

**INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ INSTITUTUL ONCOLOGIC
REPUBLICA MOLDOVA**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 618.11-037:618.145-006.6

TRIPAC IRINA

**FACTORII MOLECULAR-GENETICI DE PROGNOSTIC
AL CANCERULUI ENDOMETRIAL ÎN STADIILE I-II**

321.20 – ONCOLOGIE ȘI RADIOTERAPIE

Rezumatul tezei de doctor habilitat în științe medicale

Consultant științific:

Frank Gheorghii,

doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar,

Academician al Academiei de Științe din Rusia

Autor:

Tripac Irina,

doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2023

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului Științific Biologia Cancerului al Instituției Medico-Sanitare Publice Institutul Oncologic

Componenta consiliului științific specializat:

CERNAT Victor, președinte, dr. hab. șt. med., prof. cerc.

EFTODII Victor, secretar științific, dr. hab. șt. med., prof.cerc.

FRANK Gheorghii, consultant științific, dr. hab. șt. med., prof. univ., Academician, Rusia.

Referenți oficiali:

ACHIMAȘ-CADARIU Patriciu, dr. hab. șt. med., prof. univ., România

ANTON Emil, dr. hab. șt. med., prof. univ., România

KARSELADZE Apollon, dr. hab. șt. med., prof. cerc., Rusia

DONDIUC Iurie, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Susținerea va avea loc la 22 noiembrie 2023, ora 14.00 în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctor habilitat, specialitatea 321.20 – Oncologie și Radioterapie, Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu din Republica Moldova (bd. Ștefan cel Mare și Sfânt 165, Chișinău. MD-2004, sala 204).

Teza de doctor habilitat și rezumatul pot fi consultate la biblioteca IP Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu din Republica Moldova și pe pagina web a ANACEC (<https://www.anacec.md/>)

Rezumatul a fost expediat la 22 octombrie 2023

Secretar științific a Comisiei de susținere publică,
Eftodii Victor, dr.hab.șt.med., profesor cercetător

Consultant științific,

Frank Gheorghii, dr.hab.șt.med., profesor universitar, Academician

Autor

Tripac Irina

(© Tripac Irina, 2023)

CUPRINS

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....	4
CONȚINUTUL TEZEI.....	7
1. ASPECTELE MOLECULAR-GENETICE ALE CANCERULUI ENDOMETRIAL. O ABORDARE MODERNĂ A PROBLEMEI.....	7
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	7
3. ANALIZA CARACTERISTICILOR CLINICE ȘI MORFOLOGICE LA PACIENTELE CU CANCER ENDOMETRIAL ÎN STADIILE I-II.....	11
4. FACTORII MOLECULAR-GENETICI ÎN PROGNOSTICUL CANCERULUI ENDOMETRIAL.....	16
5. SEMNIFICAȚIA FACTORILOR CLINICO-MORFOLOGICI ȘI MOLCEULAR-GENETICI DE PROGNOSTIC LA PACIENTELE CU CANCER ENDOMETRIAL ÎN STADIILE I-II.....	21
6. PROGNOSTICUL EVOLUȚIEI CANCERULUI ENDOMETRIAL.....	25
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	27
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	29
LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE LA TEMA TEZEI.....	31
ADNOTARE.....	35
PE3IOME.....	37
SUMMARY.....	39
ANEXA 1. Designul studiului.....	41
LISTA ABREVIERILOR.....	42

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei și importanța problemei abordate.

Actualitatea temei este condiționată de nivelul înalt al morbidității prin cancer endometrial (CE), constituind o problemă majoră cu impact global în sănătatea publică. Cancerul endometrial reprezintă 4,8% din cazurile de tumori maligne și se situează, la nivel mondial, pe locul 6 în structura incidenței tumorilor maligne la femei [16,17,19].

În ceea ce privește creșterea ratei morbidității, CE ocupă constant locul 7 printre neoplasmele maligne la femei [20]. Creșterea constantă a incidenței CE se explică prin creșterea speranței medii de viață („îmbătrânirii”) în rândul populației și a nivelului de obezitate [2,3,4,18]. Incidența acestei patologii este în continuă creștere nu doar în rândul pacienților cu vârstă înaintată, ci și în rândul tinerelor. Peste 77,0% dintre cazuri sunt diagnosticate în stadiile incipiente (stadiile I și II), cu o rată înaltă de supraviețuire la 5 ani [12]. Ca urmare a unei analize detaliate, putem observa că rezultatele supraviețuirii la 5 ani variază în limitele stadiului I și constituie în stadiul IA - 91-95%, iar în stadiul IB - 80-65% [12]. Supraviețuirea la 5 ani în stadiul II a constituit 50,6% [16]. Incidența cancerului endometrial între 40 și 54 de ani crește brusc, cu un vârf la vârsta de 60-64 de ani. În grupurile de vârstă de 40-49 și 50-56 de ani, există o creștere semnificativă a incidenței.

Conform datelor Registrului National de Cancer al Republicii Moldova, în ultimii cinci ani s-a înregistrat o creștere a morbidității cancerului organelor sistemului reproductiv feminin. Conform datelor statistice, furnizate de Registrul Național de Cancer în Republica Moldova, în 2020 incidența prin cancer endometrial a constituit 515 de cazuri, mortalitatea fiind de 92 de cazuri. Rata de supraviețuire la cinci ani a pacienților cu cancer endometrial în stadiul I după tratament, conform diferitor autori, variază în funcție de profunzimea invaziei în miometru de la 97,5 (cu invazia mai mică de 5 mm) la 61,5% (cu invazia mai mare de 10 mm), în funcție de gradul de diferențiere de la 81% la paciențele cu tumori înalt diferențiate la 42% la paciențele cu tumori slab diferențiate [17].

Un studiu recent, care reprezintă o analiză integrativă a genomului în cazul a 373 de tumori endometriale, realizat de o echipă de cercetători de la Universitatea Washington (St. Louis, 2013) în cadrul proiectului *Cancer Genome Atlas (TCGA)*, a relevat că aproximativ 1/4 din tumori sunt clasificate ca fiind endometrioid, cu grad scăzut de diferențiere, cu fenotip molecular, similar carcinoamelor seroase ale corpului uterin, inclusiv mutații TP53 și anomalii ale numărului copiilor genelor somatice [11]. Din acest considerent, au fost evidențiate 4 subgrupuri noi de neoplazie endometrială, în dependență de spectrul modificărilor genetice și moleculare. În cadrul unui studiu multicentric, Y. Hussein et al. [12] au analizat parametrii morfologici și clinico-patologici a 17 tumori din subgrupul TCGA „ultramutant”, precum și o cohortă formată din 8 astfel de tumori, care au fost studiate la Universitatea din Calgary (Canada) [13].

În pofida unui număr mare de cercetări realizate atât de autorii autohtoni, cât și de cei străini, axate pe studiul aspectelor biologice moleculare ale cancerului endometrial, în prezent, niciunul dintre markerii tumorali nu este recomandat pentru o utilizare clinică la scară largă în cazul cancerului de corp uterin, deoarece nu există suficiente informații pentru introducerea acestora în practica clinică.

Conform recomandărilor actuale ale ESMO, pentru managementul pacienților cu tumori endometriale, tactica de tratament este determinată de rezultatele stratificării riscului [24]. În ceea ce privește cancerul de CE, sunt descriși un număr mare de factori de prognostic, fapt care creează anumite dificultăți în aplicarea acestora în practica clinică. Majoritatea factorilor sunt morfologici, iar informațiile despre aceștia sunt obținute în baza unui examen histologic standard. Datele respective sunt utilizate pentru a evalua riscul metastazelor limfoganglionare, a face prognoze în legătură cu evoluția bolii și viața pacienților cu CE și pentru a planifica tratamentul postoperator. Studiul factorilor clinici, dar și a celor morfologici de prognostic în cadrul anumitor stadii, în special în cele timpurii, au fost deja realizate de către alți autori [6, 9].

Totuși, conform unui studiu realizat de TCGA (2013), 1/4 dintre tumorile clasificate drept carcinoame endometriale G3, corespund, după profilul molecular, unui subgrup de tumori de tipul celor seroase [11]. În același timp, un alt grup de cercetători [18] a analizat 3 cazuri de tumori, definite histologic drept seroase, care au suferit mutații *PTEN* și *ARID1A* în absența mutațiilor *TP53*. La

reevaluarea histopatologică, toate cele 3 tumori au fost identificate ca fiind mixte. În plus, a fost efectuată o analiză imunohistochimică, care a contestat existența unui profil seros al tumorilor în legătură cu expresia normală p53 și în absența expresiei p16. De asemenea, expresia receptorilor la estrogen și progesteron a fost identificată la una dintre tumori [25]. Potrivit cercetătorilor, acest fapt sugerează că clasificarea cancerului endometrial nu mai poate reieși dintr-un model dualist. În special, tumorile cu grad scăzut de diferențiere au o eterogenitate pronunțată, care nu este reflectată în clasificarea acceptată, în timp ce profilul mutației tumorilor cu grad înalt de diferențiere și seroase variază semnificativ. Majoritatea tumorilor seroase prezintă mutații la nivelul genei *TP53*; 1/3 din tumorile „ultramutante”, de asemenea, le pot avea, totuși, prognosticul clinic este diferit. Prin urmare, atunci când se utilizează analiza imunohistochimică pentru a confirma diagnosticul de carcinom seros, determinarea p53 și panelul auxiliar de parametri imunohistochimici, cum ar fi *PTEN* și *ARID1A*, pot fi utilizate pentru diferențierea carcinomului seros de tumoarea endometrioidă cu mutația genei *POLE* [1].

În pofida numărului mare de cercetări realizate atât de către autorii autohtoni, cât și de cei străini, care s-au axat pe studiul aspectelor biologice și moleculare ale cancerului endometrial, în prezent niciunul dintre markerii tumorali nu sunt recomandați pentru o utilizare clinică pe scară largă în cancerul de corp uterin, deoarece nu există suficiente informații pentru introducerea acestora în practica clinică. Prin urmare, problema privind criteriile de prognostic în cazul cancerului endometrial rămâne a fi neabordată [8]. Ca urmare a analizării grupurilor de risc, este necesar de a stabili un model propriu de prognostic, extins datorită integrării unor caracteristici clinice și morfologice suplimentare ale tumorii.

Scopul studiului: determinarea factorilor clinico-morfologici și molecular-genetici de prognostic al cancerului endometrial (CE) în stadiile I-II pentru elaborarea modelului matematic de predicție a recidivelor și supraviețuirii pacientelor pe o perioadă de până la 3 ani.

Obiectivele lucrării:

1. Stabilirea criteriilor clinice, morfologice, imunohistochimice ca factorii de prognostic ai CE;
2. Estimarea corelației datelor molecular-genetice în funcție de caracteristicile clinice și morfologice ale cancerului de endometru;
3. Studiul particularităților imunohistochimice și estimarea profilului molecular al tumorii la pacientele lotului de studiu;
4. Analiza multifactorială al complexului criteriilor de prognostic stabilite cu determinarea valorii de prognostic pentru fiecare factor aparte la pacientele cu CE în stadiile I-II;
5. Crearea modelului matematic al evaluării complexe de prognostic al CE în stadiile I-II în funcție de grupurile de risc și de factorii de prognostic.

Noutatea și originalitatea științifică

Pentru prima dată a fost cercetată interfața biomarkerilor evenimentelor fiziopatologice principale ce se referă la declanșarea și evoluția cancerului endometrial în stadiul I și II. S-a estimat rolul echilibrului între procesele extreme iminente CE, cum ar fi apoptoza celulară și proliferarea celulară în contiguitate cu angiogeneza tumorii pentru a consolida markeri cu valoare predictivă asupra prognosticului patologic.

Problema științifică soluționată în teză

Problema științifică soluționată în teză constă în aceea, că cercetarea bazată pe studii clinico-morfologice și molecular-genetice a decelat mecanisme patogenetice inedite și predictorii ai exacerbarii CE, cum ar fi prezența mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN*, metilării promotorului genei *MLH1*, markerului de proliferare Ki-67, creșterea indicelui neutrofile/limfocite, fapt ce a permis elaborarea unui model matematic pentru prezicerea evoluției bolii la pacientele cu CE din diferite grupuri de risc.

Semnificația teoretică a lucrării

Prin dovezile concludente obținute este completat conceptul și suportul teoretic al cancerului endometrial. La această noimă este importantă decantarea aportului mutației c.389G>A a genei *PTEN*, creșterii activității proliferative a ciclului mitotic evaluată prin intermediul creșterii antigenului Ki-67, mutației genei *TP53* rezultante în deprecierea raportului Bax/Bcl2. Totodată, este

evidențiat rolul inflamației în promovarea CE, iar majorarea indicelui neutrofile/limfocite este nu numai un mecanism patogenetic, dar și un predictor fezabil al prognosticului tumorii. Este conceptual importantă legătura notabilă a CE cu creșterea masei corporale, precum și absența legăturii între CE vizavi de riscul recurenței pe o parte și caracteristicile menstruației, numărului de nașteri și avorturi spontane pe de altă parte. Rata adenocarcinomul papilar seros în lotul pacientelor cu CE cu stadiul II este în medie cu 44-48% mai mare comparativ cu indicele stadiului IA și IB. Gradul diferențierii tumorale are impact concludent asupra riscului recurenței, astfel că gradul scăzut de diferențiere se estimează în 95% la pacientele de risc crescut, iar gradul înalt de diferențiere este caracteristic riscului scăzut (80%). Remarcabil, că profunzimea invaziei tumorii nu se corelează autentic cu creșterea riscului. Prezența focarelor necrotice este un predictor veritabil al riscului crescut. Impactul inflamației se impune prin valori maxime ale raportului neutrofile/limfocite și trombocite/limfocite la pacientele cu CE de risc crescut. Markerul proliferației Ki-67 este în raport direct cu gradul de risc, precum și cu stadiul bolii (nivelul expresiei Ki-67>49% este decelat numai în grupul de risc crescut). Prezența mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* este în grupul riscului crescut de 4-8 ori mai mare comparative de riscul intermediar și intermediar-crescut. Epimutația *MLH1* nu demonstrează o legătură atât de concludentă cu evoluția CE comparative cu mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN*.

Valoarea aplicativă a lucrării

A fost elaborat un model propriu de prognostic, care include caracteristici clinice, morfologice, imunohistochimice și genetice ale cancerului endometrial. Supraviețuirea pacientelor cu CE pe o perioadă de supraveghere de 3 ani este minimală (72,2%) în rândul celor cu vârsta mai mare de 60 de ani și care fac parte din grupul de risc crescut al recurenței. Rata de supraviețuire fără recidive este de asemenea minimală la aceste paciente (44%). Totodată, rata metastazelor la pacientele cu CE nu se corelează inteligibil cu stadiul bolii. Timpul mediu de progresie a CE este în raport indirect cu valoarea raportului neutrofile/limfocite, acesta fiind minimal (6 luni: de la 5 până la 9 luni) la pacientele de risc crescut de recurență ce au un indice INL> 5,0. Markerul Ki-67 are valoare predictivă certă asupra ratei de supraviețuire și de recidivă la pacientele cu CE, astfel, că activitatea proliferativă sporită (>49%) are impact negativ la distanța de 3 ani. Prezența epimutației *MLH1* de asemenea influențează recidiva bolii la pacientele cu CE la distanța de 3 ani, dată fiind valoarea minimală a timpului mediu până la progresare de 10,5 ani atestat la purtătoarele acestei mutații din grupul de risc crescut.

Rezultatele științifice obținute pe durata efectuării studiului au fost prezentate, discutate și publicate în cadrul forurilor științifice naționale și internaționale:

A XXIV-a ediție a Expoziției Internaționale Specializate „MoldMEDIZIN & MoldDENT” Activități integrate în cadrul Programului național de control al cancerului în R. Moldova și rolul imunogeneticii în diagnosticul și tratamentul maladiilor oncologice (Chișinău, 2018); Al XIII-lea Congres al oncologilor și radiologilor din țările CSI și Euroasia (Kazani, Rusia, 2020); Al XXI-lea Congres European al Oncoginecologilor (Atena, Grecia 2020); Congresul Oncologilor din Republica Moldova cu participare internațională, ediția V, Prevenirea și Controlul cancerului – o continua provocare (Chișinău 2020); Al XIV-lea Congres al oncologilor și radiologilor din țările CSI și Euroasia (Moscova, Rusia, 2021); Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu” cu participare internațională (Chișinău, 2021); Training School: Gynecare Conference (Valletta, Malta 2022); Al XXIII-lea Congres European al Oncoginecologilor (Berlin, Germania 2022). Training School in Rare Gynaecological Tumors (Skopje, Macedonia 2022); Training School in Rare Gynaecological Cancers „Bringing the gap between research and cure in gynaecological cancers” (Napoli, Italia, 2023).

Publicații la tema tezei: au fost publicate 55 de lucrări științifice.

Sumarul compartimentelor tezei

Teza este scrisă în limba română și cuprinde: adnotările în limbile română, rusă și engleză, lista abrevierilor, declarația privind asumarea răspunderii, introducere, 6 capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie, anexe, model matematic pentru prezicerea evoluției bolii la pacientele cu CE din diferite grupuri de risc, CV-ul autorului.

CONȚINUTUL TEZEI

1. ASPECTELE MOLECULAR-GENETICE ALE CANCERULUI ENDOMETRIAL. O ABORDARE MODERNĂ A PROBLEMEI

Sunt expuse reperele principale ce caracterizează epidemiologia cancerului endometrial în Moldova și diferite țări Europene. Este decelată valoarea patogenetică vizavi de CE a diferitor factori de risc, cum ar fi sindromul metabolic, dereglarea profilului lipidic, hiperglicemia, inflamația, obezitatea, etc. Este expus apanajul fiziopatologic modern ce vizează declanșarea și evoluția CE, inclusiv la conotația modificărilor genetice cu putere de activare a procesului de proliferare pe fondalul deprecierei mecanismelor de apoptoză, așa ca mutațiile genei *PTEN* în detrimentul exercițiului de blocare a ciclului celular și controlului raportului proteinelor cu efect pro-/anti-apoptotice, Bax/Bcl2, mutațiile supresorului tumoral TP53, precum și reducerea expresiei E-caderinei, fapt ce facilitează creșterea și diseminarea tumorii. Este adus la apel panoul multi-marker util în diferențierea histologică a CE și în estimarea agresivității tumorii, catalogată în 4 paterne de neoplazie endometrială în dependență de spectrul modificărilor genetice și moleculare: tumori ultramutante, hipermutante, cu număr mare de copii și tumori cu număr redus de copii. Rolul ligandului PD/L de pe suprafața celulei tumorale este analizat în context cu relatarea markerilor proliferării celulare, antigenul Ki-67 și a antigenului nuclear celular proliferant (PCNA). Mutațiile genei TP53 sunt evidențiate drept o condiție de inhibiție a apoptozei prin creșterea expresiei factorului antiapoptotic Bcl2, iar mutația genei supresor *PTEN* este vizată predilect ca paternul c.389G>A în care guanina din poziția 389 este substituită cu adenină. De asemenea este subliniat aportul patogenetic, diagnostic și prognostic al markerilor angiogenezei, iar creșterea expresiei COX2 în asociere cu elevarea markerilor proinflamatori se impune ca factor patogenetic și predictor veritabil al cancerului endometrial.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Designul studiului conține reperele principale de jalonare și etapizare a studiului prospectiv realizat pe 269 paciente cu CE în stadiile I și II apreciate în examenul histologic.

Schema generală a proiectului de cercetare include descrierea primei etape a studiului, marcată prin evaluarea particularităților clinico-morfologice (localizarea, dimensiunea tumorii, forma creșterii, invazia, particularitățile statutului imun) și etapei a 2-a marcată prin cercetarea particularităților imunohistochimice și molecular-genetice: determinarea markerului Ki-67, mutației c.389G>A a genei *PTEN*, hipermetilării promotorului genei *MLH1* cu determinarea profilului și subtipului molecular al tumorii.

Potrivit recomandărilor modificate ale ESGO lotul general al pacientelor cu CE a fost divizat în 4 grupuri vizavi de riscul recurenței: scăzut, intermediar, intermediar-crescut și crescut. Criteriile de stratificare a pacientelor în grupuri de risc de recurență au fost: stadiul bolii, gradul de diferențiere a tumorii, profunzimea invaziei tumorale, prezența invaziei perilimfovaskulare și perineurale.

Astfel, pacientele din lotul total al studiului au fost împărțite în 4 grupuri de risc:

1. grupul 1 include 75 de paciente cu CE de risc scăzut,
2. grupul 2, care a fost format din 84 de paciente cu CE de risc intermediar
3. grupul 3, care a fost format din 50 de paciente cu CE de risc intermediar-crescut
4. 60 paciente cu CE de risc crescut, care formează grupul 4.

Aceste 4 grupuri sunt de asemenea jalonate în dependență de vârstă și activitatea reproductivă, stadiul bolii, subtipul histopatologic și gradul de diferențiere tumorală. Totodată, fiecare grup este detaliat analizat sub aspectul vârstei, duratei ciclului menstrual și a postmenopauzei, numărul de sarcini și avorturi, vechimii bolii. Pe de altă parte, grupurile au fost supuse exegezei în funcție de maladiile organelor sistemului reproductiv: boala inflamatorie pelvină, endometrioza, hiperplazie endometrială, chist ovarian, miomul corpului uterului, polipul corpului uterin, etc.

Diagnosticul și tratamentul pacientelor cu CE a corespuns algoritmilor recomandați pentru sfera diagnosticului și a tratamentului neoplasmelor maligne din Protocolul Național de CE aprobat de Ministerul Sănătății.

Toate metodele de cercetare imunohistochimică, histopatologică, molecular-genetică sunt

descrise în asociere cu expunerea utilajului tehnic utilizat. În mod detaliat sunt relatate manevrele procesării statistice a materialului cifric.

La distribuirea pacienților în funcție de vârstă, cel mai mare procent este înregistrat la categoriile de vârstă 60-69 de ani în 116 (48,3%) de cazuri. Grupurile de vârstă cel mai puțin afectate de cancer endometrial sunt 30-39 ani (0,7%), 40-49 ani (8,9%), 70+ de ani (10,4%). Categoria de vârstă 30-39 de ani a fost înregistrată la paciențele din grupurile de risc crescut și intermediar-crescut mai des, comparativ cu paciențele cu CE din grupul de risc intermediar și scăzut, în care nu a fost raportat nici un caz de CE.

Lotul general de studiu a inclus 269 de paciente cu CE în stadiile I-II, vârstă medie $59,9 \pm 0,64$ ani (Figura 2.1).

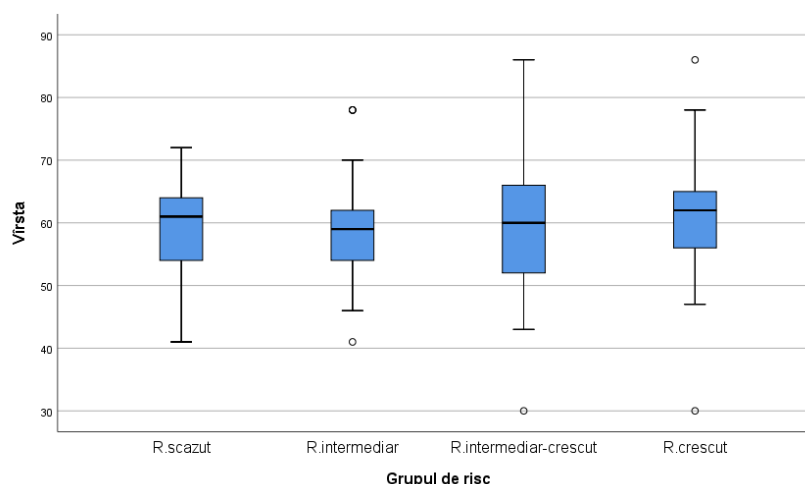


Figura 2.1. Vârsta pacienților incluse în studiu în funcție de grupul de risc, ani

În debutul bolii vârstă medie a pacienților cu CE din grupul de risc crescut aflați în perioadă reproductivă a constituit $41,7 \pm 5,84$ ani, comparativ cu datele din grupul de risc intermediar și crescut respectiv $45,5 \pm 0,96$ ani și $45,9 \pm 1,08$ ani. Astfel, vârstă medie a pacienților cu CE din grupul de risc crescut în perioadă perimenopauzală a constituit $50,0 \pm 0,58$ ani, comparativ cu datele din grupul de risc intermediar și crescut respectiv $50,0 \pm 0,0$ ani și $51,3 \pm 0,67$ ani. Vârstă medie a pacienților cu CE din grupul de risc crescut în perioadă postmenopauzală a constituit $62,9 \pm 0,95$ ani, comparativ cu datele din grupul de risc intermediar și crescut respectiv $60,8 \pm 1,0$ ani și $61,2 \pm 0,65$ ani.

Tabelul 2.1. Vârstă medie de debut a CE la paciențele în conformitate cu grupul de risc

Perioadă de vârstă	Grupul de risc				P
	Scăzut	Intermediar	Intermediar-crescut	Crescut	
Perioadă reproductivă	$41,7 \pm 5,84$	$45,5 \pm 0,96$	$43,3 \pm 2,85$	$45,9 \pm 1,08$	$F=0,624$; $p=0,608$
Perioadă perimenopauzală	$51,3 \pm 0,67$	$50,0 \pm 0,0$	$50,8 \pm 0,25$	$50,0 \pm 0,58$	$F=1,684$; $p=0,219$
Perioadă postmenopauzală	$61,2 \pm 0,65$	$60,8 \pm 1,0$	$63,2 \pm 1,01$	$62,9 \pm 0,95$	$F=1,699$; $p=0,168$

Deosebiri de vârstă, la care se instalează boala, sunt condiționate, probabil, de factorii genetici. Astfel, cercetarea molecular-genetică la paciențele cu cancer endometrial dă posibilitatea de a determina subtipul molecular al tumorii. Acest fapt trebuie luat în considerație în evaluare evoluției cancerului endometrial și gradului de agresivitate al tumorii.

Examinare clinică

În vederea verificării validității ipotezelor și atingerii obiectivelor, am aplicat următoarele metode și instrumente: metodele de investigare generale (chestionarea anamnetică și cercetarea documentației medicale), speciale (examinarea clinică ginecologică, examinarea prin metoda

instrumentală și imagistică), examenul histopatologic și metode de laborator (hemoleucograma, urograma, analiză biochimică de sânge).

Examenul ecografic al organelor genitale interne s-a efectuat în regim de timp real cu ultrasonograful de tip SAL-77A, produs de firma „Toshiba” (Japonia), dotat cu un set de transductori sectoriali și liniari cu frecvență de la 3,5 până la 7,5 MHz. În prezentul studiu s-a realizat ultrasonografia transvaginală și transabdominală a organelor pelviene interne. În timpul studiului, s-a determinat localizarea uterului și ovarelor și dimensiunile acestora. O atenție deosebită a fost acordată stării endometrului (M-Echo). Grosimea endometrului, conform M-Echo în menopauză, este în mod normal de 4-5 mm.

Chiuretajul diagnostic al cavității uterine s-a efectuat în funcție de rezultatele examenului ecografic (grosimea M-Echo) la pacientele, care prezentau acuze de metroragie în perioadă menopauzală.

Pentru **investigația citologică** s-au prelevat frotiuri de pe colul uterin, din canalul cervical, din cavitatea uterină. Fixarea preparatelor s-a efectuat prin metoda Leishman, iar colorația – după Romanowski.

Studii morfologice și imunohistochimice

În studiul morfologic al tumorilor endometriale maligne, s-a evaluat tipul histologic și gradul de diferențiere tumorală, s-a evaluat profunzimea invaziei tumorale în miometru, răspândirea procesului în canalul cervical, stadiul bolii și starea trompelor uterine și a ovarelor. Fixarea preparatelor prin metoda standard și colorația lor s-a efectuat în majoritatea cazurilor cu hematoxifilină – eozină, iar în unele cazuri – în adenocarcinom înalt diferențiat mucinos suplimentar - cu muciracmin și albastru de alcian după Stidmen, Carmin Best.

Studiul imunohistochimic a fost realizat prin metoda peroxidază-antiperoxidază conform metodei tradiționale. Am folosit anticorpi Ki-67 (Dako, clonă MIB, diluare gata, demascare în tampon citrat (pH=6,0).

Investigațiile molecular-genetice ale mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei PTEN

Pentru identificarea mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN*, ADN-ul a fost izolat din 50 probe de țesut parafinat de la pacientele cu cancer endometrial. Histopatologia fiecărui specimen de tumoare FFPE a fost revizuită de către histopatologi pentru a confirma diagnosticul și a determina procentul de celule tumorale. Investigațiile molecular-genetice au fost efectuate în Laboratorul Științific Biologia Cancerului al IMSP IO.

Probe de țesut și ADN. ADN-ul genomic a fost izolat din 50 probe de țesut tumoral parafinat (FFPE) folosind kitul GeneJET FFPE DNA Purification Kit (ThermoFisher) conform protocolului de la producător. Din fiecare bloc de parafină a fost secționat cu microtomul câte 4 secțiune de 10 uM. Următoarele etape fiind realizate în conformitate cu protocolul aferent kit-ului de la producător.

castPCR (Competitive Allele-Specific TaqMan PCR). Probele de ADN genomic au fost analizate pentru mutația *PTEN*:c.389G>A (p.R130Q) prin metoda castPCR cu utilizarea primerilor și probelor specifici (Fig. 2.2.)

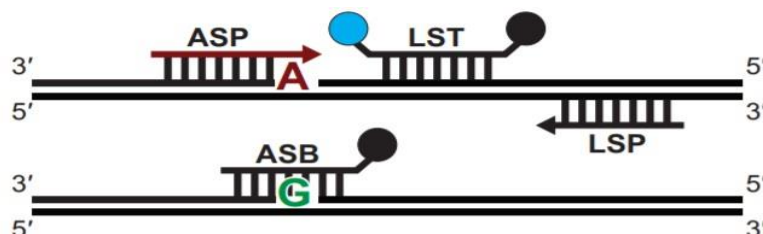


Figura 2.2. Primerii și probele utilizate pentru identificarea specifică a mutației *PTEN*:c.389G>A prin metoda castPCR. ASP – primer alelă-specific, ASB – blocant alelă-specific, LST – probă TaqMan locus-specifică, LSP – primer locus specific

Fluxul probelor pentru castPCR este reprezentat în Figura 2.3.

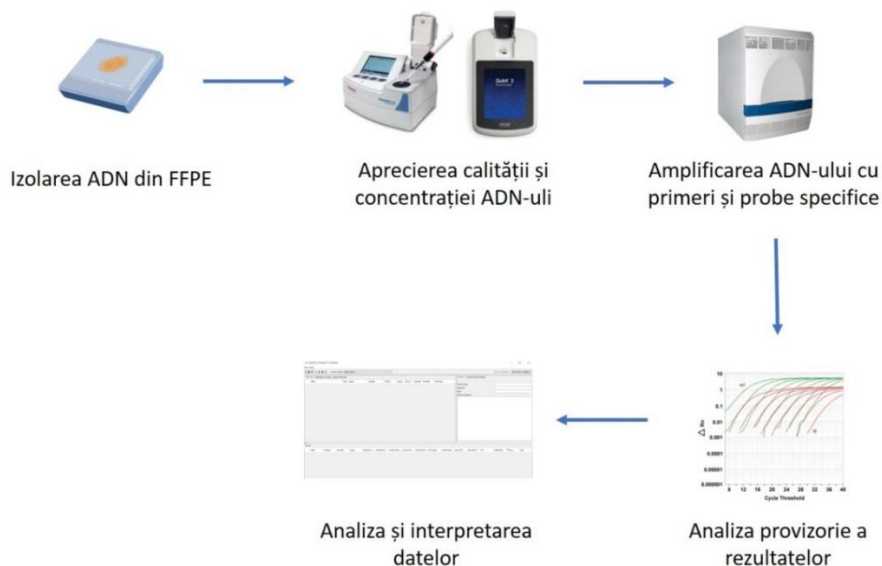


Figura 2.3. Fluxul de lucru pentru castPCR.

Investigațiile molecular-genetice ale metilării promotorului genei MLH1

Pentru generarea datelor de metilare a genei *MLH1*, ADN-ul a fost izolat din 50 probe de țesut parafinat de la pacienții cu cancer endometrial. Histopatologia fiecărui specimen de tumoare FFPE a fost revizuită de către histopatologi experți pentru a confirma diagnosticul și a determina conținutul celulelor tumorale. Selectarea cazurilor s-a bazat pe diagnosticul confirmat clinic de cancer endometrial.

Probe de țesut și ADN. Calitatea, integritatea, cantitatea și concentrația de ADN corespunde criteriilor descrise în subcapitolul 2.2.5., așa cum au fost utilizate aceleași probe de țesut parafinat și probe de ADN izolat.

MS-PCR (Methylation specific Polymerase Chain Reaction). Pentru identificarea metilării promotorului genei *MLH1*, 120 ng/probă de ADN izolat a fost modificat prin tratarea cu bisulfite de sodiu utilizând kit-ul EpiJET Bisulfite Conversion Kit (ThermoFisher) în conformitate cu protocolul. Statutul de metilare a genei *MLH1* a fost determinat utilizând metoda Reacția de Polimerizare în Lanț specifică metilării (MS-PCR – Methylation specific Polymerase Chain Reaction) și primeri specifici atât pentru fragmentele nemetilate cât și pentru cele metilate.

Reacția PCR a fost realizată utilizând kitul Platinum PCR SuperMix (ThermoFisher) și protocolul aferent kit-ului cu modificarea temperaturii de aliniere a primerilor reieșind din dimensiunea și succesivitatea nucleotidelor.

Evaluarea parametrilor indicelui neutrofile/limfocite și trombocite/limfocite

Pentru a identifica valoarea de prognostic a markerilor clinici de inflamație, am calculat următoarele rapoarte:

Indicele neutrofile/limfocite (INL) a fost calculat ca raportul dintre numărul absolut de neutrofile și numărul absolut de limfocite din sângele periferic.

Indicele trombocite/limfocite (ITL), care a fost calculat ca raportul dintre numărul absolut de trombocite și numărul absolut de limfocite din sângele periferic.

Metodologie pentru prelucrarea statistică a rezultatelor cercetării

Toate rezultatele sunt prezentate în tabele ca $M \pm m$, unde M este media eșantionului, m este eroarea mediei.

La procesarea statistică a rezultatelor obținute, au fost utilizate următoarele metode:

- testul Fisher pentru variabile independente - pentru a evalua semnificația diferențelor dintre grupuri cu o distribuție normală a trăsăturii. Diferențele au fost considerate semnificative la $p < 0,05$;
- testul Pearson χ^2 - pentru a evalua semnificația diferențelor dintre grupuri în ceea ce privește caracteristicile calitative. Diferențele au fost considerate semnificative la $p < 0,05$; - analiza

unică a varianței (ANOVA, IBM STATISTICS 26.0) a fost utilizată pentru a evalua semnificația diferențelor dintre grupuri sub influența factorilor individuali;

- s-a folosit regresia liniară logistică

3. ANALIZA CARACTERISTICILOR CLINICE ȘI MORFOLOGICE LA PACIENTELE CU CANCER ENDOMETRIAL ÎN STADIILE I-II

Parametrii clinici și anamnestici au fost studiați la 269 de paciente cu CE în stadiile I - II. Vârsta pacientelor din toate grupurile de paciente cu CE nu a diferit semnificativ și a variat de la 30 la 86 de ani, fără diferență statistic semnificativă între grupurile de risc ($\chi^2=11,681$; $gl=15$, $p>0,05$). Vârsta de 30-39 de ani s-a întâlnit la 2 (0,7%; ÎI 95% [0,0-1,9]) paciente, iar cel mai frecvent a fost observată vârsta de 60-69 de ani și a fost înregistrată la 116 (43,1%; ÎI 95% [37,5-49,1]) paciente.

Tabelul 3.1. Distribuția pacienților cu CE în stadiile I - II din diferitele grupuri de risc în funcție de vârstă

Grupuri de vârstă	Grupul de risc								TOTAL	
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut			
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
30-39 ani	0	0,0	0	0,0	1	1,2	1	1,7	2	0,7
40-49 ani	8	10,7	6	12,0	6	7,1	4	6,7	24	8,9
50-59 ani	24	32,0	22	44,0	33	39,3	20	33,3	99	36,8
60-69 ani	37	49,3	18	36,0	32	38,1	29	48,3	116	43,1
>70 ani	6	8,0	4	8,0	12	14,3	6	10,0	28	10,4

Ereditatea agravată pentru cancerul endometrial a fost observată la pacientele din toate grupurile de risc. La studierea eredității agravate în CE, s-au obținut următoarele date, prezentate în tabelul 3.2.

Tabelul 3.2. Dependența CE de prezența tumorilor maligne la rudele pacienților cu CE în stadiile I - II ale diferitelor grupuri de risc

Rudele pacienților cu CE	Grupul de risc								P gl=3
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	
Rudele de gradul I (părinți, frați și surori) 3 și mai mult	13	17,3	9	18,0	16	19,0	10	16,7	$\chi^2=0,154$; p>0,05
Rudele de gradul I (părinți, frați și surori) 2 rude	8	10,7	10	20,0	10	11,9	11	18,3	$\chi^2=3,277$; p>0,05
Rudele de gradul I (părinți, frați și surori) o rudă	13	17,3	9	18,0	22	26,2	8	13.3	$\chi^2=4,167$; p>0,05

Tumorile maligne la rudele de gradul I s-au înregistrat la 64 (85,3%; ÎI 95% [77,3-93,3]) paciente din grupul de risc scăzut, 44 (88,0%; ÎI 95% [79,0-97,0]) din grupul de risc intermediar, 80 (95,2%; ÎI 95% [90,7-99,8]) din grupul de risc intermediar-crescut și 59 (98,3%; ÎI 95% [95,1-101,6]) din grupul de risc crescut. Putem constata o ereditate mai agravată în grupul de risc crescut, veridic statistic ($\chi^2=9,870$; $gl=3$, $p<0,05$).

S-a observat că tumorile hormonal-dependente (tractul gastrointestinal, organele genitale) au fost găsite într-un procent mai mare de cazuri la rudele pacienților cu CE din grupul de risc crescut (48,6%) decât la pacientele din grupul de risc scăzut (40,8%) (Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Localizarea tumorilor maligne la rudele pacientelor cu CE stadiul I - II.

Localizarea tumorilor maligne	Grupul de risc								P gl=3
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	
Plămâni	8	10,7	9	18,0	15	17,9	11	18,3	$\chi^2=2,196$; p>0,05
Tractul gastrointestinal	9	12,0	9	18,0	17	20,2	15	25,0	$\chi^2=3,944$; p>0,05
Glanda mamară	17	22,7	17	34,0	23	27,4	15	25,0	$\chi^2=2,089$; p>0,05
Organele genitale	10	13,3	4	8,0	6	7,1	4	6,7	$\chi^2=2,551$; p>0,05
Rinichii, vezica urinară	1	1,3	1	2,0	3	3,6	1	1,7	$\chi^2=1,069$; p>0,05
Laringele	-	-	-	-	1	1,2	-	-	$\chi^2=2,211$; p>0,05
Creier	4	5,3	7	14,0	8	9,5	5	8,3	$\chi^2=2,838$; p>0,05
Leucemiile	2	2,7	1	2,0	1	1,2	1	1,7	$\chi^2=0,492$; p>0,05
Melanom malign și tumorile pielii	-	-	-	-	1	1,2	-	-	$\chi^2=2,211$; p>0,05

Ciclul menstrual regulat cu hipermenoree s-a înregistrat la pacientele din grupul de risc intermediar-crescut și din grupul de risc crescut, 16,7% și 35,0%, respectiv; pe când în grupul de risc scăzut și lotul de risc intermediar s-a înregistrat doar 13,3% și 6,0%, respectiv. Între grupuri se atestă o diferență statistic semnificativă ($\chi^2=17,951$; $gl=3$, $p<0,001$). Durata ciclului menstrual până la 26 zile s-a observat la jumătate dintre paciente - 131 (48,7%; ÎI 95% [42,4-55,0]). Ciclul menstrual de durată 27-30 zile s-a înregistrat la 58 (21,6%; ÎI 95% [16,4-26,4]) paciente. Durata ciclului menstrual nu diferă semnificativ între grupurile de studiu ($F=0,439$; $p>0,05$).

Tabelul 3.4. Caracterul ciclului menstrual conform grupului de risc la pacientele cu CE în stadiile I-II

Caracteristicile ciclului menstrual	Grupul de risc								P
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Abs.	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	
Vârsta apariției menarhei									
Până la 12 ani	6	8,0	11	22,0	10	11,9	9	15,0	$\chi^2=6,979$; gl=6; p>0,05
12- 14 ani	49	65,3	25	50,0	56	66,7	36	60,0	
15- 16 ani	20	26,7	14	28,0	18	21,4	15	25,0	
Tipul ciclului menstrual									
Ciclul regulat	10	13,3	3	6,0	14	16,7	21	35,0	$\chi^2=17,951$; gl=3; p<0,001
Polimenoreea	17	22,7	14	28,0	30	35,7	24	40,0	$\chi^2=5,686$; gl=3; p>0,05
Hipermenoreea	24	32,0	18	36,0	36	42,9	19	31,7	$\chi^2=2,722$; gl=3; p>0,05
Proiomenoreea	6	8,0	1	2,0	6	7,1	6	10,0	$\chi^2=2,842$; gl=3; p>0,05
Durata ciclului menstrual									
Până la 26 zile	37	49,3	28	56,0	37	44,0	29	48,3	$\chi^2=2,896$; gl=6; p>0,05
27- 30 zile	14	18,7	11	22,0	19	22,6	14	23,3	
31 zile și mai mult	24	32,0	11	22,0	28	33,3	17	28,3	
Vârsta apariției menopauzei									
Până la 40 ani	-	-	-	-	4	4,8	2	3,3	$\chi^2=14,194$; gl=9; p>0,05
40- 44 ani	6	8,0	1	2,0	2	2,4	-	-	
45- 49 ani	13	17,3	8	16,0	16	19,0	14	23,3	
50 ani și mai mult	56	74,7	41	82,0	62	73,8	44	73,3	
Hemoragiile uterine (HU)									
Prezent	48	73,8	24	55,8	58	75,3	43	82,7	$\chi^2=9,156$; gl=3; p<0,05
Sindromul climacteric									
Prezent	63	84,0	40	80,0	72	85,7	41	68,3	$\chi^2=2,896$; gl=6; p>0,05

Vârsta apariției menopauzei în lotul general este de $50,2\pm 0,22$ fără diferență statistic

semnificativă între loturi ($F=1,52$; $p>0,05$). Metroragiile în perioadă postmenopauzală s-au observat la bolnavele din toate grupurile de risc, însă cea mai mare frecvență a fost înregistrată în grupul de risc crescut – 43 (82,7%; ÎI 95% [72,0-92,3]) și cel de risc intermediar-crescut - 58 (75,3%; ÎI 95% [65,8-84,2]), fiind atestată diferență statistic semnificativă ($\chi^2=9,156$; $gl=3$, $p<0,05$). Sindromul climacteric a fost prezent la 53 (19,7%; ÎI 95% [15,2-24,9]) paciente din lotul general, fără diferență statistic semnificativă între loturi ($\chi^2=7,639$; $gl=3$, $p>0,05$).

S-au obținut diferențe semnificative statistic între grupurile de studiu în raport cu patologiile organelor reproductive la femei. Polipii canalului cervical și cavitații uterine au fost depistați mai des în grupul de paciente de risc scăzut și de risc intermediar, cu diferență statistică semnificativă între loturi ($\chi^2=10,722$; $gl=3$; $p<0,05$) și ($\chi^2=24,408$; $gl=3$; $p<0,001$), respectiv, a fost observată diferență statistic semnificativă ($\chi^2=1,868$; $gl=3$; $p>0,05$). Incidența miomului uterin a fost mai înaltă în grupurile pacientelor de risc intermediar-crescut și crescut, 33,3% și 30,0% respectiv, cu o diferență statistic semnificativă ($\chi^2=8,011$; $gl=3$; $p<0,05$). La analizarea incidenței chisturilor ovariene diferență statistic semnificativ nu se atestă ($\chi^2=6,370$; $gl=3$; $p>0,05$). Endometrioza a fost înregistrată mai frecvent la pacientele din loturile de risc intermediar-crescut și crescut, 28,6% și 25,0%, respectiv, cu diferență statistic semnificativă între loturi ($\chi^2=14,419$; $gl=3$; $p<0,01$).

Tabelul 3.5. Distribuția pacienților cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc și prezența patologiilor organelor sistemului reproductiv

Patologiile organelor sistemului reproductiv	Grupul de risc								P gl=3
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	
Mastopatia fibrochistică	23	30,7	23	46,0	33	39,3	30	50,0	$\chi^2=10,533$; p>0,05
Ectropion de col uterin	7	9,3	10	20,0	10	11,9	21	35,0	$\chi^2=17,932$; p<0,001
Boala inflamatorie pelvină	9	12,0	3	6,0	6	7,1	2	3,3	$\chi^2=3,898$; p>0,05
Polip canalului cervical	4	5,3	7	14,0	2	2,4	1	1,7	$\chi^2=10,722$; p<0,05
Polip cavității uterine	28	37,3	22	44,0	12	14,3	8	13,3	$\chi^2=24,408$; p<0,001
Hiperplazia endometrului	39	52,0	23	46,0	36	42,9	25	41,7	$\chi^2=1,868$; p>0,05
Endometrioză	11	14,7	2	4,0	24	28,6	15	25,0	$\chi^2=14,419$; p<0,01
Miom uterin	11	14,7	12	24,0	28	33,3	18	30,0	$\chi^2=8,011$; p<0,05
Chisturi ovariene	20	26,7	7	14,0	13	15,5	17	28,3	$\chi^2=6,370$; p>0,05
Leucoplazia și crauroză vulvei	4	5,3	1	2,0	4	4,8	2	3,3	$\chi^2=1,037$; p>0,05

În rezultatul datelor obținute putem concluziona următoarele: majoritatea morfologilor și oncologilor ginecologici consideră problemele patogeniei cancerului endometrial în strânsă legătură cu procesele hiperplazice ale endometrului.

Se cunoaște că, procesele hiperplazice endometriale în cele mai multe cazuri sunt asociate cu tulburări hormonale [4]. Numeroase studii au dovedit, că procesele hiperplazice ale endometrului prezintă un risc sporit de transformare malignă [11,18]. Hiperplazia atipică, în special, se transformă în cancerul endometrioid în aproape 52% din cazuri [11]. Datele noastre coincid cu datele literaturii și arată, că hiperplazia endometrială tipică pe fundalul fibroamelor uterine se dezvoltă de obicei în perioada de reproductivă și atipică - în perimenopauzală și postmenopauzală. Pentru a determina

grupul de risc pentru CE în conformitate cu criteriile ESGO, s-au utilizat următoarele criterii: gradul de diferențiere a tumorii, adâncimea invaziei tumorale, prezența invaziei perilimfovaskulare.

Dacă ne concentrăm doar pe aceste criterii, se observă că, în grupul de risc scăzut, crește frecvența metastazelor, precum și riscul de progresie a procesului după tratament. Aceasta poate avea următoarea explicație: precizia insuficientă a factorilor morfologici de prognostic.

Se atrage atenția asupra predominanței variantei patogenetice hormonal-dependente la paciențele cu CE din grupul de risc scăzut (85,0%) comparativ cu grupurile de risc intermediar (74,7%) și crescut (57,3%) (Tabelul 3.6).

Tabelul 3.6. Compararea prevalenței CE la paciențele din diferite grupuri de risc în funcție de variantă patogenetică

Grupul de risc	Variantă patogenetică		P
	I (hormonal-dependență), %	II (autonomă), %	
Scăzut	85,0	15,0	$\chi^2=4,955$; gl=3; p>0,05
Intermediar	74,7	25,3	
Intermediar-crescut	84,0	16,0	
Crescut	57,3	42,7	

În rezultatul examenului histopatologic s-a constatat că la majoritatea pacienților cu CE în stadiile I-II (55%) tumoarea primară a ocupat întreaga cavitate uterină fără sau cu trecerea în canalul cervical. La 31 (28,5%) paciențe tumora a fost localizată în treimea inferioară a corpului uterin fără sau cu trecerea în canalul cervical. La 18 (16,5%) paciențe tumora a fost localizată în fundul uterului și / și colțurile tubare și / și pereții uterului.

Cancer endometrial cu tumoră răspândită în miometru până la 50% (stadiul IA) a fost observată la 77 (28,6%; ÎI 95% [23,0-34,2]) paciențe, cu invazia în miometru mai mult de 50% (stadiul IB) în 128 (47,6%; ÎI 95% [41,3-53,5]) paciențe cu răspândire în colul uterin (stadiul II) la 64 (23,8%; ÎI 95% [18,7-28,9]) bolnave.

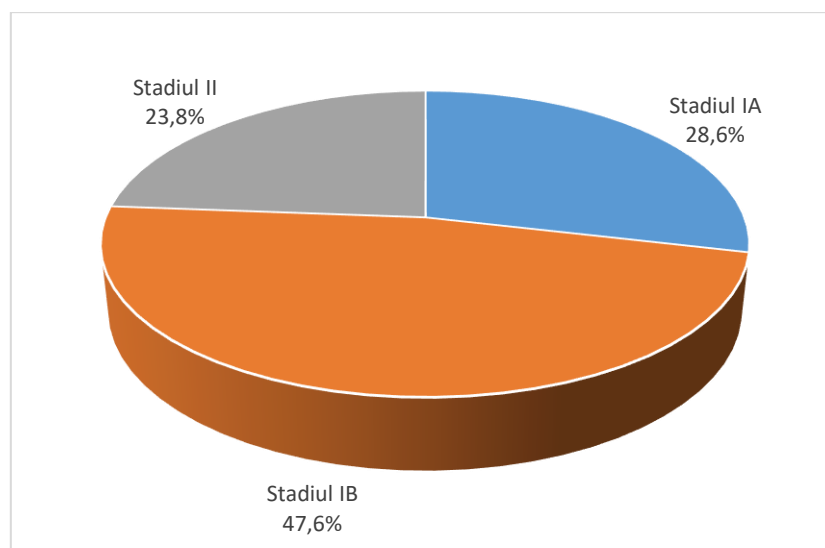


Figura 3.1. Structura pacienților cu CE din lotul de studiu conform stadiului bolii

Au fost relevate o serie de trăsături morfologice caracteristice CE în stadiile I-II. La analiza datelor privind distribuția pacienților cu CE în stadiul I, luând în considerare structura morfologică, trebuie de remarcat apariția relativ rară de forme histologice rare (adenocarcinom cu celule clare, carcinom cu celule scuamoase glandulare, adenocarcinom papilar seros și adenocarcinom mucinos), în timp ce la paciențele cu CE în stadiul II am observat o apariție destul de frecventă a formelor histologice rare 9 (3,3%; ÎI 95% [1,2-5,5]).

Tabelul 3.7. Distribuția pacienților cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc și subtipul histologic de cancer

Tipul histologic de cancer	Grupul de risc								P gl=3
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	
Adenocarcinom endometrial	70	93,3	46	92,0	69	82,1	46	76,7	($\chi^2=10,144$; $p>0,05$)
Adenocarcinom papilar seros	4	5,3	-	-	12	14,3	8	13,3	($\chi^2=10,498$; $p<0,05$)
Adenocarcinom endometrial cu metaplazia scuamocelulară	-	-	3	6,0	2	2,4	1	1,7	($\chi^2=5,065$; $p>0,05$)
Adenocarcinom clarocelular	-	-	-	-	1	1,2	2	3,3	($\chi^2=4,091$; $p>0,05$)
Carcinom pavimentos	-	-	-	-	-	-	2	3,3	($\chi^2=7,019$; $p>0,05$)

La 231 (85,9%; ia 95% [81,7-90,0]) paciente cu CE a fost diagnosticat adenocarcinomul endometrial de diferit grad de diferențiere, 6 (2,2%; ÎI 95% [0,5-4,0]) paciente au avut adenocarcinom endometrial cu metaplazie scuamoasă. Forme histologice rare de cancer de corp uterin au fost diagnosticate la 29 (10,8%; ÎI 95% [7,1-14,5]) paciente, dintre care 3 (1,1%; ÎI 95% [0,0-2,4]) paciente aveau adenocarcinom cu celule clare, în 2 (0,7%; ÎI 95% [0,0-1,8]) cazuri s-a depistat carcinom cu celule scuamoase glandulare, la 24 (8,9%; ÎI 95% [5,5-12,3]) paciente - adenocarcinom papilar seros. Adenocarcinomul endometrial înalt diferențiat a fost înregistrat la 60 (80,0%; ÎI 95% [70,9-89,1]) paciente cu CE din grupul de risc scăzut, adenocarcinomul moderat diferențiat - la 12 (16,0%; ÎI 95% [7,7-24,3]) paciente. În grupul de risc intermediar adenocarcinomul endometrial înalt diferențiat predomină la 26 (52,0%; ÎI 95% [38,2-65,8]) paciente, adenocarcinomul de grad moderat - la 22 (44,0%; ÎI 95% [30,2-57,8]) paciente. În grupul de risc intermediar-crescut adenocarcinomul endometrial înalt diferențiat a fost observat la 22 (26,2%; ÎI 95% [16,8-35,6]), adenocarcinomul de grad moderat și scăzut - la 48 (57,1%; ÎI 95% [46,6-67,7]) și, respectiv, 12 (14,3%; ÎI 95% [6,8-21,8]) paciente. În grupul de risc crescut, adenocarcinomul endometrioid de grad scăzut predomină la 57 (95,0%; ÎI 95% [89,5-100,0]), adenocarcinomul moderat și înalt diferențiat - la 3 (3,3%; ÎI 95% [0,0-7,9]) și - 1 (1,7%; ÎI 95% [0,0-4,9]) paciente, respectiv (Tabelul 3.8.).

Tabelul 3.8. Distribuția pacienților cu CE în stadiile I-II a diferitelor grupuri de risc în funcție de gradul de diferențiere tumorală

Gradul de diferențiere tumorală	Grupul de risc								P, gl=3
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	
Înalt	60	80,0	26	52,0	22	26,2	2	3,3	($\chi^2=92,539$; p<0,001)
Moderat	12	16,0	22	44,0	48	57,1	1	1,7	($\chi^2=62.975$; p<0,001)
Scăzut	-	-	-	-	12	14,3	57	95,0	($\chi^2=200,122$; p<0,001)

Analizând distribuția pacienților cu CE în stadiile I-II, luând în considerare profunzimea invaziei tumorii în miometru, s-a constatat că creșterea tumorii în endometru a avut loc la 15 (5,6%; ÎI 95% [2,8-8,3]) paciente; până la 50% din miometru - la 77 (28,6%; ÎI 95% [23,2-34,0]) paciente; peste 50% din miometru - la 127 (47,2%; ÎI 95% [41,2-53,2]) paciente; și răspândirea în toată grosimea miometrului - la 17 (6,3%; ÎI 95% [3,4-9,2]) paciente. În consecință, invazia de peste 50% în miometru a avut loc în 53,5% din cazuri. La pacientele din grupul de risc scăzut, profunzimea invaziei până la 50% din miometru a fost observată cel mai des - 49 (65,3%; ÎI 95% [54,6-76,1], adâncimea invaziei doar în limitele endometru la 10 (13,3%; ÎI 95% [5,6-21,0]) paciente. La pacientele

de risc crescut, invazia de peste 50% a fost observată la 38 (63,3%; ÎI 95% [41,4-53,4] paciente, iar la 4 dintre paciente (6,7%; ÎI 95% [0,4-13,0]), tumoarea a invadat toată grosimea uterului (Tabelul 3.9).

Tabelul 3.9. Distribuția pacienților cu CE în stadiile I-II în funcție de profunzimea invaziei tumorale

Profundzimea invaziei tumorale	Grupul de risc								P, gl=3
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	
În limitele endometrului	10	13,3	1	2,0	1	1,2	3	5,0	$\chi^2=12,892$; p<0,01
Infiltrează <50% în miometru	49	65,3	2	4,0	16	19,0	10	16,7	$\chi^2=72,276$; p<0,001
Infiltrează >50% în miometru	-	-	47	94,0	42	50,0	38	63,3	$\chi^2=200,122$; p<0,001
Toată grosimea miometrului	-	-	-	-	13	15,5	4	6,7	$\chi^2=200,122$; p<0,001

Pentru a identifica valoarea de prognostic a markerilor clinici de inflamație, am calculat următoarele rapoarte

1) indicele neutrofile/limfocite (INL), care a fost calculat ca raportul dintre numărul absolut de neutrofile și numărul absolut de limfocite din sângele periferic,

2) indicele trombocite/limfocite (ITL), care a fost calculat ca raportul dintre numărul absolut de trombocite și numărul absolut de limfocite din sângele periferic.

Tabelul 3.10. Markerii clinici ai inflamației la paciențele cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc

Indicele relativ al sângelui	Grupul de risc				P
	Scăzut	Intermediar	Intermediar-crescut	Crescut	
	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	
INL	2,29	2,39	2,46	5,34	$\chi^2=12,892$; $p<0,01$
ITL	120,19	124,0	147,1	355,7	$\chi^2=72,276$; $p<0,001$

INL a variat în toate grupurile de risc în limitele de la 0,65 la 7,22. În grupul de risc crescut mediana indicelui neutrofile/limfocite a fost cea mai înaltă și a constituit 5,34, ce corespunde datelor literaturii despre interdependența între INL și răspândirii procesului tumoral și nivelului de agresivității tumorale. ITL a variat de la 55,03 la 428,10 în toate grupurile de risc, însă în grupul de risc crescut valoarea medie a ITL a constituit 355,70. Datele obținute cu privire la nivelul INL la paciențele cu CE prezintă diferențieri semnificative statistic între grupuri ($F=0,011$; $gl=3$; $p>0,05$), precum și raportul ITL ($F=1,381$; $gl=3$; $p>0,05$).

4. FACTORII MOLECULAR-GENETICI ÎN PROGNOSTICUL CANCERULUI ENDOMETRIAL

Expresia antigenului Ki-67 a fost determinată în endometru la 50 de paciente cu CE prin metoda imunohistochimică. Valoarea markerului activității proliferative, Ki-67 la paciențele cu cancer endometrial în stadiile I-II s-a expus prin corelația acestui marker cu vârsta, numărul de sarcini, începutul și durata ciclului menstrual. Este demonstrată dependența expresiei indicelui Ki-67 de gradul de diferențiere tumorală la paciențele cu cancer endometrial conform grupului de risc, precum și legătura markerului cu stadiul CE și gradul de infiltrare a tumorii. La analiza datelor obținute, s-a relevat că la paciențele cu CE, valoarea minimă a indicelui Ki-67 a fost de 14%, valoarea maximă a fost de 75%, iar valoarea medie a fost de $43,6 \pm 12,4\%$. La paciențele cu CE non-endometrial ($n=9$),

indicele Ki-67 a variat între 16 și 77%, valoarea medie a indicelui a fost de $37,9 \pm 7,65\%$. Rezultatele studiului sunt prezentate în tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Relațiile de corelație și coeficienții de corelație Spearman între expresia Ki-67 și caracteristicile menstruale, funcția de reproducere la pacientele cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc

Grupul de risc	Corelație	Coeficient de corelație Spearman
Risc scăzut	Ki-67 - vârstă	0,415
	Ki-67 – durata ciclului menstrual	-0,212
	Ki-67 — vârstă menstuației	0,362
	Ki-67 – numărul de sarcini	0,126
Risc intermediar	Ki-67 - vârstă	-0,242
	Ki-67 – durata ciclului menstrual	-0,203
	Ki-67 — vârstă menstuației	-0,242
	Ki-67 – numărul de sarcini	0,069
Risc intermediar-crescut	Ki-67 - vârstă	0,017
	Ki-67 – durata ciclului menstrual	0,293
	Ki-67 — vârstă menstuației	0,044
	Ki-67 – numărul de sarcini	0,451
Risc crescut	Ki-67 - vârstă	0,147
	Ki-67 – durata ciclului menstrual	-0,047
	Ki-67 — vârstă menstuației	0,278
	Ki-67 – numărul de sarcini	-0,179

Astfel, la analiza datelor obținute în toate grupurile, s-a relevat că indicele de expresie Ki-67 nu depinde de vârsta pacientei. Totodată, nu a fost relevată o dependență de durata ciclului menstrual și de vârsta menopauzei. Analiza nivelului KI-67 în tumori a fost efectuată în raport cu gradul de diferențiere tumorală, profunzimea invaziei în miometru, prevalența procesului tumoral și stadiul bolii la pacientele cu CE. S-a observat că gradul de diferențiere tumorală la toate grupurile de paciente cu cancer endometrial a corelat cu nivelul indicelui de proliferare, rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Dependența expresiei indicelui Ki-67 de gradul de diferențiere tumorală la pacientele cu cancer endometrial în funcție de grupul de risc (abs.)

Diferențiere tumorală	Grupul de risc								p
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	
Înalt	13	4	1	2	-	3	-	-	$\chi^2=10,6$; gl=2; p<0,05
Moderat	1	1	4	2	-	6	-	-	$\chi^2=6,015$; gl=2; p<0,05
Scăzut	-	-	-	-	2	1	1	9	$\chi^2=4,174$; gl=1; p<0,05

La pacientele cu CE în stadiile I-II cu adenocarcinom endometrial de grad înalt de diferențiere, indicele Ki-67 a fost predominant sub valoarea medie, în timp ce în cazurile cu adenocarcinom de diferențiere moderată, aproximativ același număr de paciente (54% și 46%) au avut un indicele Ki-67 mediu mai mare și mai mic de 49%. La 75% dintre paciente cu adenocarcinom endometrial de grad scăzut de diferențiere, indicele de proliferare a fost mai mare decât mediana.

Când s-a studiat dependența expresiei indicelui de activitate proliferativă s-a relevat că la pacientele cu CE valoarea indicelui crește odată cu răspândirea procesului tumoral în miometru. Astfel, la pacientele cu CE cu profunzimea invaziei în miometru până la 50% indicele Ki-67 sub

valoare medie a fost în 9 cazuri și mai mare în 6 cazuri. Iar, la tumorile cu invazia în miometru mai mult de 50% indicele Ki-67 sub valoarea medie s-a înregistrat în 6 cazuri și mai mare în 16 cazuri.

Tabelul 4.3. Dependența expresiei indicelui Ki-67 de profunzimea invaziei în miometru la paciențele cu cancer endometrial în stadiile I-II în funcție de grupul de risc (abs.)

Profunzimea invaziei în miometru	Grupul de risc								P, gl=2
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	
Infiltrează < 50 %	14	5	-	-	-	3	-	-	$\chi^2=3,556$; p>0,05
Infiltrează ≥ 50 %	-	-	5	4	2	7	1	9	$\chi^2=6,385$; p<0,05

A fost efectuată determinarea dependenței indicelui de expresie Ki-67 de stadiul bolii, rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.4. S-a observat că în grupul de paciențe cu CE în stadiul I al bolii, la 12 dintre paciențe indicele de proliferare a fost sub valoarea medie. În stadiul II al CE, indicele de proliferare a fost predominant mai mare de 49% - la 15 paciențe.

Tabelul 4.4. Dependența expresiei indicelui Ki-67 de stadiul bolii la paciențele cu cancer endometrial în stadiile I-II în funcție de grupul de risc (abs.)

Stadiul bolii	Grupul de risc								P
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	Ki-67<49%	Ki-67>49%	
I	12	6	5	3	2	11	1	1	$\chi^2=13,440$; gl=3; p<0,01
II	-	-	-	-	-	-	-	9	$\chi^2=4,000$; gl=2 p>0,05

Astfel, analiza rezultatelor obținute a arătat că la paciențele cu CE valoarea indicelui de proliferare a fost semnificativ mai mică în stadiul I al bolii comparativ cu stadiul II și la 50,0% dintre paciențele cu stadiul I, indicele a fost sub medie ($p=0,037$). La paciențele cu CE din grupul de risc scăzut nu au fost obținute diferențe semnificative.

Valoarea markerului de proliferare Ki-67 la paciențele cu CE a avut o tendință generală: în toate grupurile a existat o dependență semnificativă de vârsta paciențelor, de durata ciclului menstrual și vârsta menopauzei. În plus, s-a depistat că valoarea expresiei Ki-67 se modifică în funcție de diferențierea tumorii, de gradul de invazie în miometru și stadiul bolii. Asocierile ale expresiei Ki-67 cu diferențierea tumorii, invazia în miometru, răspândirea în canalul cervical și stadiul bolii au fost similare în toate grupurile, dar semnificația în grupul de risc crescut indică aparent o mai mare informativitate a indicelui de proliferare pentru acest grup special, care necesită cercetări suplimentare.

În cazul cancerului endometrial, în mai mult de 50% din cazuri, gena supresoare *PTEN* este inactivă, ceea ce, potrivit multor autori, este o etapă cheie în transformarea malignă a endometrului. Conform studiilor, afectarea mutațională în regiunile promotor (regiunile de reglare) a genelor poate duce la inactivarea completă a acestora, stimulând astfel carcinogeneza [18]. Cu toate acestea, în Republica Moldova, astfel de studii nu au fost efectuate cu privire la gena *PTEN*. Rezultatele testării genetice moleculare pentru a determina mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* la 50 de femei cu CE sunt expuse prin rata de prezență și absență a mutației în raport cu grupul de risc (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5. Proporția tumorilor *PTEN*-pozitive în rândul pacientelor cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc

Prezența mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei <i>PTEN</i>	Grupul de risc								P
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	
Absentă	17	34,0	8	16,0	5	10,0	2	4,0	$\chi^2=17,459$; gl=3; p<0,01
Prezentă	2	4,0	1	2,0	7	14,0	8	16,0	

Metodele moderne de studiu a structurii ADN fac posibilă determinarea profilului genetic al tumorilor, care deseori nu coincide cu tabloul morfologic. Un interes sporit îl prezintă studierea mutațiilor *PTEN* în diferite variante patogenetice ale CE. Analiza datelor obținute a relevat că mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* a fost determinată la 18% dintre pacientele cu CE în prima variantă patogenetică.

Tabelul 4.6. Proporția tumorilor *PTEN*-pozitive la pacientele cu cancer endometrial în stadiile I-II în dependența de variantă patogenetică

Varianta patogenetică	Mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei <i>PTEN</i>				P
	Negativ		Pozitiv		
	Abs.	%	Abs.	%	
Hormonodependentă (I)	37	74,0	12	24,0	$\chi^2=0,574$; gl=1; p>0,05
Autonomă (II)	1	2,0	-	-	

Numărul pacientelor cu mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* în varianta patogenetică I a CE a prevalat asupra numărului de paciente cu *PTEN* în cazul variantei II (18% și 0%), ceea ce explică probabil evoluția mai favorabilă în varianta I. Pe baza acestui fapt, se poate presupune că prezența mutațiilor în regiunea fosfatase tensine-type domain a genei supresoare *PTEN* poate determina o evoluție favorabilă a bolii.

Am analizat relația dintre prezența unei mutații c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* și a factorilor morfologici de prognostic - structura histologică a tumorii și gradul de diferențiere a acesteia, precum și nivelul invaziei tumorale în miometru. Astfel, în prezența unei tumori înalt diferențiate, mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* a fost absentă în toate grupurile studiate. Odată cu creșterea gradului de malignitate tumorală, crește și frecvența mutațiilor genei *PTEN* în fiecare dintre grupurile studiate. Rezultatele determinării mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* în funcție de gradul de diferențiere tumorală la pacientele cu CE sunt prezentate în tabelul 4.7.

Tabelul 4.7. Dependența mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* de gradul de diferențiere la pacientele cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc (abs.)

Gradul de diferențiere	Grupul de risc								P
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	<i>PTEN</i> -	<i>PTEN</i> +	<i>PTEN</i> -	<i>PTEN</i> +	<i>PTEN</i> -	<i>PTEN</i> +	<i>PTEN</i> -	<i>PTEN</i> +	
Scăzut	16	1	3	-	-	3	-	8	$\chi^2=15,698$; gl=2; p<0,001
Moderat	1	1	5	1	3	3	-	-	$\chi^2=1,659$; gl=2; p>0,05
Înalt	-	-	-	-	2	1	2	-	$\chi^2=2,359$; gl=1; p>0,05

Mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* a fost cel mai frecvent întâlnită în tumorile slab diferențiate. Astfel, 100% dintre tumorile de grad scăzut din grupul de risc crescut au avut o mutație c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN*. Mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* au fost, de asemenea, observată la 15,7% dintre tumorile moderat diferențiate și la 13,3% din tumorile înalt diferențiate.

Mutația genei *PTEN* au fost semnificativ mai frecvent observate în tumorile care invadează mai mult de jumătate din grosimea miometrului în toate grupurile studiate. Astfel, în tumorile cu invazie a miometrului până la jumătate din grosimea acestuia la grupul de risc scăzut, doar 1 din 12 de tumori au fost *PTEN* pozitive (13,6%); întrucât tumorile cu invazie de peste jumătate din grosimea miometrului au fost observate în 6 din 8 cazuri (87,5%) din grupul de risc crescut.

Tabelul 4.8 Dependența expresiei *PTEN* de profunzimea invaziei în miometru la pacientele cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc (abs.)

Profunzimea invaziei în miometru	Grupul de risc								P
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	<i>PTEN</i> -	<i>PTEN</i> +	<i>PTEN</i> -	<i>PTEN</i> +	<i>PTEN</i> -	<i>PTEN</i> +	<i>PTEN</i> -	<i>PTEN</i> +	
Infiltrează < 50%	17	1	-	-	3	1	-	2	$\chi^2=7,619$; gl=2; p<0,05
Infiltrează > 50%	-	1	8	1	2	6	2	6	$\chi^2=7,525$; gl=2; p<0,05

La analiza datelor obținute s-a constatat că atunci când invazia cancerului endometrial în miometru este mai mică de 0,5 cm, mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* este detectată în 11% din cazuri. Într-un proces tumoral larg răspândit, mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* este detectată mult mai des (57%). Astfel, analiza datelor obținute a relevat că frecvența mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* la pacientele cu CE depinde de gradul de diferențiere tumorală, de stadiul procesului tumoral și de profunzimea invaziei tumorale. Rata prezenței mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* a fost cea mai mare exprimată în grupul pacientelor de risc crescut, ceea ce reprezintă caracteristică importantă.

La studierea instabilității microsatelitare (IM) la 50 de paciente cu CE în stadiile I - II, cu vârsta cuprinsă între 30 și 80 de ani, a arătat că în stadiul I CE frecvența detectării IM a fost de 20%. Ținând cont de factorul de vârstă, s-a depistat următoarele (Tabelul 4.10): frecvența tumorilor cu instabilitatea microsatelitară are un model clar - crește în perioada menopauzei, ajungând la 30,0% la vârsta de 50-59 de ani și 50,0 % din cazuri la 60-69 de ani și scade în perioadele de vârstă 70-79 de ani, adică în postmenopauză.

Tabelul 4.9. Distribuția pacientelor cu CE în funcție de vârstă și prezența epimutației *MLH1*

Intervalul de vârstă	Prezența <i>MLH1</i>	
	Abs.	%
30—39 ani	-	-
40—49 ani	2	20,0
50—59 ani	3	30,0
60—69 ani	5	50,0
70—79 ani	0	0

La femeile aflate în perioadă postmenopauzală, IM este rar detectată, deși, în general, numărul mutațiilor genetice crește odată cu vârsta. Datele noastre indică o posibilă relație între dereglările hormonale legate de vârstă și CE, deoarece adenocarcinomul postmenopauzal se dezvoltă adesea din endometru atrofic. Analiza rezultatelor obținute a arătat că la pacientele cu CE, prezența epimutației *MLH1* a fost semnificativ mai mare în stadiul I al bolii. Prezența epimutației *MLH1* a fost observată la 22,0% dintre pacientele cu stadiul I.

Tabelul 4.10. Dependența epimutației *MLH1* de stadiul bolii la pacientele cu cancer endometrial în stadiile I-II

Stadiul bolii	MLH1				P
	Negativ		Pozitiv		
	Abs.	%	Abs.	%	
I	34	68,0	8	22,0	$\chi^2=0,001$; gl=1; p>0,05
II	6	8,1	2	4	

Rezultatele determinării epimutației genei *MLH1* în funcție de gradul de diferențiere tumorală la pacientele cu CE sunt prezentate în tabelul 4.11.

Tabelul 4.11. Dependența prezenței epimutației *MLH1* de gradul de diferențiere tumorală la pacientele cu cancer endometrial în stadiile I-II în funcție de grupul de risc (abs.)

Gradul de diferențiere	Grupul de risc								P
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut		
	MLH1-	MLH1+	MLH1-	MLH1+	MLH1-	MLH1+	MLH1-	MLH1+	
Scăzut	-	1	3	2	3	2	3	4	$\chi^2=1,480$; gl=2; p>0,05
Moderat	14	1	3	-	5	-	2	-	$\chi^2=2,806$; gl=2; p>0,05
Înalt	4	-	1	-	-	-	2	-	$\chi^2=0,231$; gl=1; p>0,05

La analiza rezultatelor obținute, s-a relevat că la pacientele cu CE, absența epimutației *MLH1* a fost mai des observată la pacientele cu adenocarcinom de grad scăzut și moderat de diferențiere (4% și 12%). Nu au existat diferențe semnificative, dar s-a observat o tendință – odată cu creșterea gradului de diferențiere a tumorii, frecvența de detectare a epimutației *MLH1* scade. Am studiat prezența epimutației *MLH1* în funcție de profunzimea invaziei tumorale la pacientele cu CE în toate grupurile de risc.

Tabelul 4.12. Dependența prezenței epimutației *MLH1* de profunzimea invaziei miometrice la pacientele cu cancer endometrial în funcție de grupul de risc (abs.)

Profunzimea invaziei în miometru	Grupul de risc								P
	Scăzut		Intermediar		Intermediar- crescut		Crescut		
	MLH1-	MLH1+	MLH1-	MLH1+	MLH1-	MLH1+	MLH1-	MLH1+	
Infiltrează < 50%	18	2	1	-	-	-	-	1	$\chi^2=2,424$; gl=2; p>0,05
Infiltrează > 50%	-	-	6	2	8	2	7	3	$\chi^2=1,293$; gl=2; p>0,05

La analiza datelor obținute, prezența epimutației *MLH1* în 40% din cazuri, se detectează la pacientele cu invazia CE în miometru mai mică de 0,5 cm. Într-un proces tumoral larg răspândit epimutația a *MLH1* este detectată mult mai des (60%).

5. SEMNIFICAȚIA FACTORILOR CLINICO-MORFOLOGICI ȘI MOLCEULAR-GENETICI DE PROGNOSTIC LA PACIENTELE CU CANCER ENDOMETRIAL ÎN STADIILE I-II

În studiul nostru supraviețuirea generală la trei ani pentru pacientele cu CE în stadiul I a fost observată la 201 (93,5%; ÎI 95% [90,0-96,6]) paciente. În același timp, acest indicator pentru pacientele cu stadiul IA și IB a fost de 94,2% (ÎI 95% [89,0-98,1]), respectiv 92,7% (ÎI 95% [87,1-97,3]). După cum rezultă din datele prezentate, există o tendință de îmbunătățire a rezultatelor pe termen lung la paciente cu CE în stadiul IA în comparație cu stadiul IB ($p>0,05$). Perioadele de monitorizare în grupul de risc scăzut de la 3 la 6 luni, de la 6 la 9 luni și de la 9 la 12 luni au decurs

fără „eveniment” înregistrând 100% în ceea ce privește supraviețuirea generală; în grupul de risc crescut perioada de la 3 la 6 luni și intervalul 6–9 luni a decurs fără „eveniment”, a constituit 98,7% și, respectiv, 9–12 luni – 97,4%. În perioada 12–18 luni, supraviețuirea generală a constituit 97,3% în grupul de risc scăzut, în comparație cu 91,0% în grupul de risc crescut; 18–24 luni – 98,9% în grupul de risc scăzut versus 87,2% în grupul de risc crescut; 24–30 de luni – 98,9% în grupul de risc scăzut, în comparație cu 78,2% în grupul de risc crescut; în perioada 30–36 de luni, supraviețuirea generală a constituit 98,7% în grupul de risc scăzut și 71,8% în grupul de risc crescut. Testul de egalitate a distribuțiilor de supraviețuire pentru diferitele niveluri ale grupului de risc după metoda Log Rank (Mantel-Cox) a arătat o supraviețuire mai mare a pacienților cu cancer endometrial în stadiile I-II din grupul de risc intermediar $\chi^2=20,420$; $gl=3$; $p<0,001$.

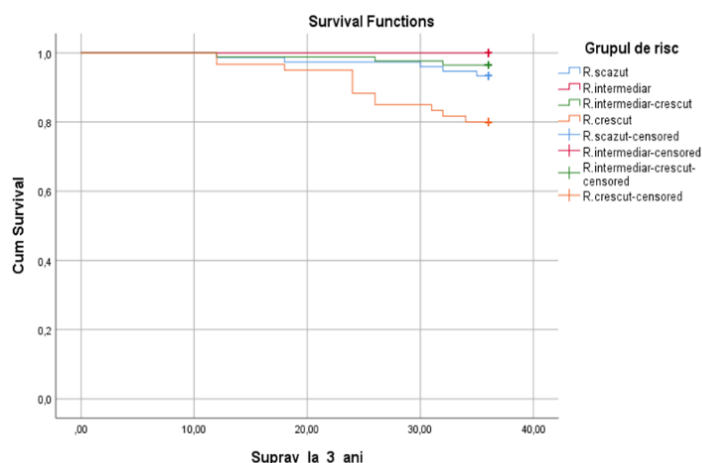


Figura 5.1. Supraviețuirea generală la trei ani a pacienților cu cancer endometrial în stadiile I-II

În studiul nostru supraviețuirea generală la trei ani pentru pacientele cu CE în stadiul I a fost observată la 205 (93,5%; ÎI 95% [90,0-96,6]) paciente. În același timp, acest indicator pentru pacientele cu stadiul IA și IB a fost de 94,2% (ÎI 95% [89,0-98,1]), respectiv 92,7% (ÎI 95% [87,1-97,3]). După cum rezultă din datele prezentate, există o tendință de îmbunătățire a rezultatelor pe termen lung la paciente cu CE în stadiul IA în comparație cu stadiul IB ($p>0,05$). Din cauza că 60 (93,5%; ÎI 95% [90,0-96,6]) paciente cu CE în stadiul II au fost prezentate de grupul de risc crescut, trebuie remarcat faptul că, în stadiul II rata de supraviețuire la 3 ani a fost mai mică de 60% și a constituit 74,2% (ÎI 95% [71,0-79,6]).

Tabelul 5.1. Supraviețuirea generală a pacienților cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc

Stadiul bolii	Grupul de risc							
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut	
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
Stadiul IA	47	94,00	20	100,0	20	100,0	11	78,6
Stadiul IB	12	92,3	23	100,0	44	93,6	24	85,7
Stadiul II	0	0	0	0	17	100,0	13	72,2

Din 269 de paciente cu CE în stadiile I-II incluși în studiu, recidivele și metastazele au fost observate la 20 (7,4%; ÎI 95% [4,3-10,6]) paciente. Dintre aceștia, 3 (1,1%; ÎI 95% [0,0-2,4]) paciente au fost diagnosticate cu recidive ale bolii, 17 (6,3%; ÎI 95% [3,4-9,2]) - metastaze. După cum urmează din cele expuse de mai sus, la pacientele cu CE în stadiile I-II, metastazele au apărut de 5,7 ori mai des decât recidivele. Pacientele cu progresare a bolii au fost distribuite după cum urmează: stadiul IA - 7 (21,8%), IB - 10 (36,4%) paciente (Tabelul 5.2).

Tabelul 5.2. Distribuția pacienților cu CE în stadiile I-II în funcție de frecvența recidivelor și metastazelor

	Stadiul IA	Stadiul IB	Stadiul II	P
Recidive	2	1	-	$\chi^2=0,667$; gl=2; p>0,05
Metastaze	5	9	3	$\chi^2=4,94$; gl=2; p>0,05

În stadiul IA al CE recidivă a fost detectată doar la 2 pacienți, care este de aproape 2,5 ori mai mică decât numărul de metastaze detectate - la 5 pacienți. În stadiul IB al CE, recidivă bolii a fost diagnosticată la 1 pacientă, iar metastaze - la 9 pacienți. Metastaze în ganglionii limfatici (GL) au fost înregistrate la 6 pacienți, la o pacientă a fost afectată regiunea iliacă, la 5 regiunea paraortică. Metastazele la ficat au fost diagnosticate la 2 pacienți, la plămâni - la 3, în creier - la 1 și multiple - la 5 pacienți (Tabelul 5.3.).

Tabelul 5.3. Distribuția pacienților cu CE în stadiile I-II în funcție de grupul de risc și localizarea recidivelor și metastazelor (abs.)

Grupuri de recidive și metastaze	Localizare	Grupul de risc				P
		Scăzut	Intermediar	Intermediar-crescut	Crescut	
Loco-regionale	Bontul vaginal	2	1	-	-	$\chi^2=2,322$; gl=3; p>0,05
	Metastaze în ganglionii limfatici	2	2	2	-	$\chi^2=2,632$; gl=3; p>0,05
Metastaze la distanță	Ficat	1	-	1	-	$\chi^2=1,405$; gl=3; p>0,05
	Plămâni	-	-	2	1	$\chi^2=2,795$; gl=3; p>0,05
	Creier	-	-	1	-	$\chi^2=2,211$; gl=2; p>0,05
Mixte		-	1	3	1	$\chi^2=2,789$; gl=2; p>0,05

Durata medie a apariției metastazelor a fost de $17,0 \pm 1,59$ (Î 95% [13,8-20,2]) luni, apariția metastazelor în ganglionii limfatici - $21,6 \pm 0,87$, în plămâni - $10,5 \pm 0,62$, în ficat - $18,5 \pm 0,52$, multiple - $17,2 \pm 0,89$. La analiza distribuției pacienților cu progresie a CE în stadiile I-II în funcție de profunzimea invaziei tumorale în miometru, s-a constatat că în 1 (12,5%) caz, tumora a fost localizată în endometru, iar în 2 (25 %) cazuri, adâncimea invaziei a fost de 1 cm; cu metastaze, acești indicatori au fost 2 (8,3%), 1 (4,2%), 7 (29,2%) și respectiv 7 (58,3%) (Tabelul 5.4.).

Tabelul 5.4. Distribuția pacienților cu CE în stadiile I-II cu progresie în funcție de grupul de risc și profunzimea invaziei tumorale în miometru (abs.)

Profunzimea invaziei tumorale în miometru	Grupul de risc							
	Scăzut		Intermediar		Intermediar-crescut		Crescut	
	Recid.	Metast.	Recid.	Metast.	Recid.	Metast.	Recid.	Metast.
În limitele endometrului	-	-	-	-	-	-	1	-
Până la 50% miometru (n=48)	-	2	-	3	-		2	1
Mai mult de 50% miometru (n=52)	-	-	-	3	-	2	-	1
Toată grosimea	-	-	-	3	-	1	-	1

Astfel, prevalența pacienților la care profunzimea invaziei tumorii a fost >1 cm, iar cel mai mare acest indicator a fost la paciențele cu metastaze. Trebuie remarcat faptul că adâncimea medie de invazie în miometru la paciențele cu recidive și metastaze a fost de $10,8 \pm 0,63$ mm față de $7,2 \pm 0,52$

mm în absența progresiei bolii. În stadiile IA-IB, acești indicatori au fost de $7,9 \pm 1,4$ și $6,2 \pm 0,9$ mm, iar în stadiul II - respectiv $11,7 \pm 1,3$ mm. Nivelul markerului de proliferare celulară, Ki-67, estimat în examenul imunohistochimic la 50 de paciente cu CE în stadiile I-II s-a impus prin valoare predictivă asupra supraviețuirii, astfel, că odată cu creșterea acestuia rata de supraviețuire scade. La pacientele cu nivelul Ki-67 iminent unei activități proliferative de 0-33% cota de supraviețuire generală a constituit $80,8 \pm 3,3\%$, iar la o activitate proliferativă mai mare de 34% cota de supraviețuire generală s-a depreciat până la $57,9 \pm 5,4\%$ în perioada de supraveghere de 3 ani. Testul de egalitate a distribuțiilor de supraviețuire după metoda Log Rank (Mantel-Cox) a arătat că activitatea proliferativă sporită (49% sau mai mult) nu a avut niciun efect asupra rezultatelor $\chi^2=2,620$; $gl=1$; $p=0,105$.

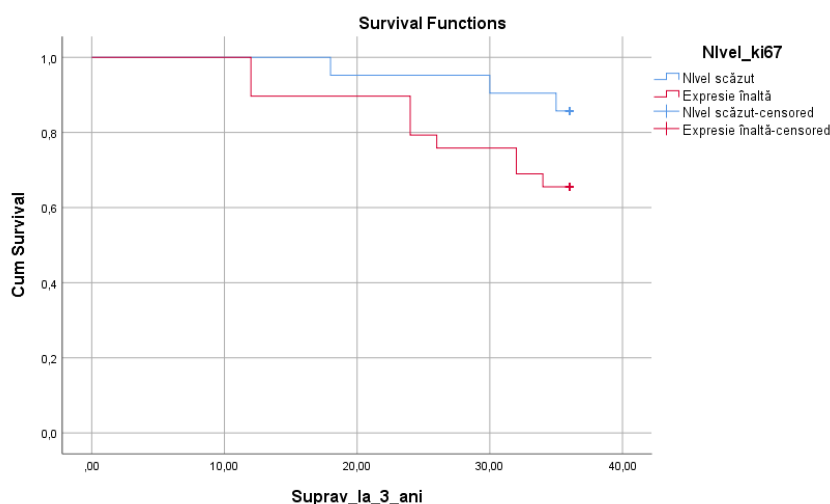


Figura 5.2. Supraviețuirea generală la 3 ani la pacientele cu CE în stadiile I-II, în funcție de expresia indicelui de proliferarea Ki-67

Expresie înaltă a factorului de proliferare Ki-67 reduce supraviețuirea fără recidivă până la $15,3 \pm 2,21$ (ÎI 95% [11,1-19,7]) luni. Timpul mediu până la progresie la pacientele din grupul de risc crescut a fost de $13,5 \pm 4,50$ luni (ÎI 95% [9,0-18,0]), la pacientele din grupul de risc scăzut - $15,8 \pm 3,36$ luni (ÎI 95% [10,5-23,0]) ($F=0,066$; $p=0,937$), care poate indica valoarea prognostică a acestui indicator pentru detectarea semnelor precoc de progresie. În același timp, sarcina noastră principală a fost de a studia efectul prezenței mutațiilor genetice asupra rezultatelor tratamentului. Rezultatele analizei supraviețuirii generale la pacientele din grupurile de studiu, în funcție de prezență epimutației *MLH1* a arătat că 71% dintre femeile cu prezența epimutației *MLH1* și 92,5% fără epimutația *MLH1* au atins supraviețuire la 3 ani. Supraviețuirea la 3 ani fără recidivă s-a înregistrat la 6 pacientele cu CE cu prezența epimutației în gena *MLH1*. Timpul mediu până la progresia CE la pacientele cu epimutația *MLH1* a fost de $14,6 \pm 2,54$ (ÎI 95% [11,1-19,7]) luni. Timpul mediu până la progresie la pacientele din grupul de risc scăzut a fost de $16,3 \pm 5,5$ (ÎI 95% [9,0-28,0]) luni. În același timp, timpul mediu până la progresia CE la pacientele cu epimutația *MLH1* în grupul de risc crescut a fost de $10,5 \pm 1,11$ (ÎI 95% [9,0-12,0]) luni ($F=0,305$; $p=0,750$). Astfel, analiza rezultatelor obținute a arătat că la pacientele cu CE, prezența fenotipului IMS al tumorii afectează semnificativ supraviețuirea fără recidivă la trei ani, indiferent de stratificarea grupurilor de risc. Ratele globale de supraviețuire la 3 ani la pacientele cu CE care sunt purtători ai epimutației *MLH1* în diferite grupuri de risc sunt prezentate în fig. 5.3. Testul de egalitate a distribuțiilor de supraviețuire după metoda Log Rank (Mantel-Cox) a arătat o supraviețuire mai mare a pacientelor nepurtătoare a epimutației promotorului *MLH1* $\chi^2=15,974$; $gl=1$; $p<0,001$.

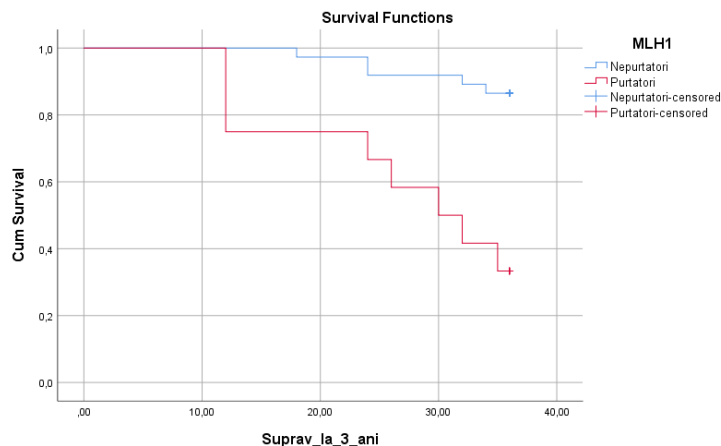


Figura 5.3. Supraviețuirea generală la 3 ani la pacientele cu CE purtătoare ale epimutației *MLH1* în diferite grupuri de risc

În ceea ce privește influența mutației în gena *PTEN* la pacientele cu CE asupra timpului de progresie în diferite grupuri de risc, aceasta demonstrează, de asemenea, corelația prezenței mutației *PTEN* cu rata de supraviețuire la pacientele cu cancer endometrial. Timpul mediu până la progresia CE la pacientele cu mutație *PTEN* a fost de $15,7 \pm 1,89$ (ÎI 95% [11,3-20,5]) luni (ÎI 95% de la 7 la 15 luni), care nu diferă ($F=0,005$; $p=0,943$) de la timpul mediu până la progresia la pacientele fără mutații – $16,0 \pm 3,97$ (ÎI 95% [12,0-28,0]). Astfel, timpul mediu până la progresie la pacientele cu mutație genică *PTEN* din grupul de risc scăzut a fost de $13,5 \pm 3,37$ (ÎI 95% [9,0-18,0]) luni, diferind semnificativ de cel la pacientele de risc crescut – $15,8 \pm 3,34$ (ÎI 95% [10,5-23,0]) luni ($F=16,2$; $p=0,891$), ceea ce poate indica semnificația prognostică a acestui indicator pentru detectarea semnelor precoce de recidivă (Fig. 5.7.). Testul de egalitate a distribuțiilor de supraviețuire după metoda Log Rank (Mantel-Cox) a arătat o supraviețuire mai mare a pacientelor nepurtătoare a mutației în gena *PTEN* $\chi^2=9,214$; $gl=1$; $p=0,002$.

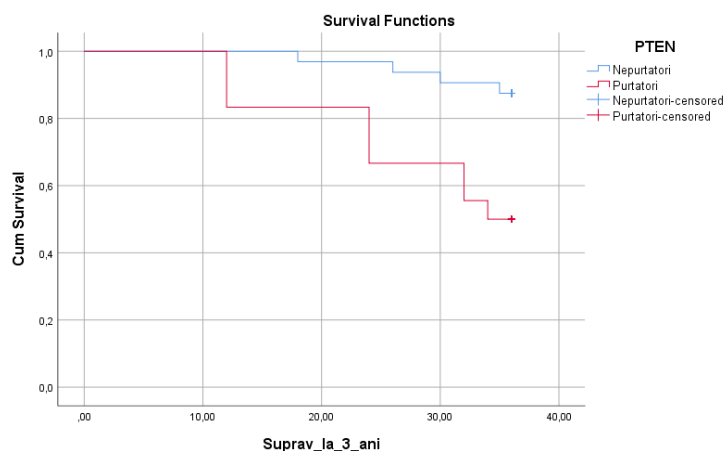


Figura 5.4. Supraviețuirea generală la 3 ani la pacientele cu CE în stadiile I-II purtătoare ale mutației *PTEN* în diferite grupuri de risc

6. PROGNOSTICUL EVOLUȚIEI CANCERULUI ENDOMETRIAL

Sunt expuse rezultatele analizei multivariate (software-ul IBM SPSS Statistics 26.0.) privind estimarea valorii prognostice a parametrilor clinico-morfologici și molecular-genetici vizavi de supraviețuirea globală și fără recidivare la distanța de 3 ani a celor 269 de paciente cu CE în stadiile I-II incluse în studiu. Indicii utilizați în acest context sunt: vârsta, IMC, stadiul bolii, gradul de diferențiere a tumorii, subtipul histologic al tumorii, profunzimea invaziei în miometru și canalul cervical, prezența infiltrației perilimfovaskulare, prezența infiltrației perineurale, prezența focarelor de necroză, nivelul de expresie Ki-67, prezența mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* și hipermetilării promotorului *MLH1*. Este trecut în evidență faptul că stadiul bolii este un factor semnificativ statistic în supraviețuirea globală la distanța de 3 ani a pacientelor cu CE, iar așa indici cum gradul de diferențiere și nivelul markerului Ki-67 sunt predictorii statistic semnificativi ai

supraviețuirii fără recidivare la aceeași perioadă de supraveghere. De asemenea sunt relatate rezultatele analizei discriminante de cluster menită să evidențieze dintr-un grup de 14 indici factori clinici, morfologici, și genetici cu valoare predictivă asupra diagnosticului și prognosticului la distanță a pacienților cu CE în stadiile I-II. În rezultatul investigațiilor complexe efectuate în capitolele precedente am determinat valoarea factorilor decisivi de risc în prognosticul evoluției CE, prezentată în tabelul 6.1.

Tabelul 6.1. Factorii de risc decisivi incluși în model pentru a evalua prognosticul evoluției bolii la paciențele cu CE în stadiile I și II

Denumirea factorilor de risc	Lambda Wilks	Toleranță	p
Vârstă	0,65137	0,77346	0,00015
Profundimea invaziei în miometru	0,57698	0,88573	0,01619
Gradul de diferențiere	0,56283	0,90336	0,04465
Dimensiunea tumorii primare	0,59191	0,83085	0,00589
Indicele INL	0,59657	0,79819	0,00433
Vârsta menopauzei	0,59707	0,85419	0,02034
Infertilitate	0,58378	0,84414	0,01830
Durata dereglării ciclului menstrual	0,57504	0,84660	0,01312
Stadiul bolii	0,61638	0,77200	0,00123
Invazia perilimfovasculară	0,57541	0,7865	0,00234
Invazia perineurală	0,59309	0,67421	0,00970
<i>PTEN</i>	0,55544	0,90359	0,02835
<i>MLH 1</i>	0,55329	0,86420	0,00978
Ki-67	0,54165	0,92120	0,02494

Au fost obținute următoarele funcții discriminante liniare:

$$Y_1 = 0,556 \cdot X_1 + 2,774 \cdot X_2 + 0,145 \cdot X_3 + 13,438 \cdot X_4 + 0,177 \cdot X_5 + 6,526 \cdot X_6 + 9,938 \cdot X_7 + 36,150 \cdot X_8 + (-0,881) \cdot X_9 + 3,589 \cdot X_{10} + 3,817 \cdot X_{11} + 0,012 \cdot X_{12} - 407,350$$

$$Y_2 = -2,179 \cdot X_1 + 1,987 \cdot X_2 + 0,186 \cdot X_3 + 14,173 \cdot X_4 + 0,027 \cdot X_5 + 6,846 \cdot X_6 + 9,622 \cdot X_7 + 38,367 \cdot X_8 + (-1,094) \cdot X_9 + 1,756 \cdot X_{10} + 3,399 \cdot X_{11} + 0,005 \cdot X_{12} - 416,584, \text{ unde}$$

X_1 - vârstă (1 - reproductivă, 2 - perimenopauzală, 3 - menopauzală, 4 - postmenopauzală)

X_2 - profundimea invaziei în miometru (1 – până la 50%, 2 - peste 50%)

X_3 - gradul de diferențiere (1 - G1, 2 - G2, 3 - G3)

X_4 - dimensiunea tumorii primare (1 – până la 2 cm , 2-de la 2-5 cm, 3- mai mult de 5 cm)

X_5 - indexul INL

X_6 - vârsta menopauzei

X_7 - infertilitatea (0 - absentă, 1 - prezentă)

X_8 - durata dereglărilor ciclului menstrual

X_9 - stadiul bolii (1 - stadiul I, 2 - stadiul II)

X_{10} - *PTEN* 1,0 (0 - absentă, 1 - prezentă)

X_{11} - *MLH1* 1,0 (0 - absentă, 1 - prezentă)

X_{12} - indexul de proliferare Ki 67 (1 - până la 49, 2 - peste 49)

X_{13} - invazia perilimfovasculară (0 - absentă, 1 - prezentă)

X_{14} - invazia perineurală (0 - absentă, 1 - prezentă)

La calcularea funcțiilor discriminante, obiectul (pacientul cu CE în stadiile I și II) a fost atribuit uneia dintre clase. Dacă $Y_1 > Y_2$, atunci obiectul aparține primei clase (prognostic nefavorabil) cu un nivel de semnificație $p < 0,05$, ceea ce înseamnă că riscul de a dezvolta un rezultat slab la acest pacient este de 95%. Dacă $Y_1 < Y_2$, atunci obiectul aparține clasei a doua (prognostic favorabil) cu un nivel de semnificație $p < 0,05$, ceea ce înseamnă că riscul de a dezvolta un rezultat favorabil este de 95%. Calitatea funcțiilor obținute a fost evaluată la 20 de pacienți care nu au fost incluși în eșantionul principal. Sensibilitatea și specificitatea modelului matematic dezvoltat au fost de 87% și 89%. Aplicarea modelului matematic de evidențiere a algoritmului de predictor s-a realizat în contextul a 2 loturi de pacienți: (1) cu prognostic favorabil și (2) nefavorabil privind supraviețuirea fără recidivare la distanța postoperatorie de 3 ani.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Concluzii

1. Rezultatele studiului complex realizat pe un lot de 269 de paciente cu CE în stadiile I-II au evidențiat predictorii clinico-morfologici ai apariției recidivelor și metastazelor: carcinom cu celule clare, celule scuamoase glandulare, cancer papilar seros, invazia mai mult de 50% în miometru, adâncimea de invazie a tumorii în miometru >1 cm și în stromă >0,5 cm, grad moderat și crescut de anaplazie celulară și nucleară a tumorii, prezența invaziei limfovaskulare și prezența focarelor de necroză în tumoră.

2. Nivelul markerului de proliferare celulară, Ki-67, estimat în examenul imunohistochimic la 50 de paciente cu CE în stadiile I-II s-a impus prin valoare predictivă asupra supraviețuirii, astfel, că odată cu creșterea acestuia rata de supraviețuire scade. La pacientele cu nivelul Ki-67 iminent unei activități proliferative de 0-33% cota de supraviețuire a constituit 80,8%, iar la o activitate proliferativă mai mare de 34% cota de supraviețuire s-a depreciat până la 57,9% în perioada de supraveghere de 3 ani.

3. Testarea ADN la 50 paciente cu CE în stadiile I-II a depistat mutații în gena *MLH1* în 10 (20%) cazuri și urmează să fie utilizată pentru determinarea riscului de recidivare a bolii. Analiza rezultatelor obținute a arătat că la pacientele cu CE prezența epimutației *MLH1* afectează semnificativ supraviețuirea fără recidivă indiferent de stratificarea grupurilor de risc. Timpul mediu până la progresia CE la pacientele cu epimutația *MLH1* a fost de $14,6 \pm 2,54$ (Î 95% [11,1-19,7]) luni.

4. Mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* a fost detectată la 12 (24%) paciente. Mai frecvent s-au detectat mutația *PTEN* în grupul pacientelor cu risc crescut în 8 (66%) cazuri. Observarea dinamică a pacientelor (n=12) purtătoare ale mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* timp de 3 ani, indiferent de grupul de risc a relevat un prognostic nefavorabil al bolii, care s-a manifestat fie prin recurența adenocarcinomului endometrial (n=8), fie prin apariția de metastaze (n=4).

5. Evoluția CE excelează prin creșterea nivelului neutrofile/limfocite dispensabil de stratificarea grupurilor de risc cu afectarea supraviețuirii fără recidivă la 3 ani, care se corelează indirect cu timpul mediu de apariție a progresiei CE. Datele studiului nostru au demonstrat, că la pacientele cu nivelul INL <2,43 timpul de declanșare a progresiei CE este de $16,2 \pm 2,75$ (Î 95% [14,5-18,4]) luni, acesta se reduce până la $15,3 \pm 2,21$ (Î 95% [11,1-19,7]) luni la pacientele cu INL (2,43-5,0) și atinge valoarea minimală de $9,1 \pm 3,32$ (Î 95% [6,7-12,7]) luni la pacientele cu INL >5,0. Remarcabil, că la pacientele cu mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* nivelul INL a fost semnificativ mai mare comparativ cu prototipul inerent pacientelor fără această mutație (5,2 versus 3,7; p<0,05).

6. Problema științifică soluționată în teză constă în aceea, că cercetarea bazată pe studii clinico-morfologice și molecular-genetice a decelat mecanisme patogenetice inedite și predictorii ai exacerării CE, cum ar fi prezența mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN*, hipermetilării promotorului genei *MLH1*, markerului de proliferare Ki-67, creșterea INL, fapt ce a permis elaborarea unui model matematic pentru prezicerea evoluției bolii la pacientele cu CE din diferite grupuri de risc pe perioada de 3 ani.

2. Recomandări practice

Nivel de sistem

1. Rezultatele studiului privind decelarea factorilor clinico-morfologici și molecular-genetici de prognostic în cancerul endometrial sunt fezabile pentru estimarea riscului de recidivă la 3 ani și pot servi drept repere pentru elaborarea algoritmului de tratament personalizat la pacientele cu CE în stadiile I-II.

2. Revizuirea Protocolului Clinic Național: Cancerul Endometrial, de către grupul de lucru al Ministerului Sănătății al Republicii Moldova, constituit din reprezentanți ai IMSP Institutul Oncologic din RM. Este necesar ca Protocolul național să fie elaborat în conformitate cu ghidurile internaționale actuale în problema cancerului endometrial și va servi drept bază pentru elaborarea protocolului instituțional.

Nivel de instituție medicală

3. Managerul IMSP IO este responsabil de revizuirea Protocolului instituțional în cancerul endometrial, cu implementarea criteriilor clinici și molecular-genetici, cum ar fi determinarea mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN*, metilării promotorului genei *MLH1*, markerului de proliferare Ki-67 și a indicelui neutrofile/limfocite. Aplicarea acestor criterii poate fi utilizată pe scară largă pentru estimarea riscului de recurență la paciențele cu CE în stadiile I-II.

4. În activitatea clinică a Laboratorului Biologia Cancerului al IMSP Institutul Oncologic elaborarea și implementarea programelor de cercetare molecular-genetică a CE cu stabilirea subtipului molecular al tumorii. Astfel, va fi eficientizată estimarea evoluției cancerului endometrial în stadiile I-II, ceea ce va permite aplicarea acestuia în conformitate cu criteriile elaborate.

Nivel de medici de familie, oncologi, ginecologi, chirurgii și specialiștii din domeniul oncologiei

5. Implementarea în practica de zi cu zi a modelului matematic, care include în sine 14 parametri clinico-morfologici și molecular-genetici, ar fi utilă pentru estimarea evoluției bolii la paciențele cu CE în stadiile I-II din diferite grupuri de risc pentru o perioadă de până la 3 ani.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. BILBAO, C., RODRIGUEZ, G., RAMIREZ, R., et al. The relationship between microsatellite instability and *PTEN* gene mutations in endometrial cancer. In: *Int J Cancer*. 2006, vol.119(3), pp. 563-570. Disponibil: doi: 10.1002/ijc.21862.
2. BUSCH, E.L., CROUS-BOU, M., PRESCOTT, J., et al. Adiponectin, leptin, and insulin-pathway receptors as endometrial cancer subtyping markers. In: *Horm Cancer*. 2018, nr.9, pp. 33–39. Disponibil: doi: 10.1007/s12672-017-0318-1.
3. CHU, Y., WANG, Y., PENG, W., et al. STAT3 activation by IL-6 from adipose-derived stem cells promotes endometrial carcinoma proliferation and metastasis. In: *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, nr.500, pp. 626–631. Disponibil: doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.121.
4. DIBABA, D.T., JUDD, S.E., GILCHRIST, S.C., et al. Association between obesity and biomarkers of inflammation and metabolism with cancer mortality in a prospective cohort study. In: *Metabolism*. 2019, nr. 94, pp.69–76. Disponibil: doi: 10.1016/j.metabol.2019.01.007.
5. ENGURUD, H., BERG, H.F., MYRVOLD, M. High degree of heterogeneity of PD-L1 and PD-1 from primary to metastatic endometrial cancer. In: *Gynecologic Oncolog*. 2020, vol.157(1), pp. 260-267. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.01.020>.
6. ERICKSON, B.K., ZEYBEK, B., SANTIN, A.D., FADER, A.N. Targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in gynecologic malignancies. In: *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*. 2020, nr. 32, pp. 57–64. Disponibil: doi: 0.1097/GCO.0000000000000599.
7. FORTNER, R.T., HUSING, A., KUHN, T., et al. Endometrial cancer risk prediction including serum-based biomarkers: results from the EPIC cohort. In: *Int J Cancer*. 2017, nr.140, pp. 1317–1323. Disponibil: doi:10.1002/ijc.30560.
8. GÓMEZ-RAPOSO, C., SALVADOR, M.M., ZAMORA, C.A., et al. Immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer. In: *Crit. Rev. Oncol*. 2021, nr. 161, e103306. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103306>.
9. HUO, X., SUN, H., CAO, D., et al. Identification of prognosis markers for endometrial cancer by integrated analysis of DNA methylation and RNA-Seq data. In: *Sci Rep*. 2019, nr. 9, pp. 9924 Disponibil: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46195-8>.
10. HUTT, S., TAILOR, A., ELLIS, P., et al. The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: A literature review. In: *Acta Oncol*. 2019, nr.58, pp. 342–352. Disponibil: doi: 10.1080/0284186X.2018.1540886.
11. HUVILA, J., PORS, J., THOMPSON, E.F., GILKS, C.B. Endometrial carcinoma: Molecular subtypes, precursors and the role of pathology in early diagnosis. In: *J. Pathol*. 2021, nr.253, pp.355–365. Disponibil: doi: <https://doi.org/10.1002/path.5608>.
12. LEE, S.Y. Tailored Therapy Based on Molecular Characteristics in Endometrial Cancer. In: *BioMed Res. Int*. 2021, e2068023. Disponibil: <https://doi.org/10.1155/2021/2068023>.
13. LIANG, X., DAIKOKU, T., TERAOKAWA, J., et al. The uterine epithelial loss of *PTEN* is inefficient to induce endometrial cancer with intact stromal *PTEN*. In: *PLoS Genet*. 2018, vol.14(8), e1007630. Disponibil: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007630>.
14. MARALI, R., DELAIR, D.F., BEAN, S.M., et al. Evolving roles of histologic evaluation and molecular/genomic profiling in the management of endometrial cancer. In: *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw*. 2018, nr.16, pp. 201–209. Disponibil: doi: 10.6004/jnccn.2017.7066.
15. MIRILI, C., BILICI, M. Inflammatory prognostic markers in endometrial carcinoma: systemic immune-inflammation index and prognostic nutritional index. In: *MSD (Medical Science and Discovery)*. 2020, vol.7(1), pp. 351-359. Disponibil: <https://doi.org/10.36472/msd.v7i1.339>.
16. MITAMURA, T., DONG, P., IHIRA, K., et al. Molecular-targeted therapies and precision medicine for endometrial cancer. In: *Jpn. J. Clin. Oncol*. 2019; nr.49, pp.108–120. Disponibil: doi: 10.1093/jjco/hyy159.

17. MITRIC, C., BERNARDINI, M.Q. Endometrial Cancer: Transitioning from Histology to Genomics. In: *Curr Oncol.* 2022, vol.29(2), pp. 741-757. Disponibil: doi: 10.3390/curroncol29020063.
18. NAGLE, C.M., CROSBIE, E.J., BRAND, A., et al. The association between diabetes, comorbidities, body mass index and all-cause and cause-specific mortality among women with endometrial cancer. In: *Gynecol Oncol.* 2018, nr.150, pp. 99–105. Disponibil: doi: 10.1016/j.ygyno.2018.04.006.
19. PASSARELLO, K., KURIAN, P., VILLANUEVA, V. Endometrial Cancer: An Overview of Pathophysiology, Management, and Care. *Seminars in Oncology Nursing*, 2019, 35(2):157-165, Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.002>.
20. RAY, S., JHA A., AFREEN ISLAM, A., SENGUPTA, M. Study of prognostic and diagnostic significance of P53 and *PTEN* mutation in proliferative lesions of endometrium. In: *Journal of Current Medical Research and Opinion.* 2020, vol.3(08), pp.563-569. Disponibil: doi: <https://doi.org/10.15520/jcmro.v3i08.321>.
21. SAUERBREI, W., TAUBE, S.E., MCSHANE, L.M. et al. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): An abridged explanation and elaboration. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 2018; nr.110, pp. 803–811. Disponibil: doi: 10.1093/jnci/djy088.
22. WANG, Z., GAO, S., SUN, C. et al. Clinical significance of serum adiponectin and visfatin levels in endometrial cancer. In: *Int J Gynaecol Obstet.* 2019, nr.145, pp. 34–39. Disponibil: doi: 10.1002/ijgo.12772.
23. WANG, Y., ZHOU, R., WANG, J. Relationship between hypothyroidism and endometrial cancer. In: *Aging Dis.* 2019, nr.10, pp.190–196. Disponibil: doi: 10.14336/AD.2018.0224.
24. WEELDEN, W. Immunohistochemical biomarkers are prognostic relevant in addition to the ESMO-ESGO-ESTRO risk classification in endometrial cancer. In: *Gynecologic Oncology*, 2021, vol.161(3), pp.787-794. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.03.031>.
25. WU L., SAXENA S., SINGH R.K. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. In: *Adv Exp Med Biol.* 2020, nr.1224, pp.1-20. Disponibil: doi: 10.1007/978-3-030-35723-8_1.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE LA TEMA TEZEI

Monografii

1. **TRIPAC, I., STRATAN, V.** Cancerul endometrial. Aspecte clinico-morfologice și molecular-genetice. Chișinău: Tipografia Poliviz-Design, 2023. 204 p. ISBN 978-9975-3159-8-2.

Articole în reviste științifice internaționale cotate ISI-Thomson și SCOPUS

2. **TRIPAC, I. AGIUS, J. et al..** Status of the Sentinel Lymph Node in Patients with Endometrial Cancer Stage I-II. In: *Chirurgia*. 2022, nr. 6(117), pp. 689-697. Disponibil: doi: 10.21614/chirurgia.2786. PMID: 3658406. ISSN: 1221-9118. IF:0.84
3. **DANCHOV, A., BORISOVA VASILEVA-SLAVEVA, M., GALAI, N., FARAGGI, D., KUBELAC, P., . TRIPAC, I., CALLEJA, N., DI FIORE, R., CALLEJA-AGIUS, J.** Cancer of the uterine cervix – epidemiology of crizis. Epidemiology, Prevention and Treatment of Cervical Carcinoma in the HPV Era. In: *Healthcare*. 2023, Nr.12. ISSN: 2227-9032. IF: 3.460
4. **TRIPAC, I.** Sentinel Lymph Node Biopsy in Endometrial Cancer. In: *Journal of Surgery*. 2022, nr. 9(18), pp.54-56. ISSN: 1221-9118. IF:0.84
5. **TRIPAC, I.** Minimally invasive surgery management treatment in patients with atypical endometrial hyperplasia and early stage endometrial cancer. In: *Journal of Surgery*. 2022, nr. 9(18), pp. 55-58 ISSN: 1221-9118. IF:0.84.

Articole în reviste științifice din străinătate recunoscute

6. **ТРИПАК, И., СТРАТАН, В и др.** Анализ частоты рецидивирования рака эндометрия I–II стадии в соответствии с факторами прогноза. In: *Medicine. Sociology. Philosophy. Applied research*. Moscova, 2022 nr.6 pp. 26-31. ISSN:2686-9365.
7. **ТРИПАК, И., СТРАТАН, В., ЦУЦУЯНУ, В., СЫТНИК, В., ДОБРОВОЛЬСКАЯ, А.** «Клинико-морфологические факторы риска рецидива рака эндометрия I стадии». В: *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки»*. 2022, №12, pp.207-212. ISSN – 2223-2966.
8. **ТРИПАК, И., СТРАТАН, В., ЦУЦУЯНУ, В., СЫТНИК, В., ДОБРОВОЛЬСКАЯ, А.** Выявление сигнального лимфатического узла у больных раком эндометрия I стадии. В: *International Journal of Medicine and Psychology*. 2022, №5(8), pp. 183-186 ISSN: 2658-3313.
9. **ТРИПАК, И., КАРАМАН, И., ФРАНК, Г.** Определение маркера клеточной пролиферации Ki-67 у больных раком эндометрия. In: *Medicine. Sociology. Philosophy. Applied research*. 2022, nr.6, pp. 65-68. ISSN:2686-9365.
10. **ТРИПАК, И., СТРАТАН, В., МИШИНА, А., ДОБРОВОЛЬСКАЯ, А., ЦУЦУЯНУ, В., СЫТНИК, В., ПОПА, К.** Абляция эндометрия как метод лечения предраковых состояний и ранних стадии рака эндометрия. В: *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки»*. 2022, N11, pp. 229-233. ISSN – 2223-2966.

Articole în reviste științifice din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei:

- categoria B:

11. **TRIPAC, I.** Noi tehnologii de tratament organomenajant la pacientele cu hiperplazie endometrială atipică și cancer endometrial în stadiu incipient cu ajutorul chirurgiei minim invazive. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2021, №4(68) , p.171-176. ISSN: 1857-0011.
12. **TRIPAC, I.** Determinarea ganglionilor limfatici santinelă ca parametri prognostici ai metastazei limfogene pentru a optimiza tratamentul pacienților cu cancer endometrial în stadiul I. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2021, № 4(68), p.176-180. ISSN: 1857-0011.

13. ȚUȚUIANU, V.... **TRIPAC, I.** Procese mutaționale de reparare a ADN-ului în cancerul de sân și ovarian. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău, 2020, №4 (68), p.176-182. ISSN: 1857-0011.
14. **TRIPAC, I.** Factorii molecular-genetici de prognostic în cancerul endometrial stadiile I-II - o abordare modernă a problemei. Revista literaturii de specialitate. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2019, № 5(1), p. 29-37. ISSN: 1857-0011.
15. **TRIPAC, I., FRANK, G., BOGDANSKAIA, N., STRATAN, V.** Determinarea markerului de proliferare celulară ki-67 la pacientele cu cancer endometrial. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei . Științe Medicale.* Chișinău. 2019, № 4(64), p. 56-60. ISSN: 1857-0011.
16. **TRIPAC, I.** Particularitățile clinico-morfologice al cancerului endometrial la pacientele în stadiile I-III. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2019, № 4(64), p. 148-153, ISSN: 1857-0011.
17. **TRIPAC, I., STRATAN, V.** Studiul frecvenței și spectrului mutațiilor genelor brca1 la pacienții cu neoplazii maligne primar multiple. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău, 2019, №4 (64), p. 60-65, ISSN: 1857-0011.
18. **TRIPAC, I.** Particularitățile clinico-morfologice al cancerului endometrial la pacientele cu risc intermediar și crescut. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2019, №4 (64), p 148-153. ISSN: 1857-0011.
19. **TRIPAC, I.** Particularitățile clinice și paraclinice ale pacientelor cu cancer endometrial stadiile I-III - cu risc intermediar și crescut. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2017, № 4(56), p. 50-55. ISSN: 1857-0011.
20. BALAN, R. ...**TRIPAC, I.** Hiperplaziile endometriului și aspectele tratamentului hormonal local. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2018, № 2-3 (59-60), p. 45-50. ISSN: 1857-0011.
21. SOFRONI, D. ...**TRIPAC, I.** Particularitățile clinice și paraclinice ale pacientelor cu cancer endometrial stadiile I-III cu risc intermediar și crescut. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2017, №4 (56) , p. 50-56. ISSN: 1857-0011.
22. **TRIPAC, I.** Particularitățile clinico-morfologice al cancerului endometrial la pacientele In stadiile I-III cu risc intermediar și crescut. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2019, № 4(64), p. 148-153, ISSN: 1857-0011.
23. **TRIPAC, I.** Principiile organizării screeningului în familiile cu risc oncologic 2(478) *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2019, № 3(48), p. 88-92, ISSN: 1857-0011.
24. GUȚU, L., SOFRONI, D., CIOBANU, V., BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Managementul cancerului cervical în baza protocolului clinic național. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2015, № 3(48), p. 93-100, ISSN: 1857-0011.
25. SOFRONI, D. CIOBANU, V., BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Tratamentul complex al cancerului cervical local-avansat asociat terapiei imunomodulatoare cu BioR *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2015, № 4(45), p. 326-331, ISSN: 1857-0011.
26. SOFRONI, D., CIOBANU, V., BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Aprecierea complexă a factorilor ce influențează asupra metastazării cancerului endometrial. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* Chișinău. 2015, № 3(48), p. 138-143, ISSN: 1857-0011.

27. CIOBANU, V. BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Aspecte clinico-morfologice de diagnostic și tratament ale precursorilor cancerului vulvar. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2015, № 3(48), p. 304-312, ISSN: 1857-0011.
28. SOFRONI, D., GUȚU, L., BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Tratamentul complex al cancerului cervical local avansat asociat terapiei imunomodulatoare cu BioR. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2014, № 4(45), p. 326-331, ISSN: 1857-0011.
29. GUȚU, L., SOFRONI, D., BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Rolul tratamentului imunomodulator cu bior în tratamentul complex al cancerului cervical local-avansat. În revista științifico-practică *Info-Med*. Chișinău. 2015, № 1(25), p. 55-60, ISSN: 1810-3936.
30. GUȚU, L., SOFRONI, D., BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Particularități imuno-umorale ale pacientelor cu cancer cervical local-avansat, stadiile II-III. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2013, № 4(40), p. 199-201, ISSN: 1857-0011.
31. BALAN, R. SOFRONI, D., CIOBANU, V., **TRIPAC, I.** GUȚU, L. ș.a. Hiperplaziile endometrului și două tipuri patogenice ale cancerului endometrial și aspectele tratamentului. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2015, № 3(48), p. 298-304, ISSN: 1857-0011.
32. BELEV N., **TRIPAC, I.** Programul screening-ului și monitoring-ului familiilor canceroase în Republica Moldova. Comunicarea I. Cercetarea rudelor asimptomatice. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2010, № 4(27), p. 232-338, ISSN 1857-0011.
33. SOFRONI, D., **TRIPAC, I.**, GUȚU, L., BALAN, R. ș.a. Particularitățile clinico-morfologice ale cancerului endometrial la pacientele în stadiile I-III cu risc intermediar și crescut. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2018, № 2(59), p. 39-44, ISSN: 1857-0011.
34. SOFRONI, D., GUȚU, L., BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Hiperplaziile endometrului și aspectele tratamentului hormonal local. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2018, № 2(59), p. 45-50, ISSN: 1857-0011.
35. SOFRONI, D., GUȚU, L., BALAN, R., **TRIPAC, I.** ș.a. Aminele biogene și particularitățile clinice, paraclinice ale cancerului endometrial. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău. 2018, № 2(59), p. 165-173, ISSN: 1857-0011.

Teze în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare):

36. **TRIPAC, I.** et al. Screening of families with hereditary susceptibility to cancer of female reproductive organs. European Journal of Cancer. ECCO: In: *European Cancer Congress. Abstracts*. Amsterdam. 2017, vol. 72(1), p.156, ISSN: 0959-8049. IF: 9.433
37. **TRIPAC, I.** et al. New aspects in prevention and early diagnostic of endometrial cancer in a first-degree relatives from families with Lynch syndrome. In: *International Journal of Gynecological Cancer*. 2019, p. 2347 ISBN 978-5-9908 IF: 4.661
38. **TRIPAC, I.** et al. Prognostic significance of molecular genetic factors in endometrial cancer. a modern approach to the problem. In: *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2022, vol. 32:A88. p.166 IF: 4.661
39. **TRIPAC, I.** et al. MLH1 promoter methylation analysis in patients with endometrial cancer stage I-II. In: *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2022, vol.32, p.807. ISBN 978-5-9908 IF: 4.661
40. **TRIPAC, I.** Endometrial cancer. Clinico-morphological and molecular genetics aspects. Updates on Rare Gynaecological Cancer: Focus on Pathological Aspects and Beyond.

In: *Training School on Pathology of Rare Gynaecological Cancers*. COST Action, 18th, 19th and 20th September North Macedonia 2022, p.107

41. **ТРИПАК, И.** Молекулярно-генетические факторы прогноза рака тела матки I–II стадии. In: *Eurasian Journal of Oncology*. 2021, vol.9, Supl.1. p. 158. ISBN 978-5-9908
42. **ТРИПАК, И.** Анализ частоты рецидивирования рака эндометрия I-II стадии в соответствии с критериями групп риска. In: *Eurasian Journal of Oncology*. 2020, vol. 8, supl. 2. p. 352. ISBN 978-5-9908.
43. СОФРОНИ, Д., ГУЦУ, Л., БАЛАН, Р, **ТРИПАК, И.** и др. Прогноз рака тела матки: серозно-папиллярный и светлоклеточный рак versus низкодифференцированная аденокарцинома. В III-ий *Петербургский Международный Онкологический Форум*. Санкт-Петербург. 2017, с. 285. ISBN 978-5-9908.
44. СОФРОНИ, Д., ГУЦУ, Л., БАЛАН, Р, **ТРИПАК, И.** и др. Внедрение скрининга семей с наследственной предрасположенностью к раку эндометрия. В III-ий *Петербургский Международный Онкологический Форум*. Санкт-Петербург, Россия. 2017, с.286. ISBN 978-5-9908516-0-36.
45. СОФРОНИ, Д., ГУЦУ, Л., БАЛАН, Р, **ТРИПАК, И.** и др. Ранняя диагностика рака органов репродуктивной системы у женщин из наследственно отягощенных раковых семей. В III-ий *Петербургский Международный Онкологический Форум*. Санкт-Петербург, Россия 2016. с. 467. ISBN 978-5-9908516-0-36 .
46. СОФРОНИ, Д., ГУЦУ, Л., БАЛАН, Р, **ТРИПАК, И.** и др. Новые технологии в ранней диагностике и профилактике рака эндометрия в семьях с отягощенным онкологическим анамнезом. В: *Евразийский Онкологический журнал*. Беларусь. 2016, с. 476.
47. СОФРОНИ, Д., ГУЦУ, Л., БАЛАН, Р, **ТРИПАК, И.** и др. Рак тела матки у женщин репродуктивного возраста. Факторы прогноза . В: *Евразийский Онкологический журнал*. Минск, Беларусь. 2016, с. 476, ISSN: 2414-2360.
48. СОФРОНИ, Д., ГУЦУ, Л., БАЛАН, Р, **ТРИПАК, И.** и др. Локальная прогестинотерапия в лечении фоновых и предраковых состояний эндометрия. В *Евразийский Онкологический журнал*. Минск, Беларусь. 2016, с. 478, ISSN: 2414-2360.

Teze în culegeri științifice naționale cu participare internațională

49. BOTNARU, N., **TRIPAC, I.** Aspectele contemporane de tratament al cancerului endometrial. In: *Materialele Congresului consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, 2021, p. 576.
50. **TRIPAC, I.** Analiza frecvenței recidivelor cancerului endometrial In conformitate cu criteriile grupurilor de risc. In: *Materialele Congresului consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, 2020, p. 1088.
51. **TRIPAC, I.** The significance of molecular-genetic prognostic factors in patients with endometrial cancer stage I-II. In: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. Chișinău, 2022, nr.3 (29), p. 347.
52. **TRIPAC, I.** The significance of molecular-genetic prognostic factors in patients with endometrial cancer stage I-II. In: *Culegere de rezumate. Conferința științifică anuală USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, 2022, p. 434.

Brevete de invenție și alte obiecte de proprietate intelectuală (OPI)

53. GUȚU, L. ... **TRIPAC, I.**, ș.a. *Metodă de tratament al cancerului endometrial de stadiile I-III*. Brevet de invenție eliberat de AGEPI. 2020.
54. **TRIPAC, I.**, STRATAN, V., TUTUIANU, V., SITNIC, V. *Metodă de pronostic al evoluției cancerului endometrial de stadiul I-II*. Brevet de invenție eliberat de AGEPI nr. 1676 din

31.03.2023

55. **TRIPAC, I., STRATAN, V., TUTUIANU, V., SITNIC, V.** Metodă de pronostic al evoluției cancerului endometrial de stadiul I-II. *Brevet de invenție eliberat de AGEPI nr. 1677 din 31.03.2023*

ADNOTARE

Teza pentru gradul științific de doctor habilitat în medicină cu tema „Factorii molecular-genetici de prognostic al cancerului endometrial în stadiile I-II” a fost elaborată de către Tripac Irina în cadrul Instituției Medico-Sanitare Publice Institutul Oncologic, Chișinău, 2023. Structura tezei: introducere, 6 capitole, concluzii și recomandări practice, bibliografie din 206 titluri, 5 anexe, 161 pagini de text de bază, 32 figuri, 62 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate de către autor în 55 de lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: factori de prognostic, factori clinico-morfologici, factori molecular-genetici, model de prognostic, cancer endometrial.

Domeniul de studiu: Oncologie și radioterapie.

Scopul studiului: determinarea factorilor clinico-morfologici și molecular-genetici de prognostic al cancerului endometrial (CE) în stadiile I-II pentru elaborarea modelului matematic de predicție a recidivelor și supraviețuirii pacienților pe o perioadă de până la 3 ani.

Obiectivele lucrării: stabilirea criteriilor clinice, morfologice, imunohistochimice ca factorii de prognostic ai CE; estimarea corelației datelor imunohistochimice și molecular-genetice în funcție de caracteristicile clinice și morfologice ale cancerului de endometru; estimarea profilului molecular al tumorii la pacienții lotului de studiu; analiza multifactorială al complexului criteriilor de prognostic stabilite cu determinarea valorii de prognostic pentru fiecare factor aparte la pacienții cu CE în stadiile I-II; crearea modelului matematic al evaluării complexe de prognostic al CE în stadiile I-II în funcție de grupurile de risc și de factorii de prognostic.

Noutatea și originalitatea științifică: pentru prima dată a fost cercetată interfața biomarkerilor evenimentelor fiziopatologice principale ce se referă la declanșarea și evoluția cancerului endometrial în stadiul I și II. S-a estimat rolul echilibrului între procesele extreme iminente CE, cum ar fi apoptoza celulară și proliferarea celulară în contiguitate cu angiogeneza tumorii pentru a consolida markerii cu valoare predictivă asupra prognosticului patologiei.

Problema științifică soluționată în teză: problema științifică soluționată în teză constă în aceea, că cercetarea bazată pe studii clinico-morfologice și molecular-genetice a decelat mecanisme patogenetice inedite și predictorii ai exacerării CE, cum ar fi prezența epimutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN*, metilării promotorului genei *MLH1*, markerului de proliferare Ki-67, creșterea indicelui neutrofile/limfocite, fapt ce a permis elaborarea unui model matematic pentru prezicerea evoluției bolii la pacienții cu CE din diferite grupuri de risc.

Semnificația teoretică: prin dovezile concludente obținute este completat conceptul și suportul teoretic al cancerului endometrial. La această formă este importantă decantarea aportului mutației c.389G>A a genei *PTEN*, creșterii activității proliferative a ciclului mitotic evaluată prin intermediul creșterii antigenului Ki-67, mutației genei *TP53* rezultante în deprecierea raportului Bax/Bcl2. Totodată, este evidențiat rolul inflamației în promovarea CE, iar majorarea indicelui neutrofile/limfocite este nu numai un mecanism patogenetic, dar și un predictor fezabil al prognosticului tumorii. Este conceptual importantă legătura notabilă a CE cu creșterea masei corporale, precum și absența legăturii între CE vizavi de riscul recurenței pe o parte și caracteristicile menstruației, numărului de nașteri și avorturi spontane pe de altă parte. Valoare predictivă asupra creșterii riscului de recurențe la pacienții cu CE este atribuită unor factori inerți patologiei organelor reproductive, cum ar fi chistul ovarian, miomul uterin și mastopatia fibrochistică. Rata adenocarcinomul papilar seros în lotul pacienților cu CE cu stadiul II este în medie cu 44-48% mai mare comparativ cu indicele stadiului IA și IB. Gradul diferențierii tumorale are impact concludent asupra riscului recurenței, astfel că gradul scăzut de diferențiere se estimează în 95% la pacienții de risc crescut, iar gradul înalt de diferențiere este caracteristic riscului scăzut (80%). Remarcabil, că

profundizarea invaziei tumorii nu corelează autentic cu creșterea riscului. Prezența focarelor necrotice este un predictor veritabil al riscului crescut. Impactul inflamației se impune prin valori maxime ale raportului neutrofile/limfocite și trombocite/limfocite la paciențele cu CE de risc crescut. Markerul proliferației Ki-67 este în raport direct cu gradul de risc, precum și cu stadiul bolii (nivelul expresiei Ki-67 > 49% este decelat numai în grupul de risc crescut). Prezența mutației c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN* este în grupul riscului crescut de 4-8 ori mai mare comparative de riscul intermediar și intermediar-crescut. Important este prezența acestei mutației numai la paciențele cu paternul hormondependent al tumorii în proporție de 36%, dar stadiul II bolii se impune prin reducerea ratei mutației genei *PTEN* versus stadiul I. Epimutația *MLH1* nu demonstrează o legătură atât de concludentă cu evoluția CE comparative cu mutația c.389G>A (p.R130Q) a genei *PTEN*.

Valoarea aplicativă: pe un material clinic probatoriu vast a fost apreciată semnificația clinică a expresiei markerilor biologici moleculari care caracterizează apoptoza, proliferarea celulară și angiogeneza în țesutul tumoral la paciențele cu CE în stadiul I și II. Au fost determinate criteriile clinice, morfologice, imunohistochimice, și genetice precise de diagnostic și prognostic al CE la paciențele cu cancer endometrial în stadiile I-II. Au fost evidențiate caracteristicile imunohistochimice ale CE (expresia Ki-67), prezența mutației c.389G>A a genei *PTEN*, identificarea metilării promotorului genei *MLH1* și corelația în funcție de caracteristicile clinico-morfologice ale cancerului endometrial la paciențele lotului de studiu cu elaborarea profilului molecular al tumorii pentru fiecare pacient. Această abordare permite de a efectua o analiză detaliată a valorii de prognostic pentru fiecare factor aparte, ce va permite identificarea celor mai principali factori de prognostic. A fost elaborat un model propriu de prognostic, care include caracteristici clinice, morfologice, imunologice, imunohistochimice și genetice ale cancerului endometrial. Supraviețuirea pacientelor cu CE pe o perioadă de supraveghere de 3 ani este minimală (72,2%) în rândul celor cu vârsta mai mare de 60 de ani și care fac parte din grupul de risc crescut al recurenței. Rata de supraviețuire fără recidive este de asemenea minimală la aceste paciente (44%). Totodată, rata metastazelor la paciențele cu CE nu corelează inteligibil cu stadiul bolii. Timpul mediu de progresie a CE este în raport indirect cu valoarea raportului neutrofile/limfocite, acesta fiind minimal (6 luni: de la 5 până la 9 luni) la paciențele de risc crescut de recurență ce au un INL > 5,0. Markerul Ki-67 are valoare predictivă certă asupra ratei de supraviețuire și de recidivă la paciențele cu CE, astfel, că activitatea proliferativă sporită (>49%) are impact negativ la distanța de 3 ani. Prezența epimutației *MLH1* de asemenea influențează recidiva bolii la paciențele cu CE la distanța de 3 ani, dată fiind valoarea minimală a timpului mediu până la progresare de 10,5 ani atestat la purtătoarele acestei mutații din grupul de risc crescut.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele studiului au fost raportate la 8 foruri naționale și 18 internaționale. Pe marginea cercetării au fost validate: 3 brevete de invenții. Rezultatele studiului vor fi expuse sub forma unor recomandări practice pentru medicii de familie, ginecologi, dar și pentru specialiștii din domeniul oncologiei. În activitatea clinică a Laboratorului Biologia Cancerului a IMSP Institutul Oncologic vor fi elaborate și implementate programe de cercetare molecular-genetică a CE cu stabilirea subtipului molecular al tumorii. Astfel, va fi eficientizată estimarea evoluției cancerului endometrial în stadiile I-II, ceea ce va permite aplicarea acestuia în conformitate cu criteriile elaborate.

РЕЗЮМЕ

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук на тему: «Молекулярно-генетические факторы прогноза рака эндометрия I-II стадий» выполнена Трипак Ириной Евгеньевной в Медико-Санитарном Публичном Учреждении Институт Онкологии, Кишинэу, 2023. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов и практических рекомендаций. Работа изложена на 161 печатных страницах, содержит 62 таблиц, 32 рисунка. Библиография представлена 206 источниками. Полученные результаты были опубликованы в 55 научных работах.

Ключевые слова: прогностические факторы, клиничко-морфологические факторы, молекулярно-генетические факторы, прогностическая модель, рак эндометрия.

Область исследования: Онкология и лучевая терапия.

Цель исследования: определение клиничко-морфологических и молекулярно-генетических факторов прогноза рака эндометрия (РЭ) I-II стадий для разработки математической модели прогнозирования рецидивов и выживаемости пациенток на срок до 3 лет.

Задачи исследования: установить клинические, морфологические, иммуногистохимические критерии как прогностические факторы РЭ; оценить корреляции иммуногистохимических и молекулярно-генетических данных по клиничко-морфологическим характеристикам рака эндометрия; оценить молекулярный профиль опухоли у пациенток основной группы; провести многофакторный анализ комплекса установленных прогностических критериев с определением прогностического значения каждого отдельного фактора у больных РЭ I-II стадии; создание математической модели комплексной прогностической оценки РЭ I-II стадий.

Научная новизна и оригинальность: впервые исследовано взаимодействие биомаркеров основных патофизиологических событий, связанных с возникновением и развитием рака эндометрия на I и II стадиях. По оценкам, роль баланса между такими процессами РЭ, как клеточный апоптоз и пролиферация в сочетании с опухолевым ангиогенезом, усиливает маркеры, имеющие прогностическое значение для данной патологии.

Решенная научная проблема: в диссертации на основании клиничко-морфологических и молекулярно-генетических исследований выявлены новые патогенетические механизмы и предикторы обострения РЭ, такие как наличие эпимутации с.389G>A (p.R130Q) гена *PTEN*, метилирование промотора гена *MLH1*, маркера пролиферации Ki-67, повышение нейтрофильно-лимфоцитарного индекса, что позволило разработать математическую модель для прогнозирования эволюции заболевания у больных РЭ из разных групп риска.

Теоретическое значение: полученные убедительные доказательства дополняют концепцию и теоретическую основу рака эндометрия. На этом этапе важно оценить вклад мутации с.389G>A гена *PTEN*, повышение пролиферативной активности клеток, оцениваемое по увеличению экспрессии антигена Ki-67, приводящий к снижению соотношения Bax/Bcl2. При этом подчеркнута роль воспаления в стимуляции РЭ, а повышение нейтрофильно-лимфоцитарного индекса является не только частью патогенетического механизма, но и возможным предиктором опухолевого прогноза. Прогностическое значение повышенного риска рецидива у пациенток с РЭ следует придавать патологическим процессам репродуктивных органов, таким как киста яичника, миома матки и фиброзно-кистозная мастопатия. Частота серозно-папиллярной аденокарциномы в группе больных со II стадией РЭ в среднем на 44-48% выше показателя IA и IB стадии. Показано, что степень дифференцировки опухоли оказывает решающее влияние на риск рецидива, так, низкая степень дифференцировки определялась в 95% больных высокого риска, а высокая степень дифференцировки характерна в группе низкого риска (80%). Примечательно, что глубина инвазии опухоли на нашем материале не коррелировала с увеличением риска рецидивирования. Наличие очагов некроза является верным предиктором повышенного риска рецидива. Показано, что влияние воспаления проявляется максимальными значениями соотношения нейтрофилы/лимфоциты и тромбоциты/лимфоциты у больных РЭ высокого риска. Маркер пролиферации Ki-67 также напрямую связан со степенью риска, стадией заболевания (уровень

экспрессии Ki-67 >49% выявляется только в группе высокого риска). По нашим данным наличие эпимутации с.389G>A (p.R130Q) гена *P TEN* выявлено в группе высокого риска в 4-8 раз чаще по сравнению с промежуточным и промежуточно-высоким риском. Эпимутация *MLH1* не показала убедительной связи с прогнозом РЭ.

Практическая ценность: разработана собственная прогностическая модель, включающая клинические, морфологические, иммунологические, иммуногистохимические и генетические характеристики рака эндометрия I-II стадии. Выживаемость пациентов с РЭ за 3-летний период наблюдения минимальна (72,2%) среди лиц старше 60 лет и относящихся к группе повышенного риска рецидива. Безрецидивная выживаемость у этих больных также минимальна (44%). Среднее время до прогрессирования РЭ косвенно связано с величиной соотношения нейтрофилов/лимфоцитов, которое минимально (6 мес.: 5-9 мес.) у пациентов с высоким риском рецидива с индексом НЛИ > 5,0. Маркер Ki-67 имеет определенную прогностическую ценность в отношении выживаемости и частоты рецидивов у пациентов с РЭ, так что повышенная пролиферативная активность (>49%) оказывает негативное влияние на протяжении 3 лет. Наличие эпимутации *MLH1* также влияет на рецидив заболевания у больных РЭ на протяжении 3 лет, вне зависимости от стратификации группы риска.

Внедрение научных результатов: Результаты исследования были представлены на 8 национальных и 18 международных форумах, подтверждено 3 патента на изобретения. Результаты исследования будут представлены в виде практических рекомендаций для семейных врачей, гинекологов, а также для специалистов в области онкологии. В клинической деятельности Лаборатории биологии рака Медико-Санитарного Публичного Учреждения Института Онкологии будут разработаны и реализованы программы молекулярно-генетических исследований РЭ с установлением молекулярного подтипа опухоли. Таким образом, будет упрощена оценка эволюции рака эндометрия на I-II стадиях, что позволит применять ее в соответствии с разработанными критериями.

SUMMARY

The dissertation for doctor in philosophy in medicine on topic: “Molecular-genetic factors for the prognosis of endometrial cancer in stages I-II” was elaborated by Tripac Irina in the Public Medico-Sanitary Institution Institute of Oncology, Chisinau, 2023. This work includes an introduction, 6 chapters, conclusions and practical recommendations. The paper contains 161 pages, 62 tables, 32 schemes. The bibliography list includes 206 sources. The results obtained have been published in 55 scientific papers.

Key-words: Prognostic factors, clinical-morphological factors, molecular-genetic factors, prognostic model, endometrial cancer.

Study domain: Oncology and radiotherapy.

The aim of the study: determination of clinical, morphological and molecular genetic factors of endometrial cancer (EC) stages I-II to develop a mathematical model for predicting relapses and patient survival for up to 3 years.

Objectives of the study: To establish the clinical, morphological, immunohistochemical criteria as prognostic factors of the endometrial cancer (EC); estimating the correlation of immunohistochemical and molecular-genetic data according to the clinical and morphological characteristics of endometrial cancer; estimating the molecular profile of the tumour in the patients of the study group; multifactorial analysis of the complex of prognostic criteria established with the determination of the prognostic value for each separate factor in patients with EC in stage I-II; creation of the mathematical model of the complex prognostic evaluation of the EC in stages I-II according to the risk groups and the prognostic factors.

Scientific novelty and originality: The mathematical model allows complex analysis of the prognostic factors of the evolution of endometrial cancer, based on the molecular profile of the tumour and the characteristics that make it possible to predict the response of the tumour to treatment. Determining the expression of Ki-67, PDL1, *MLH1* proteins presents useful information about the biological behaviour of the tumour already in the early stages of EC.

The solved scientific problem: The scientific problem solved in the thesis is that research based on clinical-morphological and molecular-genetic studies has found novel pathogenic mechanisms and predictors of EC exacerbation, such as the presence of c.389G>A epimutation (p.R130Q) of the *PTEN* gene, methylation of the *MLH1* gene promoter, the Ki-67 proliferation marker, the increase of the neutrophil-lymphocyte index, which allowed the development of a mathematical model to predict the evolution of the disease in patients with EC from different risk groups.

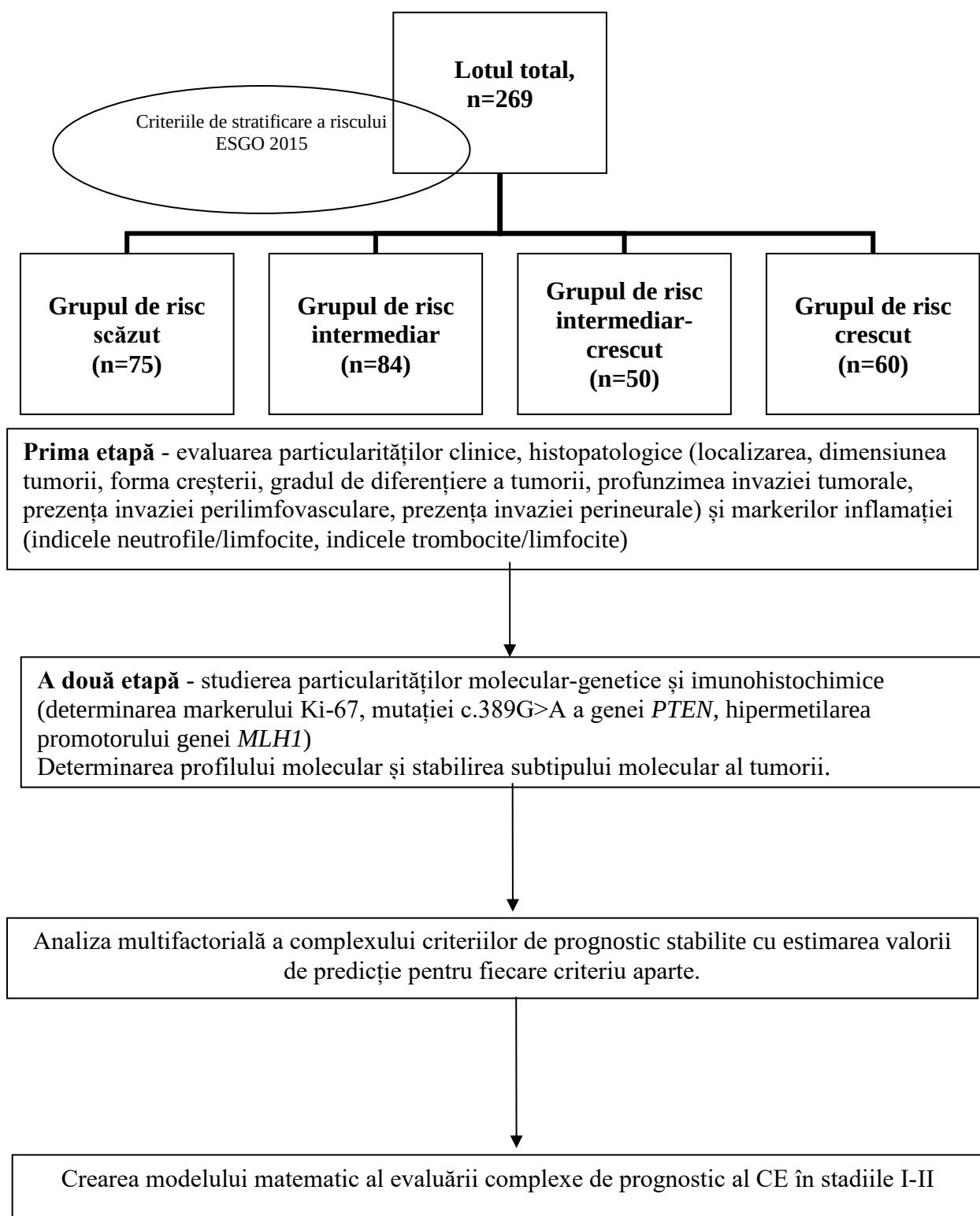
Theoretical significance: The conclusive evidence obtained completes the concept and theoretical support of endometrial cancer. At this point, it is important to decant the contribution of the c.389G>A mutation of the *PTEN* gene, the increase of the proliferative activity of the mitotic cycle evaluated by the increase of the Ki-67 antigen, the mutation of the *TP53* gene resulting in the depreciation of the Bax / Bcl2 ratio. At the same time, the role of inflammation in promoting the EC is highlighted, and the increase in the neutrophil / lymphocyte index is not only a pathogenic mechanism, but also a feasible predictor of tumour prognosis. It is conceptually important that the EC has a significant link with the increase in body mass, as well as the absence of a link between the EC with regard to the risk of recurrence on the one hand and the characteristics of menstruation, births and miscarriages on the other. Predictive value on the increased risk of recurrence in patients with EC is attributed to factors inherent in the pathology of reproductive organs, such as ovarian cyst, uterine fibroids and fibrocystic mastopathy. The rate of serous papillary adenocarcinoma in the group of patients with stage II EC is on average 44-48% higher compared to the index of stage IA and IB. The degree of tumour differentiation has a conclusive impact on the risk of recurrence, so that the low degree of differentiation is estimated at 95% in high-risk patients, and the high degree of differentiation is characteristic of low risk (80%). Remarkably, the depth of the tumour invasion does not really correlate with the increase in risk. The presence of necrotic foci is a true predictor of increased risk. The impact of inflammation is imposed by maximum values of the ratio neutrophils / lymphocytes and platelets / lymphocytes in patients with high-risk EC. The marker of Ki-67 proliferation is directly related to the degree of risk as well as to the stage of the disease (the level of

Ki-67 expression > 49% is detected only in the high risk group). The presence of the c.389G>A mutation (p.R130Q) of the *PTEN* gene is in the 4-8 times higher risk group compared to the intermediate and intermediate-increased risk. Important is the presence of this mutation only in patients with a hormone-dependent pattern of tumour in 36%, but stage II disease is required by reducing the rate of *PTEN* gene mutation vs. stage I. *MLH1* epimutation does not show such a conclusive link with EC c.389G>A (p.R130Q) of the *PTEN* gene.

Practical value of the study. The clinical significance of the expression of molecular biological markers that characterize apoptosis, cell proliferation and angiogenesis in tumour tissue in patients with stage I and II EC has been assessed on a wide range of clinical evidence. Precise clinical, morphological, immunohistochemical, and genetic criteria for EC diagnosis and prognosis in patients with stage I-II endometrial cancer have been determined. The immunohistochemical characteristics of EC (Ki-67 expression), the presence of the c.389G>A mutation of the *PTEN* gene, the identification of the methylation of the *MLH1* gene promoter and the correlation according to the clinical-morphological characteristics of endometrial cancer in patients of the study group with molecular profile were highlighted of the tumour for each patient. This approach allows to perform a detailed analysis of the prognostic value for each particular factor, which will allow the identification of the main prognostic factors. Its own prognostic model has been developed, which includes clinical, morphological, immunological, immunohistochemical and genetic characteristics of endometrial cancer. The survival of patients with EC over a 3-year surveillance period is minimal (72.2%) among those older than 60 years and belonging to the high risk group of recurrence. The relapse-free survival rate is also minimal in these patients (44%). At the same time, the rate of metastases in patients with EC is not intelligibly correlated with the stage of the disease. The mean time to progression of the EC is indirectly related to the value of the neutrophil/ lymphocyte ratio, which is minimal (6 months: 5 to 9 months) in patients at high risk of recurrence with an INL index >5.0. The Ki-67 marker has a definite predictive value on the survival and recurrence rate in patients with EC, so that increased proliferative activity (>49%) has a negative impact at a distance of 3 years. The presence of *MLH1* epimutation also influences the recurrence of the disease in patients with EC at a distance of 3 years, given the minimum value of the mean time to progression of 10.5 years attested to the carriers of this mutation in the high risk group.

Implementation of scientific results: The results of the study were reported to 8 national and 18 international forums. On the research side, 3 invention patents were validated. The results of the study will be presented in the form of practical recommendations for family doctors, gynecologists, but also for oncology specialists. In the clinical activity of the Cancer Biology Laboratory of the IMSP Oncological Institute, EC molecular-genetic research programs will be developed and implemented with the establishment of the molecular subtype of the tumor. Thus, the estimation of the evolution of endometrial cancer in stages I-II will be streamlined, which will allow its application in accordance with the elaborated criteria.

Designul studiului



LISTA ABREVIERILOR

CCD IMSP IO - Centrul Consultativ Diagnostic al IMSP Institutului Oncologic
CCNPE – cancer colorectal nonpolipozic ereditar
CCR – cancer colorectal
CCU - cancer de corp uterin
CE – cancer endometrial
CGM – cancer al glandei mamare
CM – cancer mamar
CO – cancer ovarian
COGF – cancer al organelor genitale feminine
DZ – diabetul zaharat
ESGO – European Society of Gynaecological Oncology (Societate Europeană a Oncoginecologilor)
ESMO – European Society for Medical Oncology (Societate Europeană a Oncologilor Medicali)
ESTRO – European Society for Radiotherapy & Oncology (Societate Europeană a Radioterapeuților și Oncologilor)
FIGO - Federația Internațională a Obstetricienilor și Ginecologilor
Gy - Gray
IDF - Federația Internațională pentru Diabet
IM - instabilitate microsatelitară
IMSP IO – Instituția Medico-Sanitară Publică Institutul Oncologic
INL - indicele neutrofile/limfocite
ITL - indicele trombocite/limfocite
IÎ – interval de încredere
gg/l – ganglioni limfatici
MS – stabilitatea microsatelitară
MSI –instabilitatea microsatelitară
MSMPS – Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale
OMS - Organizația Mondială a Sănătății
PTEN - omolog de fosfatază și tensină
RMN – rezonanță magnetică nucleară
RTE – radioterapie externă
RTIC – radioterapie intracavitară
RTOG – Radiation Therapy Oncology Group (Grupul Oncologic al Radioterapeuților)
SFR – supraviețuire fără recidivare
SG – supraviețuire generală
SM – sindrom metabolic
TC – tomografie computerizată
USG – ultrasonografie

TRIPAC IRINA

**FACTORII MOLECULAR-GENETICI DE PROGNOSTIC
AL CANCERULUI ENDOMETRIAL ÎN STADIILE I-II**

321.20 – ONCOLOGIE ȘI RADIOTERAPIE

Rezumatul tezei de doctor habilitat în științe medicale

Aprobat spre tipar: 16.10.2023
Hârtie ofset. Tipar ofset.
Coli de tipar.: 2,50

Formatul hârtiei 60x84 1/16
Tiraj 50 ex.
Comanda nr. imprint/12
