value*)
RNR – ribonukleorūgštis
ROC – sprendimus priimančiojo ypatybių kreivė (angl. *receiver operating characteristic*)
ROMA – kiaušidžių piktybinių navikų algoritmas (angl. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*)
RRS – riziką mažinanti operacija (angl. *Risk reducing surgery*)
IARC – tarptautinė vėžio tyrimų agentūra (angl. *International Agency for Research on Cancer*)
SafeSeqS – saugi sekoskaitos sistema (ang. *Safe-sequencing system*)
SCOUT– kiaušintakio epitelio sekrecinių ląstelių išvešėjimas (angl. *secretory cell OUT growth*)
SEOC – sinchroninis endometriumo ir kiaušidžių vėžys (angl. *synchronous endometrial and ovarian cancer*)
STIL – serozinis kiaušintakių intraepitelinis pažeidimas (angl. *serous tubal intraepithelial lesion*)
STIC – serozinė kiaušintakių intraepitelinė karcinoma (angl. *serous tubal intraepithelial carcinoma*)
ŠS – šansų santykis
TCGA – vėžio genomo atlaso projektas (angl. *The Cancer Genome Atlas Research Network*)
TNM – piktybinių navikų išplitimo vertinimo sistema (angl. *Tumor, Nodes, Metastasis*)
TVE – transvaginalinė echoskopija

1. ĮVADAS

Kiaušidžių vėžys (KV) yra dažniausia moterų mirtingumo nuo onkoginekologinių susirgimų priežastis. Pasaulyje 2020 metais nuo šios ligos mirė maždaug 207 tūkstančių moterų [1]. Lietuvoje per metus diagnozuojama apie 400 naujų KV atvejų [2, 3]. Penkerių metų išgyvenamumas sergant KV yra 47 proc. ir jis labai skiriasi priklausomai nuo ligos stadijos ir histologinio naviko tipo. Nustačius ligą I FIGO stadijoje penkerių metų išgyvenamumas yra 92 proc., o III-IV stadijoje 17-40 proc. [4]. Didžioji dalis moterų suserga kiaušidžių navikais, kurie, deja, ligos diagnozavimo metu būna jau išplitę (III ir IV FIGO stadija). Histologiškai dauguma piktybinių kiaušidžių navikų yra epiteliniai (90 proc.) ir pagal XXI amžiaus dualistinę KV patogenezės teoriją (R. J. Kurman), epiteliniai navikai skirstomi į I ir II tipo navikus. I tipo epiteliniai navikai (žemo piktybiškumo serozinė karcinoma, mucininė, endometriodinė, šviesių ląstelių karcinoma) nėra dažni navikai bei pasižymi neagresyvia eiga, paprastai nustatomi ankstyvoje stadijoje [5, 6]. II tipo KV sudaro iki 80 proc. visų kiaušidžių piktybinių navikų, jie yra agresyvūs, genetiškai nestabilūs ir dažniausiai nustatomi III-IV FIGO stadijoje. Šiai grupei priklauso aukšto piktybiškumo serozinė kiaušidžių karcinoma – HGSOC (angl. *high-grade serous ovarian carcinoma*), nediferencijuota karcinoma, karcinosarkoma. HGSOC pasižymi didžiausiu mirtingumu, daugiau nei 88 proc. diagnozuojama III–IV stadijoje [5-7]. Santykinis penkerių metų išgyvenamumas sergant šio tipo visų stadijų KV siekia 39 proc., o IV st. – tik 9 proc. [4].

Pradinis vėžio patogenezės mechanizmas yra genų pažeidimas, kurie atsakingi už ląstelės ciklo valdymą, augimo ir apoptozės signalų perdavimą. KV, kaip ir kitas onkologines ligas, sukelia daugybiniai genetiniai ir epigenetiniai pakitimai. KV turi didžiausią iš visų onkologinių ligų paveldimą genetinį komponentą: naujausi tyrimai rodo, kad iki 20 proc. KV gali būti sąlygoti genetiškai [8, 9]. II tipo epitelinis KV dažniausiai diagnozuojamas III–IV FIGO stadijoje, nes ligos klinika nėra specifinė ir nėra efektyvių ankstyvos diagnostikos metodų. I tipo epiteliniai navikai bei neepiteliniai navikai dažniausiai nustatomi ankstyvoje ligos stadijoje ir tai yra pagrįsta jų patogenezei būdinga lėta eiga ir simptomais, kurie atsiranda ankstyvoje stadijoje. Tradiciniai metodai anstyvai KV diagnostikai yra: transvaginalinė echoskopija (TVE), vėžio žymuo karbohidratų antigenas 125 (CA-125) bei žmogaus epidermio baltymas 4 (HE4) ± kiaušidžių piktybinių navikų algoritmo indeksas (angl. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm* (ROMA)). Atlikta nemažai klinikinių tyrimų, siekiant išsiaiškinti KV patikros metodų efektyvumą – PLCO, UKCTOCS, ROCA, GOG0199, Shizuoka ir kiti. Visų

šių tyrimų rezultatai labai panašūs – tokia patikra (CA-125 ir TVE) nesumažina mirtingumo [10-17].

Diagnostinius iššūkius kelia ne tik II tipo KV epiteliniai navikai, bet ir reti sinchroniniai gimdos kūno ir kiaušidžių navikai (angl. *synchronous endometrial and ovarian cancer* (SEOC)). SEOC apibūdinamas kaip vienu metu diagnozuojamas gimdos kūno piktybinis navikas ir KV. Kartais labai sudėtinga atskirti SEOC ir metastazavusį vėžį, nes dažnu atveju liga gali būti neteisingai diagnozuota kaip gimdos kūno FIGO III stadija arba KV FIGO II stadija, ypač kai histologijos yra vienodos. Tačiau gydymo strategija ir bendras išgyvenamumas SEOC ir metastazavusios ligos labai skiriasi [18-23].

Ieškant ankstyvos KV diagnostikos metodų tyrėjai visame pasaulyje siekia pritaikyti skysčių biopsijos tyrimus, kurių metu iš kraujo, šlapimo, makšties tamponų ekstraktų, skystos terpės citologinių ėminių, gimdos nuoplovų ar kitų kūno skysčių išskirtose cirkuliuojančiose navikų ląstelėse, egzosomose ar nukleorūgštyse būtų tiriami biožymenys [24-33]. Remiantis literatūros duomenimis gimdos ertmės nuoplovų paėmimo metodika ir navikinės DNR ištyrimas yra labai daug žadantis tyrimas, nes surenkamos navikinės DNR arčiau pirminio naviko. Šiai dienai gimdos ertmės nuoplovų metodas dar mažai ištirtas, tik kelios pilotinės studijos pateikė savo duomenis apie šio metodo panaudojimo galimybes II tipo KV diagnostikoje [30-33].

1.1 Darbo tikslas

Nustatyti II tipo kiaušidžių vėžiui ir sinchroniniams endometriumo ir kiaušidžių navikams būdingas mutacijas ir sukurti mažai invazinį testą ankstyvai šių ligų diagnostikai.

1.2 Darbo uždaviniai

1. Naudojant gimdos nuoplovų mėginius nustatyti II tipo kiaušidžių vėžiui būdingas genų mutacijas ir įvertinti jų diagnostinę vertę.
2. Įvertinti *TP53* geno mutacijų aptikimo galimybę II tipo kiaušidžių vėžio audinio biopsijos ir skysčių biopsijos mėginiuose.
3. Išanalizuoti tiriamų genetinių žymenų koreliacijas su II tipo kiaušidžių vėžio klinikiniais rodikliais.
4. Įvertinti genetinių žymenų tyrimo vertę sinchroninio endometriumo ir kiaušidžių vėžio diagnostikai.

1.3 Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Ankstyvos KV diagnostikos problema išlieka labai aktuali, nes esami biožymenys CA-125 ir HE4 pasižymi nedideliu jautrumu ir specifiškumu. Biologiniai žymenys, kurie gali būti naudojami atrankinės patikros programose ir galėtų pagerinti išgyvenamumą, buvo šio tyrimo prioritetas. Vienas iš tokių metodų galėtų būti navikinių ląstelių DNR ištyrimas mėginiuose, kurie būtų paimti iš gimdos ertmės naudojant ploną kateterį, siekiant surinkti didesnę kiekį iš kiaušintakių ir kiaušidžių migravusių ląstelių (arčiau pirminio naviko). Iki šiol publikuoti DNR mutacijų tyrimai proksimalinių organizmo skysčių mėginiuose buvo atlikti tik mažos imties studijose išplitusio vėžio atvejais (III–IV st.). Šio biomedicininio tyrimo metu siekėme rasti biožymenis, kurie ateityje galėtų padėti diagnozuoti KV ankstyvoje stadijoje ar netgi priešvėžinius pokyčius kiaušintakyje - serozinę kiaušintakių intraepitelinę karcinomą (angl. *serous tubal intraepithelial carcinoma* (STIC)). Tyrimo metu sukaupti duomenys padėjo įvertinti gimdos ertmės nuoplovų, kaip tiriamosios medžiagos, tinkamumą ankstyvai KV diagnostikai. Taip pat, tyrimas įvertino *TP53* geno mutacijų diagnostinę vertę nustatant II tipo KV bei ištyrė mutacijų įvairovę retuose sinchroniniuose endometriumo ir kiaušidžių navikuose.

1.4 Autoriaus indėlis

Autorė dalyvavo rengiant tyrimo protokolą bei reikalingus dokumentus Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto leidimui gauti. Atrinko pacientes, kurios buvo operuojamos dėl įtariamos ginekologinės patologijos: KV, gimdos kūno vėžio ar gerybinės moters lyties organų patologijos. Rinko gimdos ertmės nuoplovas, klinikinius duomenis, koordinavo mokslinio darbo eigą, dalyvavo atrenkant molekulinis žymenis tyrimams bei klinikinių atvejų analizei. Autorė susipažino su DNR gryninimu, naujos kartos sekoskaita (NKS). Atliko duomenų statistinę analizę, interpretavo, susistemino ir aprašė gautus rezultatus. Mokslo darbą viešino skaitydama pranešimus Lietuvos ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose, kartu su bendraautoriais rengė mokslines publikacijas.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Kiaušidžių vėžio epidemiologija

KV yra aštuntoje vietoje tarp moterų mirties nuo vėžio priežasčių pasaulyje. 2020 metais pasaulyje registruota apie 313 tūkst. naujų KV atvejų ir 207 tūkst. moterų nuo šios ligos mirė [1]. Lyginant su ankstesnių metų duomenimis, mirtingumas bei naujai nustatytų ligos atvejų skaičius didėja. 2020 metų duomenimis KV yra 8-tas dažniausiai moterims diagnozuojamas vėžys, 18 – tas dažniausiai diagnozuojamas vėžys pasaulyje. Europoje didžiausi sergamumo rodikliai yra Latvijoje (15,1 atv./100000 gyv.), Lenkijoje (12,7 atv./ 100000 gyv.), Serbijoje (12,7 atv./ 100000 gyv.). Lietuva pasaulyje užima 8 – tą vietą pagal sergamumą šia liga (11,8 atv./ 100000 gyv.) ir 6-tą vietą pagal mirtingumą (7,2 atv./ 100000 gyv.). Kiekvienais metais Lietuvoje diagnozuojama apie 400 kiaušidžių piktybinių navikų. Lietuvos vėžio registro duomenimis 2015 m. tarp moterų piktybinių susirgimų KV sudarė 4,5 proc. visų moterų piktybinių navikų (šešta vieta), o tarp mirčių nuo vėžio – 7,5 proc. (trečia vieta) [2, 3].

Sergamumo KV rizika didėja su amžiumi - didžiausi sergamumo rodikliai stebimi tarp moterų 75 ir daugiau metų amžiaus grupėje. Daugiau nei pusei visų pacienčių KV diagnozuojamas pažengusios stadijos. Daugelio piktybinių navikų išgyvenamumas per pastaruosius 50 metų labai pagerėjo, tačiau nepaisant per paskutinius kelis dešimtmečius įvykusios sparčios pažangos - naujų vaizdinimo technologijų, išplėstinės chirurgijos metodų, naujų priešvėžinių medikamentinių preparatų taikymo klinikinėje praktikoje, santykinis 5-ių metų išgyvenamumas sergant KV išliko beveik nepakitęs nuo 1980 m. [4, 37, 38].

KV išlieka dažniausia moterų mirčių nuo onkoginekologinių susirgimų priežastimi. Remiantis SSER santykinis 5-ių metų išgyvenamumas nustačius epitelinį KV I FIGO stadijoje 92 proc., II stadijoje 74 proc., III-IV stadijoje tik 29 proc. Aukšto piktybiškumo serozinė kiaušidžių karcinoma sudaro iki 80 proc. visų KV atvejų ir pasižymi aukščiausiu mirtingumu. Tik 13% HGSOE atvejų diagnozuojama I arba II FIGO stadijoje, didžioji dalis HGSOE diagnozuojama pažengusioje ligos stadijoje. Santykinis 5-ių metų išgyvenamumas sergant šio tipo visų stadijų KV siekia 39 proc., o IV st. – tik 9 proc. [37-39].

2.2 Kiaušidžių vėžio rizikos veiksniai

Rizikos veiksniai skirstomi į genetinius ir negenetinius. Apie 20 proc. visų epitelinių KV atvejų ligos priežastimi yra paveldimi pakitimai. Apie pusėje epitelinio KV atvejų nustatomi genetiniai ir epigenetiniai pokyčiai homologinės rekombinacijos kelio genuose, lemiantys ydingą DNR pažaidų taisymą - homologinės rekombinacinės taisymo sistemos nepakankamumą (angl. *homologous recombination deficiency* - HRD). Pakitimai siejami su HRD keliu dažniausiai nustatomi esant krūtų – kiaušidžių vėžio sindromui (patologinės *BRCA1* ar *BRCA2* mutacijos) bei organui specifinio šeiminio KV sindromui (kai dvi ir daugiau pirmosios ar antrosios eilės giminaičių sirgo epitelinės kilmės KV). Nors dažniausiai KV pakitęs kelias yra HRD, galimos pažaidos ir kituose atsako keliuose - RB1, PI3K/Ra ir NOTCH [8, 9, 40- 42].

Stipriausias genetinis KV rizikos veiksnis yra paveldima *BRCA1/BRCA2* mutacija, ypač jei giminėje KV buvo diagnozuotas iki 50 metų amžiaus. Germinacinė *BRCA1/2* mutacija sergant epiteliniu KV nustatoma 10-15 proc. atvejų, didžiausiu dažniu pasižymi HGSOE - iki 25 proc. atvejų. Esant paveldėtai *BRCA1/BRCA2* mutacijai KV rizika padidėja iki 50 proc, krūties vėžio – iki 80 proc. Šis sindromas sudaro apie 90 proc. visų paveldimo KV atvejų. Svarbu pažymėti, kad pacientės su *BRCA1/2* mutacija pasižymi geresniu jautrumu chemoterapijai ir geresniu santykinu 5-ių metų išgyvenamumu. Žinomi ir kiti genetiniai sindromai tokie kaip Lynch II, Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers bei paveldimos patologinės genų mutacijos (*BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1*, *CHEK2*, *MRE11A*, *RAD50*, *ATM*) susiję su padidėjusia KV rizika [40-42].

Manoma, kad negenetiniai rizikos veiksniai lemia apie 7–11 proc. visų KV atvejų [43-45]. Negenetiniai KV riziką didinantys veiksniai yra:

- vyresnis amžius;
- ankstyva mėnesinių pradžia;
- vėlyva menopauzė;
- gimdymų nebuvimas ar vėlyvas (>35m) pirmasis gimdymas;
- buvę kiaušidžių gerybiniai navikai;
- endometriozė;
- dubens uždegiminės ligos;
- nutukimas;
- mažas fizinis aktyvumas;

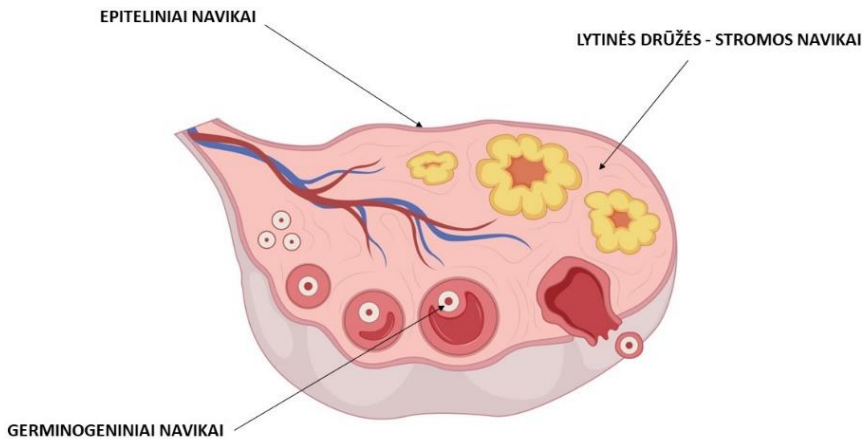
- rūkymas, nesaikingas alkoholio vartojimas;
- pakaitinė hormonų terapija;
- vaistai nevaisingumui gydyti ir ovuliacijos indukcijai;

Vėžio riziką mažina:

- sudėtinių kontraceptinių tablečių, progestinų vartojimas;
- maitinimas krūtimi;
- nėštumai;
- salpingektomija, ovariectomija;
- abipusis kiaušintakių perrišimas ar histerektomija;

2.3 Kiaušidžių vėžio histologija

Morfologiškai kiaušidžių piktybiniai navikai klasifikuojami į dvi pagrindines grupes: epiteliniai ir neepiteliniai kiaušidžių navikai. Neepiteliniai kiaušidžių navikai savo ruožtu skirstomi į lytinės drūžės - stromos bei germinogeninius navikus, tačiau šie navikai sudaro tik apie 10 proc. visų KV [46-48].



1 pav. Morfologinė kiaušidžių vėžio klasifikacija (originalas)

Dauguma piktybinių kiaušidžių navikų yra epiteliniai (90 proc.). 2020 m. Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) išskyrė penkis pagrindinius epitelio KV histologinius tipus [46]:

1. Aukšto piktybiškumo serozinė karcinoma (70 proc.)
2. Endometrioidinė karcinoma (iki 12 proc.)
3. Šviesių ląstelių karcinoma (iki 12 proc.)
4. Žemo piktybiškumo serozinė karcinoma (iki 3 proc.)
5. Mucininė karcinoma (iki 3 proc.)

Kiti epiteliniai piktybiniai navikai kaip karcinosarkoma, adenosarkoma ir endometriumo stromos sarkoma yra išskirtinai reti, todėl yra labai mažai duomenų apie jų patogenezę ir molekulinės charakteristikas. Dažniausios somatinių mutacijų charakteristikos pagal naviko histologinį tipą pateiktos pirmoje lentelėje [48-55].

Lentelė 1. KV histologinis tipas ir dažniausios mutacijos

Histologinis tipas	Dažniausios somatinės mutacijos
Aukšto piktybiškumo serozinė karcinoma (II tipo KV)	<i>TP53</i> (96-99 proc.), <i>BRCA1</i> (9 proc. germinacinė, 4 proc. somatinė), <i>BRCA2</i> (8 proc. germinacinė, 3 proc. somatinė), <i>CCNE1</i> kopijų skaičiaus padidėjimas (20 proc.), <i>NF1</i> (4-11 proc.), <i>RBI</i> (iki 9 proc.), <i>PTEN</i> delecija (6-7 proc.), <i>CSMD3</i> (6 proc.), <i>FAT3</i> (6 proc.), <i>CDK12</i> (3 proc.), <i>GABRA6</i> (2 proc.), <i>APC</i> (3 proc.), <i>LRP1b</i> (8 proc.), <i>CDKN2A</i> (2 proc.), <i>CREBBP</i> (5 proc.), <i>WWOX</i> (4 proc.), <i>ANKRD</i> (4 proc.), <i>MAP2K4</i> (3 proc.)
Žemo piktybiškumo serozinė karcinoma (I tipo KV)	<i>BRAF</i> (30 proc.), <i>KRAS</i> (30 proc.), <i>NRAS</i> , <i>ERBB2</i> , <i>EIF1AX</i> , <i>USP9X</i> , <i>FRAR1</i> , <i>NF1</i> , <i>HRAS</i>
Endometrioidinė karcinoma (I tipo KV)	<i>ARID1A</i> (30 proc.), <i>PIK3CA</i> (30 proc.), <i>CTNNB1</i> , <i>PPP2R1α</i> , <i>PTEN</i> , <i>TERT</i> , MMR sutrikimas
Šviesių ląstelių karcinoma (I tipo KV)	<i>PIK3CA</i> (50 proc.), <i>ARID1A</i> (50 proc.), <i>KRAS</i> , <i>MET</i> , <i>PTEN</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>RPL22</i> , <i>TP53</i>
Mucininė karcinoma (I tipo KV)	<i>CDKN2A</i> (76 proc.), <i>KRAS</i> (64 proc.), <i>TP53</i> (64 proc.), <i>ERBB2</i> (26 proc.), <i>RNF43</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>ARID1A</i> (8–12proc.), <i>HER-2</i> amplifikacija

2.4 Kiaušidžių vėžio diagnostika

II tipo epiteliniai kiaušidžių navikai dažniausiai nustatomi FIGO III-IV stadijoje, nes ligos pradžioje šio tipo vėžys dažniausiai nesukelia jokių simptomų. I-II stadijoje specifinių simptomų nėra. Ilgainiui, ligai progresuojant pilvaplovės ertmėje, atsiranda nespecifiniai simptomai: pilvo apimties didėjimas dėl navikinių darinių pilve ir ascito, virškinimo sutrikimai, pykinimas, žarnyno nepraeinamumo klinika, skausmas, dusulys, šlapinimosi sutrikimai, svorio kritimas ir kiti.

I tipo epitelinių navikų nustatymas ankstyvoje ligos stadijoje yra pagrįstas jų patogenezei būdinga lėta eiga. Didesnių matmenų kiaušidžių navikai neretai pasireiškia tokiais simptomais kaip priepuolinis skausmas, pilvo apimties didėjimas, šlapinimosi, tuštinimosi sutrikimai, tačiau net ir didelių auglių atvejais liga retai būna išplitusi už kiaušidžių ribų [56].

Ankstyva KV (ypač II tipo) diagnostika išlieka iššūkiu. Diagnozuojant ankstyvų stadijų KV patyrusio specialisto atliktas ultragarsinis tyrimas (UG) išlieka vienu vertingiausių ankstyvos diagnostikos metodų. Echoskopinis tyrimas padeda diferencijuoti gerybinius ir piktybinius kiaušidžių navikus vertinant kraujotaką, ascito buvimą, morfologinius piktybiškumo požymius (solidinio komponento buvimas, gausios papilinės išaugos ir kt.). Pasirinktiniais atvejais išliekant neaiškiai kiaušidžių naviko interpretacijai, gali būti atliekamas dubens magnetinio rezonansas tyrimas (MRT) ar kompiuterinė tomografija (KT). Krūtinės ląstos KT, pilvo ir dubens KT ir/arba MRT atliekami siekiant iširti ligos išplitimą (atokiosios metastazės, plitimas limfmazgiuose). Šie tyrimai privalomai atliekami kliniškai diagnozavus išplitusį KV ar esant aiškiems kiaušidės naviko piktybiškumo požymiams UG tyrimo metu. Kartais gali būti atliekama pozitronų emisijos tomografija su kompiuterine tomografija (PET-KT), kuri gali identifikuoti labai smulkias metastazes ar pirminius navikus nevizualizuojamus kitais radiologinio ištyrimo metodais. Endoskopiniai tyrimai (ezofagogastroduodenoskopija, rektoskopija, kolonoskopija) atliekami pasirinktiniais atvejais siekiant atmesti kitų lokalizacijų išplitusias karcinomas bei visais mucininių kiaušidžių piktybinių navikų atvejais [56].

Biologiniai vėžio žymenys identifikuoja cirkuliuojančius naviko elementus, navikų išskiriamus baltymus, arba imuninio atsako į naviką komponentus kūno skysčiuose, pavyzdžiui, kraujyje ir šlapime. Šiai dienai nėra pakankamai jautrių ir specifiskų žymenų ankstyvai KV diagnostikai. Per pastaruosius dešimtmečius buvo tiriami daugybė KV biožymenų, tačiau CA-125 ir HE4 išlieka svarbiausi žymenys KV diagnostikoje. Buvo atlikta daugybė klinikinių tyrimų siekiant įvertinti CA-125 diagnostinį jautrumą bei

specifiškumą. Nustatyta, kad daugelis fiziologinių veiksnių turi įtakos CA-125 koncentracijos padidėjimui: menopauzė, menstruacinio ciklo diena (ovuliacijos ir menstruacijos metu), didelio laipsnio nutukimas, amžius. CA-125 pasižymi žemu jautrumu, jis padidėja sergant gerybine patologija (gimdos miomos, kiaušidės cistos ir kitos), mažojo dubens uždegimu, endometriozė, kepenų bei širdies ligomis, kitos lokalizacijos vėžiu (krūties, plaučių, kasos, storosios žarnos, skrandžio). KV sergančių pacientų CA-125 kiekis koreliuoja su naviko histologija, FIGO stadija bei diferenciacijos laipsniu. CA-125 padidėjimas I FIGO KV stadijoje nustatomas tik iki 50 proc. atvejų. PLCO studijoje I-II KV stadijoje žymuo buvo padidėjęs tik 29 proc. atvejų [10]. Kitas svarbus aspektas, kad iki 20 proc. KV atvejų pasižymi nereaktyviu CA-125. Moss ir kiti atliktame tyrime nustatė, kad CA-125 buvo padidėjęs 80 proc. visų tiriamųjų atvejų, kai KV diagnozė nebuvo patvirtinta [11]. Didelis klaidingai teigiamų rezultatų dažnis ir nedidelis CA-125 jautrumas atrankoje prisideda prie nereikalingų chirurginių procedūrų ir psichologinių pasekmių šioms moterims.

HE4 pasižymi labai panašiu jautrumu kaip CA-125. ROMA indeksas nepasižymi didesniu jautrumu nei CA-125 ar HE4. Naudojant šiuos metodus (CA-125, HE4 ir TVE) ankstyvai KV diagnostikai išauga bereikalingų chirurginių intervencijų skaičius. Remiantis UKCTOCS didžiausio atsitiktinių imčių klinikinio tyrimo duomenimis - 2 iš 3 operacijų nenustatė KV. PLCO tyrimo duomenys parodė, jog 1 vėžio atvejui nustatyti reikia atlikti 20 biopsijų [10 -17].

2.5 Kiaušidžių vėžio patogenezė ir tipai

Viena pagrindinių priežasčių, kodėl KV išlieka daugiausiai mirčių sukeliančiu ginekologiniu susirgimu, yra šios ligos heterogeniškumas. Iki šiol KV klasifikacija buvo pagrįsta morfologija ir imunohistocheminiais tyrimais, tačiau nauji diagnostikos metodai atsižvelgia į molekulinę vėžio genetiką. Ilgą laiką buvo diskutuojama dėl aukšto piktybiškumo serozinės kiaušidžių karcinomos ląstelės pirmtakės kilmės. Naujos išvalgos apie HGSOC patogenezę atsirado tiriant histologinius mėginius, pacienčių operuotų dėl nustatytos paveldimos *BRCA1/2* mutacijos. Histologiniai mėginiai suteikė patologams galimybę ištirti šiuos audinius dėl okultinio vėžio. Atsirado prielaidų, kad HGSOC gali kilti ne iš kiaušidžių audinio, o iš kiaušintakių fibrijų [57-59]. 2001 metais Piek ir kt. [60] nustatė mažus displazinius pažeidimus kiaušintakiuose, panašius į HGSOC, pacienčių grupėje kurioms buvo atlikta profilaktinė salpingoovarektomija dėl *BRCA1/2* mutacijos. Tai paskatino sukurti SEE-FIM (angl. *Sectioning and Extensively Examining the*

FIMbriated end) protokolą siekiant sistemingai įvertinti *BRCA1/2* mutacijų nešiotojų kiaušintakių audinius [61]. Pastebėta, kad pirminiai pakitimai įvyksta kiaušintakių epitelio ląstelėse, fimbrijose, vėliau pakitimai išplinta į kiaušides bei pilvaplėvę. Naujausios pastangos tirti epitelinį KV iš molekulinės ir genetinės perspektyvos pakeitė ligos klasifikaciją, įdiegus dualistinį kiaušidžių kancerogenozės modelį. Šį modelį pirmą kartą pasiūlė Kurman ir Shih 2004 m., o 2014 m. PSO jį oficialiai įtraukė į atnaujintas moterų reprodukcinę organų navikų klasifikacijos gaires (navikų histologinį ir genetinį tipavimą) [5, 6, 61, 62].

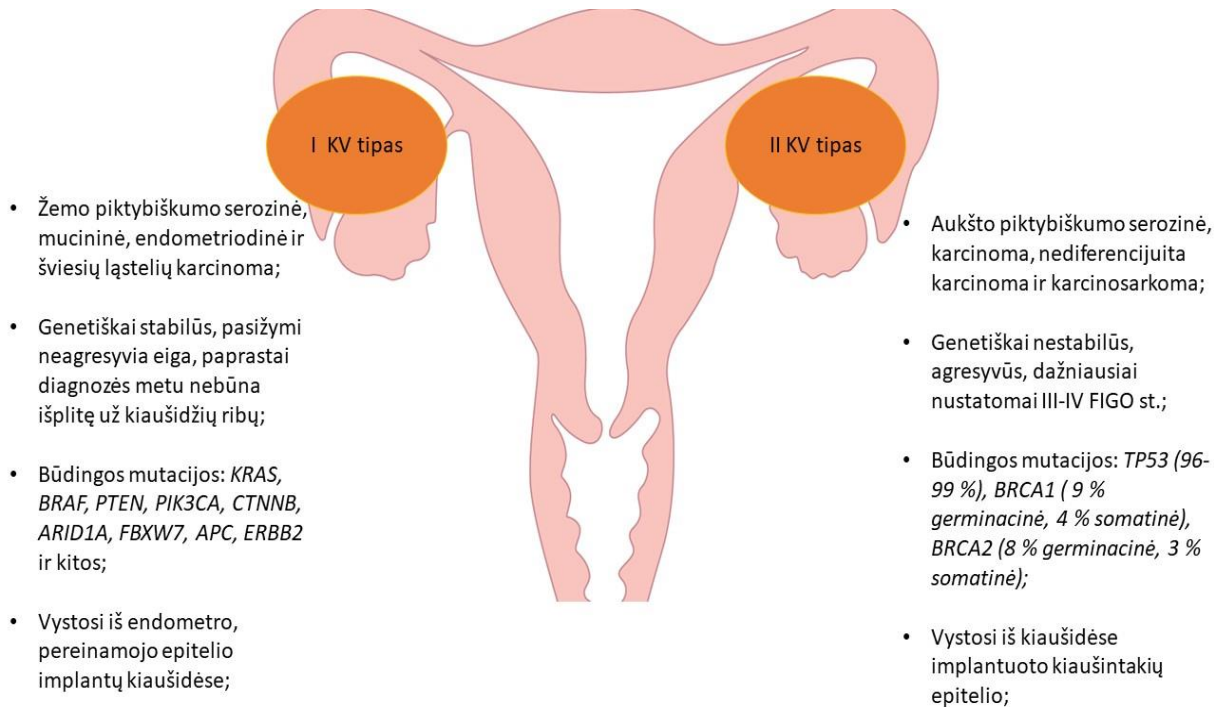
Pagal XXI amžiaus dualistinę KV patogenezės teoriją (R. J. Kurman), KV galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes [5, 6, 62]:

1) „Kiaušidžių“ kilmės KV (lytinės drūžės navikai, germinacinių ląstelių navikai)

2) „Ne kiaušidžių“ kilmės (angl. extraovarian origin) KV, kuriam priklauso I ir II tipo epiteliniai navikai.

Abiejų grupių KV vystosi nepriklausomai, jiems būdingi skirtingi molekuliniai patogenezės mechanizmai. Ši nauja teorija leidžia daryti išvadas, kad tikrieji kiaušidžių navikai (kiaušidžių kilmės) yra tik lytinės drūžės–stamos ir germinaciniai navikai, o „ne kiaušidžių“ kilmės navikai vystosi audiniuose, esančiuose už kiaušidės ribų, ir tik vėliau apima kiaušides arba formuojasi iš šių audinių implantų kiaušidės kapsulėje.

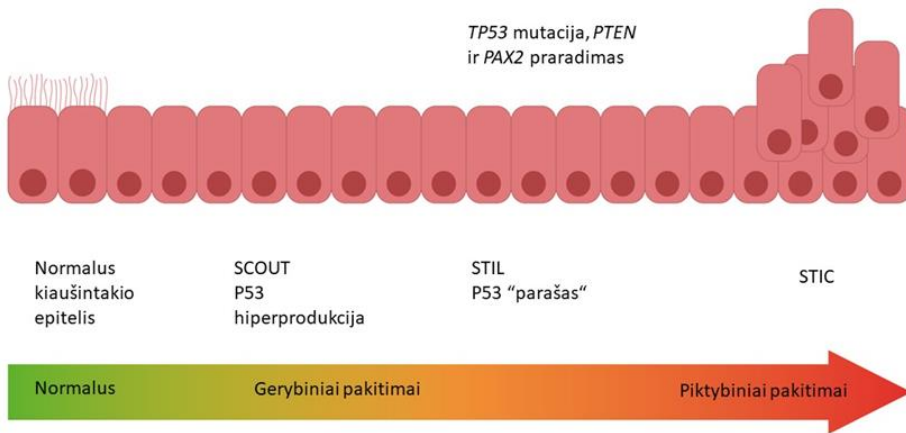
Priklausomai nuo patogenezės skiriami du „ne kiaušidžių“ kilmės vėžio tipai: I ir II tipas (2 pav.).



2 pav. I ir II kiaušidžių vėžio tipai bei jų charakteristika (originalas)

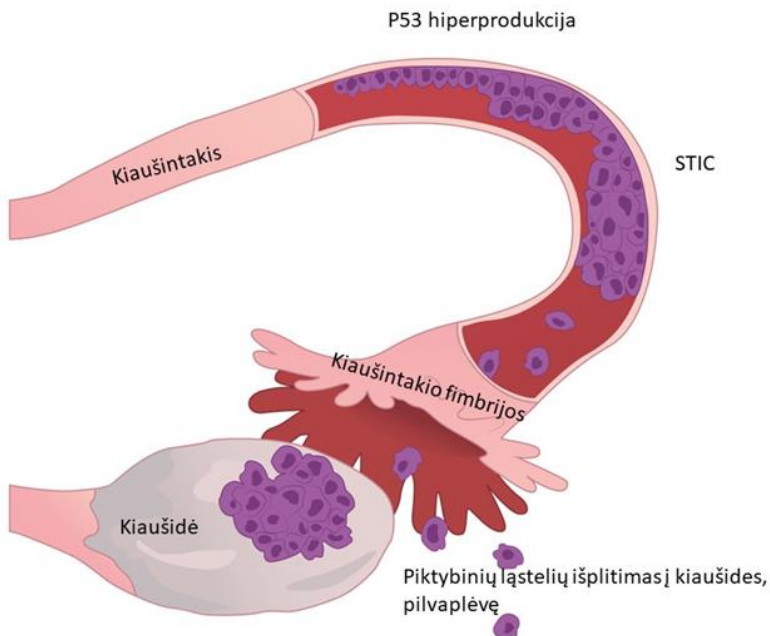
I tipo KV vystosi iš gimdos gleivinės arba pereinamojo epitelio ląstelių implantų kiaušidėse. Pradžioje atsiranda gerybiniai dariniai (mucininė cistadenoma, endometrioma, serozinė cistadenoma, Brenerio navikai), ilgainiui vystosi ribinio piktybiškumo navikai ir galiausiai endometrioidinė, šviesių ląstelių, mucininė, žemo piktybiškumo serozinė karcinoma. Šio tipo navikai yra genetiškai stabilūs, pasižymi neagresyvia eiga, paprastai nebūna išplitę už kiaušidžių ribų diagnozės metu ir nustatomi dažniausiai I FIGO stadijoje. Jiems nebūdinga *TP53* mutacija. Tačiau jiems būdingos *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *ARID1A* ir *PIK2R1* genų patologijos, kurios sutrikdo ląstelių signalinius kelius ir lemia vėžio vystymąsi. Daugiau nei pusei I tipo KV atvejų nustatomos *KRAS* ir *BRAF* mutacijos, kurios dalyvauja mitogenų aktyvuojamos baltymų kinazės (MAPK) signalinio kelio aktyvacijoje. Šio signalinių kelio aktyvacija yra svarbi vėžinių ląstelių proliferacijai ir išgyvenamumui. Apie 40 proc. I tipo KV pasižymi Wnt/ β -kateninų signalinio kelio aktyvacija, dažniausiai *CTNNB1* geno, koduojančio β -kateniną, patologijomis. Ketvirtadaliui I tipo KV atvejų nustatomos *PTEN* ar *PIK3CA* patologijos, kurios aktyvuoja PI3K / PTEN signalinį kelią: *PTEN* inaktyvacija daro įtaką fosfatidilinozitolio (3,4,5)- trifosfato (PIP3) ir baltymų kinazės B (PKB ir AKT) raiškai, taip sumažinant baltymų fosfatazės aktyvumą ir skatinant ląstelės ciklo progresiją [5-7, 62].

II tipo KV sudaro iki 80 proc. visų kiaušidžių piktybinių navikų. Šiai grupei priklauso: HGSOE, nediferencijuota karcinoma ir karcinosarkoma. Šio tipo KV startinis patogeneizės momentas – pakitimai kiaušintakių fimbrijų epitelyje, kiaušintakio epitelio sekrecinių ląstelių išvesėjimas (angl. *secretory cell OUT growth* (SCOUT)), kuriam būdinga TP53 hiperprodukcija ir apie 90 proc. nustatomas PAX2 praradimas arba labai žema jo raiška. Dėl PAX2 praradimo padidėja jautrumas estrogenams, nes padidėja estrogenų receptorių, kas gali paskatinti ląstelių pažeidimą ir atsparumą apoptozei. Ilgainiui atsiranda serozinis kiaušintakių intraepitelinis pažeidimas (angl. *serous tubal intraepithelial lesion* (STIL)) – normaliai atrodantis kiaušintakio epitelis, kuriam būdinga TP53 „parašas“ (angl. *TP53 signature*), TP53 mutacija, PTEN ir PAX2 praradimas. Vėliau pakitimai pereina į serozinę kiaušintakių intraepitelinę karcinomą (angl. *serous tubal intraepithelial carcinoma* (STIC)) –, kuriai būdinga TP53 mutacija, padidėjęs TP53 ir γ H2AX kiekis, kas yra DNR pažeidimų žymuo [5-7, 61 - 67].



3 pav. Aukšto piktybiškumo serozinės karcinomos ikivėžiniai pokyčiai/pirmtakai (originalas)

Manoma, kad atsiradus šiems genetiniams pokyčiams, padidėja WNT4 kiekis, kas sukelia pakitusių ląstelių migraciją ir invaziją. Be to, *TP53* mutacija gali pakeisti kiaušintakių ląstelių atsaką į progesteroną, kas sukelia reguliuojamą nekrozę - nekroptozę. Ilgainiui, manoma, kad per 6-7 metus STIC pakitimai vystosi į invazyvinę aukšto piktybiškumo serozinę karcinomą – HGSC. Navikinės ląstelės implantuojasi kiaušidžių, pilvaplėvės audiniuose.



4 pav. Aukšto piktybiškumo serozinės karcinomos patogenezė (originalas)

Tai genetiškai nestabilūs, agresyvūs navikai, diagnozės metu yra išplitę už kiaušidžių ribų – didelio piktybiškumo serozinė karcinoma (HGSOC), nediferencijuota karcinoma. II tipo navikams būdingos somatinės *TP53* mutacijos 95–99 proc., daugiau nei pusė pasižymi homologinės rekombinacijos sistemos nepakankamumu, *BRCA1/2* genų mutacijos nustatomos iki 22 proc., o kitų genų *RBI*, *NF1*, *MECOM*, *CCNE1*, *KRAS*, *MYC* mutacijos tik iki 6 proc. [12-16]. *CCNE1* amplifikacijos siejamos su bloga ligos prognoze bei rezistentiškumu platinos preparatams, *PTEN* mutacijos taip pat siejamos su prastais išgyvenamumo rodikliais [61- 72].

Pagrindiniai KV (I ir II tipo) pirmtakai ir kilmės ląstelės priklausomai nuo histologinio tipo įvardinti 2 lentelėje [72-76].

Lentelė 2. Kiaušidžių vėžio histologinis tipas ir jo pirmtakai

Histologija	Kilmės ląstelė	Pirmtakas
Aukšto piktybiškumo serozinė karcinoma (II KV)	Kiaušintakio liaukinio epitelio ląstelės	SCOUT, TP53 hiperprodukcija, STIC
Žemo piktybiškumo serozinė karcinoma (I tipo KV)	Kiaušintakio liaukinio epitelio ląstelės	Serozinė cistadenoma, adenofibroma, atipinis proliferuojantis serozinis navikas, neinvazyvus serozinis ribinio tipo navikas
Endometrioidinė karcinoma (I tipo KV)	Endometrio epitelio ląstelės	Endometriozė, endometrioidinis paribinis navikas
Šviesių ląstelių karcinoma (I tipo KV)	Endometrio epitelio ląstelės	Endometriozė, endometrioidinis paribinis navikas
Mucininė karcinoma (I tipo KV)	Nežinoma	Mucininė adenoma, mucininis paribinis navikas

2.6 II tipo navikų molekulinė patogenezė

2.6.1 *TP53* mutacijos II tipo kiaušidžių navikuose

Genas *TP53* yra lokalizuotas 17 chromosomos trumpajame petyje (lokusas 17p13.1), jis koduoja baltymą TP53 atsakingą už ląstelės ciklo kontrolę ir atsaką į DNR pažeidimus. TP53 baltymas susideda iš kelių struktūrinių domenu, kurių kiekvienas turi savo funkciją. Šis genas yra laikomas vienu iš pagrindinių organizmo genų, dalyvaujančių kancerogenezės

procesu. Dėl savo savybės saugoti genomą nuo mutacijų jis yra vadinamas naviko formavimąsi slopinančiu genu [77, 78].

Aktyvuotas TP53 arba sustabdo ląstelės ciklą G1 fazėje (leidžia ištaisyti klaidas) arba indukuoja ląstelės apoptozę. TP53 yra aktyvuojamas ląstelinio streso, kurį sukelia DNR pažeidimai, hipoksija, onkogenų aktyvacija ir ribosominis stresas. Tada TP53 yra fosforilinamas, taip mažinant giminingumą ubikvitino ligazei pelės dvigubos minutės 2 homologui (angl. *mouse double minute 2* (MDM2)) ir šio baltymo nebeveikia ubikvitino ligazė, kai normaliomis sąlygomis E3 ubikvitino ligazė MDM2 palaiko nedidelį TP53 kiekį ląstelėje. Slopinamas TP53 ardymas, padidėja TP53 kiekis ląstelėje ir padidėja TP53 aktyviamų genų raiška. Kaip atsaką į DNR pažeidimus, TP53 aktyvuoja genų raišką, dalyvaujančių DNR pažeidimų atsake (pavyzdžiui genų *DDB2* ir *XPC*), ląstelės ciklo sustabdyme (nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitoriaus 1 (*CDKN1A*), koduojančio p21), apoptozėje (*PUMA*, *BAX*, Apaf-1, Noxa), ląstelės metabolizme (TP53 indukuotos glikolizės ir apoptozės reguliatorio (TIGAR)) ir savo paties reguliacinėse grandinėse (MDM2 ir p53 indukuotos fosfatazės 1) [69, 78, 79].

TP53 geno pokyčiai nustatomi daugiau kaip pusėje visų navikų, todėl TP53 yra vienas geriausiai ištirtų genų pasaulyje. Daugumoje žmogaus piktybinių navikų mutavęs TP53 genas yra praradęs funkciją aktyvinti DNR pažeidimų taisymą. Literatūros duomenimis TP53 geno patologija nustatomos beveik visais II tipo KV atvejais (iki 99 proc.). Šis pokytis yra atsakingas už didelį chromosominio nestabilumo laipsnį, dėl kurio dažnai padaugėja ar netenkama chromosomų regionų.

2011 metais vykdytame vėžio genomo atlaso projekte (angl. *The Cancer Genome Atlas Research Network* -TCGA), greta kitų navikų ištirta 489 pacienčių, sergančių II tipo KV genetinė medžiaga (mRNR, miRNR, DNR). Šis tyrimas nustatė, kad TP53 mutacija pasireiškia 96 proc. atvejų [77]. II tipo KV atvejais dažniausiai pasitaikančios TP53 geno patologijos įvyksta 5–8 egzonuose ir yra sporadinės. Tai pat daugumą TP53 mutacijų yra aminorūgštį (AR) pakeičiantys pokyčiai – (angl. *missense mutacijos*). Remiantis tarptautine vėžio tyrimų agentūra (angl. *International Agency for Research on Cancer* (IARC)) duomenimis nustatyta, kad HGSOE grupėje apie 70 proc. TP53 mutacijų yra *missense* tipo, rečiau pasitaiko rėmelio poslinkio, *nonsense* ir splaisingo mutacijos, 2 proc., 8,7 proc. ir 5,1 proc. atitinkamai [74]. *Missense* mutacijos įvyksta dėl vieno ar kelių nukleotidų intarpų ir pakitus nukleotidui, pasikeičia ir kodonas, o baltyme viena AR pakeičiama kita. Mutacijos dažniausiai nustatomos centrinėje baltymo dalyje – apoptozę stimuliuojantis baltymas TP53 (angl. *apoptosis-stimulating protein of p53* (DNR/ASPP)) domene, maždaug 80 proc. Šie pokyčiai lemia

naują baltymo funkciją, didina TP53 baltymo raiškos stabilizaciją, todėl sutrinka normalus ląstelės ciklas [80, 81]. Kadangi TP53 veikia kaip tetrameras, dėl daugelio *missense* mutacijų taip pat gali susidaryti dominuojantis neigiamas baltymas, kuris gali slopinti tetramerizaciją, net ir esant likusiam laukinio tipo TP53 baltymui. Mutantinis TP53 baltymas yra daug stabilesnis ląstelėje nei jo laukinio tipo atitikmuo dėl nesugebėjimo sąveikauti su jo inhibitoriumi HDM2, kuris paprastai kaip jau minėjome užtikrina savalaikį jo skaidymą proteasomoje. Šis padidėjęs stabilumas, taigi ir didesnis mutuo to TP53 baltymų kiekis, gali leisti jam turėti papildomą onkogeninį funkcinio aktyvumo padidėjimą. Maždaug 20 proc. KV atvejų įvyksta onkomorfinės *TP53* mutacijos, pakeičiančios p53 funkciją ir taip prisidedančios prie vėžio progresijos ir neįautrumo chemoterapijai. Nustatyta, kad pacientai su onkomorfinėmis mutacijomis turi prastesnius išgyvenamumo ir dažnesnius atsparumo platinos chemoterapijai rodiklius. *TP53* patologijos yra laikomos viena pagrindinių II tipo KV vystymosi priežasčių. *TP53* mutacija yra pirmoji žinoma molekulinė transformacija, kuri įvyksta kiaušintakio sekretinėse ląstelėse ir gali būti nustatoma ankstyvajame etape - STIC. Tyrimai parodė, kad *TP53* mutacijos tipas ir vieta turi įtakos ligos prognozei [69, 79-83].

2.6.2 Kiti genetiniai pokyčiai II tipo KV

Nors *TP53* mutacijos nustatomos daugelyje II tipo KV, didelę klinikinę reikšmę kiaušidžių kancerogenezėje turi *BRCA* genų pokyčiai. *BRCA1* ir *BRCA2* baltymai atlieka svarbų vaidmenį palaikant genomo vientisumą, organizuojant DNR taisymą homologinės rekombinacijos būdu. Homologinė rekombinacija yra didelio tikslumo procesas, nes be klaidų atliekamas dvigubų trūkių taisymo procesas (angl. *double-strand break repair (DSBR)*), naudojant seserinę chromatidę kaip šabloną taisymui. Įvykus *BRCA1* ir *BRCA2* mutacijoms tai sukelia homologinės rekombinacinės taisymo sistemos nepakankamumą. HGSOC grupėje *BRCA1/2* mutacijos nustatomos iki 20 proc. atvejų - paveldimos *BRCA1* mutacijos 8 proc., paveldimos *BRCA2* – 6 proc., o somatinės *BRCA1* mutacijos – 4 proc. ir *BRCA2* – 3 proc. Tačiau *BRCA* pakitimai siejami su HRD keliu nustatomi dažniau, net iki 50 proc. HGSOC pacienčių. Pavyzdžiui, *BRCA1* promotorius gali būti hipermetilintas, todėl prarandama geno raiška ir imituojamas *BRCA1* mutantinis fenotipas. *BRCA* geno hipermetilinimas nustatomas apie 11 proc. Kiti genai, koduojantys baltymus homologinės rekombinacijos kelyje ir siejami su HGSOC yra *PTEN*, *ATM*, *ATR*, *RAD50*, *CHEK2* ir daugelis Fanconi anemijos

genų - *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *BARD1*, *PALB2* [9, 40, 41, 42, 74, 80].

Mitogenų aktyvuojamos baltymų kinazės (MAPK) ir fosfatidilinozitolio-4,5-bisfosfato 3-kinazė (PI3K)/proteinkinazė B (AKT) yra du pagrindiniai ląstelių signalų perdavimo keliai, kurie gali būti suaktyvinti dėl: 1. fosfatazės ir tenzino homologo (*PTEN*) funkcijos praradimo; 2. fosfatidilinozitolio-4,5-bisfosfato 3-kinazės katalizinio subvieneto α (*PIK3CA*), Kirsten žiurkių sarkomos virusinio onkogeno homologo (*KRAS*), neuroblastomos RAS virusinio onkogeno homologo (*NRAS*) arba B-Raf proto-onkogeno, serino/treonino kinazės (*BRAF*) genetinės mutacijos; 3. MET proonkogeno, receptorių tirozinkinazės (MET) receptorių, dalyvaujančių HGSOC kancerogenezeje, mutacijų aktyvavimo. Šie genetiniai pokyčiai yra susiję su padidėjusiu atsparu chemoterapijai ir blogesniais išgyvenamumo bei laikotarpio be progresavimo rodikliais. Kaip jau minėjome, be HRD kelio, galimi ir kiti patogenezės keliai - RB1, PI3K/Ra ir NOTCH. *PTEN* delecija nustatoma 6 proc. (PI3K signalinio kelio mutacijos) ir manoma, kad ji įvykta anstyvose KV stadijose ir net priešvėžiniuose pakitimuose [9, 49, 50, 52, 77, 79, 84].

II tipo KV grupėje *CCNE1* kopijų skaičiaus amplifikacija nustatoma apie 20 proc. atvejų. Ši amplifikacija gali būti nustatyta ankstyvuose kiaušintakių pažeidimuose (STIC), kas gali sukelti chromosomų nestabilumą. *CCNE1* koduoja cikliną E1, ciklino E1 baltymų kiekis ląstelės ciklo metu skiriasi ir jis vaidina svarbų vaidmenį perėjime iš G1 į S fazę, surišdamas ir aktyvuodamas nuo ciklino priklausomą kinazę 2 (CDK2). Neįprastai didelė ciklino E1 raiška sukelia neplanuotą DNR replikaciją, centrosomų amplifikaciją ir chromosomų nestabilumą. *CCNE1* amplifikacija yra susijusi su atsparumu chemoterapijai ir blogesniais išgyvenimo rodikliais [85].

2.7 Skysčių biopsija

Naujos kartos molekuliniai vėžio žymenys – tai genetiniai ir epigenetiniai pakitimai, aptinkami genetiniais, genominiiais, proteominiais tyrimų metodais ir jie tiesiogiai susiję su vėžio geneze. Manoma, kad aptikus juos vėžį galima nustatyti iki klinikinio jo pasireiškimo. Norint pritaikyti molekulinę KV klasifikaciją yra būtina rasti paprastų ir neinvazinių būdų nustatyti vėžio tipą. Pastaruoju metu KV diagnostikoje yra siekiama pritaikyti skysčių biopsijos tyrimus, kurių metu iš kraujo, šlapimo, makšties tamponų ekstraktų, skystos terpės citologinių ėminių, gimdos nuoplovų ar kitų kūno skysčių išskirtose cirkuliuojančiose navikų ląstelėse, egzosomose ar nukleorūgštyse būtų tiriami biožymenys, padedantys nustatyti ligą ir jos tipą.

Cirkuliuojanti DNR (angl. *cell-free DNA (cfDNR)*) yra vienas iš vėžio biožymenų tyrimo objektų. CfDNR dažniausiai yra trumpi (70–200 bp) dvigrandininiai DNR fragmentai, kurie apoptozės ar nekrozės metu atpalaiduojami iš ląstelių ir laisvai cirkuliuoja kraujotakoje. Sveikiems asmenims cfDNR išskiriama apoptozinių ląstelių, jos padidėjimas stebimas fizinio krūvio, uždegimo ar traumos atveju. CfDNR kiekis vėžiu sergančių pacientų kūno skysčiuose yra didesnis už sveikų asmenų ir cfDNR nustatytos patologijos atitinka navikinės DNR patologijas. Naujausi tyrimai patvirtino, kad vėžiu sergančių pacientų kraujyje yra didesnis cfDNR kiekis – vidutiniškai 180 ng/l (svyruoja nuo 0 iki 1000 ng/ml), o sveiki asmenys ar pacientės, sergančios gerybinėmis kiaušidžių patologijomis turi vidutiniškai 30 ng/ml (svyruoja nuo 0 iki 100 ng/ml). Nors cfDNR kiekis skysčių biopsijos mėginiuose dažniausiai yra labai nedidelis (gali sudaryti mažiau nei 0,01 proc. mėginio), cfDNR galima nustatyti jautriais ir specifiskais kiekybinio PGR, naujos kartos sekoskaitos ar kitais molekuliniais metodais [24–26, 85]. Kamat ir kt. nustatė, kad KV sergančioms pacientėms prieš operaciją buvo padidėjusi cfDNR koncentracija plazmoje, palyginus su pacientėmis sergančiomis gerybinėmis kiaušidžių ligomis arba sveikomis moterimis, ir pasiūlė cfDNR kaip diagnostinį ir prognostinį žymenį [27]. Q. Zhou ir kiti atliko devynių tyrimų metaanalizę norėdami išsiaiškinti cfDNR vertę KV diagnostikai. Remiantis atliktos metanalizės duomenimis, išvados buvo tokios: cfDNR pasižymi nepakankamu jautrumu – 70 proc., bet priimtiniu specifiskumu 90 proc. KV diagnostikai. Kiekybinė cfDNA analizė vargu ar gali būti naudojama kaip nepriklausomas diagnostinis biožymuo KV diagnostikai, tačiau derinyje su kitais specifiniais biologiniais žymenimis perspektyvos akivaizdžios [28].

Be kiekybinių pokyčių vertinimo, tyrėjai sutelkė dėmesį į kokybinius pokyčius, įskaitant somatines mutacijas, DNR metilinimą ir cfDNA chromosominius pokyčius. Plazmoje cirkuliuojančio naviko DNR (angl. *circulating tumor DNA (ctDNR)*) yra perspektyvus minimaliai invazyvus diagnostinis biožymuo, kuris pasižymi diagnostiniu jautrumu nuo 76 iki 83 proc., o specifiskumu – nuo 55 iki 95 proc. Tačiau labai skiriasi ctDNR aptikimo dažnis, kuris svyruoja atitinkamai nuo 38–100 proc. esant III-IV ligos stadijai ir 35–68 proc. ankstyvoje KV stadijoje. Dauguma mokslininkų, atliekančių ctDNR analizę KV pacientėms, šiuo metu daugiausia dėmesio skiria HGSOc pacientų grupei ir mutantinio *TP53* ištyrimui, kuris parodė didelį jautrumą (>75–100 proc.) ir specifiskumą (>80 proc.) [29, 30, 31].

Kinde et al. pilotinėje studijoje ištyrė ctDNR iš gimdos kaklelio citologinės medžiagos (skystos terpės ėminiai), naudojant 12 genų mutacijų rinkinį. Mutacijos nustatytos 41 proc. (9 iš 22) pacientų sergant HGSOc, o endometriumo vėžiu sergančioms pacientėms DNR mutacijos buvo nustatytos

100 proc. (24 iš 24). Šis pilotinis nedidelės imties tyrimas parodė, kad naviko ląsteles ir fragmentus, kuriuose yra naviko DNR, galima rasti ir surinkti makštyje naudojant makšties tamponą ir iširti naudojant genetinę analizę, kas galėtų padėti anksti nustatyti KV [33].

2015 m. E. Maritschnegg ir kiti surinko mėginius arčiau kiaušidžių ir kiaušintakių, gimdos ertmės nuoplovų paėmimui naudojant histerosalpingografijos kateterį. Į tyrimą buvo įtrauktos 65 pacientės: 30 sergančios KV, 27 kurioms nustatyta gerybinė ginekologinė moters lyties organų patologija ir 8 su kitos lokalizacijos piktybiniais navikais. Visos pacientės pavyko sėkmingai atlikti gimdos ertmės nuoplovų mėginio paėmimą ir buvo gauta pakankamai ctDNR. Buvo analizuojami šie genai: *AKT1*, *APC*, *BRAF*, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *EGFR*, *FBXW7*, *FGFR2*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *POLE*, *PPP2RIA*, *PTEN*, ir *TP53*. Mutacijos, daugiausia *TP53*, buvo aptiktos 60 proc. KV grupėje taikant NKS metodą. Papildomi naudojant didesnio jautrumo metodus tokius kaip skaitmeninė lašelių polimerazės grandininė reakcija (angl. *digital droplet polymerase chain Reaction (ddPCR)*) arba saugi sekoskaitos sistema (ang. *Safe-sequencing system (SafeSeqS)*), mutacijų nustatymo dažnis padidėjo iki 80 proc. Svarbu pažymėti, kad visoms FIGO IA stadijos pacientėms (N = 5) buvo nustatytos *TP53* mutacijos gimdos ertmės nuoplovose bei vienai pacientei kuriai nustatytas okultinis KV [34]. Vėliau 2018 m. E. Maritschnegg paskelbė duomenimis apie gimdos ertmės nuoplovų paėmimo techniką naudojant trikanalį kateterį. Ši technika buvo sėkmingai pritaikyta mėginių surinkimui 98, 9 proc. atvejų keturiuose skirtinguose ginekologiniuose centruose. Naudojant šią techniką net 80 proc. (24 iš 30) KV pacientų buvo nustatytos specifinės mutacijos. Atlikta studija dar kartą parodė, kad gimdos ertmės nuoplovų molekulinė analizė gali būti labai naudinga ir turi didelį potencialą ankstyvai KV diagnostikai [35].

2018 metais KV diagnostikai buvo pasiūlytas PapSEEK testas. Šiuo testu naujos kartos sekoskaitos metodu tiriama 18 genų sekos ir aneuploidijos. 81 proc. moterų, sergančių epiteliniu KV, nustatytos patologijos gimdos kaklelio tepinėliuose (kūno skysčiuose, gautuose Papanicolaou (PAP) tyrimo, paprastai taikomo gimdos kaklelio vėžio diagnostikoje, metu). Dar didesnis kiekis patologijų (93 proc.) nustatytas tepinėliuose, gautuose iš gimdos (Tao tepinėlis), šie tyrimai pasižymėjo didesniu – 99 proc. specifiškumu. Tepinėliuose dažniausiai pasitaikančios patologijos: *PTEN* (63 proc.), *TP53* (42 proc.), *PIK3CA* (36 proc.), *PIK3R1* (20 proc.), *KRAS* (17 proc.), *CTNNB1* (15 proc.), *FGFR2* (15 proc.), *RNF43* (11 proc.), *PPP2RIA* (7 proc.), *POLE* (7 proc.) ir *FBXW7* (6 proc.). To pačio tyrimo metu, daliai moterų (n = 83)

buvo tirtos mutacijos ne tik PAP tepinėlyje, bet ir kraujo plazmoje, tačiau tik 17 mėginių, sutapo nustatytos patologijos [36].

Nors PapSEEK tyrimas pasižymi itin dideliu specifiškumu, o tyrimas gimdos nuoploose pasižymi dideliu jautrumu, reikia atlikti daugiau tyrimų siekiant pritaikyti skysčių biopsijos testus KV diagnostikai ir gydymui. TP53 mutacijų nustatymas, sergant seroziniu KV, gali turėti svarbią reikšmę KV diagnostikai, ypač norint diferencijuoti aukšto ir žemo piktybiškumo serozinę kiaušidžių karcinomą, taip pat ir stebėjimo taktikos parinkimui. Šiandien vis dar išlieka labai aktuali ankstyvos KV diagnostikos problema. Norint sukurti tinkamą tyrimo metodą, reikalingas diagnostinių technologijų tobulinimas, kuris leistų tirti DNR mutacijas mėginiuose, paimtuose iš gimdos ertmės naudojant plonas kaniules / kateterius, siekiant surinkti didesnę kiekį iš kiaušintakių ir kiaušidžių migravusių ląstelių (arčiau pirminio naviko).

2.8 Sinchroniniai gimdos kūno ir kiaušidžių navikai

Sinchroniniai ginekologiniai navikai nustatomi labai retai, dažniausias sinchroninis navikas, iki 70 proc. visų sinchroninių navikų, yra sinchroninis gimdos kūno ir kiaušidžių navikas (angl. *synchronous endometrial and ovarian cancer* (SEOC)). SEOC apibūdinamas kaip vienu metu diagnozuojamas gimdos kūno piktybinis navikas ir KV. Endometrioidinis gimdos kūno vėžio histologinis tipas yra reikšmingai susijęs su padidėjusia antrojo pirminio KV su endometrioidine histologija rizika. Be to, endometrioidinis KV nustatytas iki 50 metų, gali būti susijęs su klaidingai suporuotų nukleotidų DNR pažaidų taisymo sistemos praradimu, ir tokioms pacientėms sinchroninio pirminio piktybinio naviko rizika yra žymiai didesnė. Iki 86 proc. visų SEOC turi atitinkamą endometrioidinę histologiją abiejuose navikuose [23, 86, 87].

Daugiau nei 20 metų Ulbrighto ir Rotho histologiniai kriterijai buvo naudojami metastazavusiam vėžiui atskirti nuo dvigubo pirminio vėžio. SEOC diagnozės kriterijai pirmą kartą buvo dokumentuoti 1981 m., o 1998 m. jos patobulino Scully. Scully kriterijai yra pagrįsti histologiniu panašumu, dydžiu, pirmtakų nustatymu, vieta ir invazija ir kitais rodikliais [88-90]. Vėliau keli autoriai pasiūlė molekulinės analizės metodus tiksliai SEOC diagnostikai, tačiau šiai dienai molekulinė diagnostika rutiniškai nėra taikoma. Kartais labai sudėtinga atskirti SEOC ir metastazavusį vėžį, tačiau labai svarbu teisingai nustatyti ar tai yra SEOC navikas, nes skiriasi tolimesnė gydymo taktika. Kadangi SEOC yra reta liga, dažnai gali būti neteisingai diagnozuotas kaip gimdos kūno FIGO III stadija arba KV FIGO II stadija. Kai dviejų navikų histologija yra skirtinga, SEOC diagnozę nustatyti yra lengva,

tačiau dilema iškyla kai histologijos yra vienodos. Gydomo strategija ir bendras išgyvenamumas labai skiriasi nuo SEOC ir metastazavusios ligos. Ulbright ir Roth kriterijai SEOC diagnostikai ne visada gali būti pritaikomi, jų gali neužtekti tiksliai SEOC diagnozei nustatyti. Kai diagnozės patikslinimui atliekami molekuliniai tyrimai nustatyta, kad didelė dalis yra metastazavusi liga, o ne SEOC. *CTNNB1*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA* ir *PTEN* genų mutacijų, taip pat mikrosatelito nestabilumo, β -katenino ekspresijos molekulinė analizė gali būti naudinga SEOC diagnostikai tais atvejais, kai histologinių parametrų neužtenka [18 -22]. Probleminiais atvejais naviko molekulinė analizė padeda nustatyti tikslią diagnozę ir naviko kilmės ląstelę, o mutacijų analizė skysčių biopsijoje gali padėti vėžį diagnozuoti anksti.

3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI

3.1 Tiriamieji ir tyrimo eiga

Į prospektyvinį tyrimą buvo įtraukta 95 moterys, kurioms 2018–2021m. planine tvarka buvo atliekama gimdos ir jos priedų (kiaušidžių ir kiaušintakių) pašalinimo operacija dėl moters lyties organų įtariamo arba nustatyto piktybinio naviko, arba dėl nustatytos *BRCA1/2* mutacijos. Prieš pradėdant tyrimą iš Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto gautas leidimas tyrimą atlikti (protokolo Nr. 158200-18/5-988-539). Visi mėginiai surinkti gavus raštišką moterų sutikimą dalyvauti tyrime.

Įtraukimo į biomedicininį tyrimą kriterijai:

- Moteriai numatoma operacija dėl moters lyties organų navikų: įtariamas / patvirtintas KV, gimdos kūno vėžys, nepiktybiniai gimdos ar kiaušidžių navikai
- Vyresnė nei 18 metų
- Patvirtintas informuotas sutikimas ir leidimas naudoti asmens sveikatos informaciją, kuris pasirašytas moters ar jos globėjų

Moterų neįtraukimo kriterijai:

- Jaunesnės nei 18 metų moterys
- Moters atsisakymas dalyvauti tyrime
- Moteriai iki operacijos jau buvo pašalintas (i) kiaušintakis (iai)

Atmetimo tyrimo eigoje kriterijai:

- Jei po operacijos nutatytas ne ginekologinės kilmės navikas
- Jei dėl anatominių ar kitų priežasčių nepavyksta paimti gimdos ertmės nuoplovų mėginio ar mėginys nekokybiškas

Pradžioje į tyrimą buvo įtrauktos 95 moterys, tačiau 5 buvo atmetos, nes 3 pacientėms dėl anatominių priežasčių nepavyko paimti gimdos ertmės nuoplovų ir 2 gavus histologinį tyrimo atsakymą nustatyta ne ginekologinės kilmės vėžio diagnozė (kirmėlinės ataugos mucininė karcinoma, tulžies latakų blogai diferencijuota adenokarcinoma). Galutinę tyrimo imtį sudarė 90 moterų. Operacijos metu buvo gautos 90 gimdos ertmės nuoplovų bei 46 kiaušidžių biopsijos. Po operacijos gavus galutinį histologinį atsakymą, moterys buvo suskirstytos į tiriamąją ir kontrolinę grupes. Galutinę tyrimo imtį sudarė: tiriamoji grupė - 37 moterys, kurioms nustatytas II tipo KV (HGSOC), bei kontrolinė grupė – 53 moterys.

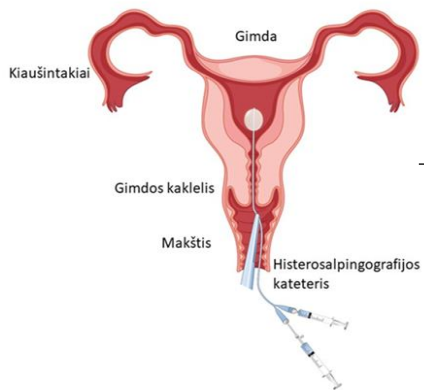
Kontrolinę grupę sudarė keturi pogrupiai:

- 9 ne II tipo KV (1 šviesių ląstelių karcinoma, 3 paribiniai kiaušidžių navikai, 2 muciniai piktybiniai navikai, 2 endometrioidiniai kiaušidžių navikai, 1 granuliozinių ląstelių navikai);
- 12 gimdos gleivinės navikai;
- 19 gerybiniai moters lyties organų navikai;
- 13 pacienčių, kurioms buvo atliekama riziką mažinanti (angl. *risk reducing surgery* (RRS)) profilaktinė salpingoovarektomija dėl nustatytos *BRCA1/2* mutacijos.

Planinė operacija
dėl moters lyties organų įtariamo arba nustatyto
piktybinio naviko, arba dėl nustatytos *BRCA1/2*
mutacijos

Moterys, kurios atitiko įtraukimo kriterijus
N=95

Prieš operaciją
paimtos gimdos ertmės nuoplovos

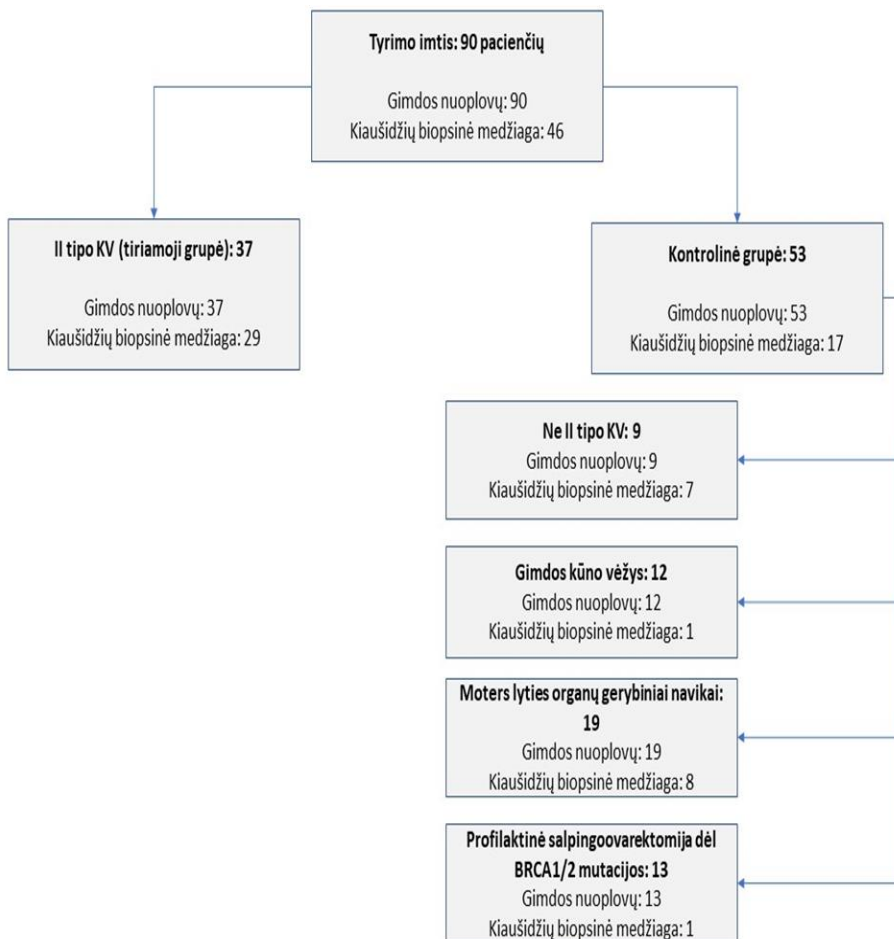


Atmestos:
N=3
(nepavyko paimti gimdos
ertmės nuoplovų)
Moterys, kurios atitiko
įtraukimo kriterijus
N=92

Gavus galutinį
histologinį tyrimo
atsakymą atmestos N=2
(nustatyta ne
ginekologinės kilmės
vėžys)
Galutinė analizė: N=90

Įtariant kiaušidžių vėžį operacijos metu
paimta kiaušidžių audinio biopsija

5 pav. Tiriamųjų atrankos schema
Santrumpos: N – imties dydis

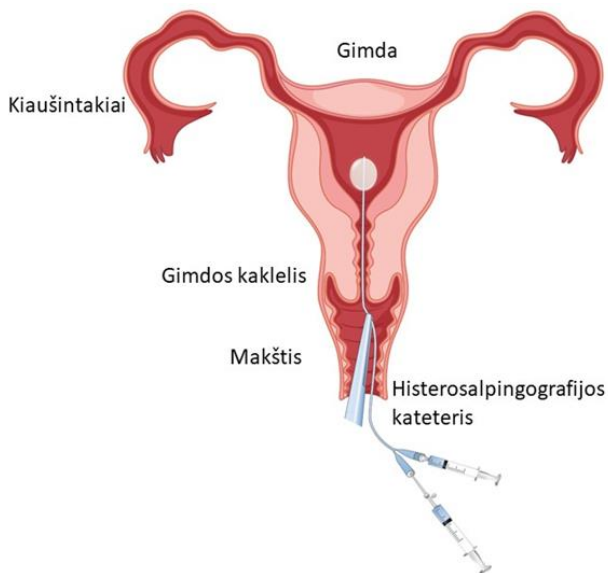


6 pav. Galutinė tyrimo imtis – tiriamoji ir kontrolinė grupės (originalus)

3.2 Tyrimo metodika

3.2.1 Gimdos ertmės nuoplovas

Gimdos ertmės nuoplovas buvo sėkmingai surinktos iš 90 tyrime dalyvavusių moterų. Bendrinėje nejauroje, prieš pradėdant operaciją, laikantis aseptikos taisyklių, naudojant dvidantes žnyples buvo suimamas gimdos kaklelis ir tada 5,5 Fr / 1,7mm diametro histerosalpingografijos kateteris buvo įkišamas į gimdos ertmę per gimdos kaklelio kanalą.



7 pav. Histerosalpingografijos kateteris (originalas)

Jei gimdos kaklelio kanalas buvo stenozuotas, norint įkišti kateterį, gimdos kaklelis buvo išplėstas iki 4 mm su Hegaro plėtikliais. Įvedus histerosalpingografijos kateterį į gimdą kateterio balionas buvo pripūstas 2-3 ml fiziologinio tirpalo, kad gautume sandarumą ir būtų išvengta retrogradinio fiziologinio tirpalo nutekėjimo. Tuomet įšvirkščiama 3–4 ml sterilaus fiziologinio tirpalo, kateteris užspaudžiamas ir po 5 sekundžių, tas pats fiziologinis tirpalas (jau su gimdos ertmės nuoplovomis) surenkamas tuo pačiu kateteriu. Galiausiai balionas buvo ištuštintas ir kateteris pašalintas iš gimdos. Toks skysčių instiliacijos į gimdos ertmę metodas yra taikomas ginekologijoje rutiniškai – tiek ultragarsinėje diagnostikoje (sonohisterografija), tiek kiaušintakių praeinamumo radiologinėje diagnostikoje.

3.2.2 Kiaušidžių audinio biopsija

Operacijos metu bendrinėje nejautoje moterims, kurioms kliniškai/radiologiškai buvo įtariamas kiaušidžių piktybinis navikas buvo paimta papildoma medžiaga - 2 x 3 mm navikinių audinių biopatas iš pašalintos/ų kiaušidės/kiaušidžių. Būtent toks medžiagos dydis reikalingas genetiniam ištyrimui. Medžiaga buvo saugota -80 ° C temperatūroje. Analizei viso buvo paimti 46 kiaušidžių audinio mėginiai: 29 II KV tipo, 7 ne II tipo KV, 1 endometriumo vėžys, 1 RRS grupėje ir 8 moters lyties organų gerybiniai navikai.

3.2.3 DNR gryninimas

Surinktas gimdos ertmės nuoplovų mėginys buvo centrifuguotas 15 minučių 2000×g. Gautas supernatantas buvo pašalintas, o likusios ląstelės plaunamos 2 ml fosfatiniu buferiniu druskos tirpalu (PBS). Gautos gimdos ertmės nuoplovos buvo pakartotinai suspenduotos 2 ml PBS ir iki panaudojimo buvo laikomos -80 °C temperatūroje. 1 ml gimdos ertmės nuoplovų buvo panaudotas DNR ekstrakcijai naudojant *Magmax™ Cell-free Isolation Kit* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (TFS), Foster, CA, JAV) rinkinį pagal gamintojo protokolą. Paruošti gimdos ertmės nuoplovų DNR mėginiai buvo laikomi -20 °C temperatūroje iki sekoskaitos bibliotekos paruošimo.

Genominės DNR ekstrakcijai kiaušidžių audinių mėginiai buvo mechaniškai homogenizuoti skystame azote. 10-20 mg audinių miltelių buvo ardoma proteinaze K (ThermoScientific, TFS, Vilnius, Lietuva) 16 valandų, po to genominė DNR buvo išgryninta standartiniu fenolo-chloroformo ekstrahavimo ir nusodinimo etanoliu metodu. DNR buvo ištirpinta vandenyje be nukleazijų (Invitrogen, TFS, Ostinas, TX, JAV) ir buvo saugoma -20°C temperatūroje iki tolesnių veiksmų.

3.2.4 Naujos kartos sekoskaita

Pasirinktas tikslinis 6 genų, susijusių su kiaušidžių vėžiu bei gimdos kūno vėžiu, rinkinys - *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *KRAS*, *PTEN*. Nusekvenuoti 136 mėginiai: 90 gimdos ertmės nuoplovų ir 46 kiaušidžių audinio biopsijų DNR mėginiai. DNR koncentracija buvo nustatyta naudojant Qubit™ dsDNA HS tyrimo rinkinį ant Qubit™ 2.0 fluorometro (Invitrogen, TFS, Eugene, OR USA). Iki 10 ng/mėginyje genominės DNR bibliotekos paruošimui buvo naudojama AmpliSeq™ Library Kit 2.0 ir Ion AmpliSeq™ Custom DNA Panel (Life Technologies (LT), Carlsbad, CA, USA) pagal gamintojo nurodymus. Sekoskaitos bibliotekos kiekybiniam įvertinimui buvo naudojama TaqMan™ kiekybinio vertinimo rinkinys (AB, TFS, Vilnius, Lietuva). Naujos kartos sekoskaita buvo atlikta naudojant "Ion Torrent Ion™ S5™ system" Ion 530™ lustuose (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Duomenų analizė atlikta automatiškai naudojant "Ion Reporter 5.18" platformą (LT, Carlsbad, CA, JAV), kur sekos nuskaitymai buvo lyginami su žmogaus referentiniu genomu 19 (angl. *Genome Reference Consortium GRCh37*). Visi aptikti variantai buvo klasifikuojami pagal Amerikos medicinos genetikos ir genomikos kolegijos rekomendacijas (angl. *American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG*), naudojant

patogeninių variantų duomenų bazę ClinVar. ACMG pateikia penkias patogeniškumo kategorijas: 1) patogeninis (angl. *pathogenic*); 2) tikėtina patogeninis (angl. *likely pathogenic*); 3) neaiškios klinikinės reikšmės (angl. *uncertain significance*); 4) tikėtina nepatogeninis (angl. *likely benign*); 5) nežalingas (angl. *benign*), ir kriterijus, pagal kuriuos geno variantai turėtų būti priskirti vienai ar kitai kategorijai [94].

3.2.5 Tyrimo imties apskaičiavimas

Tyrimo imties dydžiams nustatyti naudota „G*Power“ (versija 3.1.9.4) programa. Kriterijaus reikšmingumo lygmuo pasirinktas $\alpha = 0,05$. Atsižvelgta į tai, kad kriterijaus galia būtų ne mažesnė kaip 0,8 ($0,8 < \beta < 0,95$). Pasirinktas imčių dydis atitiko reikalavimus.

3.2.6 Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant R paketą (4.0.3 versija). Dviejų klasių duomenys buvo pateikti kaip proporcija (p) ir 95 proc. pasiklovimo intervalu (PI). Homogeniškumas tarp grupių buvo analizuojami naudojant neparametrinį Friedmaną susijusių pavyzdžių bandymams. Vienodas pasiskirstymas kiekvienoje grupėje buvo laikomas nuline hipoteze, tuo tarpu egzistuojantys reikšmingi skirtumai formuluojami kaip alternatyvi hipotezė. Palyginimui tarp grupių buvo naudojamas chi-kvadrato testas. Kiekybinių požymių, atitikusių normaliojo skirstinio sąlygas, reikšmių vidurkiai dviejose nepriklausomose grupėse lyginti taikant Stjudento t testą. Vertinant gimdos ertmės nuoplovų mėginių mutacijų koreliacija su klinikiniais duomenimis naudotas Fišerio, Mann-Whitney ir Welch testas.

Mutacijų, nustatomų gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose, diagnostinei vertei nustatyti skaičiuotas jautrumas, specifiškumas, tikslumas, teigiama prognostinė vertė (PPV), neigiama prognostinė vertė (NPV). Siekiant įvertinti biožymenų prognostines reikšmes KV diagnostikai nubraižytos ROC kreivės ir apskaičiuoti plotai po kreivėmis (AUC). Skirtingų modelių AUC palyginti naudojant DeLong testą. Optimaliai ribinei vertei nustatyti panaudotas Judeno (J) indeksas (jautrumas + (1 – specifiškumas) – 1). Gimdos ertmė nuoplovų mutacijos predikcija II tipo KV atvejais buvo įvertinta naudojant rizikos koeficiento ir šansų santykio charakteristikas. Analizuojamų požymių skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai nustatytas reikšmingumo lygmuo (p reikšmė) buvo mažesnis už 0,05.

4. REZULTATAI

4.1 Tiriamosios grupės apibūdinimas

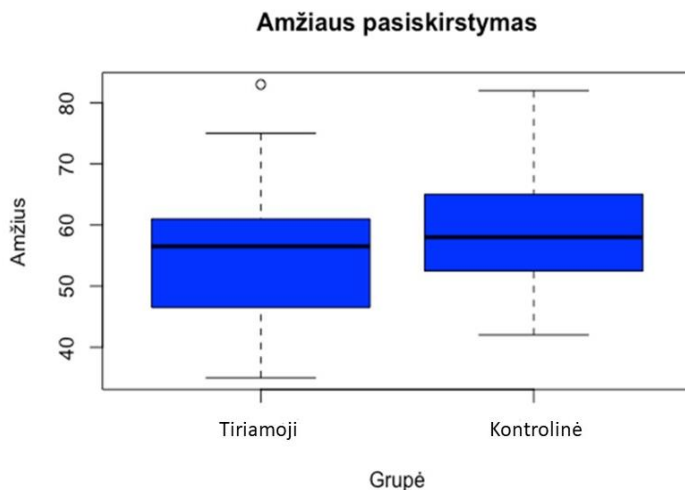
Į tyrimą įtrauktų moterų amžiaus vidurkis buvo 57±9,2 metai (nuo 35 iki 83 m.). Ligos stadija nustatyta pagal FIGO (2014) ir TNM (2017) klasifikaciją. Klinikinės pataloginės pacienčių charakteristikos pateiktos lentelėje numeris 3.

Lentelė 3. Tiriamųjų charakteristikos

Grupė	Tiriamoji grupė (II tipo KV)	Kontrolinė grupė			
		Ne II tipo KV	Gimdos kūno vėžys	Moters lyties organų gerybiniai navikai	Profilaktinė operacija dėl BRCA1/2 mutacijos
Moterų skaičius (n)	37	9	12	19	13
Amžiaus vidurkis metai, (minimalus-maksimalus)	58,2 (42-82)	62,6 (49-75)	62,8 (56-74)	55,9 (41-83)	46,3 (36-65)
FIGO stadija				Netaikoma	Netaikoma
IA		8 (88,9 %)	6 (50,0 %)		
IB		1 (11,1 %)	4 (33,3 %)		
IC					
IIA					
IIB	1 (2,7%)				
IIIA	1 (2,7 %)				
IIIB	4 (10,8 %.)				
IIIC	19 (51,4%)		4 (16,7 %)		
IV	12 (32,4%)				
Diferenciacijos laipsnis					
G1		3 (33,3%)	7 (58,3%)		
G2		1 (11,1%)	5 (41,7%)		
G3	37 (100%)	1 (11,1%)			
G netaikomas		4 (44,4%)		19 (100,0%)	19 (100,0%)

FIGO – Tarptautinė akušerijos ir ginekologijos federacija; G1 – gerai diferencijuotas navikas; G2 – vidutiniškai diferencijuotas navikas; G3 – blogai diferencijuotas navikas;

Nagrinėta tiriamoji ir kontrolinės grupės buvo homogeniškos pagal amžių (vid. 58.24 ir 55.53 ir), p-reikšmė = 0.2359. Amžius nėra statistiškai reikšmingas kintamasis, kuris skiriasi tarp tiriamosios ir kontrolinės grupės. Imtyse dispersija yra vienodai pasiskirstyta tarp tiriamosios ir kontrolinės grupės, nes p-reikšmė (0.1767) buvo didesnė nei 0.05. O Šapiro testas rodė, kad amžiaus pasiskirstymas yra normalus abiejose grupėse, nes p-reikšmė buvo didesnė nei 0.05.



8 pav. Tiriamųjų amžiu tiriamojoje ir kontrolinėje grupėse

4.2 Mutacijų analizė gimdos ertmės nuoplovose

Tyrimui naudoti 90 pacienčių gimdos ertmės nuoplovų mėginiai, gauti prieš planinę operaciją bendrinėje neįtauroje naudojant histerosalpingografijos kateterį. Visoms pacientėms sėkmingai pavyko atlikti gimdos ertmės nuoplovų paėmimą. Toliau atlikta su KV susijusių genų (*TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS*) mutacijų analizė. Visi 90 gimdos ertmės nuoplovų mėginiai turėjo NKS pakankamą DNR kiekį ir buvo sėkmingai išanalizuoti. Mutacijos buvo vertinamos kaip: pataloginė mutacija arba nepatologinė mutacija, somatinė arba germinacinė. Taip pat buvo įvertintas mutacijos tipas ir vieta.

Bent viena mutacija buvo nustatyta 45,6 proc. mėginių (41 iš 90), dvi arba trys mutacijos buvo nustatytos 8,8 proc. mėginių (8 iš 90), vienai pacientei buvo nustatytos keturios mutacijos gimdos ertmės nuoplovų mėginyje. Daugiau nei pusė aptiktų mutacijų 51,8 proc. (29 iš 56) buvo nustatytos tiriamojoje grupėje - II tipo KV.

II tipo KV grupėje *missense* ir *nonsense* tipo *TP53* mutacijos buvo nustatytos 10 iš 37 atvejų (27 proc.), iš jų 90 proc. *TP53* mutacijų buvo *missense* tipo. Beveik pusei II tipo KV pacienčių (46 proc.) buvo nustatyta *BRCA1* arba *BRCA2* mutacijos. Trečdaliui (35,1 proc., 13 iš 37) pacienčių buvo nustatyta *BRCA1* mutacijos, o 10,8 proc. (3 iš 37) atvejų - *BRCA2* mutacijos. Dauguma (82 proc.) *BRCA1/BRCA2* mutacijų buvo germinacinės. Vienai pacientei buvo nustatyta *missense* tipo *PIK3CA* mutacija, vienai *PTEN* bei *KRAS* mutacija (lentelė 4).

Kontrolinės grupės gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose *TP53* mutacijų nebuvo aptikta, įskaitant vieną pacientę kuriai buvo diagnozuotas STIC. Kontrolinės grupės tiriamųjų, kurioms buvo nustatyti moters lyties organų gerybiniai navikai, gimdos ertmės nuoplovose jokių mutacijų nebuvo nustatyta. Vienam iš devynių atvejų I tipo KV sergančių moterų grupėje (serozinis paribinis histologinis KV tipas) buvo nustatyta *KRAS* mutacija. Tuo tarpu 4 iš 12 (33,3 proc.) endometriumo vėžio atvejų buvo nustatytos PI3K signalinio kelio genų (*PIK3CA*, *PTEN* arba *KRAS*) mutacijos. Trims moterims, kurioms buvo nustatytos mutacijos visuose trijuose PI3K kelio genuose, jų histologinis tipas - vidutiniškai diferencijuota (G2) endometrioidinė gimdos kūno adenokarcinoma. Vienai pacientei buvo aptiktos dvi PIK kelio mutacijos - *PIK3CA* ir *PTEN*, kurios histologinis endometriumo vėžio tipas buvo gerai diferencijuota (G1) endometrioidinė adenokarcinoma (lentelė 5).

4.3 Mutacijų analizė audinyje

Taip pat atlikta 46 kiaušidžių audinio biopsijos mėginių sekoskaita ir analizė. Viso 46 mutacijos buvo nustatytos 67,4 proc. (31 iš 46) mėginių. Dažniausiai nustatyta mutacija buvo *TP53*, kuri buvo aptikta net 79,3 proc. (23 iš 29) II KV pacientų (lentelė 6). Dauguma *TP53* mutacijų II tipo KV grupėje buvo *missense* tipo – 78 proc. (18 iš 23), kitos 12 proc. (5 iš 23) mutacijos buvo *nonsense* tipo.

Lentelė 6. Mutacijos tiriamosios grupės kiaušidžių vėžio mėginiuose

		Mutacijos II tipo KV audinyje																														
Genai	Pacienčių	KN6	KN7	KN19	KN22	KN30	KN33	KN36	KN37	KN41	KN49	KN50	KN52	KN55	KN59	KN60	KN61	KN64	KN72	KN73	KN74	KN77	KN78	KN81	KN82	KN84	KN85	KN88	KN93	KN94	KN95	
	<i>BRCA1</i>																															
	<i>BRCA2</i>																															
	<i>TP53</i>																															
	<i>PTEN</i>																															
	<i>PIK3CA</i>																															
	<i>KRAS</i>																															

Viena *TP53* mutacija buvo nustatyta kontrolinėje grupėje (ne II tipo KV grupėje) šviesių ląstelių karcinomos atveju. Daugybines mutacijos buvo aptiktos 93,1 proc. (27 iš 29) II tipo KV pacienčių kiaušidžių audinių mėginių. Dažnai kartu vyko *TP53* ir *BRCA1* ar *BRCA2* genų mutacijos. Ne II tipo KV grupėje be vienos *TP53* mutacijos, dar buvo aptiktos keturios PI3K kelio genų mutacijos – dvi *PIK3CA*, viena *PTEN* ir viena *KRAS* mutacija. Moters lyties organų gerybinių navikų grupėje jokių mutacijų nebuvo nustatyta.

Lentelė 7. Mutacijos kontrolinės grupės kiaušidžių audinio mėginiuose

		Mutacijos audinyje kontrolinėje grupėje															RRS	
		Ne II tipo KV							Gimdos Ca	Gerybiniai navikai								
Pacienčių Nr.:		KN13	KN25	KN35	KN43	KN62	KN 64	KN71	KN34	KN9	KN31	KN32	KN40	KN44	KN48	KN56	KN65	KN76
<i>BRCA1</i>																		
<i>BRCA2</i>																		
<i>TP53</i>																		
<i>PTEN</i>																		
<i>PIK3CA</i>																		
<i>KRAS</i>																		

4.4 Tyrimo rezultatų atitikimas

Poriniuose mėginiuose bendras gimdos ertmės nuoplovų ir kiaušidžių audinio biopsijos mėginių tyrimo rezultatų atitikimo (konkordiškumo) rodiklis buvo 65,2 proc. (30 iš 46). Tačiau teigiamas atitikimo rodiklis

(visiškai sutampančių atvejų iš visų mutavusių mėginių skaičius) buvo 48,5 proc. (15 iš 31) (8 lentelė)

Lentelė 8. Mėginių atitikimas. Bendras ir teigiamas atitikimo koeficientas ir Kappa vertės, apibūdinančios susitarimų kategorijas (1= tobulas susitarimas, 0 = bendras nesutarimas). Bendras atitikimas apskaičiuojamas kaip $(++)+(- -)/$ bendras atvejų skaičius, o teigiamas atitikimo koeficientas apskaičiuojamas kaip $(++)/(++)+(+ -)$.

	ctDNA	Biopsinė medžiaga		Bendras	Teigiamas	Kappa (SE)
		+	-	atitikimas proc.	atitikimas proc.	
<i>TP53</i>	+	10	0	69,6	41,6	0,406 (0,107)
	-	14	22			
<i>BRCA1/2</i>	+	15	0	100	100	1(0)
	-	0	31			
<i>PI3K</i> kelias	+	2	0	91,3	33,3	0,465 (0,216)
	-	4	40			
Bet kuri mutacija	+	15	0	65,2	48,4	0,379 (0,098)
	-	16	15			

Tarp nesutampančių atvejų vyravo *TP53* mutacijos: 13 skirtingų mutacijų buvo aptikta 14 audinių mėginių (*TP53* c.659A > G *missense* mutacija buvo aptikta 2 skirtinguose audinių mėginiuose), kurie nebuvo aptikti gimdos ertmės nuoplovose. *TP53* mutacijos aptikimo sutapimo statistika 0.8043, atsižvelgiant į tiriamąją grupę (II tipo KV), ir 0,6957 neatsižvelgiant. Visos mutacijos gimdos ertmės nuoplovose bei kiaušidžių audinyje nurodytos lentelėje 9.

Lentelė 9. Gimdos ertmės nuoplovų ir kiaušidžių audinio mėginių mutacijos tiriamajoje ir kontrolinėje grupėse

Grupė	Tiriamoji grupė (II tipo KV)	Kontrolinė grupė			
		Ne II tipo KV	Gimdos kūno vėžys	Moters lyties organų gerybiniai navikai	Profilaktinė operacija dėl <i>BRCA1/2</i> mutacijos
Pacienčių skaičius (n)	37	9	12	19	13
Mutacijos gimdos ertmės nuoplovose	10 (27%)				
<i>TP53</i>	13 (35%)				11 (84,6 %)
<i>BRCA1</i>	4 (10,8%)				2 (15,4 %)
<i>BRCA2</i>	1 (2,7%)		4 (33,3 %)		

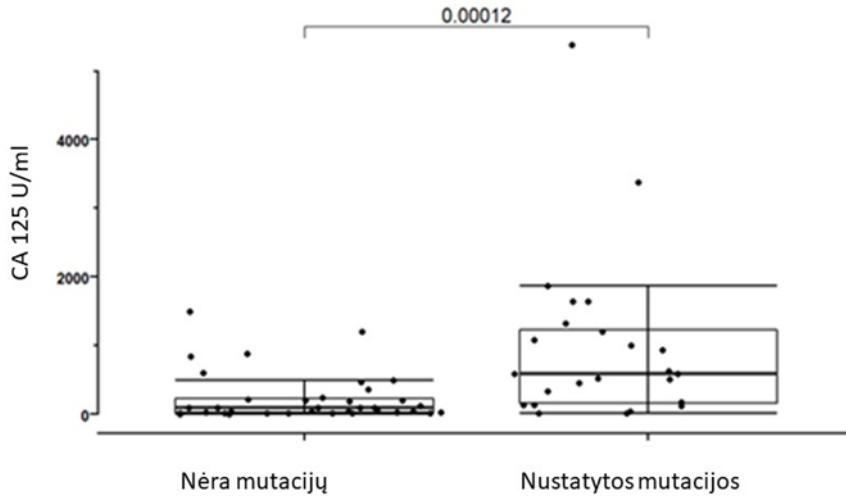
Grupė	Tiriamoji grupė (II tipo KV)	Kontrolinė grupė			
		Ne II tipo KV	Gimdos kūno vėžys	Moters lyties organų gerybiniai navikai	Profilaktinė operacija dėl <i>BRCA1/2</i> mutacijos
<i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> <i>KRAS</i>	1 (2,7%)	1 (11,1%)	4 (33,3 %) 3 (25,0 %)		
Mutacijos audinyje <i>TP53</i> <i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> <i>KRAS</i>	23 (79%) 10 (34 %) 4 (24%) 2 (6,8 %)	1 (14,2%) 2 (29 %) 1 (14,2%) 1 (14,2 %)			

4.5 Gimdos ertmės nuoplovų mėginių mutacijų koreliacija su klinikiniais duomenimis

Toliau analizavome ryšį tarp gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose nustatytų mutacijų ir klinikinių požymių. Žymiai daugiau mutacijų buvo aptikta gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose moterų, sergančių FIGO III ir IV stadijomis KV ($p = 0,002$, tikslus Fišerio testas), palyginus su moterimis sergančiomis I ar II FIGO stadijos kiaušidžių ar endometriumo vėžiu. II tipo KV grupėje pacientėms sergančioms IV stadijos buvo nustatyta žymiai daugiau mutacijų gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose ($p = 0,002$, tikslus Fišerio testas), nei II- III FIGO stadijos. Be to, II tipo KV grupėje moterys, kurioms buvo nustatyta *BRCA1* arba *BRCA2* mutacijos, buvo žymiai jaunesnės nei kitos moterys šioje grupėje (vidutinis skirtumas 7,0 metų, $p = 0,0183$, Welch t testas). *TP53* mutacijų būklė (yra/nėra) II tipo KV grupėje nepriklausė nuo amžiaus, operacijos radikalumo ($p < 0,5$).

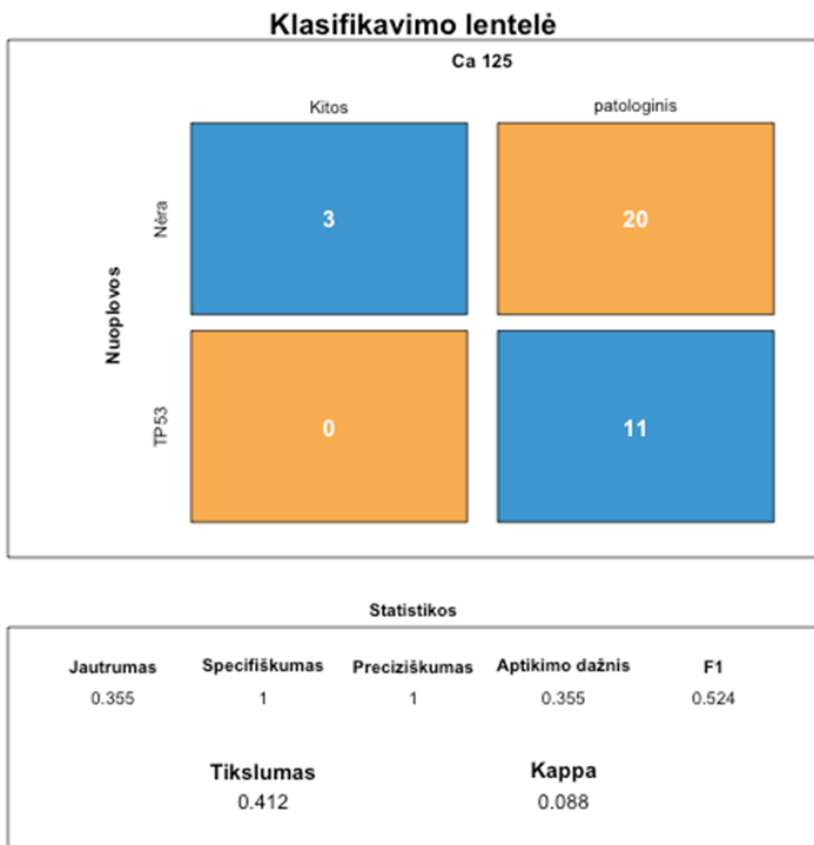
CA-125 koncentracija, nustatyta prieš gydymą, buvo žymiai didesnė moterims, kurioms gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose buvo nustatytos patologinės mutacijos lyginant su moterimis kurios neturėjo nei vienos mutacijos ($p = 0,0001$, Mann-Whitney testas; pav. 9).

Gimdos ertmės nuoplovų mutacijų koreliacija su CA 125



9 pav. Gimdos ertmės nuoplovų mėginių mutacijų koreliacija su CA-125

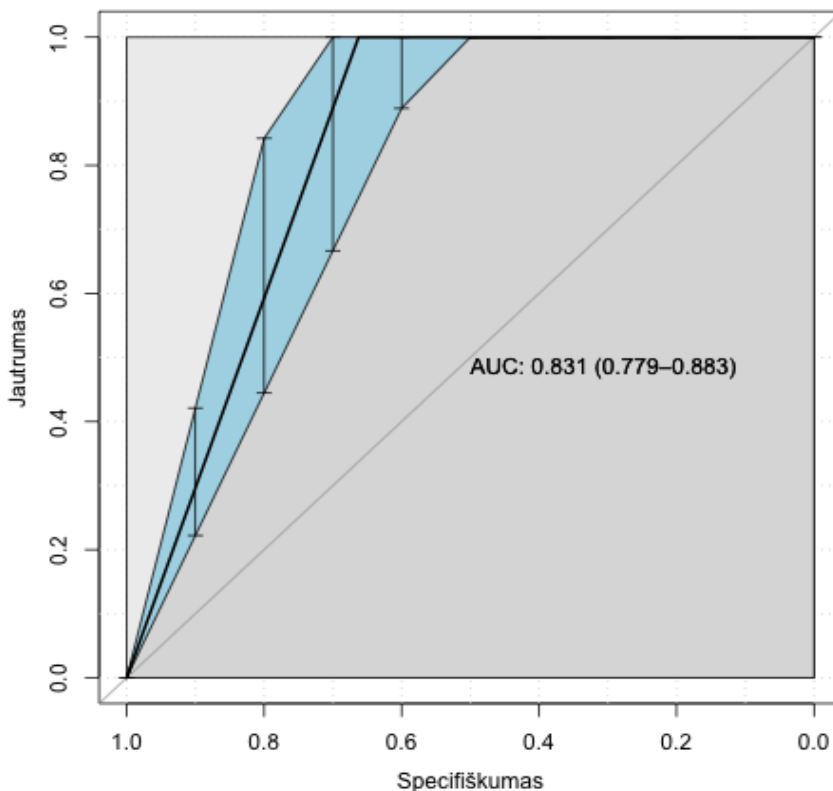
Tačiau, pataloginė CA-125 koncentracija kraujyje (> 35 U/ml) neturėjo sąsajos su *TP53* mutacijomis gimdos ertmės nuoplovose (šansų santykis (ŠS) 1.15; pasikliautinasis intervalas (PI) 0.98-1.34, $p=0.2096803$) skaičiuojant Chi kvadrato statistiką (pav. 10).



10 pav. *TP53* mutacijų sąsajos su CA-125

4.6 Mutacijų, nustatomų gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose, diagnostinė vertė

Atlikus *TP53* mutacijų paiešką gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose, nustatyta 10 sutampančių mutacijų, kurios buvo aptiktos ir biopsijos mėginiuose. Tiriant gimdos ertmės nuoplovų mėginius, *TP53* mutacijų testo jautrumas 27 proc., o specifiškumas 100 proc., tikslumas 70 proc., TPV 100 porc., NPV 66,3 proc. (ŠS 2.96; PI 2.18-4.03; $p < 0.0001$). *TP53* biožymens tikslumas prognozuojant II tipo KV įvertintas nubraižius ROC kreives ir apskaičiavus plotą po kreivėmis (AUC). Apskaičiuotas *TP53* AUC siekė 0,831 (pav. 11).

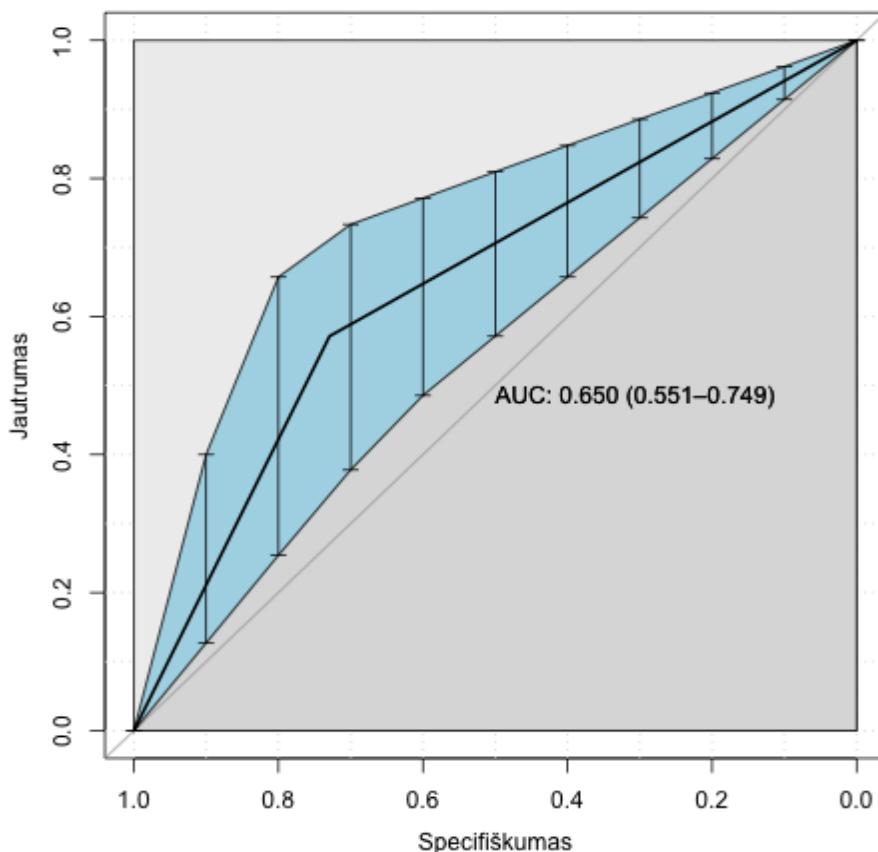


11 pav. *TP53* mutacijų gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose diagnostinė vertė, ROC kreivė, AUC – plotas po ROC kreive

Beveik pusei II tipo KV moterų (46 proc.) buvo nustatyta *BRCA1* arba *BRCA2* mutacijos. *BRCA1* mutacija buvo nustatyta 13 moterų, tokios pat mutacijos buvo nustatytos 100 proc. biopsijos mėginių, jautrumas 35,1 proc., specifiškumas 100 proc., tikslumas 68,8 proc., TPV 100 proc., NPV– 62,5 proc. (ŠS 2.667; PI 1.94-3.65; $p < 0.0001$). *BRCA2* mutacija buvo nustatyta 3 atvejais ir visais atvejais sutapo su biopsine medžiaga. Nors *BRCA2* pasižymėjo 100 proc. specifiškumu, jautrumas nustatytas tik 10,8 proc., tikslumas 57,1 proc., TPV 100 proc., NPV 54,7 proc. (ŠS 2.2; PI 1.71-2.84; $p = 0.0488$).

KRAS, *PIK3CA*, *KRAS* mutacijos buvo nustatyta vienu atveju ir pilnai atitiko biopsijos rezultatus. Šie genai pasižymėjo 87,5 proc. specifiškumu, bet tik 2,7 proc. jautrumu, tikslumas 46,7 proc., TPV 100 proc., NPV 49,3 proc. (ŠS 0.329; PI 0.054 – 1.99; $p=0.2022$).

Vertinant viso šešių genų testo (*TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *KRAS*, *PTEN*) diagnostinę vertę indentifikuojant II tipo KV kai nustatomas bent vieno geno mutacija, testas pasižymėjo 64,9 proc. jautrumu, 66 proc. specifiškumu, teigiama prognostine verte 0.571, neigiama prognostine verte 0.729 (ŠS 2.87; PI 1.78 -4.62; $p < 0.0001$). Testo tikslumas prognozuojant II tipo KV įvertintas nubraižius ROC kreives ir apskaičiavus AUC siekė 0,650 (pav. 12).



12 pav. Bent vieno geno diagnostinė vertė gimdos ertmės nuoplovose ROC kreivė, AUC – plotas po ROC kreive

Įvertinus viso tyrimo ir kiekvieno geno atskirai diagnostinę vertę nustatyta, kad geriausiu šansų santykiu pasižymėjo *TP53* genas – 2.96 bei šešių genų testas – šansų santykis 2.86 (lentelė 10).

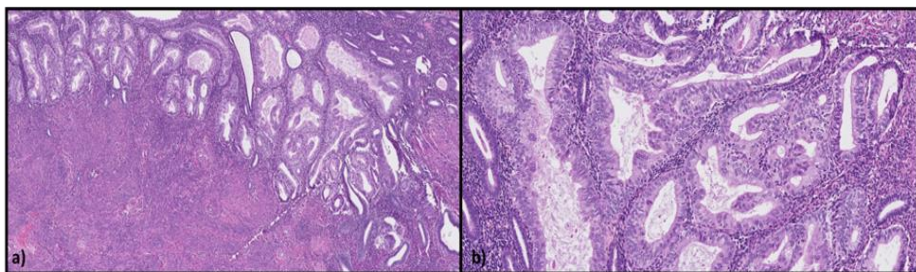
Lentelė 10. Mutacijų, nustatomų gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose, diagnostinė vertė tiriamojoje grupėje

	Jautrumas %	Specifiškumas %	TPV %	NPV %	ŠS	PI	Fišer testas, p
<i>TP53</i>	27	100	100	66,3	2.96	2.18- 4.03	p < 0.0001
<i>BRCA1</i>	35,1	100	100	62,5	2.66	1.94- 3.65	p < 0.0001
<i>BRCA2</i>	10,8	100	100	54,7	2.2	1.71- 2.84	p = 0.0488
<i>PIK3CA</i>	2,7	87,5	100	49,3	0.32	0.05- 1.99	p=0.2022
<i>KRAS</i>	2,7	87,5	100	49,3	0.32	0.05- 1.99	p=0.2022
<i>PTEN</i>	2,7	87,5	100	49,3	0.32	0.05- 1.99	p=0.2022
Bent vienas genas	64,9	66,0	57,1	72,9	2.87	1.78- 4.62	p < 0.0001

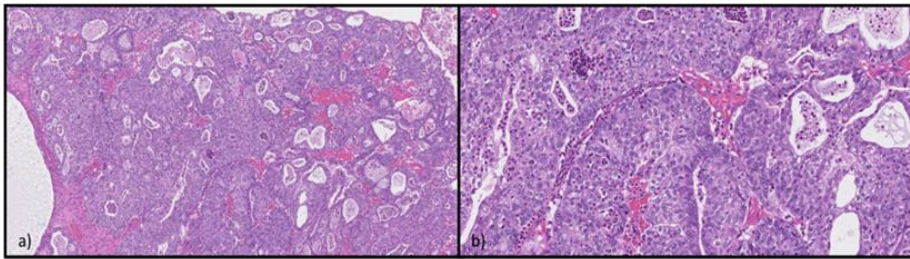
TPV – teigiama prognostinė vertė, NPV – neigiama prognostinė vertė, ŠS – šansų santykis, PI – pasikliautinis intervalas

4.7 Gimdos nuoplovų analizė SEOC atvejais

Mūsų tyrime dviem pacientėms buvo diagnozuota SEOC. Pirmuoju atveju 54 metų pacientei nustatyta gerai diferencijuota gimdos endometrioidinė karcinoma IA FIGO st. ir kairės kiaušidės vidutiniškai diferencijuota endometrioidinė karcinoma IA FIGO st.



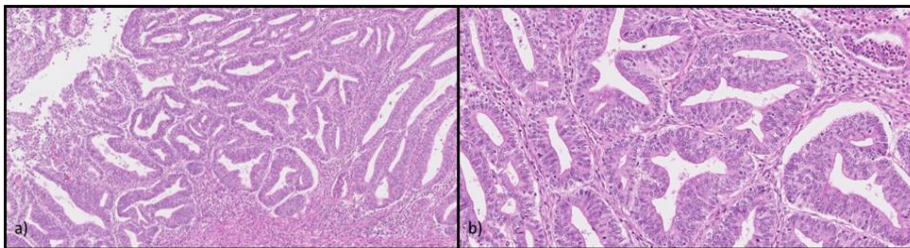
13 pav. Histologinis vaizdas endometriumo vėžio a) Hematoksilinu ir eozinu nudažytas mažos galios objektinis stiklis (lęšio objektyvas x4) rodo glaudžiai supakuotas netaisyklingas liaukų struktūras b) Hematoksilinu ir eozinu nudažytame vidutinio galingumo objekte (lęšio objektyvas x14) rodomas koloninis epitelis su ovaliais, sluoksniuotais branduoliais.



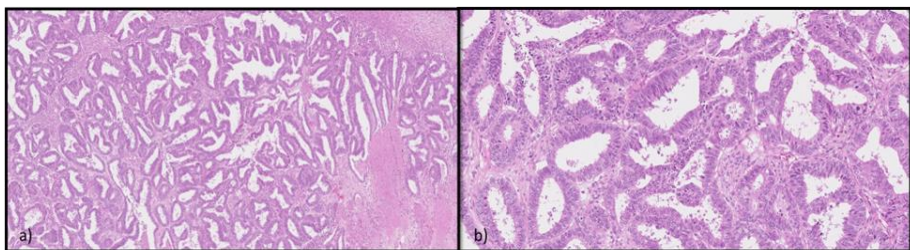
14 pav. Histologinis vaizdas kiaušidės vėžio a) Hematoksilinu ir eozinu nudažytame mažos galios objekte (lęšio objektyvas x4) matomos glaudžiai supakuotos netaisyklingos liaukų struktūros b) Hematoksilinu ir eozinu nudažytas vidutinio galingumo objektinis stiklelis (lęšio tikslas x 14) rodo naviką, sudarytą iš vidutinio kiekio eozinofilinės citoplazmos su šiek tiek polimorfiniais branduoliais ir matomais branduoliais.

Analizuojant gimdos nuoplovų bei biopsinę kiaušidės naviko medžiagą buvo naudojamas tas pats mūsų pasirinktas 6 genų testas - *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *KRAS*, *PTEN*. Pirmuoju atveju pasirinktų genų mutacijų nebuvo nustatyta nei audinyje, nei gimdos ertmės nuoplovose.

Antru atveju 45 metų pacientei histologiškai nustatyta gerai diferencijuota (G1) endometrioidinė karcinoma, apsiribojanti kairėje kiaušidėje, ir gerai diferencijuota (G1) gimdos endometrioidinė karcinoma, ribota endometriume. Nustatyta galutinė diagnozė - synchroninė FIGO IA st. endometrioidinė gerai diferencijuota kairės kiaušidės karcinoma ir FIGO IA st. gerai diferencijuota endometriumo karcinoma.



15 pav. Histologinis vaizdas endometriumo vėžio a) Hematoksilinu ir eozinu nudažytas mažos galios objektinis stiklelis (lęšio objektyvas x4) rodo glaudžiai supakuotas netaisyklingas liaukų struktūras b) Hematoksilinu ir eozinu nudažytoje vidutinio galingumo skaidrėje (objektyvo objektyvas x14) matyti aukštas stulpelinis epitelis su ovaliais, sluoksniuotais branduoliais su matomais branduoliais.



16 pav. Histologinis vaizdas kiaušidės vėžio a) Hematoksilinu ir eozinu nudažytas mažos galios objektinis stiklelis (lęšio objektyvas x 4) rodo glaudžiai supakuotas netaisyklingas liaukų struktūras su židinine nekroze b) Hematoksilinu ir eozinu nudažytas vidutinio galingumo objektinis stiklelis (lęšio objektyvas x 14) rodo stulpelinį epitelį su ovaliais, sluoksniuotais branduoliais ir matomais branduoliais.

Gimdos ertmės nuoplovoje genų mutacijų nebuvo nustatyta, tačiau kiaušidžių audinio mėginyje buvo aptiktos somatinės *PIK3CA* ir *PTEN* mutacijos (11 lentelė).

Lentelė 11. Antrojo SEOC klinikinio atvejo genetinių tyrimų duomenys

Genas	Gimdos nuoplovos	Kiaušidžių audinio biopsija	dbSNP	Aminorūgščių pokytis
<i>PIK3CA</i>	-	c.1093G>A	rs1064793732	p.Glu365Lys
<i>PTEN</i>	-	c.517C>T	rs121913293	p.Arg173Cys

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Dėl prastų išgyvenamumo rodiklių sergant KV, ankstyvos kiaušidžių vėžio diagnostikos problema išlieka labai aktuali. Klinikinėje praktikoje iki šiol nėra patikimų laboratorinių tyrimų ir biožymenų ankstyvai KV diagnostikai, todėl didelis dėmesys skiriamas naujos kartos genetinių žymenų sistemų sukūrimui. Skysčių biopsijos mėginiai yra labai patraukli tiriamoji medžiaga mažai invazyviam diagnostiniam testui sukurti. Iki šiol publikuoti DNR mutacijų tyrimai proksimalinių organizmo skysčių mėginiuose buvo tik išplitusio KV atvejais (FIGO III– IV st.). Pirma pilotinė studija, kuri išbandė gimdos ertmės nuoplovas KV diagnostikai buvo paskelbta 2015 metais, kurią atliko E. Maritschnegg ir kiti [34] ir pateikė daugiausia duomenų apie gimdos ertmės nuoplovų diagnostinę svarbą klinicinei praktikai [34, 35]. Mūsų tyrėjai norint sukurti mažai invazinį KV testą ankstyvai ligos diagnostikai naudojo histerosalpingografijos kateterį gimdos ertmės nuoplovoms paimti ir parodė, kad šis metodas yra tinkamas skysčių biopsijos surinkimui. Iš kiaušintakių ir kiaušidžių migravusios navikinės ląstelės ir jų genetinė medžiaga buvo surenkama nuoplovų metodu, o navikui būdingos mutacijos aptinkamos taikant NKS metodą.

Pagrindinis dėmesys mūsų tyrime buvo skirtas II tipo KV grupei, nes šis vėžio tipas sudaro 70-80 proc. epitelinio KV atvejų ir pasižymi didžiausiu mirtingumu, ir šiai dienai nėra jokių ankstyvos diagnostikos metodų jį nustatyti [1, 4]. Parenkat genų rinkinį aktualu buvo įtraukti s *TP53* geną ir patyrinėti jo mutacijų spektrą ir dažnį, nes yra žinoma, jog II tipo KV būdingas didelis *TP53* mutacijų dažnis siekiantis 98-100 proc. [9, 69, 70]. Mūsų tyrime visi 90 gimdos ertmės nuoplovų mėginių turėjo pakankamą DNR kiekį ir buvo sėkmingai išanalizuoti NKS metodu. Daugiausiai mutacijų analizuojant gimdos ertmės nuoplovas buvo aptiktos II tipo KV grupėje – 62 proc. (23 iš 37). Dažniausios aptiktos mutacijos buvo *TP53* ir *BRCA1/2*. II tipo KV grupės identifikavimas nuoplovose vertinant tik *TP53* mutacijas siekė 27 proc. jautrumą ir 100 proc. specifiškumą. Kontrolinėje grupėje - I tipo KV, endometriumo vėžio, moters lyties organų gerybinių navikų grupėse *TP53* bei *BRCA1/2* mutacijų nuoplovose nebuvo aptikta. Palyginimui, E. Maritschnegg ir kt. tyrime [34, 35] 60 proc. KV pacientų buvo nustatytos *TP53* mutacijos gimdos ertmės nuoplovose. Analizuojant *TP53* mutacijas naudojant standartinę NKS techniką buvo pasiektas aukštas specifiškumas, tačiau pritrūko pageidaujamo klinikinio jautrumo. Tai būtų galima pagerinti naudojant tikslesnę sekos nustatymo techniką, kitokio tipo skystos biopsijos mėginį arba kelių biožymenų kombinaciją. Tame pačiame pilotiniame tyrime, kurį atliko E. Maritschnegg et al. [34], SafeSeqS sekoskaita ir ddPCR metodas

pagerino mutacijų aptikimo nustatymą dar 20 proc., palyginus su įprastu NKS metodu. Vėlesnis tos pačios grupės tyrimas [88] pritaikė itin tikslią dvigrandinės DNR sekvenavimo techniką (angl. *duplex sequencing technique*) 10 gimdos ertmės nuoplovų mėginių mutacijų analizei iš KV pacientų ir parodė didelį jautrumą (*TP53* mutacijos aptiktos 80 proc. KV pacienčių mėginių), tačiau taip pat aptiko žemo dažnio *TP53* mutacijas beveik visose vėžiu nesergančių pacientų nuoplovose. Norint sukurti tinkamą skysčių biopsijos ankstyvos diagnostikos testą labai svarbu rasti tinkamą testo jautrumo ir specifiškumo pusiausvyrą.

Mūsų tyrime gimdos nuoplovų analizė neaptiko 14 iš 24 *TP53* mutacijų, nustatytų audinio biopsijos mėginiuose, kas lėmė atitikimo rodiklį (konkordiskumą) - 69,6 proc. Kitų tyrėjų darbai taip pat parodė tam tikrą neatitikimą tarp skysčių biopsijos ir naviko mutacijų analizės rezultatų KV grupėje. Neseniai atliktas tyrimas [93], kuris analizavo kraujo ctDNR ir audinių mėginių *TP53* mutacijas I ir II tipo KV grupėse, parodė, kad *TP53* rezultatai sutapo 45 proc. (116 iš 258) atvejų, panašus teigiamas atitikimo dažnis buvo mūsų tyrime (41,7 proc.).

II tipo KV gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose *BRCA1* arba *BRCA2* mutacijas aptikome 46 proc. atvejų (82 proc. iš jų buvo germinacinės). Be to, visoms pacientėms kurios buvo operuotos dėl šeiminio krūties ir kiaušidžių vėžio sindromo, gimdos ertmės nuoplovose buvo nustatytos *BRCA1/2* mutacijos. Paprastai *BRCA1/2* mutacijos II tipo KV populiacijoje aptinkamos iki 20-22 proc. [42, 94, 95]. *BRCA1/2* mutacijos daugiausia naudojamos kaip prognostinis biožymuo HGSOE ir tik derinyje su kitais biožymenimis gali pagerinti skystos biopsijos diagnostinį potencialą ankstyvai KV diagnostikai. Nuo 10 proc. iki 15 proc. moterų, kurioms atliekama profilaktinė salpingoovarektomija dėl *BRCA1/2* mutacijos lyginant su bendra populiacija, dažniau diagnozuojama STIC ir jos turi didesnę II tipo KV riziką [60-63]. Daugiau nei 90 proc. STIC pasižymi *TP53* mutacija. Taigi gimdos ertmės nuoplovų metodika teoriškai gali aptikti ankstyvas mutacijas ne tik pradinėje ligos stadijoje bet ir ikivėžinėje būklėje. Mūsų tyrime iš 13 moterų tik vienai buvo nustatytas STIC, tačiau *TP53* mutacijos gimdos ertmės nuoplovose nebuvo aptiktos

Tai pat mūsų kohorteje buvo nustatyti du reti SEOC atvejai. Remiantis literatūros duomenimis teisinga SEOC diagnostika yra tikras iššūkis, ypač kai histologinis tipas yra vienodas. SEOC dažniausiai pasireiškia jaunesnėms moterims prieš menopauzę. SEOC ar metastazavusios gimdos/kiaušidžių ligos nustatymas turi didelę klinikinę reikšmę, nes skiriasi ligos valdymas, prognozė ir bendras išgyvenamumas. Norint tiksliai diagnozuoti SEOC, be įprastinio histopatologinio ištyrimo, gali prireikti papildomų molekulinį ar

imunohistocheminių tyrimų. Gimdos nuoplovų genetinis ištyrimas galėtų pagelbėti diferencinei SEOC diagnostikai. Remiantis literatūros apžvalga vimentino tyrimais, *CTNNB1*, *PAX8* ir β -katenino ekspresijos genų mutacijos molekulinė analizė gali būti naudinga klasifikuojant SEOC tais atvejais, kai klinikiniai ir pataloginiai parametrai yra abejotini [18-22]. Mūsų pasirinktų genetinių biožymenų analizė gimdos ertmės nuoplovose SEOC atvejais pakitimų nenustatė.

Mūsų atliktas tyrimas šiai dienai yra viena didžiausių studijų, kurioje pasitelkus NKS technologiją analizuojama 90 gimdos ertmės nuoplovų mėginių, iš kurių 46 mėginiai buvo KV ir iš jų net 37 pacientės sirgo II tipo KV. Maritschnegg tyrimo imtį sudarė 65 pacientės: 30 I ir II tipo KV, o II tipo KV buvo 23 pacienčių. Ghezelayagh į tyrimą įtraukė 35 pacientes, iš kurių 14 turėjo HGSOE diagnozę ir tik 7 iš jų turėjo porinius mėginius. Mūsų darbe visos gimdos ertmės nuoplovos buvo renkamos trijų gydytojų akušerių ginekologų vienoje ligoninėje, taikant identišką metodiką, kas lėmė gerą nuoplovų paėmimo kokybę. Į vieną iš kontrolinės grupės pogrupį buvo įtrauktos pacientės, operuojamos dėl nustatytos paveldėtos *BRCA1/2* genų patogeninės mutacijos, siekiant nustatyti ikivėžinius pakitimus (STIC). Tokio pobūdžio ikivėžinių pakitimų tyrimų šiai dienai publikuota labai mažai.

Vienas iš mūsų tyrimo trūkumų buvo, kad II tipo KV grupėje dominavo moterys, kurioms nustatyta FIGO III-IV stadija. Į savo tyrimą įtraukėme moteris, kurios buvo operuojamos dėl įtariamo KV ar kitų moters lyties organų navikų. Gimdos ertmės nuoplovos buvo imamos prieš pradedant operaciją, o iki operacijos, dažniausiai histologinis tipas bei galutinė ligos stadija nebuvo žinoma. Po operacijos gavus galutinius histologinius atsakymus paaiškėjo, kad visos pacientėms kurioms buvo įtariama I-II FIGO stadija, buvo ne II tipo kiaušidžių navikai. Todėl II tipo KV (tiriamojoje) grupėje nebuvo nei vienos moters kuriai nustatyta I FIGO stadija, ir tik viena - kuriai nustatyta II ligos stadija. Aptikti II tipo KV FIGO I-II stadijoje yra daugiau sėkmė nei tikslios diagnostikos nuopelnas. Remiantis literatūros duomenimis, žinome, kad daugiau nei 88 proc. II tipo KV diagnozuojama III–IV stadijoje. Mūsų tyrime tik viena *KRAS* mutacija buvo nustatyta I stadijos gimdos ertmės nuoplovose paribinio naviko KV atveju. Tyrimai, į kuriuose buvo įtrauktos ankstyvos stadijos KV moterys, parodė nedidelį mutacijų dažnį skystos biopsijos mėginiuose. Tiek Maritschnegg [34], tiek Kinde [33] tyrimuose dvi iš keturių I stadijos KV moterų turėjo aptinkamas mutacijas gimdos ertmės nuoplovose ir PAP tepinėliuose, o PapSEEK tyrimas parodė panašų mažą 34 proc. specifiškumą ankstyvai stadijai (I-II) [36]. Kitas mūsų tyrimo trūkumas, kad ne visos II tipo KV moterys turėjo biopsinę medžiagą iš

kiaušidžių, kas galėjo neigiamai paveikti mutacijų atitikimo palyginimą tarp skirtingų tos pačios pacientės mėginių.

Gimdos ertmės nuoplovų metodika yra daug žadantis metodas ankstyvai KV diagnostikai, tačiau norint patvirtinti šio metodo klinikinį naudingumą, reikalinga didelės imties studija, įtraukiant daugiau FIGO I-II stadijos II tipo KV pacienčių. Tai pat, norint pasiekti tinkamą diagnostinio tyrimo jautrumą DNR mutacijų analizė turi būti derinama su papildomais biožymenimis.

Mes tikimės rasti biožymenis, kurie ateityje galėtų padėti diagnozuoti KV ankstyvoje stadijoje ar netgi priešvėžinius pokyčius kiaušintakyje (STIC). Planuojama tęsti tyrimą, parenkant optimalaus genu/mutacijų rinkinius KV diagnostikai proksimalinių organizmo skysčių mėginiuose kombinacijoje su papildomai biožymenimis.

6. IŠVADOS

1. Nujos kartos sekoskaitos metodu II tipo kiaušidžių vėžio gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose nustatytos *TP53* (27,0 proc.), *BRCA1* (35,1 proc.), *BRCA2* (10,8 proc.), *PTEN*, *PIK3CA* bei *KRAS* (2,7 proc.) genų mutacijos. Viso genų rinkinio skysčių biopsijos testo jautrumas II tipo kiaušidžių vėžio mėginiuose siekia 64,9 proc., o specifiškumas 66,0 proc.
2. *TP53* geno mutacijos II tipo kiaušidžių vėžio grupėje aptiktos 79,0 proc. kiaušidžių audinio biopsijos mėginių ir tik 41,6 proc. porinių gimdos ertmės nuoplovų mėginių. *TP53* mutacijų analize grįstas skysčių biopsijos testas pasižymi aukštu specifiškumu (100 proc.), bet nepakankamu jautrumu (27 proc.) ankstyvai II tipo kiaušidžių vėžio diagnostikai.
3. Ketvirtos FIGO stadijos II tipo kiaušidžių vėžio grupėje gimdos ertmės nuoplovose nustatoma daugiau mutacijų, nei II-III stadijos grupėje. Priešoperacinė CA-125 koncentracija kraujyje tiesiogiai koreliuoja su mutacijų kiekiu gimdos ertmės nuoplovų mėginiuose.
4. SEOC navikams būdingos mutacijos nebuvo aptiktos skysčių biopsijos mėginiuose. SEOC diagnostinių žymenų paiešką būtina tęsti didesnėse šių retų navikų imtyse.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Gimdos ertmės nuoplovų paėmimo technika naudojant histerosalpingografijos kateterį yra tinkama surinkti kiaušidžių, ednometriumo naviko ląsteles ir laisvą cirkuliuojančią DNR.
2. Norint pritaikyti gimdos nuoplovų metodą ankstyvai kiaušidžių vėžio diagnostikai reikalingi tolesni tyrimai didesnėse nepriklausomose imtyse taikant didesnį genų ar biožymenų derinių rinkinį (miRNR, DNR metilinimas ir kt.).
3. Naujos kartos sekoskaita yra tinkamas metodas navikinės DNR ištyrimui ir analizei iš gimdos ertmės nuoplovų, tačiau norint pagerinti klinikinį jautrumą, rekomenduojama taikyti jautresnius tyrimo metodus.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
2. Vėžys Lietuvoje 2014 m. Prieiga per internetą: https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.nvi.lt%2Fuploads%2Fpdf%2FVežio%2520registras%2FKnygele%25202015_nvi.lt.xlsx&wdOrigin=BROWSELINK
3. European Cancer Information System (ECIS). Prieiga per internetą: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>
4. Jessmon P, Boulanger T, Zhou, W, Patwardhan P. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer. *Expert Rev.Anticancer. Ther.* 2017, 17, 5427–5437.
5. Kurman RJ, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer. Shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011 Jul;42(7):918-31. doi: 10.1016/j.humpath.2011.03.003. PMID: 21683865; PMCID: PMC3148026.
6. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 4th ed.; WHO: Geneva, Switzerland, 2014.
7. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent Concepts of Ovarian Carcinogenesis: Type I and Type II. *BioMed Res. Int.* 2014, 934261. [CrossRef] [PubMed]
8. Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, Walsh T, Lee MK et al. Inherited Mutations in Women with Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2016, 2, 482–490.
9. Yamulla RJ, Nalubola S, Flesken-Nikitin A, Nikitin AY, Schimenti JC. Most Commonly Mutated Genes in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Are Nonessential for Ovarian Surface Epithelial Stem Cell Transformation. *Cell Rep.* 2020 Sep 1;32(9):108086. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108086. PMID: 32877668; PMCID: PMC7545232.
10. Temkin SM, Miller EA, Samimi G, Berg CD, Pinsky P et al. Outcomes from ovarian cancer screening in the PLCO trial: Histologic heterogeneity impacts detection, overdiagnosis and survival. *Eur. J. Cancer* 2017, 87, 182–188.

11. Moss E, Hollingworth J, Reynolds TM. The role of CA125 in clinical practice. *J. Clin. Pathol.* 2005, 58, 308–312. *Cancers* 2021, 13, 3840 14 of 17
12. Jia M, Deng J, Cheng X, Cheng Z, Yan LQC et al. Diagnostic accuracy of urine HE4 in patients with ovarian cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* 2017, 8, 9660–9671.
13. Romagnolo C, Leon AE, Fabricio AS, Taborelli M, Polesel J et al. HE4, CA125 and risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) as diagnostic tools for ovarian cancer in patients with a pelvic mass: An Italian multicenter study. *Gynecol. Oncol.* 2016, 141, 303–311.
14. Wei S, Li H, Zhang B. The diagnostic value of serum HE4 and CA-125 and ROMA index in ovarian cancer. *Biomed. Rep.* 2016,5, 41–44.
15. Kobayashi H, Yamada Y, Sado T, Sakata M, Yoshida S et al. A randomized study of screening for ovarian cancer: A multicenter study in Japan. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2008, 18, 414–420.
16. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Singh N, Ryan A et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2021 Jun 5;397(10290):2182-2193. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00731-5. Epub 2021 May 12. PMID: 33991479; PMCID: PMC8192829.
17. Charkhchi P, Cybulski C, Gronwald J, Wong FO, Narod SA et al. CA125 and Ovarian Cancer: A Comprehensive Review. *Cancers* 2020, 12, 3730. <https://doi.org/10.3390/cancers12123730>
18. Song T, Seong SJ, Bae DS, Suh DH, Kim DY et al. Synchronous primary cancers of the endometrium and ovary in young women: a Korean gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol.* 2013;131(3):624–8.
19. Shin W, Park SY, Kang S. How to manage synchronous endometrial and ovarian cancer patients?. *BMC Cancer* 21, 489 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08220-w>
20. Matias-Guiu X and Stewart CJR: Endometriosis-associated ovarian neoplasia. *Pathology.* 50:190–204. 2018.
21. Amaral PI, Silva A, Lacerda A, Barros C. Synchronous endometrioid endometrial and ovarian cancer in a 34-year-old woman. *BMJ Case Rep.* 2015 Sep 8;2015:bcr2015210940. doi: 10.1136/bcr-2015-210940. PMID: 26351313; PMCID: PMC4567756.
22. Anglesio MS, Wang YK, Maassen M, Horlings HM, Bashashati A, Senz J, et al. Synchronous endometrial and ovarian carcinomas: evidence of clonality. *Journal of the National Cancer Institute.* 2016; 108: djv428.
23. Zaino R, Whitney C, Brady MF, DeGeest K, Burger RA, et al. Simultaneously detected endometrial and ovarian carcinomas—a

- prospective clinicopathologic study of 74 cases: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol.* 2001; 83:355–62.
24. Mari R, Mamessier E, Lambaudie E, Provansal M, Birnbaum D et al. Liquid Biopsies for Ovarian Carcinoma: How Blood Tests May Improve the Clinical Management of a Deadly Disease. *Cancers* 2019, 11, 774. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
 25. Barbosa A, Peixoto A, Pinto P, Pinheiro M, Teixeira MR. Potential clinical applications of circulating cell-free DNA in ovarian cancer patients. *Expert Rev. Mol. Med.* 2018, 20, e6. [Google Scholar] [CrossRef]
 26. Li B, Pu K, Ge L, Wu X. Diagnostic significance assessment of the circulating cell-free DNA in ovarian cancer: An updated meta-analysis. *Gene* 2019, 714, 143993. [Google Scholar] [CrossRef]
 27. Kamat M, Baldwin D, Urbauer D, Dang LY, Han A et al. Plasma cell-free DNA I ovarian cancer. *Cancer* 2010, 116, 1918–1925. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed][Green Version]
 28. Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z et al. Circulating cell free DNA as the diagnostic marker for ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2016, 11, e0155495. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
 29. Phallen J, Sause M, Adleff V, Leal A, Hruban C et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci. Transl. Med.* 2017, 9, 403.
 30. Du-Bois Asante L, Calapre M, Ziman TM, Meniawy EG. Liquid biopsy in ovarian cancer using circulating tumor DNA and cells: Ready for prime time? *Cancer Lett.* 2020, 468, 59–71.
 31. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y et al. Detection of circulating tumor DNA in early-and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 2014, 6, 224. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
 32. Piskorz A, Lin K, Morris JA, Mann E, Oza AM et al. Feasibility of Monitoring Response to the PARP Inhibitor Rucaparib with Targeted Deep Sequencing of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Women with High-Grade Serous Carcinoma on the ARIEL2 Trial. *J. Clin. Oncol.* 2016, 34, 15.
 33. Kinde I, Bettgowda C, Wang Y, Wu J, Agrawal N et al. Evaluation of DNA from the papanicolaou test to detect ovarianand endometrial cancers. *Sci. Transl Med.* 2013, 5, 167ra4.
 34. Maritschnegg E, Wang Y, Pecha N, Horvat R, Van Nieuwenhuysen et al. Lavage of the Uterine Cavity for Molecular Detection of Müllerian

- Duct Carcinomas: A Proof-of-Concept Study. *J. Clin. Oncol.* 2015, 33, 4293–4300.
35. Maritschnegg E, Heitz F, Pecha N, Bouda J, Trillsch F et al. Uterine and Tubal Lavage for Earlier Cancer Detection Using an Innovative Catheter: A Feasibility and Safety Study. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2018, 28, 1692–1698. [Google Scholar] [CrossRef].
 36. Wang Y, Li L, Douville C, Cohen JD, Yen TT et al. Evaluation of liquid from the Papanicolaou test and other liquid biopsies for the detection of endometrial and ovarian cancers. *Sci. Transl. Med.* 2018, 10, eaap8793.
 37. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/ovarian-cancer-statistics/>
 38. Gaona-Luviano P, Medina-Gaona LA, Magaña-Pérez K. Epidemiology of ovarian cancer. *Chin Clin Oncol.* 2020 Aug;9(4):47. doi: 10.21037/cco-20-34. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32648448.
 39. Noone AM, Howlander N, Krapcho M, Miller D, Brest A et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2015; Based on November 2017 SEER Data Submission, Posted to the SEER Web Site; National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, 2018.
 40. Manchana T, Phoolcharoen N, Tantbiroj P. BRCA mutation in high grade epithelial ovarian cancers. *Gynecologic Oncology Reports*, Volume 29, 2019, 102-105. <https://doi.org/10.1016/j.gore.2019.07.007>.
 41. Denkert C, Romey M, Swedlund B, Hattesoehl A, Teply-Szymanski J et al. Homologous Recombination Deficiency as an Ovarian Cancer Biomarker in a Real-World Cohort: Validation of Decentralized Genomic Profiling. *J Mol Diagn.* 2022 Dec;24(12):1254-1263. doi: 10.1016/j.jmoldx.2022.09.004. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36191839.
 42. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2022 May 26]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>
 43. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health.* 2019 Apr 30;11:287-299. doi: 10.2147/IJWH.S197604. PMID: 31118829; PMCID: PMC6500433.
 44. Whelan E, Kalliala I, Semertzidou A, Raglan O, Bowden S et al. Risk Factors for Ovarian Cancer: An Umbrella Review of the Literature. *Cancers.* 2022; 14(11):2708. <https://doi.org/10.3390/cancers14112708>
 45. Whiteman DC, Webb PM, Green AC, Neale RE, Fritschi L et al. Cancers in Australia in 2010 attributable to modifiable factors: Summary and conclusions. *Aust. New Zealand J. Public Health* 2015, 39, 477–484.

46. Höhn AK, Brambs CE, Hiller GGR, May D, Schmoeckel E et al. 2020 WHO Classification of Female Genital Tumors. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2021 Oct;81(10):1145-1153. doi: 10.1055/a-1545-4279. Epub 2021 Oct 6. PMID: 34629493; PMCID: PMC8494521.
47. Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol.* 2008;27:161–174.
48. Köbel M, Kang EY. The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification. *Cancers* 2022, 14, 416. <https://doi.org/10.3390/cancers14020416>
49. Hirst J, Crow J, Godwin A. Ovarian Cancer Genetics: Subtypes and Risk Factors. DOI: 10.5772/intechopen.72705.
50. Ramus SJ, Song H, Dicks E, Tyrer JP, Rosenthal AN et al. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2 and NBN Genes in Women with Ovarian Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015, 107, djv214. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
51. Levine DA. Network, T. C. G. A. R. (2013) „Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma“, *Nature*. Nature Publishing Group, 497(7447), p. 67–73. doi: 10.1038/nature12113.
52. Singer G, Oldt R, Cohe Y, Wang B, Sidransky D et al. Mutations in BRAF and KRAS Characterize the Development of Low-Grade Ovarian Serous Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95, 484–486. [CrossRef].
53. Ricci F, Affatato R, Carrassa L, Damia G. Recent insights into mucinous ovarian carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1569 [CrossRef].
54. Brilhante AVM, Augusto KL, Portela MC, Sucupira LCG, Oliveira LAF et al. Endometriosis and ovarian cancer: An integrative review (endometriosis and ovarian cancer). *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2017, 18, 11–16.
55. Siebe NLG, Macropoulos P, Roemen GMJM. In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J. Pathol.* 2004, 202, 336–340.
56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567760/>
57. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Berchuck A, Berek JS et al. Rethinking ovarian cancer: Recommendations for improving outcomes. *Nat. Rev. Cancer* 2011, 11, 719–725.
58. Network, C.G.A.R. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011, 474, 609–615.
59. Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, Garber JE, Cramer DW, Crum CP. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2006 Feb;30(2):230-6. doi: 10.1097/01.pas.0000180854.28831.77. PMID: 16434898.

60. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom, RJ et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J. Pathol.* 2001, 195, 451–456.
61. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 1511–1518.
62. Kurman R.J. (2013) „Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma“, 24 (Supplement 10). doi: 10.1093/annonc/mdt463.
63. Crum CP, Drapkin R, Miron A. The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007;19:3–9. doi: 10.1097/GCO.0b013e328011a21f.
64. Kroeger PTJ, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology: February 2017 - Volume 29 - Issue 1 - p 26-34* doi: 10.1097/GCO.0000000000000340.
65. Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih IM. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2002, 160, 1223–1228. [CrossRef]
66. Colina J, Varughese P, Karthikeyan S, Salvi A, Modi D, Burdette JE, Reduced PAX2 expression in murine fallopian tube cells enhances estrogen receptor signaling, *Carcinogenesis*, (2019).
67. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol.* 2007 Jan;211(1):26-35. doi: 10.1002/path.2091. Erratum in: *J Pathol.* 2007 Sep;213(1):116. PMID: 17117391.
68. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Apr;20(4):199-210. doi: 10.1038/s41580-019-0110-x. PMID: 30824861.
69. Zhang Y, Cao L, Nguyen D, Lu H. TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Transl. Cancer Res.* 2016, 5, 650–663.
70. Bergsten TM, Burdette JE, Dean M. Fallopian tube initiation of high grade serous ovarian cancer and ovarian metastasis: Mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 2020 Apr 28;476:152-160. doi: 10.1016/j.canlet.2020.02.017. Epub 2020 Feb 15. PMID: 32067992; PMCID: PMC7069002.
71. Labidi-Galy SI, Papp E, Hallberg D, Niknafs N, Adleff V et al. High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat*

- Commun. 2017 Oct 23;8(1):1093. doi: 10.1038/s41467-017-00962-1. PMID: 29061967; PMCID: PMC5653668.
72. El Bairi K, Al Jarroudi O, Le Page C, Afqir S. Does the “Devil” originate from the fallopian tubes? *Semin. Cancer Biol.* 2021, inpress; ISSN 1044-579X. [CrossRef]
 73. Seidman JD, Khedmati F. Exploring the histogenesis of ovarian mucinous and transitional cell (Brenner) neoplasms and their relationship with walthard cell nests: A study of 120 tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008, 132, 1753–1760. [CrossRef]
 74. Bell D, Berchuck A, Birrer M. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011, 474, 609–615.
 75. Testa U, Petrucci E, Pasquini L, Castelli G, Pelosi E. Ovarian cancers: Genetic abnormalities, tumor heterogeneity and progression, clonal evolution and cancer stem cells. *Medicine* 2018, 5, 16.
 76. Vang R, Shih IM, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: Pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv. Anat. Pathol.* 2009, 16, 267–282. [CrossRef]
 77. Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR et al The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet.* 2013 Oct;45(10):1113-20. doi: 10.1038/ng.2764. PMID: 24071849; PMCID: PMC3919969
 78. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/tp53/>
 79. Iijima M, Banno K, Okawa R, Yanokura M, Iida M et al. Genome-wide analysis of gynecologic cancer: The Cancer Genome Atlas in ovarian and endometrial cancer. *Oncol Lett.* 2017 Mar;13(3):1063-1070. doi: 10.3892/ol.2017.5582. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28454214; PMCID: PMC5403284..
 80. Virani S, Baiocchi G, Bowtell D, Cabasag CJ, Cho KR et al. IARC/NCI International Cancer Seminar Series Report: expert consensus on future directions for ovarian carcinoma research, *Carcinogenesis*, Volume 42, Issue 6, June 2021, Pages 785–793, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgab043>.
 81. Brachova P, Thiel KW, Leslie KK. The Consequence of Oncomorphic TP53 Mutations in Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2013,14,19257-19275. <https://doi.org/10.3390/ijms140919257>.
 82. Seagle BL, Eng KH, Dandapani M, Yeh JY, Odunsi K et al. Survival of patients with structurally-grouped TP53 mutations in ovarian and breast cancers. *Oncotarget* 2015, 6, 18641–18652.

83. Tuna M, Ju Z, Yoshihara K. Clinical relevance of TP53 hotspot mutations in high-grade serous ovarian cancers. *Br J Cancer* 122, 405–412 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0654-8>.
84. Martins FC, Couturier DL, Paterson A. Clinical and pathological associations of PTEN expression in ovarian cancer: a multicentre study from the Ovarian Tumour Tissue Analysis Consortium. *Br J Cancer* 123, 793–802 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0900-0>
85. Gorski JW, Ueland FR, Kolesar JM. CCNE1 Amplification as a Predictive Biomarker of Chemotherapy Resistance in Epithelial Ovarian Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2020 May 5;10(5):279. doi: 10.3390/diagnostics10050279. PMID: 32380689; PMCID: PMC7277958.
86. Soliman PT, Slomovitz BM, Broaddus RR, Sun CC, Oh JC, Eifel PJ, Gershenson DM, Lu KH. Synchronous primary cancers of the endometrium and ovary: a single institution review of 84 cases. *Gynecol Oncol*. 2004; 94:456–62.
87. Chen T, Brenner H, Fallah M, Jansen L, Castro FA, Geiss K, Holleczeck B, Katalinic A, Luttmann S, Sundquist K, Ressing M, Xu L, Hemminki K. Risk of second primary cancers in women diagnosed with endometrial cancer in German and Swedish cancer registries. *Int J Cancer*. 2017;141:2270–2280.
88. Ulbright TM, Roth LM. Metastatic and independent cancers of the endometrium and ovary: a clinicopathologic study of 34 cases. *HumPathol*.1985;16(1):28–34. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(85\)80210-0](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(85)80210-0).
89. Scully RE YR, Clement PB . Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Ovary, Maldeveloped Gonads, Fallopian Tube and Broad Ligament 1998;27–50.
90. Scully RE, Young RH. Metastatic Tumors of the Ovary. In: Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnett BM, editors. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Cham: Springer International Publishing; 2002. p. 987–90.
91. Piskorz, A.; Lin, K.; Morris, J.A.; Mann, E.; Oza, A.M.; Coleman, R.L. Feasibility of Monitoring Response to the PARP Inhibitor Rucaparib with Targeted Deep Sequencing of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Women with High-Grade Serous Carcinoma on the ARIEL2 Trial. *J. Clin. Oncol*. 2016, 34, 15.
92. Zaino R, Whitney C, Brady MF, DeGeest K, Burger RA, Buller RE. Simultaneously detected endometrial and ovarian carcinomas—a

- prospective clinicopathologic study of 74 cases: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol.* 2001; 83:355–62.
93. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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. doi: 10.1038/gim. 2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
 94. Candido-dos-Reis FJ, Song H, Goode EL, Cunningham JM, Fridley B Let al. Germline mutation in BRCA1 or BRCA2 and ten-year survival for women diagnosed with epithelial ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2015, 21, 652–657.
 95. Cass I, Holschneider C, Datta N, Barbuto D, Walts AE, Karlan BY. BRCA-mutation-associated fallopian tube carcinoma: a distinct clinical phenotype? *Obstet Gynecol.* 2005 Dec;106(6):1327-34. doi: 10.1097/01.AOG.0000187892.78392.3f. PMID: 16319259.

9. TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ

9.1 Gyvenimo aprašymas

Vardas, pavardė: Diana Žilovič

Darbovietės adresas: Santariškių g. 1, Vilnius, LT-08660 Lietuva

Informacija kontaktams: Mob. tel.: +37067333367;

e-paštas: diana.zilovic@nvi.lt

Darbovietė: Nacionalinis vėžio institutas Santariškių g. 1, Vilnius, LT-08660 Lietuva

Veiklos sritis: Gydytoja akušerė ginekologė Nr. MPL-23731

Išsilavinimas:

- Medicinos magistro kvalifikacinis laipsnis, 2015-06-29, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
- Gydytojo akušerio ginekologo kvalifikacija, 2019-06-22, Vilniaus universitetas
- Nuo 2018 doktorantūros studijos Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, biomokslų institute

Kalbos:

- Rusų – C2
- Anglų – C1
- Ispanų – A1

Profesinės draugijos:

1. Lietuvos gydytojų sąjungos narė.
2. Lietuvos akušerių ir ginekologų draugijos narė
3. European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) narė.
4. ENYGO (European Network of Young Gynaecological Oncologists) narė.

Darbo patirtis:

Nuo 2019 m. Nacionalinio vėžio instituto Onkoginekologijos skyriaus, gydytoja akušerė ginekologė bei jaunesnioji mokslo darbuotoja.

Dalyvavimas klinikiniuose tyrimuose: Nuo 2018 m. tyrėja klinikiniame tyrime: „Biožymenų paieška gimdos ertmės nuoplovose kiaušidžių vėžio diagnostikai predikcijai“.

9.2 Publikacijų sąrašas

9.2.1 Straipsniai disertacijos tema

1. D. Žilovič, R. Čiurliene, R. Sabaliauskaite, S. Jarmalaitė. Future screening prospects for ovarian cancer. *Cancers* 2021, 13, 3840. <https://doi.org/10.3390/cancers13153840>.
2. Žilovič D, Vaicekauskaitė I, Čiurlienė R, Sabaliauskaitė R, Jarmalaitė S. Uterine cavity lavage mutation analysis in lithuanian ovarian cancer patients. *Cancers (base)*. 2023 jan 30; 15(3):868. Doi: 10.3390/cancers15030868. Pmid: 36765826; pmcid: pmc9913062.
3. Žilovič D, Čiurlienė R, Šidlovskaja E, Vaicekauskaitė I, Sabaliauskaitė R, Jarmalaitė S. Synchronous endometrial and ovarian cancer: A case report. *World J Clin Cases* 2023; 11(18): 4341-4349 [DOI: 10.12998/wjcc.v11.i18.4341].

9.2.2 Straipsniai ne disertacijos tema

1. R. Liutkevičienė, G. Mečėjus, D. Žilovič, Ž. Bumbulienė. Endometrial biopsy and density of nerve fibers in eutopic endometrium. Looking for easier ways to diagnose endometriosis. *Gynecological endocrinology*. Received 22 jan 2019, accepted 02 jul 2019, published online: 19 jul 2019.
2. R. Čiurlienė, D. Žilovič, K.E. Romeikienė, E. Šidlovskaja. Minimally invasive surgery and sentinel lymph node biopsy – a modern standart of uterine confined endometrial cancer treatment: reviewing literature and presenting the national cancer institute experience. *Lietuvos chirurgija*. 19,3-4 (dec. 2020), 120-127.
3. D. Žilovič, D. Čerkauskaitė, K. Kvitkovskaja, R. Čiurlienė. Intravenous leiomyomatosis. Case report. *Journal of medical sciences*. Jan 30, 2021 volume 9 | issue 1. Electronic - issn: 2345-0592.
4. Vaicekauskaitė, I.; Dabkevičienė, D.; Šimienė, J.; Žilovič, D.; Čiurlienė, R.; Jarmalaitė, S.; Sabaliauskaitė, R. ARID1A, NOTCH and WNT Signature in Gynaecological Tumours. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 5854. <https://doi.org/10.3390/ijms24065854>

9.2.3 Pranešimai disertacijos tema

1. Zilovic D, Vaicekaskaitė I, Ciurliene R, Sabaliauskaite R, Jarmalaitė S. Stendinis pranešimas „ Analysis of uterine lavage for early ovarian cancer detection “. ESGO State of the Art virtual conference, Berlynas, 2020 12.
2. Vaicekaskaitė I, Zilovic D, Ciurliene R, Sabaliauskaite R, Jarmalaitė S. Stendinis pranešimas „Targeted sequencing of uterine lavage fluid for early detection of gynecologic cancer“. ESGH, Austrija.
3. Vaicekaskaitė I, Sabaliauskaite R, Zilovic D, Ciurliene R, Lazutka J.R, Jarmalaitė S. Stendinis pranešimas “Prognostic insights from the analysis of uterine lavage samples in ovarian cancer patients“. FEBS3+ Conference of Estonian, Latvian and Lithuanian Biochemical Societies. Talinn, Estonia, 2022 06.
4. Vaicekaskaitė I, Sabaliauskaite R, Zilovic D, Ciurliene R, Lazutka J.R, Jarmalaitė S. Stendinis pranešimas „Uterine lavage fluid for molecular identification of high grade ovarian cancer“. ESGH, Viena, Austrija , 2022 06.

9.2.4 Pranešimai ne disertacijos tema

1. D. Žilovič, R. Čiurlienė. Žodinis pranešimas „Gimdos kūno vėžio gydymo galimybės“ konferencijoje “Vėžio metastazių chirurginis gydymas“. Vilnius, 2018 m.
2. D.Žilovič, R. Čiurlienė. Stendinis pranešimas „Pelvic parachordoma: rare tumor case report” konferencijoje „1st baltic conference of gynaecological oncology” Vilnius, 2018 m.
3. D. Žilovič, R. Čiurlienė. Stendinis pranešimas „Impact of hipec on disease relapse pattern in recurrent ovarian cancer patients” konferencijoje „10th International Charité-Mayo-conference. Global perspectives and future directions in women’s cancer”. Vokietija, Berlynas, 2019 m.
4. D. Žilovič, R. Čiurlienė. Žodinis pranešimas „Klaidų kultūra ginekologijoje. Jaunojo gydytojo žvilgsnis” konferencijoje „Klinikinė ginekologija: kasdien pritaikomos žinios ir įgūdžiai”. Vilnius, 2020m.
5. D. Žilovič, R. Čiurlienė. Žodinis pranešimas „Hormonus gaminantys navikai” konferencijoje „Ginekologinė endokrinologija: patikrintos tiesios ir naujos išvalgos”. Vilnius, 2021m.
6. D. Žilovič, R. Čiurlienė. Žodinis pranešimas “ ŽPV reiškėmė navikų išsivystymui, vakcinacijos nuo ŽPV aktualijos. Kaip keičiasi gimdos kaklelio

vėžio ankyvosios patikros programa?“ IV-oje prof. L. L. Griciūtės vardo konferencijoje „Vėžio prevencijos, diagnostikos ir gydymo aktualijos 2022“. Vilnius, 2022 m.

9.3 Stažuotės

Stazuotė JAV, Arizonoje nuo 2018 11 03 iki 2018 12 16 “Mayo clinic”.

Stazuotė Danijoje, Odense nuo 2022 01 03 iki 2022 01 14 “Odense University Hospital”.

10. SUMMARY

LIST OF ACRONYMS

AUC – Area under the curve
CA-125 – cancer marker carbohydrate antigen 125
ctDNA – circulating tumor DNA
HGSOC – high grade serous ovarian carcinoma
HE4 – human epidermis protein 4
NGS – next-generation sequencing
NPV – negative predictive value
OC – ovarian cancer
PPV – positive predictive value
ROC – Receiver operating characteristic
ROMA index – risk of ovarian algorithm index
SEOC – synchronous endometrial and ovarian cancer
STIC – serous tubal intraepithelial carcinoma

10.1 Introduction

10.1.1 Relevance of the study

Ovarian cancer (OC) is the most lethal gynecological malignancy. Worldwide, in 2020, approximately 207 thousand women died from this disease [1]. In Lithuania, about 400 new cases of OC are diagnosed per year. The relative five-year survival rate of OC is 47% and varies greatly depending on the stage of the disease and the histological type of OC [2 -4]. When the disease is detected at stage FIGO stage I five-year survival rate is 92% , and in FIGO stage III-IV only 17- 40 %. Due to the lack of early OC symptoms and effective screening approaches, approximately 60-70% of OC cases are diagnosed in advanced stages. High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) is the most common and most aggressive type of OC. This type of OC accounts for 70-80% of all cases of epithelial OC and more than 88% of HGSOC is diagnosed in FIGO stage III- IV [2, 3].

The initial mechanism of cancer pathogenesis is damage to the genes that are responsible for controlling the cell cycle, transmitting the growth signal and the signal of apoptosis. OC, like other oncological diseases, is caused by multiple genetic and epigenetic lesions. OC has the largest hereditary genetic

component of all oncological diseases: recent studies show that up to 20% of OC can be genetically caused [5-9].

OC is most often diagnosed at stage FIGO III-IV, since the clinic of the disease is not specific and there are no effective methods of early diagnosis. Traditional methods of diagnosing OC are: transvaginal ultrasonography, cancer marker carbohydrate antigen 125 (CA-125) and human epidermis protein 4 (HE4) ± ROMA index (Risk of Ovariancy Algorithm). A number of clinical trials have been conducted to find out the effectiveness of OC screening methods – PLCO, UKCTOCS, ROCA, GOG0199, Shizuoka and others. Their results are very similar – such screening (CA-125 and transvaginal ultrasound) does not reduce mortality [10-17].

HGSOC is believed to arise in the fallopian tube epithelium, and mutations in the tumor suppressor gene *TP53* are believed to be a very early event in the carcinogenesis of HGSOC [5-9]. An important feature of HGSOC, which may facilitate early detection, is the high prevalence of *TP53* mutations (>96%), even in premalignant lesions. Despite years of research, the diagnosis of early-stage cancer remains extremely challenging. In recent years there has been a significant amount of research into the use of ctDNA (circulating tumor DNA) in uterine lavage as a potential biomarker. Uterine lavage ctDNA is a promising liquid biopsy technique: unlike regular biopsies, uterine lavage samples are relatively non-invasive and repeatable, thus may be used for patient screening and monitoring [24-36].

10.1.2 Aim of the dissertation

Identify type II ovarian cancer and SEOC - specific mutations and develop a low-invasive test for early diagnosis of the disease.

10.1.3 Objectives

1. Using uterine lavage identify type II OC-specific gene mutations and to evaluate the characteristics of the genetic test.
2. Assess the possibility of detecting *TP53* mutation in type II OC tissue biopsy and uterine lavage samples.
3. Determine the correlations of the selected genetic biomarkers with the clinical characteristics of type II OC.
4. Evaluate the diagnostic value of the genetic test in differential diagnosis for SEOC.

10.1.4 Novelty and practical relevance

The problem of early diagnosis of OC remains very acute, since the existing diagnostic markers CA-125 and HE4 are characterized by low sensitivity and specificity [10-17]. Biomarkers that can be used in screening programs and could improve survival are a priority for our study. One such method could be DNA testing of tumor cells in samples that would be taken from the uterine cavity using a thin catheter to collect a larger amount of migrating cells from the fallopian tubes and ovaries (closer to the primary tumor). To date, published DNA mutation tests in proximal body tissue samples have only been studied in pilot studies for advanced cancer (FIGO stage III-IV), and the studies have been small in samples. In this biomedical study, we sought to find biomarkers that could help diagnose OC in the early stages or even precancerous changes in the fallopian tube (serous tubal intraepithelial carcinoma -STIC) in the future. The data accumulated during the study will help to assess the suitability of uterine lavage as a test substance for the early diagnosis of OC [24-36].

10.2 Materials and methods

10.2.1 Patient cohort

The patient cohort consisted of 90 patients which undergone surgery with pre-operative concern for an ovarian malignancy, uterine cancer, benign gynecological tumor or prophylactic salpingoovarectomy for the identified *BRCA 1/2* germline mutation at National cancer institute between 2018 and 2021 year. Overall, the patient cohort consisted of 37 patients 48 with type II OC (HGSOC) and 53 patients in the control group, further subdivided into four smaller groups: 9 patients with non type II OC (1 clear cell, 3 borderline, 2 mucinous, 2 with simultaneous endometrioid ovarian and endometrial malignant tumor, 1 granulosa cell tumor), 12 patients with endometrial carcinoma, 19 cases with benign gynecologic tumors, and 13 patients that are known *BRCA1/2* mutation carriers, who underwent risk-reducing surgery in hereditary breast and ovarian cancer (RRS) (figure 1). All participants were informed about the study and signed a written consent form. The study was approved by the regional bioethics committee (no. 158200-18/5-988-539).

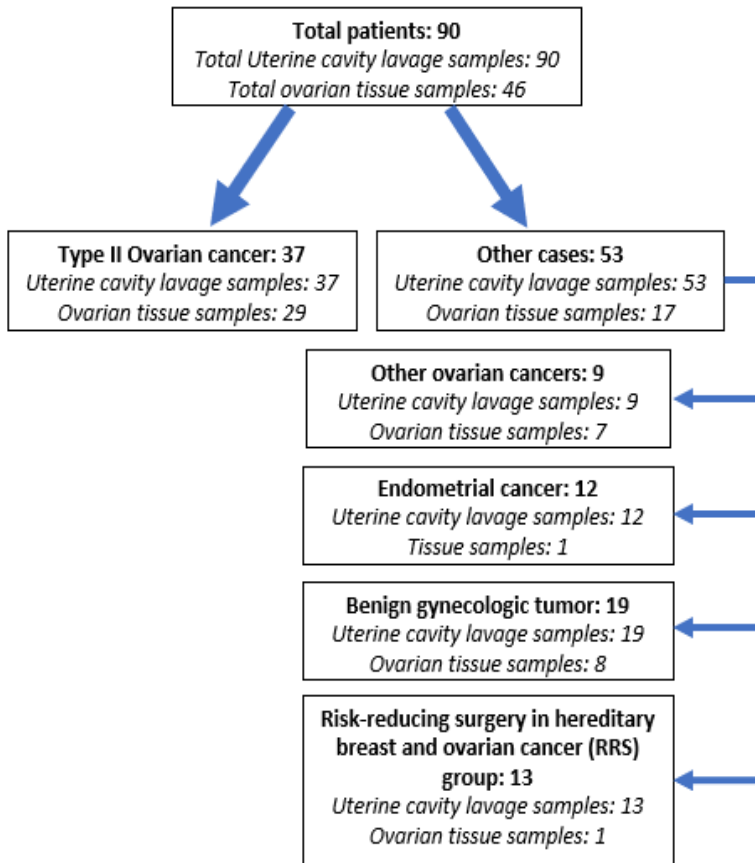


Figure 1. Schematic representation of the study cohort

10.2.2 Uterine cavity lavage and ovarian tissue sample collection and DNA extraction

Uterine lavage samples were successfully collected from 90 patients following a protocol under the general anesthesia before surgery. Using a bullet forceps, the cervix was grasped and a two-way hysterosalpingography catheter was inserted into the cervical canal, and the balloon was inflated with approximately 2-3 mL of saline to seal the cervical canal to prevent retrograde leakage of saline. One 5 mL syringe containing 5 mL of saline was connected to the catheter tube. By pushing on the plunger of the syringe containing saline, the uterine cavity and fallopian tubes were slowly perfused. Then the syringe was gently pulled out and uterine lavage was collected. Finally, the balloon was deflated, and the catheter was removed. Immediately following collection procedure, the uterine lavage sample was centrifuged for 15 minutes at 2000×g. The resulting supernatant was discarded and the cellular

debris was washed with 2 mL phosphate buffered saline (PBS) solution. The resulting uterine lavage cell pellet was resuspended in 2 mL PBS and stored at -80°C until use. 1 mL of uterine lavage sample was used for DNA extraction using Magmax™Cell- 77 free Isolation Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (TFS), Foster, CA, USA) following the manufacturer's protocol. The final tissue and uterine cavity lavage DNA samples were stored at -20°C until library preparation.

During surgery, a small sample of tumor tissue was allocated for analysis and immediately stored at -80°C. 46 paired tissue and uterine lavage samples were collected for the analysis: 29 type II OC, 7 other ovarian tumors, 1 endometrial cancer, and 1 RRS group, 8 83 benign tumors. For genomic DNA extraction, the ovarian tissue samples were mechanically homogenized in liquid nitrogen using mortar and pestle. 10-20 mg of tissue powder was digested with proteinase K (ThermoScientific, TFS, Vilnius, Lithuania) for 16 hours, then genomic DNA was purified following standard phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation protocols. Final DNA was dissolved in nuclease free water (Invitrogen, TFS, Austin, TX, USA). and stored at -20°C until further steps.

10.2.3 Targeted next-generation sequencing

In all, 136 samples (90 uterine cavity lavage and 46 tissue) were sequenced using custom targeted 6 gene panel which included genes commonly associated with ovarian and endometrial cancers (*TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *KRAS*, *PTEN*). DNA concentration was determined using Qubit™dsDNA HS Assay Kit on a Qubit™2.0 Fluo-rimeter (Invitro-gen, TFS, Eugene, OR USA). Up to 10 ng/sample of genomic DNA was used for library preparation using AmpliSeq™ Library Kit 2.0 and Ion AmpliSeq™Custom DNA Panel (Life Technologies (LT), Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's recommendations. Ion Library TaqMan™Quantification Kit (AB, TFS, Vilnius, Lith-uania) was used for the sequencing library quantification. The next-generation sequencing was carried out using the Ion Tor- rent™Ion S5™system on Ion 530™chips. Data analysis was conducted automatically on the Ion Reporter 5.18 tool (LT, Carlsbad, CA, USA) where sequence reads were aligned to human reference genome 19 (Genome Reference Consortium GRCh37). Additionally, each alignment was visualized and verified using the Integrative Genomics Viewer 2.4.8 tool. All detected variants were clas-sified according to American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) recommendations using ClinVar (NCBI) database.

10.2.4 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out using the R package (version 4.0.3). The data for the two classes were presented in the form of proportion (p) and 95 percent confidence interval (CI). Homogeneity between groups was analyzed using nonparametric Friedman for testing related samples. Uniform distribution in each group was considered a zero hypothesis, while the existing significant differences are formulated as an alternative hypothesis. Uterine lavage mutation performance for Type II OC classification characteristics (sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) was calculated. Uterine lavage mutation predictive value of Type II disease was assessed using risk ratio and odds ratio characteristics. To assess the prognostic value of genes in type II OC in uterine lavage, ROC curves were plotted and the areas under the curves (AUC) were calculated.

10.3 Results of the study

10.3.1 Mutation analysis in uterine cavity lavage samples

Mutation analysis of 6 ovarian cancer-related genes (*TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *PTEN* and *KRAS*) was first performed in 90 uterine lavage samples. 41 (45.6%) samples had at least one mutation. Of them, four (4.4%) samples had two, another four (4.4%) had three alterations, and one patient had four alterations detected. More than half (29/56 51.8%) of detected mutations was found in type II OC group. Of them 11 (37.9%) were *TP53* missense and nonsense mutations, 13 (44.8%) *BRCA1*, 4 (13.8%) *BRCA2* mutations and one *PI3KCA* missense mutation. Interestingly, in five (13.5%) of Type II OC cases *BRCA1/2* or *PI3KCA* mutations were detected alongside *TP53* missense mutations. No alterations were detected in uterine lavage samples from patients with benign gynecologic conditions. However, in the group of patients with non type II OC one case out of 9 patients (a patient with serous borderline tumor) had *KRAS* mutation. Meanwhile, 4/12 (33.3%) endometrial cancer cases, patients had at least three alterations in PI3K pathway genes analysed (*PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS*). All three patients with mutations in all three PI3K pathway had grade 3 endometrioid endometrial carcinoma. In uterine lavage samples from other groups (other ovarian cancers, endometrial cancer, benign 142 gynecologic malignancies and RRS) no *TP53* mutations were detected, while *BRCA1/2* alterations were found in only type II OC and RRS group.

10.3.2 Mutation analysis in ovarian tissue samples

In addition to sequencing uterine lavage liquid biopsy samples, mutation analysis was also carried out in available 46 tissue samples. 46 mutations were detected in 67.4% (31/46) samples. In agreement with uterine lavage sample sequencing, the majority of *TP53* alterations 96.0% (24/25) were detected in type II OC patients. However, one *TP53* mutation was found in a clear cell OC case. Multiple mutations were detected in 44.8% (13/29) type II OC patient's tissue samples: *TP53* and either *BRCA1* (31.0%, 19/29 samples), *BRCA2* (6.9%, 2/29 samples), or *PIK3CA* (3.4%, 1/29 samples). In Type II OC patient's tissue samples one additional mutation in *BRCA1*, two mutations in *BRCA2*, and one additional *PIK3CA* mutation were detected. In cases other than type II OC, *BRCA2* alteration was detected in the only available RRS group tissue sample. PI3K pathway alterations were also detected in other ovarian tumor tissue samples: one *KRAS* alteration, two *PI3KCA* and one *PTEN*. No mutations detected in either endometrial cancer or benign gynecologic malignancy group. Overall concordance rate between uterine lavage and tissue samples was 65.2% (32/46). However the positive concordance rate (the amount of fully concordant cases/ all mutated 1 tissue samples) was 48.5% (15/31).

Table 1. Overall and positive concordance rates and Kappa value describing agreement categories (1=perfect agreement, 0 = total disagreement). Overall concordance is calculated as $((++)+(- -))/\text{total cases}$, while positive concordance rate is calculated as $((+))/(((++)+(+ -))$.

	ctDNA	Tissue		Overall concordance rate %	Positive concordance rate %	Kappa (SE)
		+	-			
<i>TP53</i>	+	10	0	69.565	41.667	0.406 (0.107)
	-	14	22			
<i>BRCA1/2</i>	+	15	0	100.000	100.000	1(0)
	-	0	31			
<i>PI3K pathway</i>	+	2	0	91.304	33.304	0.465 (0.216)
	-	4	40			
Any mutation	+	15	0	65.217	48.487	0.379 (0.098)
	-	16	15			

Among discordant cases, *TP53* mutations were predominant: 13 mutations, that were not detected in uterine lavage, detected in 14 tissue samples (*TP53* c.695A>G missense mutation detected in two different tissue samples) All discordant *TP53* mutations were found in Type II OC tissue samples. Overall, 62% (28/46) mutations were detected in both paired samples. 3 *PI3KCA* and 1 *PTEN* mutations were found in tissue samples only. Interestingly, all *BRCA1/2* mutations were perfectly concordant among tissue and uterine lavage samples, as well as available germline testing data. However, 14.6% (7/48) 171 patients samples were partially concordant: with germline *BRCA1* but not *TP53* mutations detected in uterine lavage samples.

10.3.3. Uterine lavage mutation correlation with clinical features

We further analysed the uterine lavage mutation association with clinical features. Overall, significantly more mutations were detected in uterine lavage samples from patients with FIGO stage III- IV in OC patients ($p=0.002$, Fisher's exact test) than patients with less developed disease (FIGO stage I-II) of OC or endometrial cancer. More mutations in uterine lavage samples were detected in II type OC FIGO stage IV ($p = 0,002$, Fisher test), compared with stage type II OC FIGO stage II -III. *TP53* mutational status in II type OC did not depend on patient's age, treatment or surgery radicality ($p < 0,5$).

Pre-surgery CA-125 concentration was significantly higher in patients with detected mutations in uterine cavity lavage ($p=0.0001$, Mann-Whitney test).

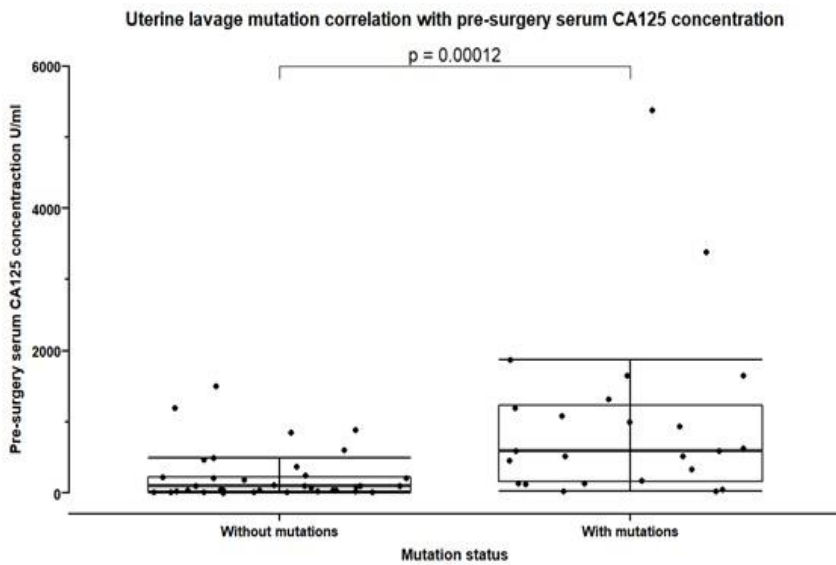


Figure 2. Pre-Surgery serum CA-125 concentration in patients with and without detected mutations in uterine cavity lavage samples. Error bars show mean and standard deviation.

10.3.4. Clinical performance of uterine lavage mutations in type II OC

TP53 mutations in uterine lavage cavity were detected in 10 samples, all those mutations were also detected in ovarian tissue biopsy. In uterine cavity lavage samples, *TP53* mutation analysis showed sensitivity - 27% and specificity – 100 %, with positive predictive value (PPV) 100% and negative predictive value (NPV) 66.3%. The accuracy of the *TP53* biomarker in the prediction of type II OC was estimated by plotting ROC curves and calculating the area under the curves (AUC). The estimated AUC of the *TP53* test was 0.831 (Fig. 3).

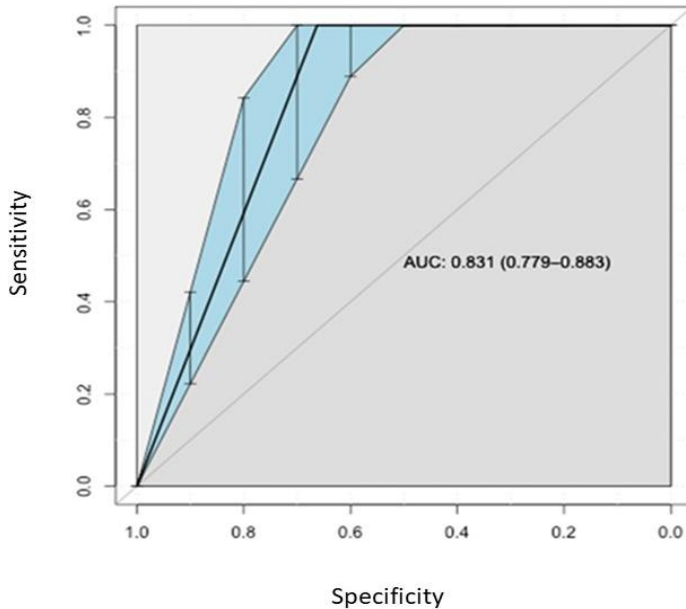


Figure 3. Diagnostic value of *TP53* mutations in uterine cavity lavage samples, ROC curve, AUC – area under the ROC curve

Nearly half (46%) of type II OC patients had *BRCA1* or *BRCA2* mutation. *BRCA1* mutation was detected in 13 cases, with 35.1% sensitivity and 100% specificity (PPV- 100%, NPV- 62.5%). *BRCA2* mutation was detected in 3 patients. Although *BRCA2* showed 100 % specificity, the sensitivity was only 10.8 % (PPV - 100%, NPV- 54.7%).

Mutations in *KRAS*, *PIK3CA*, *KRAS* were detected in one case and fully corresponded to the biopsy results. These genes had a specificity of 87.5%, but only 2.7 % sensitivity (PPV – 1.000, NPV -0.4930). When assessing the diagnostic value of at least one gene out of six (*TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *KRAS*, *PTEN*), the identification of type II OC showed a sensitivity of 64.9 %, specificity of 66 % (PPV - 57.1%, NPV -72.9%). The accuracy of at least one gene in predicting type II OC was estimated by drawing ROC curves and calculating the AUC at 0.650 (Fig. 4).

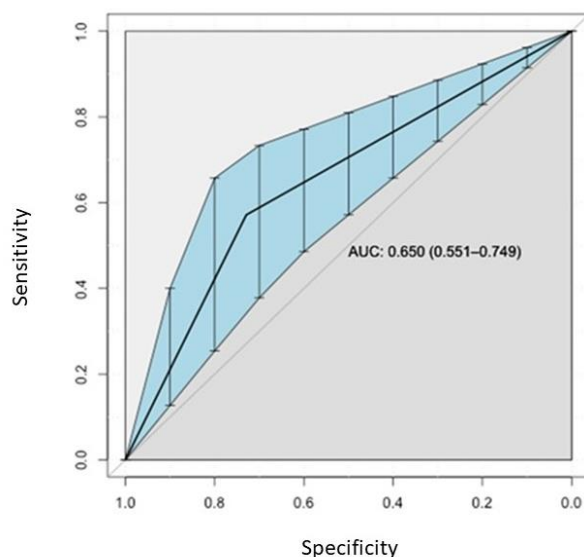


Figure 4. Diagnostic value of at least one gene in uterine cavity lavage samples, ROC curve, AUC – area under ROC curve

After evaluating predictive risk, it was found that the most significantly associated with type II disease was *TP53* gene mutations with risk ratio 2.96 and at least one mutation (of 6 selected genes) with risk ratio of 2.86.

10.3.5 Analysis of uterine lavage in SEOC cases

In our cohort two patients were diagnosed with SEOC, both patients had endometrioid type histology with early stage and low-grade histology for both EC and OC. They underwent surgical treatment and staging. Next-generation sequencing of 6 genes-panel identified *PIK3CA* and *PTEN* gene mutations in ovarian tissue in one case, while none of these genes were mutated in other cases.

Table 2. Mutational profile of SEOC case 2.

Gene	Uterine lavage mutation	Tissue mutation	dbSNP	Amino Acid Change
<i>PIK3CA</i>	-	c.1093G>A	rs1064793732	p.Glu365Lys
<i>PTEN</i>	-	c.517C>T	rs121913293	p.Arg173Cys

The importance of distinguishing SEOC from either isolated endometrium or OC with metastasis is crucial, as it determines adjuvant treatment strategy and prognosis. The prognosis of patients with synchronous EC and OC is better than the patients with single-organ cancer with ovarian or endometrial spread. Molecular profiling also can be beneficial for prognostic and predictive meaning. Studies analyzing SEOC mutational profiles identified *PI3KCA*, *PTEN*, *KRAS*, *CTNNB1* and *ARID1A* gene mutations can be helpful for diagnostic of SEOC.

10.4 Discussion

Our pilot study demonstrates that cells shed from Müllerian duct cancer can be collected through a lavage of the uterine cavity, where tumor-specific mutations can be detected through targeted next-generation sequencing (NGS). All 90 uterine lavage samples in our study had a sufficient amount of DNA and were successfully sequenced using NGS.

Mutations in uterine lavage samples were detected in 62% (23/37) of type II OC with predominant alterations of the *TP53*. No such mutations were detected in uterine lavage in type I OC or endometrial carcinomas, and no mutation was detected in uterine lavage from the benign group, showing reasonable specificity of NGS-based analysis. In our study, *TP53* mutation achieved high specificity (100 %), however, it lacked the desirable clinical sensitivity (27 %). This could be improved by using a more accurate sequencing technique, an expanded biomarker panel or combination of additional biomarkers. Although our uterine lavage samples “missed” 13/23 *TP53* mutations, resulting in a low overall concordance rate of 62.2%, other liquid biopsy studies also find high discordance between liquid biopsy and tumor mutations [34, 35, 37].

Also in our cohort we identified two cases of rare SEOC. The identification of SEOC or metastatic endometrium/ovarian disease has great clinical significance, as the disease management, prognosis and overall survival differ. Precise diagnosis of SEOC may require additional molecular or immunohistochemical testing in addition to routine histopathologic assessment. According to literature review testing of vimentin, molecular analyses of gene mutation of *CTNNB1*, *PAX8*, and β -catenin expression may be helpful to categorize SEOC in cases where clinical and pathological parameters are inconclusive [18-23]. Our two cases do not show that uterine lavage was a suitable diagnostic test for SEOC, but further investigation is needed, and additional disease-specific biomarkers need to be discovered.

Main limitation of our study was that the type II OC group consisted mainly of FIGO stage III-IV patients, and there were no patients with FIGO stage I. This was due to the fact that type II OC patients are rarely diagnosed until the late stages. In our study, only one *KRAS* uterine lavage mutation was detected in stage I borderline OC case (in 1/7 other OC cases). Cancer-derived mutations, especially those from early-stage tumors, often present only in a tiny fraction of the total circulating DNA, so it is even more challenging to detect mutation in the early stages. However, other studies which included yearly stage OC patients showed similar results between early and late stage OC. In both, Maritschnegg et al. and Kindle et al. studies, two out of four stages I OC patients had detectable mutations in uterine lavage and Pap smears respectively, and PapSEEK study showed similar low specificity of 34% in both early (I-II) and late (III-IV) OC patients [34, 35].

Early type II OC detection is currently the primary goal of OC biomarker research. According to the dualistic OC model, type II OC arises from malignant precursor lesions in fallopian called tubes serous tubal intraepithelial carcinoma (STIC) that share up to 90% incidence of *TP53* mutations in both STIC and type II OC tissue. Type II OC detection at an early stage or even in STIC form, would ensure better success in treatment, significantly higher success in total tumor resection, and reduced need for neoadjuvant therapy and subsequent chemotherapy. Thus it would be instrumental to conduct this study on patients with STIC in order to determine uterine lavage utility in early OC detection [24-36].

Our study proved that uterine lavage is an efficient technique for gynecologic cancer detection, but more research is needed in order to incorporate this technique in clinical practice.

10.5 Conclusions

1. In type II OC uterine lavage samples mutation of selected genes using NGS were detected: *TP53* (27.0 %), *BRCA1* (35.1 %), *BRCA2* (10.8 %), *PTEN*, *PIK3CA* and *KRAS* (2.7%). The sensitivity of the 6 gene set (any gene) in the uterine lavage sample for type II OC was 64.9 % and specificity - 66.0 %.
2. Mutations in the *TP53* gene in the type II OC were detected in 79 % of ovarian tissue biopsy samples and only 41.6 % of paired uterine lavage samples. *TP53* mutation analysis-based uterine lavage test for type II OC showed specificity of 100 % and sensitivity of 27 %.
3. More mutations in uterine lavage samples were detected in FIGO stage IV II type OC ($p = 0,002$, Fisher test) than in FIGO stage II-III. CA-125

levels correlated with the frequency of mutations detected in uterine lavage samples.

4. Gene mutations found in the SEOC tumor tissue could not be detected in uterine lavage biopsy. The search for diagnostic markers for SEOC must be continued in larger cohorts.

PERSONAL INFORMATION

Diana Žilovič
Jonazoliu 19-107, LT-04140 Vilnius (Lithuania)
(+37)067333367
dianauljanionok@gmail.com

POSITION

Medical doctor, obstetrician and gynecology doctor, scientific worker, PHD student.

WORK EXPERIENCE

- From 2015 Medical doctor at National Cancer Institute, Vilnius (Lithuania)
- From 2017 Junior scientific worker at Nacional Cancer Institute, Vilnius (Lithuania)
- From 2019 gynecologist at Oncogynecology Department, Nacional Cancer Institute, Vilnius (Lithuania)

EDUCATION AND TRAINING

- 2009–2015 Master in medicine, qualification – physician; Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas (Lithuania). License number MPL-20565.
- 2015-2019 Obstetrics and gynecology residency at Vilnius University, Lithuanian. License number MPL-23731.
- From 2018 started PHD at Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University.
- 2017 04-05 Professional exchange at Oncogynecological department at Hospital Clinico San Carlos, Madrid (Spain)
- Biomedical Cilinical trial Nr. 158200-18/5-988-539 : „Lavage of uterine cavity for diagnosis and prediction of ovarian cancer “.
- 2023 03 EUROGIN congress, Bilbao, Spain.

PERSONAL SKILLS

Mother tongue(s) Lithuanian
Russian C2
English C1
Spanish A1

10.7 List of publications and presentations

10.7.1 Articles on the topic of the dissertation

1. D. Žilovič, R. Čiurlienė, R. Sabaliauskaitė, S. Jarmalaitė. Future screening prospects for ovarian cancer. *Cancers* 2021, 13, 3840. [HTTPS://DOI.ORG/10.3390/CANCERS13153840](https://doi.org/10.3390/cancers13153840).
2. Žilovič, I. Vaicekauskaitė, R. Čiurlienė, R. Sabaliauskaitė, S. Jarmalaitė. Uterine cavity lavage mutation analysis in Lithuanian ovarian cancer patients. *Cancers (Basel)*. 2023 jan 30;15(3):868. Doi: 10.3390/cancers15030868. Pmid: 36765826; pmcid: pmc9913062.
3. Žilovič D, Čiurlienė R, Šidlovskaja E, Vaicekauskaitė I, Sabaliauskaitė R, Jarmalaitė S. Synchronous endometrial and ovarian cancer: A case report. *World J Clin Cases* 2023; 11(18): 4341-4349 [DOI: 10.12998/wjcc.v11.i18.4341].

10.7.2 Articles other than on the subject of the dissertation

1. R. Liutkevičienė, G. Mečėjus, D. Žilovič, Ž. Bumbulienė. Endometrial biopsy and density of nerve fibers in eutopic endometrium. Looking for easier ways to diagnose endometriosis. *Gynecological endocrinology*. Received 22 jan 2019, accepted 02 jul 2019, published online: 19 jul 2019.
2. R. Čiurlienė, D. Žilovič, K. Romeikienė, E. Šidlovskaja. Minimally invasive surgery and sentinel lymph node biopsy – a modern standard of uterine confined endometrial cancer treatment: reviewing literature and presenting the national cancer institute experience. *Lietuvos chirurgija*. 19,3-4 (dec. 2020), 120-127.
3. D. Žilovič, K. Čerkauskaitė, K. Kvitkovskaja, R. Čiurlienė. Intravenous leiomyomatosis. Case report. *Journal of medical sciences*. Jan 30, 2021 volume 9 | issue 1. Electronic - issn: 2345-0592.
4. I. Vaicekauskaitė, D. Dabkevičienė, J. Šimienė, D. Žilovič, R. Čiurlienė, S. Jarmalaitė, R. Sabaliauskaitė. ARID1A, NOTCH and WNT signature in gynaecological tumours. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 5854. <https://doi.org/10.3390/ijms24065854>

10.7.3 Presentations on the topic of the dissertation

1. Zilovic D, Vaicekauskaitė I, Ciurliene R, Sabaliauskaite R, Jarmalaitė S. 2020 12 ESGO State of the Art virtual conference. Analysis of uterine lavage for early ovarian cancer detection.
2. Vaicekauskaitė I, Zilovic D, Ciurliene R, Sabaliauskaite R, Jarmalaitė S. 2021. Targeted sequencing of uterine lavage fluid for early detection of gynecologic cancer. ESGH, Austria.
3. Vaicekauskaitė I, Sabaliauskaite R, Zilovic D, Ciurliene R, Lazutka J.R, Jarmalaitė S. FEBS3+ Conference of Estonian, Latvian and Lithuanian Biochemical Societies. Prognostic insights from the analysis of uterine lavage samples in ovarian cancer patients. Talinn, Estonia; 2022.06.15 – 03.17.
4. Vaicekauskaitė I, Sabaliauskaite R, Zilovic D, Ciurliene R, Lazutka J.R, Jarmalaitė S. Uterine lavage fluid for molecular identification of high grade ovarian cancer. ESGH 2022; Viena, Austria 2022.06.11 – 06.14.

10.8 Financial support

This research received funding by the Lithuanian National Cancer Institute research fund.

11. PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju Nacionalinio vėžio instituto administracijai ir NVI mokslo fondui už suteiktą galimybę ir paramą vykdant šį mokslinį darbą.

Esu ypač dėkinga mokslinio darbo vadovei prof. Sonatai Jarmalaitei už pasitikėjimą, nuostatas siekti kuo geresnių darbo rezultatų, padaršinimą, palaikymą ir galimybę artimiau pažinti mokslą.

Dėkoju onkoginekologijos skyriaus vedėjai gyd. R. Čiurliene už diskusijas bei konsultacijas klinikiniais darbo aspektais, vertingas idėjas, nuolatinį skatinimą tobulėti bei palaikymą.

Labai ačiū Nacionalinio vėžio instituto kolegoms, onkoginekologijos skyriaus kolektyvui už pagalbą formuojant tiriamųjų grupes. Esu laiminga ir dėkinga galėdama būti jūsų kolektyvo dalimi. Dėkoju Nacionalinio vėžio instituto Genetinės diagnostikos laboratorijos kolektyvui už bendradarbiavimą renkat mėginius, galimybę realizuoti mokslinę idėją ir patarimus rengiant pranešimus ir mokslines publikacijas. Nuoširdžiai dėkoju Genetinės diagnostikos laboratorijos vedėjai dr. Rasai Sabaliauskaitei ir jaunesniajai mokslo darbuotojai Ievai Vaicekauskaitei už metodinę ir praktinę pagalbą ruošiant medžiagą molekuliniais tyrimams.

Dėkoju visoms tyrime dalyvavusioms moterims, be kurių šis tyrimas nebūtų įvykęs. Jų indėlis į mokslinę veiklą yra labai svarbus ir vertingas.

Dėkoju recenzentams už skirtą laiką ir vertingas pastabas.

Taip pat esu dėkinga savo šeimai, ypač savo vyrui Valdemarui Žilovič už visapusišką palaikymą ir supratimą.

12. PRIEDAI

Priedas 1. FIGO kiaušidžių, kiaušintakio ir pirminio pilvaplėvės vėžio klasifikacija, 2014 m

FIGO Stadijos	TNM	Naviko išplitimas
I	T1	Navikas vienoje ar abiejose kiaušidėse ar kiaušintakiuose.
IA	T1a	Navikas vienoje kiaušidėje ar kiaušintakyje; kapsulė nepažeista, ant kiaušidės ar kiaušintakio paviršiaus naviko nėra; ascite ir pilvaplėvės nuoplovose piktybinių ląstelių nėra.
IB	T1b	Navikas abiejose kiaušidėse (kapsulė nepažeista) ar kiaušintakyje, ant kiaušidės ar kiaušintakio paviršiaus naviko nėra; ascite ir pilvaplėvės nuoplovose piktybinių ląstelių nėra.
IC		Navikas vienoje ar abiejose kiaušidėse ar kiaušintakiuose ir bet kuris radinys iš šių:
IC1	T1c1	Naviko kapsulės plyšimas operacijos metu.
IC2	T1c2	Naviko kapsulės plyšimas iki operacijos, navikas ant kiaušidės ar kiaušintakio paviršiaus.
IC3	T1c3	Yra piktybinių ląstelių ascite ar pilvaplėvės nuoplovose.
II	T2	Navikas vienoje ar abiejose kiaušidėse ar kiaušintakiuose ir išplitęs į dubenį ar yra pirminis pilvaplėvės vėžys.
IIA	T2a	Naviko plitimas ar implantai gimdoje ar/ir kiaušintakiuose ar/ir kiaušidėse
IIB	T2b	Navikas išplitęs į kitus dubens intraperitoninius audinius.
III		Navikas vienoje ar abiejose kiaušidėse ar kiaušintakiuose ar yra pirminis pilvaplėvės vėžys bei citologiškai ar histologiškai patvirtintų metastazių pilvaplėvėje, už dubens ribų ir/arba yra metastazių retroperitoniniuose limfmazgiuose.
IIIA		Yra metastazių retroperitoniniuose limfmazgiuose ir ± mikroskopinių metastazių už dubens ribų.
IIIA1	T1/T2-N1	Yra metastazių tik retroperitoniniuose limfmazgiuose.
IIIA2	T3a-N0/N1	Yra mikroskopinių metastazių pilvaplėvėje, už dubens ribų ± metastazių retroperitoniniuose limfmazgiuose.
IIIB	T3b-N0/N1	Yra makroskopinių metastazių pilvaplėvėje, už dubens ribų ≤ 2 cm dydžio ± metastazių retroperitoniniuose limfmazgiuose.
IIIC	T3c-N0/N1	Yra makroskopinių metastazių pilvaplėvėje už dubens ribų > 2 cm dydžio ± metastazių retroperitoniniuose limfmazgiuose.
IV	Bet koks T ir N, M1	Yra tolimųjų metastazių (išskyrus metastazes pilvaplėvėje).

Priedas 2. Nustatytos mutacijos nuoplovose ir audinyje

Numeris	Mėginis (mėginiai)	Genas	Egzonas	Kodavimas	Amino r. Pakeitimas	Mutacijos tipas	dbSNP	
1	KN-014-nuoplovos; KN-017-nuoplovos; KN-030-porinis; KN-033-porinis; KN-036-porinis; KN-037-porinis; KN-046-nuoplovos; KN-049-porinis; KN-067-nuoplovos; KN-073-porinis; KN-081-porinis; KN-086-nuoplovos; KN-087-nuoplovos; KN-089-nuoplovos; KN-090-nuoplovos	BRCA1	10	c.4035delA	p.Glu1346LysfsTer20	frameshift Deletion	rs8035771	
2	KN-060-poriniai; KN-063-nuoplovos; KN-079-nuoplovos; KN-085-poriniai; KN-092-nuoplovos		19	c.5266_5267insC	p.Gln1756ProfsTer74	frameshift Insertion	rs1217805	
3	KN-023-nuoplovos		7	c.485_486delITG	p.Val162GluufsTer19	frameshift Deletion	rs8035770	
4	KN-020-nuoplovos		4	c.181T>G	p.Cys61Gly	missense	rs2889767	
5	KN-078-porinis			c.213-15A>G	p.?	unknown	rs8860409	
6	KN-083-nuoplovos		10	c.2481delA	p.Gly828AlafsTer18	frameshift Deletion	rs8860400	
7	KN-019-porinis; KN-052-porinis; KN-093-porinis	BRCA2	11	c.3847_3848delGT	p.Val1283LysfsTer2	frameshift Deletion	rs1229267	
8	KN-076-porinis		8	c.658_659delGT	p.Val220IlefsTer4	frameshift Deletion	rs1131692	
9	KN-095-porinis		17	c.7879A>T	p.Ile2627Phe	missense	rs8035901	
10	KN-091-nuoplovos		20	c.8572C>T	p.Gln2858Ter	nonsense	rs8035911	
11	KN-094-porinis		10	c.1024C>T	p.Arg342Ter	nonsense	rs7308820	
12	KN-088-porinis		5	c.524G>A	p.Arg175His	missense	rs2893457	
13	KN-036-porinis		6	c.578A>C	p.His193Pro	missense	rs7862018	
14	KN-007-porinis		6	c.645T>G	p.Ser215Arg	missense	rs1057520	
15	KN-007-porinis		7	c.701A>G	p.Tyr234Cys	missense	rs5877800	
16	KN-022-porinis		7	c.710T>A	p.Met237Lys	missense	rs7658482	
17	KN-052-porinis	TP53	7	c.742C>T	p.Arg248Trp	missense	rs1219126	
18	KN-019-porinis		8	c.814G>A	p.Val272Met	missense	rs1219126	
19	KN-085-porinis		8	c.817C>T	p.Arg273Cys	missense	rs1219133	
20	KN-084-porinis		8	c.818G>A	p.Arg273His	missense	rs2893457	
21	KN-072-porinis		8	c.842A>G	p.Asp281Gly	missense	rs5877815	
22	KN-007-porinis; KN-058-nuoplovos		21	c.3140A>G	p.His1047Arg	missense	rs1219132	
23	KN-001-nuoplovos		21	c.3129G>A	p.Met1043Ile	missense	rs1219132	
24	KN-003-nuoplovos		PIK3CA	10	c.1625A>T	p.Glu542Val	missense	rs1057519
25	KN-047-nuoplovos			2	c.112C>T	p.Arg38Cys	missense	rs7494150
26	KN-058-nuoplovos			5	c.1030G>A	p.Val344Met	missense	rs1057519
27	KN-001-nuoplovos; KN-064-porinis	2		c.35G>T	p.Gly12Val	missense	rs1219135	
28	KN-047-nuoplovos	KRAS	2	c.35G>A	p.Gly12Asp	missense	rs1219135	
29	KN-058-nuoplovos		2	c.35G>C	p.Gly12Ala	missense	rs1219135	
30	KN-001-nuoplovos	PTEN	5	c.389G>A	p.Arg130Gln	missense	rs1219092	
31	KN-003-nuoplovos		3	c.202T>C	p.Tyr68His	missense	rs3981233	
32	KN-003-nuoplovos		5	c.388C>G	p.Arg130Gly	missense	rs1219092	
33	KN-058-nuoplovos		6	c.518G>A	p.Arg173His	missense	rs1219132	
34	KN-047-nuoplovos		4	c.210-1G>C	p.?	unknown	rs1114167	
<i>Mutacijos nustatytos tik audinyje</i>								
35	KN-082-audinyje	TP53	4	c.372C>A	p.Cys124Ter	nonsense		
36	KN-081-audinyje		5	c.524G>A	p.Arg175His	missense	rs2893457	
37	KN-071-audinyje		5	c.527G>A	p.Cys176Tyr	missense	rs7862029	
38	KN-073-audinyje		5	c.548C>G	p.Ser183Ter	nonsense		
39	KN-061-audinyje		6	c.586C>T	p.Arg196Ter	nonsense	rs3975164	
40	KN-033-audinyje		6	c.613T>G	p.Tyr205Asp	missense	rs1057520	
41	KN-050-audinyje		6	c.645T>G	p.Ser215Arg	missense	rs1057520	
42	KN-030-audinyje; KN-049-audinyje		6	c.659A>G	p.Tyr220Cys	missense	rs1219126	
43	KN-078-audinyje		7	c.711G>T	p.Met237Ile	missense	rs5877826	
44	KN-037-audinyje		7	c.742C>T	p.Arg248Trp	missense	rs1219126	
45	KN-055-audinyje		8	c.814G>T	p.Val272Leu	missense	rs1219126	
46	KN-041-audinyje		8	c.817C>T	p.Arg273Cys	missense	rs1219133	
47	KN-059-audinyje		8	c.892G>T	p.Glu298Ter	nonsense	rs2017445	
48	KN-043-audinyje		PIK3CA	6	c.1093G>A	p.Glu365Lys	missense	rs1064793
49	KN-071-audinyje			10	c.1637A>G	p.Gln546Arg	missense	rs3975172
50	KN-074-audinyje			21	c.3140A>T	p.His1047Leu	missense	rs1219132
51	KN-043-audinyje		PTEN	6	c.517C>T	p.Arg173Cys	missense	rs1219132

Priedas 3. Biomedicinio tyrimo leidimas



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS
Viešoji įstaiga, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius. Duomenys kaupiami ir saugomi Juridinių asmenų registre, kodas 211950810
Fakulteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, 03101 Vilnius, tel. (8 5) 239 8700, el. p. mif@mf.vu.lt
VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
Komiteto duomenys: M.K. Čiurlionio g. 21/27, 03101 Vilnius, tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2018-05-08 Nr.158200-18/5-988-539

Tyrimo pavadinimas:

**Biožymenų paieška gimdos ertmės nuoplovoje kiaušidžių
vėžio diagnostikai ir predikcijai**

Protokolo Nr.:	II-2017-10
Versija:	4
Data:	2018 03 12
Informuoto asmens sutikimo forma:	3 2018 01 29
Pagrindinis tyrėjas:	Rūta Čiurlienė
Įstaigos pavadinimas: Adresas:	Nacionalinis vėžio institutas Santariškių g. 1, Vilnius
Leidimas galioja iki:	2020 01

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2018/5), vykusio 2018 m. gegužės 8 d. sprendimu.

Pirmininkas



prof. Saulius Vosylius

LR **Asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo** 10 str. 3 punktą numato, jog asmens duomenys apie asmens sveikatą automatiškai būdu, taip pat mokslinio **medicininio tyrimo tikslais** gali būti tvarkomi tik pranešus Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai. Šiuo atveju Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija privalo atlikti išankstinę patikrą.

LR **Asmens duomenų teisinės apsaugos įstatymo** 12 str. 1 punktą numato, kad **be duomenų subjekto sutikimo** asmens duomenys **mokslinio tyrimo tikslais** gali būti tvarkomi tik pranešus Valstybinei duomenų apsaugos inspekcijai. Šiuo atveju Valstybinė duomenų apsaugos inspekcija privalo atlikti išankstinę patikrą.

Pasibaigus tyrimui privaloma VRBTEK raštu informuoti apie tyrimo pabaigą bei pateikti tyrimo ataskaitos santrauką.

Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro įsakymo "Dėl leidimų atlikti biomedicininį tyrimą išdavimo tvarkos aprašo patvirtinimo" (*Žin.*, 2008, Nr. 6-225, 2016 m. sausio 8 įsakymo Nr. V-27 redakcija (galiojanti suvestinė redakcija (nuo 2017-01-04) VII.40. Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą galioja iki biomedicininio tyrimo paraiškoje nurodytos tyrimo pabaigos datos. VII.41. Biomedicininių tyrimų užsakovas, jo įgaliotas atstovas ar pagrindinis tyrėjas per **30 kalendorinių dienų** nuo biomedicininio tyrimo pabaigos **privalo raštu pranešti** leidimą išdavusiam Lietuvos bioetikos komitetui ar regioniniam biomedicininių tyrimų etikos komitetui apie biomedicininio tyrimo pabaigą ir per **90 kalendorinių dienų** nuo biomedicininio tyrimo pabaigos **pateikti** biomedicininio tyrimo **vykdymo ataskaitos santrauką**.

Įsakymo nuostata taikoma visiems biomedicininiams tyrimams.

Priedas 4. Biomedicinio tyrimo leidimo pratęsimas



VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
sui generis darinys prie VILNIAUS UNIVERSITETO

Biomedicinio tyrimo „Biožymenų paieška gimdos ertmės nuoplovoje kiaušidžių vėžio diagnostikai ir predikcijai“
pagrindinei tyrėjai Rūtai Čiurlienei

2020-02-25 Nr. 2020-LP-11

PRITARIMAS BIOMEDICININIO TYRIMO DOKUMENTŲ PAKEITIMAMS

Leidimo Nr. 158200-18/5-988-539 pakeitimas Nr. 1

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas išnagrinėjęs prašymą atlikti su vykdomu biomedicininiu tyrimu „*Biožymenų paieška gimdos ertmės nuoplovoje kiaušidžių vėžio diagnostikai ir predikcijai*“ (leidimas Nr. 158200-18/5-988-539, išduotas 2018-05-08 d.) susijusių dokumentų pakeitimus pritaria, kad pakeitimai atitinka Lietuvos Respublikos biomedicininių tyrimų etikos įstatymo II skyriuje nustatytiems biomedicininių tyrimų etikos reikalavimams. Atsižvelgiant į tai leidžia:

- tyrimą pratęsti iki 2021-12-31 d.

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

Priedas 5. Informuoto asmens sutikimo forma

PATVIRTINTA
Lietuvos bioetikos komiteto
biomedicininį tyrimų ekspertų grupės
2016 m. lapkričio 15 d. sprendimu

Informuoto asmens sutikimo forma, versija Nr. 3 , data: 2018 - 01 - 29

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA

Biomedicininio / klinikinio vaistinio preparato tyrimo pavadinimas: Biožymenų paieška gimdos ertmės nuoplovoje kiaušidžių vėžio diagnostikai ir predikcijai.

Protokolo Nr.: II -2017-10

Užsakovas: Nacionalinis vėžio institutas

Adresas: Santariškių g. 1, LT-08660, Vilnius

Tel.: (8 5) 278 6700

El. paštas: administracija@nvi.lt

Užsakovo atstovas: Sonata Jarmalaitė, NVI Direktorius pavaduotoja mokslui ir plėtrai

Atsakingas tyrėjas¹: Rūta Čiurlienė

Tyrimo centro pavadinimas: Nacionalinis vėžio institutas

Adresas: Santariškių g. 1, LT-08660, Vilnius

Tel.: (85)2786763

El. paštas: ruta.ciurliene@nvi.lt

1. Kokia šio dokumento paskirtis?

Šioje formoje pateikiama Jums skirta informacija apie biomedicininį tyrimą, aptariamą tyrimo atlikimo priežastys, mokslinio tyrimo procedūros, nauda, rizika, galimi nepatogumai ir kita svarbi informacija. Jei nuspręsite dalyvauti, prašysime Jūsų pasirašyti šią sutikimo formą, kuria sutinkate tyrimo metu vykdyti gydytojo tyrėjo ir tyrimo komandos nurodymus. Pasirašydami šį dokumentą,

¹ Jeigu tyrėjo adresas nesutampa su tyrimo centro adresu – nurodykite abu

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.