

VILNIUS UNIVERSITY

VILIUS RUDAITIS

***BRCA1/2* MUTATION SPECTRUM AND ITS PROGNOSTIC SIGNIFICANCE
FOR PROGRESSION-FREE AND OVERALL SURVIVAL IN ADVANCED
OVARIAN CANCER**

Summary of Doctoral Thesis
Biomedical science, medicine (06B)

Vilnius
2014

The study was carried out at Vilnius University during 2010-2014

Scientific supervisor

Prof. dr. Laimonas Griškevičius (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06B)

Consultant

Dr. Ramūnas Janavičius (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 07B)

Doctorate Committee

Chairman – prof. dr. Algirdas Utkus (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06B)

Members:

Prof. dr. Gražina Drąsutienė (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06B)

Prof. dr. Artūras Inčiūra (Lithuanian University of Health Sciences, biomedical sciences, medicine – 06B)

Prof. dr. Feliksas Jankevičius (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06B)

Prof. dr. Rūta Jolanta Nadišauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, biomedical sciences, medicine – 06B)

Opponents:

Prof. dr. Janina Didžiapetrienė (Vilnius University, biomedical sciences, medicine – 06B)

Prof. dr. Elona Juozaitytė (Lithuanian University of Health Sciences, biomedical sciences, medicine – 06B)

Defense of the dissertation will take place at the open Doctorate Committee meeting on 24 September 2014 at 1 p. m. in the Red Conference Hall of Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos.

Address: Santariškių str. 2, LT-08661, Vilnius, Lithuania

The summary of doctoral dissertation was mailed on the 21 August 2014.

The full Lithuanian text is available at Vilnius University library, Lithuania

VILNIAUS UNIVERSITETAS

VILIUS RUDAITIS

**IŠPLITUSIO KIAUŠIDŽIŲ VĖŽIO *BRCA1/2* GENŲ MUTACIJŲ ĮVAIROVĖ IR
JŲ PROGNOZINĖ REIKŠMĖ LIGOS BERECIDYVIAM IR BENDRAJAM
PACIENČIŲ IŠGYVENAMUMUI**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (06B)

Vilnius 2014

Disertacija rengta 2010–2014 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

Prof. dr. Laimonas Griškevičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Konsultantas

Dr. Ramūnas Janavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B)

Disertacija bus ginama Vilniaus universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – prof. dr. Algirdas Utkus (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Nariai:

Prof. dr. Gražina Drąsutienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Prof. dr. Artūras Inčiūra (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Prof. dr. Feliksas Jankevičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Prof. dr. Rūta Jolanta Nadišauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Oponentai:

Prof. dr. Janina Didžiapetrienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Prof. dr. Elona Juozaitytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija bus ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2014 m. rugsėjo mėn. 24 d. 13 val. Disertacijos gynimo vieta – Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos, Raudonoji auditorija.

Adresas: Santariškių g. 2, LT-08661, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2014 m. rugpjūčio 21 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

ABBREVIATIONS

BRCA1 – breast cancer 1 gene

BRCA2 – breast cancer 2 gene

BRCA1/2 – *BRCA1* and *BRCA2* genes

CI – confidence interval

ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group

HR – hazard ratio

PFS – progression-free survival

RECIST – response evaluation criteria in solid tumors

OS – overall survival

SEER – Surveillance, Epidemiology and End Results

SEE-FIM – Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated End

INTRODUCTION

According to the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program of the United States (U.S.) National Cancer Institute, the death rate from ovarian cancer has not appreciably changed in the four decades since the so-called “war on women’s killer” was declared. On the other hand, due to early diagnosis and effective treatment methodologies, the survival results of other female genital malignant tumors have considerably improved. Nevertheless, malignant ovarian tumors still remain the first mortality cause among all female genital malignancies. In Europe, ovarian cancer amounts to 3 % of all malignant tumors in women. In a general population, 1 out of every 72 women develop ovarian cancer and for 1 in every 95 women this disease is lethal (Bray, Ren et al. 2013). According to the Lithuanian Cancer Registry, ovarian cancer ranks 3rd among genital tract malignancies in women. Unfortunately, the majority of newly detected ovarian cancers (75 %) are diagnosed in advanced stages III and IV.

Numerous clinical trials have shown that the course of the disease depends on more than the classical prognostic indicators such as histological tumor type, tumor differentiation, stage of the disease or treatment modalities.

More than two decades ago, the first publications on hereditary factors indicated propensity to develop ovarian malignancies in patients with regard to their first-degree relatives. The first genetic autosomal dominant inheritance was determined in the high-risk cancer tumor suppressor *BRCA1/2* genes (Rubin, Benjamin et al. 1996). The publications on the frequency of inherited ovarian cancer in the general population are ambiguous. At first it was believed that it varied from 2 to 7 % but subsequent publications on the frequency of hereditary ovarian cancer indicated an incidence of 30 and more percent (Gallagher, Konner et al. 2011). It has been observed that the incidence of inherited ovarian cancer can vary in accordance with geographic region, race and ethnicity (Reeves, Yawitch et al. 2004). Actually, research and clinical application in *BRCA1/2* genes is focused on early detection of the ovarian cancer patients' first-degree relatives who already harbor deleterious *BRCA1/2* genes mutations. Recommendations on preventive measures are also taken into account.

According to genetic counseling recommendations, oncogenetic testing and counseling are supposed to be started with the patient who has already been diagnosed

with ovarian or breast cancer: this specific gene mutation is likely to be present. This is also a resource saving approach. If deleterious mutations in *BRCA1/2* genes have been detected, possible ovarian or breast cancer could be blocked more effectively by preventive operations. These genes cause hereditary ovarian and breast cancer occurrence or hereditary breast-ovarian cancer syndrome (Weissman, Weiss et al. 2012).

According to *C. Garcia et al.*, the efficacy of ovarian cancer risk reducing surgery could be considerably improved if the exact variations of *BRCA1/2* genetic types in certain populations were known, and counseling and recommendations for women with these deleterious mutations were timely (Garcia, Wendt et al. 2014).

In certain countries (e.g. Israel) and in certain ethnic groups (e. g. Ashkenazi Jews) where *BRCA* gene mutations occur more frequently, preimplantational *BRCA1/2* genes mutation testing in blastomere is proposed (Sagi, Weinberg et al. 2009; Werner-Lin, Rubin et al. 2012).

The publications on the clinical significance of *BRCA1/2* genes still remain controversial – from insignificant to notably positive impact on the course of the disease (Artioli, Borgato et al. 2010; Alsop, Fereday et al. 2012). It is important to note that so far no clinical trial which would assess the role of the *BRCA1/2* genes mutations for improved survival in case of advanced ovarian cancer has been stratified. In other words, clinical trials that determine drug or treatment method efficacy have not been stratified in order to determine the survival changing factor e. g. *BRCA1/2* mutation.

There is evidence that treatment of advanced ovarian cancer patients who harbor mutations in *BRCA1/2* genes with platinum agents is more effective compared with the efficacy of these agents in the absence of *BRCA1/2* genes mutations. Together with taxanes, platinum salts are the first and second line drugs in the treatment of advanced ovarian cancer. This can be explained by the fact that DNA damage caused by platinum agents is repaired incorrectly by DNA repair systems, whose efficacy depends on the *BRCA1* and xeroderma pigmentosum complementation group A (XPA) genes. It should be noted that the use of platinum salts in combination with taxanes may result in resistance to platinum agents because taxanes could reduce platinum concentrations within the cell. There is a hypothesis that such patients should probably be treated with platinum alone and thus avoid taxane-induced toxicity and potential resistance to platinum agents. The clinical response was higher to the pegylated doxorubicin than to

the topoisomerase inhibitor topotecan which is more frequently used for the treatment of patients with *BRCA1/2* genes mutation and recurrent ovarian cancer (Kaye, Lubinski et al. 2012). Despite the enormous progress of chemotherapy in the treatment of ovarian cancer, surgical treatment remains of a major therapeutic importance. Postoperative residual tumor size is particularly important for the progression-free (PFS) and overall survival (OS) (du Bois, Reuss et al. 2009). Thus, it should be emphasized that patients must be treated in a tertiary center dedicated to this purpose. (Aletti, Dowdy et al. 2006).

In spite of the abundant number of trials studying the *BRCA1/2* genes' role in breast and ovarian carcinogenesis, the influence of these genes is on the disease prognosis has not been fully elucidated. So far no study has specifically addressed advanced ovarian cancer patients. We have carried out a study assessing the spectrum of *BRCA1/2* genes mutations as well as the interaction of clinical and hereditary factors in advanced ovarian cancer.

AIM AND OBJECTIVES OF THE STUDY

Aim

To determine prognostic significance of the *BRCA1/2* genes mutations on progression-free and overall patient survival in advanced ovarian cancer.

Objectives

1. To evaluate the *BRCA1/2* genes mutation spectrum and frequency in cases of advanced ovarian cancer.
2. To determine the founder mutation in cases of advanced ovarian cancer.
3. To analyze the prognostic significance of clinical and genetic factors on progression-free and overall survival.

NOVELTY OF THE STUDY

The idea of this trial was similar to other aims of fundamental research works in oncology, i. e. to determine new markers which could be applied in everyday clinical practice as predictors towards a better or worse prognosis. Due to large sizes of genes, diverse mutations or variants of unknown significance and complexity of large genomic

rearrangements requiring special technical approaches, *BRCA1* and *BRCA2* gene screening still remains a labor and time consuming challenge. This procedure is still too complex and expensive to cover a broader target (e. g. all breast or ovarian cancer patients and their first-degree relatives). It cannot be routinely applied in less privileged countries.

This scientific research was focused on:

1. Performing a prospective surveillance study of possibility to assess progression-free and overall survival in patients with advanced ovarian cancer depending on the presence or absence of *BRCA1/2* mutation status.
2. Determining the most common *BRCA1/2* genes mutations in patients with advanced ovarian malignancies, their correlations with other clinical factors and their significance on progression-free and overall survival.
3. Establishing a correlation of the positive role of optimal cytoreduction towards longer progression-free and overall survival in patients with advanced ovarian cancer which confirms that patients suffering from ovarian cancer must be treated only at a specific treatment center.

MATERIAL AND METHODS

The study protocol was approved by Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee (protocol no. 158200-12-271-64). All patients signed a written informed consent form.

Patient selection and data definition. Patients were recruited into the study at Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos (VUHŠK) between September 2010 and December 2012. Eligible patients were 18 years of age or older women who had histologically confirmed non-mucinous primary or recurrent stage III-IV advanced ovarian cancer and who were treated with debulking surgery and platinum based chemotherapy. The date of diagnosis, tumor histology, age, ascites, level of cytoreduction, treatment type (chemotherapy, surgery), date of the first relapse, subsequent treatment modalities and death were recorded. Cytoreduction to less than 5 mm or non-visible or palpable residual tumor was considered as optimal (R0) cytoreduction. Cytoreduction to more than 5 mm, but less than 2 cm residual tumor was considered as suboptimal (R1), and cytoreduction to more than 2 cm residual tumor was

considered as non-optimal (R2). Prospective follow-up was carried out in VUHSK by clinical oncologists or gynecologists every 2-3 months after the disease diagnosis. In case of suspicion of relapse, the gynecological examination with pelvic and abdominal ultrasound was performed followed by body computed tomography and/or magnetic resonance imaging. Surgical stage, histological tumor type, grade of differentiation were defined according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) nomenclature and World Health Organization standards after the review of medical and pathology records. Performance status was evaluated according to the Eastern Cooperative Oncology Group criteria (ECOG). Date of progression was determined based on ovarian cancer biomarker CA-125 levels and imaging results according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria. PFS was defined as time interval between the end of first-line chemotherapy and first confirmed sign of disease progression or recurrence. PFS was considered to be 0 months if disease progression manifested during treatment. OS was defined as time interval between the date of diagnosis and date of death from any cause.

BRCA1/2 genetic analysis. Comprehensive *BRCA1/2* genetic testing was accomplished in Laboratory of Molecular Medicine, Hematology, Oncology and Transfusion Medicine Center, VUHSK. Genomic DNA for molecular analysis was extracted from peripheral blood leucocytes of advanced ovarian cancer patients using column-based kits (QIAamp Mini Kit (*Qiagen*) or GeneJET™ Kit (UAB Thermo Fisher Scientific Baltics)) according to the manufacturer's instructions. Firstly, genetic screening for mutations in *BRCA1/2* genes was performed by high resolution melting (*HRM*) screening strategy on 96-well plate Light Cycler 480® (LS480) (*Roche Diagnostics*) and 384-well plate LightScanner™ (LS) (*Idaho Technology*) using M13-tagged primers described previously²³ with optimized conditions for Maxima HotStartTaq and SYTO9 (*Invitrogen*) fully saturating dye. LC480 was used for the initial rapid screening for identified 5 frequent mutations in Lithuania (i.e. *BRCA1*: c.4035delA (4154 delA), c.5266dupC (5382insC), c.181T>G (300T>G), c.1687C>T (1806C>T) and *BRCA2*: c.658 659del (220delGT) and LS for the full *BRCA1/2* screen of samples negative for the initial screen of common mutations. Gene Scanning Software (*version 1.5; Roche*) and LightScanner software (*version 2.0; Idaho Technology*) were used for

analysis of melting curves obtained on the LC480 and LS, respectively. Automated bidirectional sequencing on ABI 3500 genetic analyzer (*Life Technologies*) was performed for the observed aberrant melting curve samples from the independent PCR product. NTI 10 (*Invitrogen*) software was used for the generated sequencing electropherogram data alignment and analysis.

Secondly, large genomic rearrangements (*LGRs*) were assessed by Multiplex ligation-dependent probe amplification (*MLPA*) method using *SALSA BRCA1 P002* and *BRCA2 P045* probemix kits (*MRC Holland*, the Netherlands) according to the manufacturer instructions for the samples negative for small *BRCA1/2* mutations. The fragment analysis of the amplified probes was implemented on an ABI 3500 genetic analyzer and generated data was analyzed by visual inspection. Mutations of *BRCA1/2* genes were classified according to Human Genome Variation Society (*HGVS*) nomenclature at genomic level and Breast Cancer Information Core (*BIC*) nomenclature was used for consistency. All advanced ovarian cancer patients, identified with pathogenic *BRCA1/2* mutations, received cancer genetic counseling during their medical follow up.

Statistical analysis. Descriptive statistics were used to describe demographic characteristics. The normality of the distribution was assessed using Kolmogorov-Smirnov test. Student-t and Mann-Whitney-Wilcoxon tests were used to evaluate the differences between the two independent normally and non-normally distributed data sets, respectively. The differences between independent two qualitative data groups were evaluated by Fisher exact test. Risk factors for PFS and OS were assessed by Cox regression analysis. Factors found to be significant in univariate Cox regression analysis were entered into multivariate Cox model with stepwise model selection process. Survival trends were evaluated by Kaplan-Meier method. A two-tailed p-value less than 0.05 considered to be significant. Statistical analysis was performed using Statistical Analysis System (SAS) package version 9.2.

RESULTS

Clinical characteristics and mutations. 107 eligible patients (88 with primary and 19 with recurrent advanced ovarian cancer) were enrolled. Stage distribution was: IIIA –

3 (2.8%), IIIB – 2 (1.9%), IIIC – 78 (72.9%) and IV – 24 (22.4%). The median age at diagnosis of all patients was 50 (range 23-82) years. Fifty-five (51.4%) patients were carriers of *BRCA1/2* germline mutations (Table 1). Compared to the *BRCA1/2* wild type patients, *BRCA1/2* mutant patients were diagnosed at a younger age (48 vs. 54 years), more often had serous histology (98.2% vs. 86.5%), had a better (ECOG 0-1) performance status (94.5% vs. 80.8%) and had more often neoadjuvant chemotherapy (16.4% vs. 36.5%). The differences in clinical characteristics between *BRCA1/2* carriers and *BRCA1/2* wild type were statistically not significant. Optimal cytoreduction was not different between the mutation and wild type groups. The median follow-up time of all patients was 29 (range 1-210) months and was not different between the *BRCA1/2* carriers and wild type groups (Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of advanced (stage III-IV) advanced ovarian cancer patients

Characteristic	<i>BRCA</i> mutation positive		<i>BRCA</i> wild type		p-value
	No.	%	No.	%	
Total	55	51.4	52	48.6	-
Age at the diagnosis of ovarian cancer, years					
Median	48		54		0.035
Range	37-73		23-82		
Family history					
Breast-ovarian family history	37	67.3	6	11.5	<0.0001
No history of breast-ovarian cancer	18	32.7	46	88.5	
Histological subtype					
Serous	54	98.2	45	86.5	0.029**
Endometrioid	1	1.8	3	5.8	
Clear cell carcinoma	0	0.0	3	5.8	
Small cell carcinoma	0	0.0	1	1.9	
Neoadjuvant chemotherapy					
Performed	9	16.4	19	36.5	0.027
Not performed	46	83.6	33	63.5	
Primary debulking status					
R0	32	58.2	28	53.9	0.699*

R1	9	16.4	6	11.5	
R2	14	25.4	18	34.6	
Chemotherapy					
Platinum with paclitaxel	39	70.9	41	78.8	0.380
Platinum and cyclophosphamide	16	29.1	11	21.2	
Time from diagnosis to <i>BRCA1/2</i> genes testing, months					
Median	6		2		0.457
Range	0-155		0-191		
Follow-up for all patients, months					
Median	35		25		0.343
Range	1-169		8-210		

Among the *BRCA1/2* mutation patients, 35 (63.6%) had Lithuanian founder mutation c.4035delA (Table 2.) which together with c.5266dup and c.181T>G accounted for 89.2% of all germline mutations. The prevalence of the remaining mutations was less than 5%. Four of the *BRCA1/2* mutation positive and one sporadic advanced ovarian cancer patient had previously been diagnosed with breast cancer. The prevalence of the Baltic mutation in advanced ovarian cancer trial population was 32.7 %.

Table 2. *BRCA1/2* genes mutation types of advanced (stage III-IV) advanced ovarian cancer patients

<i>BRCA1/2</i> genes status	No.	%
<i>BRCA1/2</i> wild type	52	48.6
<i>BRCA1/2</i> mutated	55	51.4
<i>BRCA1</i> c.4035delA (4154 delA)	35	63.6
<i>BRCA1</i> c.5266dup (5382 insC)	11	20.0
<i>BRCA1</i> c.181T>G (300T>G)	3	5.6
<i>BRCA1</i> c.1687C>T (1806C>T)	2	3.6
<i>BRCA1</i> c.5258G>C (5377G>C)	1	1.8
<i>BRCA1</i> c.3700_3704del5 (3819del5)	1	1.8
<i>BRCA2</i> c.658_659del (8ex) (220delGT)	1	1.8
<i>BRCA2</i> c.3975_3978dup (4206ins4)	1	1.8

Survival outcomes. Univariate Cox regression analysis identified four potential risk factors for a shorter PFS: age, non-optimal cytoreduction, lower performance status, and *BRCA1/2* wild type (Table 3). In multivariate analysis, age (HR: 1.032, 95% CI: 1.010-1.055, $p = 0.005$), non-optimal cytoreduction (HR: 3.170, 95% CI: 1.986-5.060, $p < 0.0001$) and *BRCA* wild type (HR = 1.625 (1.003-2.632), $p = 0.049$) remained independently statistically associated with shorter PFS.

Table 3. Cox regression analysis for progression-free (PFS) and overall survival (OS) of advanced ovarian cancer patients

Factor	Univariate			Multivariate		
	Hazard ratio		p value	Hazard ratio		p value
	estimate	95% CI		estimate	95% CI	
PFS						
Age, years	1.032	1.010-1.054	0.0044	1.032	1.010-1.055	0.0047
Non-optimal cytoreduction	2.801	1.769-4.434	<0.0001	3.170	1.986-5.060	<0.0001
ECOG criteria ≥ 2	2.520	1.263-5.028	0.0088	non-significant		
Non-serous histology	2.043	0.931-4.483	0.0747	-	-	-
BRCA negative	1.590	1.010-2.504	0.0454	1.625	1.003-2.632	0.0486
OS						
Age, years	1.016	0.981-1.052	0.3709	-	-	-
Non-optimal cytoreduction	2.684	1.264-5.701	0.0102	2.684	1.264-5.701	0.0102
ECOG criteria ≥ 2	0.899	0.270-2.993	0.8620	-	-	-
Non-serous histology	1.174	0.351-3.924	0.7946	-	-	-
<i>BRCA1/2</i> negative	1.189	0.591-2.393	0.6268	-	-	-

ECOG-Eastern Cooperative Oncology Group

The median PFS was 19 (95% CI: 13-25) months in *BRCA1/2* mutated compared to 13 (95% CI: 10-16) months in *BRCA1/2* wild type ($p = 0.0390$) patients.

At the last data check 30 patients were dead. All deaths were cancer related, meaning that OS is equivalent to cancer specific survival for purposes of this analysis. The deaths were equally distributed in both groups: fifteen deaths were recorded in the *BRCA1/2* mutation group and 15 were in the *BRCA1/2* wild type group. Non-optimal cytoreduction was the only significant factor for shorter OS (HR: 2.684, 95% CI: 1.264-

5.701, $p = 0.0102$). The median OS was 92 (95% CI: 44-140) and 94 (95% CI: 45-143) months in *BRCA1/2* mutated and wild type ($p = 0.6256$) patients, respectively (Figure 1).

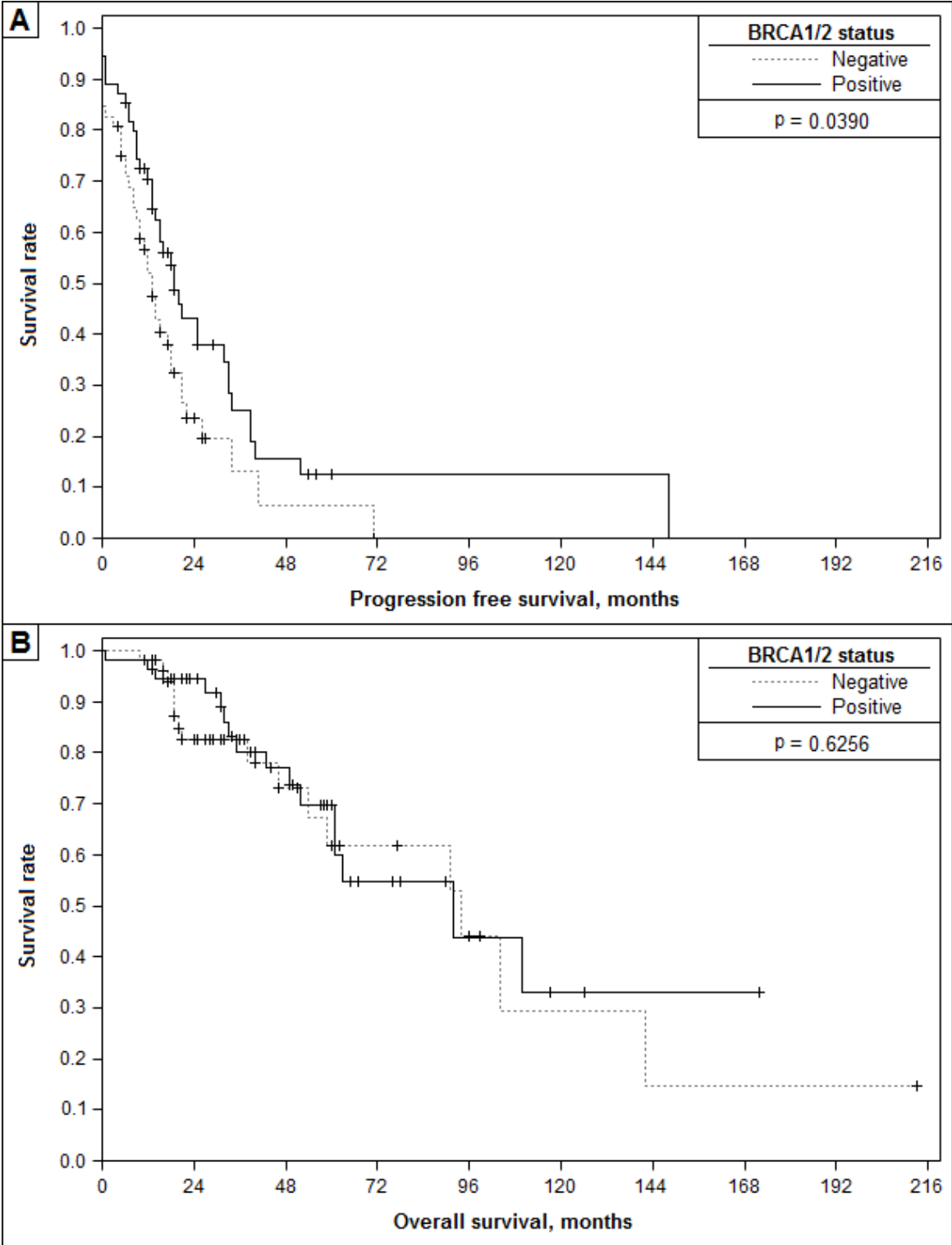


Fig. 1 Progression-free (PFS) (A) and overall survival (OS) (B) of advanced ovarian cancer patients according to *BRCA1/2* mutation or wild type

We have compared survival outcomes between patients who were cytoreduced to non-visible or/and non-palpable level of tumor burden (R0) with patients who had the residual tumor left after cytoreduction (non-R0). It appeared that patients with residual tumor had significantly poorer outcome compared to R0 patients. Their PFS was 3 times shorter comparing to optimal cytoreduced patients. (HR: 3.170, 95% CI: 1.986-5.060, $p < 0.0001$). The significance remained while analyzing that feature in OS. Patients after optimal cytoreduction had significant longer OS comparing with non-optimal cytoreduced patients (Figure 2).

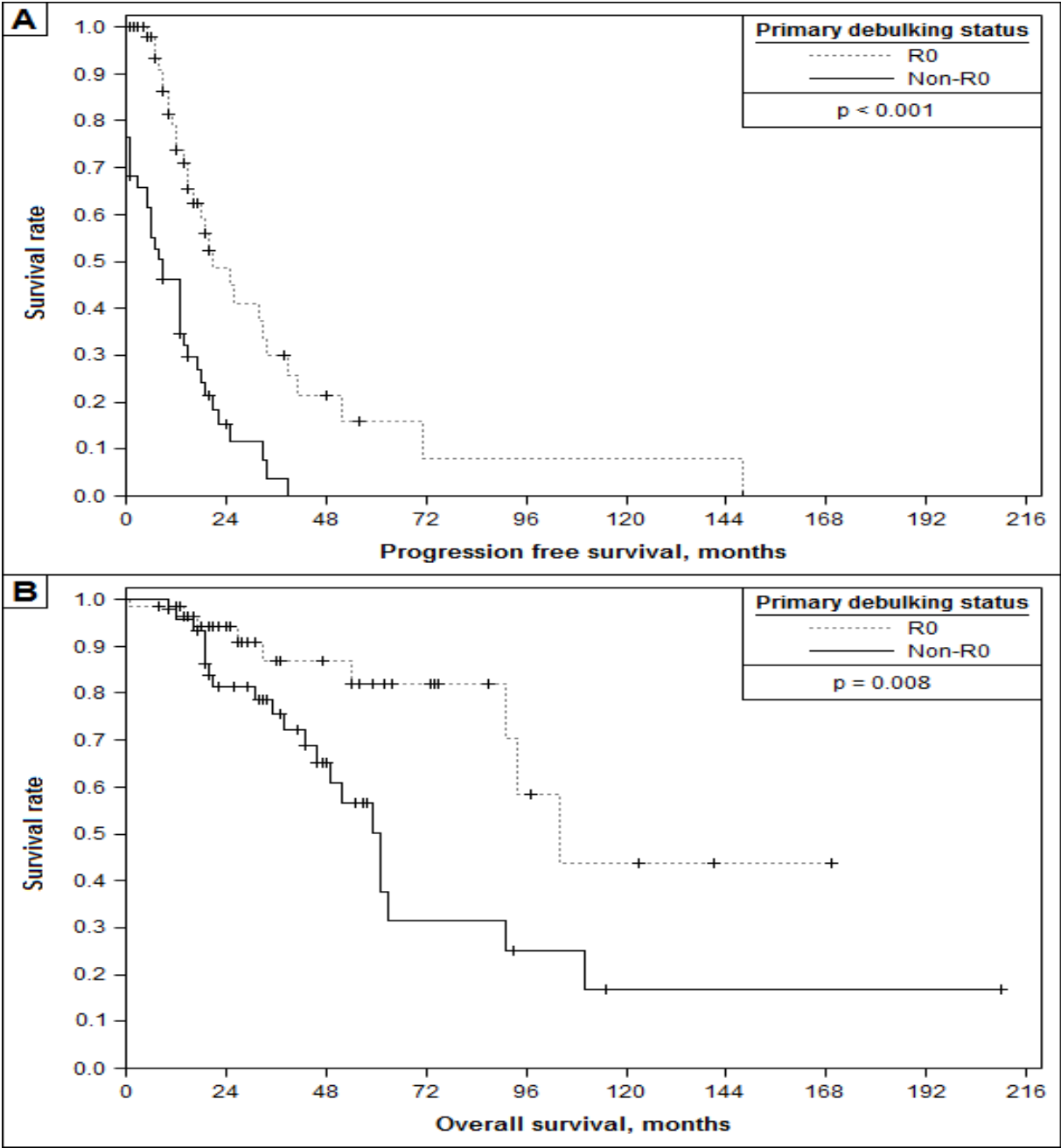


Figure 2. Progression-free (PFS) (A) and overall survival (OS) (B) of advanced ovarian cancer patients according to optimal and non-optimal cytoreduction

CONCLUSIONS

1. In advanced ovarian cancer the *BRCA1/2* mutation frequency was 51.4 %. Eight different *BRCA1/2* genes mutations have been detected. Three most frequent *BRCA 1/2* mutations represented 89.2 % from all 8 *BRCA 1/2* mutations.
2. Among all determined *BRCA1/2* genes mutations *BRCA1 4035delA* or founder mutation was most frequent. It amounted to 63.6 %.
3. In advanced ovarian cancer, non-optimal cytoreduction, patients' older age and the absence of *BRCA1/2* mutations were statistically significantly predictive of shorter PFS. Only non-optimal cytoreduction was significantly associated with shorter OS.

PRACTICAL RECOMMENDATIONS

1. In order to predict the course of the disease, it is appropriate to apply *BRCA1/2* genes mutation tests to patients with ovarian cancer, especially to those with family history of cancer.
2. It is appropriate to perform *BRCA1/2* genes mutation tests for patients with advanced ovarian cancer which are planned to be included into new drug research because the gene mutation is an independent determinant for better progression-free survival and it could distort the future trial results.
3. The survey algorithm was recommended for the patients with advanced ovarian cancer and their first-degree relatives regarding genetic and obstetrician gynecologist guidance for the ovarian cancer risk reducing surgery and Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated End (SEE-FIM) protocol.
4. When counseling patients with ovarian cancer, it is appropriate to first carry out tests on the most frequent *BRCA1* gene and especially *BRCA1 4035delA* (4154delA) mutation. In cases negative for the most common mutations, a comprehensive *BRCA1/2* gene testing is indicated.
5. Ovarian cancer patients should preferably treated in specialized treatment centers with an integrated multidisciplinary team of medical geneticists, clinical oncologists and highly experienced obstetrician gynecologists trained to perform extensive debulking procedures.

SUMMARY IN LITHUANIAN

Remiantis Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) Nacionalinio vėžio instituto programos „Stebėseną, epidemiologiją ir rezultatus“ (SEER; angl. Surveillance, Epidemiology and End Results) duomenimis, mirtingumas nuo kiaušidžių vėžio per pastaruosius keturis dešimtmečius praktiškai nesumažėjo, nors vadinamasis „karas moterų žudikai“ buvo paskelbtas būtent tuo metu. Kita vertus, kitų moters lyties organų piktybinių navikų gydymo rezultatai pagerėjo dėl ankstyvosios diagnostikos ar efektyvesnių gydymo metodų atsiradimo. Mirtingumas nuo piktybinių kiaušidžių navikų išlieka didžiausias tarp visų moterų lyties organų piktybinių navikų. Europoje kiaušidžių vėžys sudaro 3 proc. tarp moterų piktybinių navikų. Jis užima 10 vietą pagal piktybinių navikų dažnį moterų populiacijoje ir apie 5 vietą pagal mirtingumą tarp visų moterų piktybinių navikų. Bendrojoje populiacijoje 1 iš 72 moterų suseraga kiaušidžių vėžiu ir 1 iš 95 moterų miršta nuo šios ligos. Lietuvoje šis vėžys, remiantis Lietuvos vėžio registro duomenimis, užima 3 vietą tarp moterų onkoginekologinių ligų. Didžioji dalis moterų suseraga kiaušidžių navikais, kurie, deja, ligos diagnozavimo metu būna jau išplitę. Net 3 iš 4 moterų nustatoma III ir IV ligos stadija.

Tyrimų duomenys rodo, kad ligos eiga nėra priklausoma vien tik nuo klasikinių prognozinių rodiklių, tokių kaip histologinis naviko tipas, naviko diferenciacija, ligos stadija, taikytas gydymas.

Daugiau nei prieš du dešimtmečius pastebėjus tarp pacienčių, sergančių kiaušidžių piktybiniais navikais, ir jų artimųjų giminaičių bendruosius piktybinių navikų dėsningumus, pradėti tyrinėti paveldimi kiaušidžių vėžio veiksniai. Pirmieji genetiniai autosominiu dominantiniu būdu paveldimi pokyčiai nustatyti didelės vėžio rizikos naviko slopikliuose *BRCA1/2* genuose. Dėl paveldimo kiaušidžių vėžio dažnio bendrojoje populiacijoje literatūros duomenys nėra vienareikšmiai. Iš pradžių buvo manoma, kad paveldimo kiaušidžių vėžio dažnis svyruoja nuo 2 iki 7 proc. Vėlesnėse publikacijose paveldimo kiaušidžių vėžio dažnis siekia 30 proc. ir daugiau tarp visų epitelinių kiaušidžių piktybinių navikų atvejų. Pastebėta, kad šio vėžio dažnis gali skirtis priklausomai nuo geografinio regiono, rasės bei etninės grupės .

Aktuali *BRCA1/2* genų tyrimų sritis ir klinikinis pritaikymas – tai pacienčių, sergančių kiaušidžių vėžiu, artimų giminaičių, turinčių šių mutacijų, ankstyvasis

nustatymas ir prevencinių priemonių rekomendacija. Onkogenetiniai tyrimai ir gydytojo genetiko konsultacijos pradamos nuo asmens (probando), kuriam jau yra diagnozuotas kiaušidžių ar krūties vėžys, nes yra didesnė tikimybė, kad tokiam asmeniui bus nustatyta geno mutacija ir tyrimai tokiu atveju bus daug informatyvesni bei pigesni. Nustačius žalingas mutacijas *BRCA1/2* genuose galima efektyviai „užkirsti kelią“ galimam piktybiniam kiaušidžių ar krūties vėžiui (šie genai sąlygoja paveldimo kiaušidžių ir krūties vėžio atsiradimą arba šeiminių kiaušidžių ir krūties vėžio sindromą) atliekant profilaktines operacijas. Remiantis C. Garcia ir bendraautorių (2014) duomenimis, kiaušidžių vėžio riziką mažinančių operacijų efektyvumą galima būtų gerokai padidinti, jeigu tiksliai žinotume *BRCA1/2* genų tipų variacijas tam tikrose populiacijose, o konsultuojančių gydytojų rekomendacijos būtų laiku perduodamos moteriai, turinčiai šias žalingas mutacijas. Tam tikrose šalyse (pvz., Izraelyje) ir etninėse grupėse (pvz., Aškenazi žydai), kuriose šių mutacijų aptinkama dažnai, fertilaus amžiaus sveikai moteriai nustačius *BRCA1/2* genų mutacijų, yra siūloma atlikti preimplantacinę *BRCA1/2* genų mutacijų tyrimą blastomeroje. Jeigu prieš 5 metus daugeliui tai asocijavosi su neetišku požiūriu į gyvybę, šiuo metu, atliekant pagalbinį apvaisinimą, tai tampa normalios preimplantacinės paveldimų ligų genetinės analizės dalimi.

Literatūros duomenys apie klinikinę *BRCA1/2* genų reikšmę yra kontroversiški – nuo visiškai bereikšmio iki ženkliai teigiamo poveikio ligos eigai prognoziniu požiūriu. Šiuo metu nėra stratifikuotas nė vienas klinikinis tyrimas, kurio metu būtų įvertinta *BRCA1/2* genų svarba ligos eigai ir prognozei tarp moterų, sergančių kiaušidžių vėžiu.

Yra duomenų, kad pacienčių, kurių *BRCA1/2* genas yra mutavęs, gydymas platinos preparatais, kurie yra I bei II eilės pasirinkimo chemopreparatai gydant kiaušidžių vėžį, yra efektyvesnis, palyginti su šių preparatų efektyvumu nesant minėto geno mutacijų. Tai galima paaiškinti tuo, kad platinos preparatai sukelia DNR pažaidas, taisomas klaidingai suporuotų DNR nukleotidų taisymo sistemos, kurios efektyvumas priklauso nuo *BRCA1* ir pigmentinės kserodermos komplementacijos grupės A (XPA; angl. Xeroderma pigmentosum complimentation group A) genų. Būtina pažymėti, kad, vartojant platinos preparatus kartu su taksanais, gali atsirasti rezistentiškumas platinos preparatams, nes taksanai sumažina platinos preparatų koncentraciją ląstelės viduje. Yra iškelta hipotezė, kad tokias pacientes, matyt, reikia gydyti vien tik platinos preparatais ir taip išvengti taksanų sukeliama toksiškumo bei galimo rezistentiškumo platinos

preparatams. Gydančios pacientės, turinčias *BRCA1/2* genų mutacijų ir recidyvavusį naviką, klinikinis atsakas buvo didesnis į pegilnuotą doksorubiciną, o ne į dažniausiai taikomą topoizomerezės slopiklį topotekaną.

Žinios apie *BRCA1/2* genų reikšmę vykstant dvigrandžių DNR pažaidų taisymui, kuris yra sutrikęs esant *BRCA1/2* genų mutacijų, ir apie tai, kad taikant poli(adenozindifosfato ribozės) polimerazės (PARP; angl. poli(ADP-ribose polimerase) slopiklius galima blokuoti viengrandžių DNR pažaidų taisymą ir taip sustiprinti citotoksinės chemoterapijos poveikį, leido sukurti audinių taikinių preparatą olaparibą, slopinantį būtent minėtą viengrandžių DNR pažaidų taisymą. Šiuo metu vyksta II fazės klinikiniai šio vaistinio preparato efektyvumo tyrimai.

Nepaisant didžiulio chemoterapijos progreso gydant kiaušidžių vėžį, ir toliau išlieka didžiulė chirurginio gydymo svarba. Ligos berecidyviam laikotarpiui ir pacienčių išgyvenamumui ypač svarbus likutinis pooperacinis naviko dydis. Šiuolaikinėse išplitusio kiaušidžių vėžio chirurginio gydymo rekomendacijose nurodoma, kad reikia siekti kuo didesnio radikalumo.

Nepaisant gausaus skaičiaus darbų, tyrinėjančių *BRCA1/2* genų vaidmenį krūties ir kiaušidžių kancerogenezeje, iki šiolei nėra pakankamai aiški šių genų įtaka ligos prognozei. Atsižvelgiant į tai, kad didžioji dalis kiaušidžių navikų diagnozuojama vėlyvosiose stadijose dėl ligos klinikinės eigos ypatumų bei ankstyvosios diagnostikos galimybių ribotumo, išplitusio kiaušidžių vėžio gydymas tiek pasaulyje, tiek Lietuvoje yra aktuali problema. Todėl svarbu įvertinti klinikinę ir paveldimų veiksnių svarbą ir tarpusavio sąveiką ligos eigai siekiant optimizuoti taikomą gydymą. Todėl mūsų darbo tikslas ir buvo tirti *BRCA1/2* genų mutacijų svarbą klinicinei išplitusio kiaušidžių vėžio eigai.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas – nustatyti *BRCA1/2* genų mutacijų prognozinę reikšmę pacienčių, sergančių išplitusiu kiaušidžių vėžiu, berecidyviam ir bendrajam išgyvenamumui.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti *BRCA1/2* genų mutacijų dažnį ir jų įvairovę tarp pacienčių, sergančių išplitusiais epiteliniais kiaušidžių piktybiniais navikais.

2. Identifikuoti dažniausiai pasitaikančią BRCA1/2 genų mutaciją.
3. Įvertinti klinikinių ir genetinių veiksnių įtaką berecidyviam ir bendrajam pacienčių, sergančių išplitusiu kiaušidžių vėžiu, išgyvenamumui

Tyrimo medžiaga ir metodai

Tyrimė dalyvavo 107 pacientės, kurios buvo konsultuotos ir stebėtos Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Konsultacinėje poliklinikoje ir gydytos Ginekologijos bei Onkologijos-chemoterapijos skyriuose. Į tyrimą buvo įtrauktos sergančios išplitusiu epiteliniu kiaušidžių piktybiniu naviku pacientės, kurioms pirmą kartą nustatytas šis navikas, bei pacientės, kurioms buvo atlikta citoredukcinė (naviko masę mažinanti arba visiškai pašalinanti) operacija ir kurios atvyko toliau gydytis į Vilniaus universiteto ligoninę Santariškių klinikas turėdamos visus duomenis apie buvusią operaciją, jos atlikimo optimalumą, tikslų naviko išplitimo laipsnį, operacijos trukmę bei naviko histologinį tipą, taip pat pacientės, atvykusios konsultotis dėl tolesnės gydymo taktikos atsiradus recidyvui ar ligai progresuojant, kurios turėjo duomenis ne tik apie prieš tai buvusią operaciją, bet ir taikytą pooperacinę chemoterapiją. Atliekant įprastinį kraujo tyrimą pooperacinių kraujo rodiklių kontrolei arba atliekant CA-125 žymens kontrolinę patikrą iš periferinės venos buvo paimta papildomai 3ml kraujo. Iš kraujo plazmoje cirkuliuojančių leukocitų buvo išskirta genomine DNR, kuri buvo iširta dėl BRCA1/2 genų mutacijų. Buvo vertinamas pacienčių amžius, naviko histologinis tipas, berecidyvus išgyvenamumas, optimalios citoredukcinės operacijos apimtis, neoadjuvantinės chemoterapijos dažnis, chemoterapijos tipas (karboplatina/paklitakselis ar cisplatina/ciklofosfamidai) bei BRCA1/2 genų tyrimo laikotarpis nuo pirminės kiaušidžių vėžio diagnozės nustatymo.

Statistinė analizė buvo atlikta naudojant statistinės analizės paketą SAS (angl. Statistical Analysis System), versiją 9.2.

Klinikinių-patologinių charakteristikų analizė. Aprašomoji statistika naudota siekiant nustatyti pacienčių demografines bei klinikines-patologines charakteristikas. Vertinant skirtumus tarp dviejų nepriklausomų grupių pirmiausia, pasinaudojant Kolmogorovo-Smirnovo (angl. Kolmogorov-Smirnov) testu, buvo įvertintas analizuojamų grupių duomenų normalumas. Atsižvelgus į Kolmogorovo-Smirnovo testo išvadas grupių skirtumai buvo vertinami atitinkamai panaudojant Mano-Vitnio-Vilkoksono (angl. Mann-Whitney-Wilcoxon) testą, jeigu duomenys nebuvo pasiskirstę

normaliai arba Studento t (angl. Student-t) testą, jeigu duomenys buvo pasiskirstę normaliai. Tikslusis Fišerio testas (angl. Fisher Exact Test) buvo naudojamas vertinant nepriklausomas kokybinių duomenų grupes.

Išgyvenamumo analizė. Tyrime analizuotas berecidyvys ir bendrasis pacienčių išgyvenamumas. Siekiant įvertinti išgyvenamumo skirtumus tarp grupių naudotas Kaplano-Mejerio (angl. Kaplan-Meier) metodas. Statistiniam reikšmingumui įvertinti naudotas log-rank testas. Statistiškai reikšmingi laikyti skirtumai kai $p < 0,05$.

Įvairių veiksnių tarpusavio sąveika. Ligos berecidyvį bei bendrąjį pacienčių išgyvenamumą lemiantys fiziniai veiksniai buvo vertinami panaudojant Kokso regresijos (angl. Cox regression) modelį. Daugiaveiksnis pažingsnis (angl. multivariate stepwise) Kokso regresijos modelis buvo sudaromas iš vienaveiksnių (angl. univariate) Kokso modelyje esančių statistiškai reikšmingų rizikos reikšmių.

Rezultatai

Pacientės, kurioms nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, buvo jaunesnės (amžiaus vidurkis – 48 metai; amžiaus ribos – 37–73 metai), palyginti su pacientėmis, kurioms nebuvo nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų (amžiaus vidurkis – 54 metai; amžiaus ribos – 23–82 metai). Šis skirtumas buvo statistiškai reikšmingas ($p=0,035$).

Pacienčių fizinės būklės vertinimas pagal ECOG statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių neparodė.

Analizuota, kokią procentą tarp pacienčių, kurioms nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, sudaro šeiminiis kiaušidžių-krūties vėžys. Šeiminiis krūties-kiaušidžių vėžys anamnezėje buvo ženkliai dažnesnis tarp pacienčių, kurioms nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų ($p < 0,0001$). Palyginus pacienčių pasiskirstymą pagal naviko histologinį tipą ženkliai kiekiu išsiskyrė kiaušidžių epitelinių navikų tipai. Tarp pacienčių, kurioms nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, seroziniai navikai sudarė net 98,2 proc. ir tik 1-ai pacientei buvo diagnozuota endometrioidinė adenokarcinoma. Pacienčių, kurioms nebuvo nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, navikų histologinių tipų spektras buvo įvairesnis, tačiau ir šioje grupėje dominavo seroziniai navikai. Statistiškai reikšmingai daugiau serozinių navikų buvo nustatyta pacientėms, turinčioms *BRCA1/2* genų mutacijų ($p=0,029$).

Tarp tiriamųjų pacienčių statistiškai reikšmingai skyrėsi neoadjuvantinės chemoterapijos taikymas. Taikant neoadjuvantinę chemoterapiją buvo gydyta 36,5 proc. pacienčių, kurioms nenustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, ir tik 16,4 proc. pacienčių esant *BRCA1/2* genų mutacijų ($p=0,027$)

Reikia pažymėti, kad optimalių ir neoptimalių citoredukcinių operacijų dažnis nesiskyrė tarp pacienčių, kurioms nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, ir pacienčių, kurioms *BRCA1/2* genų mutacijų nenustatyta

Lyginant tiriamų pacienčių grupes pagal taikytą adjuvantinę chemoterapiją statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių negauta: paklitakselio ir platinos preparatų derinys buvo skirtas 70,9 proc. pacienčių, kurioms nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, ir 78,8 proc. pacienčių, kurioms *BRCA1/2* genų mutacijų nerasta.

Laikotarpis tarp kiaušidžių vėžio diagnozavimo ir *BRCA1/2* geno nustatymo buvo ilgesnis pacienčių, turinčių *BRCA1/2* mutacijų, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo negauta.

Tirtų genų mutacijų spektrą sudarė 8 mutacijos. Vyraujanti tarp pacienčių, turinčių *BRCA1/2* genų mutacijų, buvo *BRCA1 c.4035(4154 delA)* mutacija, kuri nustatyta 63,6 proc. pacienčių. Antra pagal dažnumą buvo *BRCA1c.5266dup(5382insC)* mutacija, nustatyta 20 proc. pacienčių. *BRCA2* genų mutacijos buvo nustatytos tik dviem pacientėms, taigi jos sudarė tik 3,6 proc. visų moterų, turinčių minėtų genų mutacijų.

Toliau buvo analizuojama *BRCA1/2* genų mutacijų įtaka ligos berecidyviam ir bendrajam pacienčių išgyvenamumui. Pacientėms, kurioms nebuvo nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, berecidyvius išgyvenamumas buvo statistiškai reikšmingai blogesnis nei pacienčių, turinčių *BRCA1/2* genų mutacijų (log rank, $p=0,039$). Pacienčių, kurioms nustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų, vidutinė berecidyvio laikotarpio trukmė buvo 19 mėn., o pacienčių, kurioms nenustatyta *BRCA1/2* genų mutacijų – 13 mėn. Berecidyviam pacienčių išgyvenamumui *BRCA1/2* genų mutacijų įtakos nenustatyta.

Išanalizavus įvairių veiksnių tarpusavio sąveikos įtaką berecidyviam išgyvenamumui, nustatyta, kad statistiškai reikšmingos įtakos turi amžius, operacijos apimtis bei *BRCA1/2* genų mutacijos. Didėjant amžiui ligos atsinaujinimo rizika didėja ($p=0,005$). Neoptimalios citoredukcinės operacijos atvejais ligos atsinaujinimo rizika yra 3 kartus didesnė negu optimalios citoredukcinės operacijos atvejais ($p<0,001$). Didesnė

ligos atsinaujinimo rizika taip pat nustatyta pacientėms, neturinčioms *BRCA1/2* genų mutacijų ($p=0,049$).

Išanalizavus įvairių veiksnių tarpusavio sąveikos įtaką bendrajam pacienčių išgyvenamumui, nustatyta, kad tik citoredukcinės operacijos apimtis turi įtakos bendrajam pacienčių išgyvenamumui ($p=0,010$). Neoptimalių citoredukcinių operacijų atveju pacienčių mirtingumo rizika buvo beveik 3 kartus didesnė, nei atlikus optimalią citoredukcinę operaciją.

Išvados:

1. Sergant išplitusiu kiaušidžių vėžiu *BRCA1/2* mutacijų dažnis buvo 51,4 proc. Nustatytos 8 skirtingos *BRCA1/2* genų mutacijos. Trys dažniausios *BRCA 1/2* genų mutacijos sudarė 89,2 proc. visų nustatytų mutacijų kiekio.
2. Dažniausia arba bendrojo protėvio *BRCA1* geno mutacija – 4035delA (4154 delA), kuri sudarė 63,6 proc. tarp visų nustatytų *BRCA1/2* genų mutacijų.
3. Statistiškai reikšmingos įtakos sergančiųjų išplitusiu kiaušidžių vėžiu berecidyviam išgyvenamumui turi pacienčių amžius, *BRCA1/2* genų mutacijos bei operacijos apimtis, o bendrajam išgyvenamumui – tik operacijos apimtis.

RELATED PUBLICATIONS

(Published peer reviewed articles related to the thesis)

1. Janavičius R, Andrėkutė K, Mickys U, Rudaitis V, Brasiūnienė B, Griškevičius L. Apparently "*BRCA*-related" breast and ovarian cancer patient with germline TP53 mutation. *Breast J.* 2011; 17(4):409-15.
2. Janavičius R, Rudaitis V, Feng BJ, Ozolina S, Griškevičius L. Haplotype analysis and ancient origin of the *BRCA1* c.4035delA Baltic founder mutation. *Eur J Med Genet.* 2013; 56(3):125-30.
3. Lūža T, Ožalinskaitė A, Rudaitis V. The rate and role of diaphragmatic peritonectomy in optimal cytoreduction in patients with advanced stage ovarian cancer: a prospective study of 100 patients. *Acta medica Lituanica.* 2014; 21(1):1–7.

4. Janavičius R, Rudaitis V, Mickys U, Elsakov P, Griškevičius L. Comprehensive *BRCA1* and *BRCA2* mutational profile in Lithuania. *Cancer Genetics*. 2014; DOI: 10.1016/j.cancergen.2014.05.002. (In press).
5. Rudaitis V, Zvirblis T, Kanopiene D, Janulynaite D, Griskevičius L, Janavicius R. *BRCA1/2* mutation status is independent factor of improved survival for advanced stage (III-IV) ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2014; (accepted manuscript).

PRESENTATIONS RELATED TO THE THESIS

1. V.Rudaitis, R.Janavičius, L.Griškevičius. Should detection of BRCA genes be used routinely in treatment of ovarian cancer? The International conference of Evolutionary Medicine: New solutions for old problems. June 12-15, 2012, Vilnius.
2. V.Rudaitis, R.Janavičius, L.Griškevičius. Prognostic biomarkers study in the event of advanced ovarian cancer. The international Conference of Vilnius University, Faculty of Medicine, 210 years founding anniversary of Obstetrics and Gynecology Clinic . December 13, 2013, Vilnius (in Lithuanian).

AUTHOR (CV)

PERSONAL DATA	
First Name:	Vilius
Last Name:	Rudaitis
Academic Title :	MD
Specialized in:	Obstetrics and Gynecology

CURRENT EMPLOYMENT	
Position held since:	2009, Head
Institution Name:	Vilnius University Hospital Santariskiu klinikos
Department:	Gynecological Department
Address:	Santariskiu 2, Vilnius, Lithuania
Telephone:	(+370)65636509
Fax:	(+370)52365210
E-mail:	Vilius.Rudaitis@santa.lt

PREVIOUS EMPLOYMENT			
Position	Institution, Department	Location	Period: year - year
Staff doctor	Institute of Oncology, Vilnius University	Lithuania	2003-2009
Resident	Vilnius University	Lithuania	1999-2003
Intern doctor	Salcininku hospital	Lithuania	1997-1998

EDUCATION AND TRAINING			
Degree	Institution	Location (City, Country)	Period: year - year
Masterclass: Surgical Solutions for Uterine Bleeding Disorders	European Surgical Institute	Germany	2013.09.18 – 2013.09.20
LAVH, Laparoscopic sacrocolpopexy	Augsburg Hospital	Germany	2012.10.05 – 2012.10.06
Laparoscopic Surgery in Gynaecological Oncology Course	Barts and The London/NHS	UK	2011.02.23 – 2011.02.25
Total Laparoscopic Hysterectomy	Centre Hospitalier Regional Universitaire de Lille	France	2011.04.13 – 2011.04.14
TAIL Hysterectomy	Kantonsspital Baden	Switzerland	2010.12.03 – 2010.12.05
Operating Theater Course on Gynecological Cancer	Budapest	Hungary	2010.10.27 – 2010.10.29
Techniques Avancees en Endoscopie Gynecologique	Centre International de chirurgie endoscopique (CICE)	France	2010.07.05 – 2010.07.09
Solid Tumor Oncology-Breast and Gynecological Cancer	Weil Medical College of Cornell University	Austria	2010.09.12 – 2010.09.18
Oncology	Weil Medical College of Cornell University	Austria	2007.09.23 – 2007.09.29

MEDICAL LICENCE	
Number	Issued in
MPL-11606	2003.08.19

Experience with clinical trials			
Trial	Design & Clinical Phase	Role in Trial	Trial period
PAP smear comparison with cervical histology	Retrospective	Investigator	2005-2006
Investigation of ovarian cancer biomarkers	Prospective	Investigator	2010-2013
Member			
Lithuanian Association of Obstetricians and Gynecologists			
Lithuanian Society of Surgical Oncology			
Association of Oncology Gynecology			
European Society of Gynaecological Oncology			