Olsztyn, 2023 r.

ZALEŻNOŚĆ WYSTĘPOWANIA I STATUSU NIESTABILNOŚCI MIKROSATELITARNEJ OD STOPNIA EKSPRESJI RECEPTORA AMH (HORMONU ANTY- MULLEROWSKIEGO) TYPU II W RAKU TRZONU MACICY U KOBIET

ROZPRAWA DOKTORSKA MARTA SZADURSKA-NOGA

Promotor: dr hab. n. med. Konrad Ptaszyński, prof. UWM

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Lekarski
Katedra Patomorfologii i Medycyny Sądowej

Podziękowania

Pragnę wyrazić moją dozgonną wdzięczność osobom, które miały ważny wpływ na powstanie i kształt mojej rozprawy doktorskiej.

Mojemu promotorowi dr hab. n. med. Konradowi Ptaszyńskiemu, prof. UWM za poświęcony czas i motywowanie mnie do pracy.

Mojej nieocenionej grupie badawczej, której mam zaszczyt być członkiem:

dr hab. n. med. Marcie Majewskiej, prof. UWM

dr n. biol. Aleksandrze Lipce

dr n. med. Markowi Gowkielewiczowi

Choć nie potrafię znaleźć odpowiednich słów, które oddadzą w pełni ogrom mojej wdzięczności, to dziękuję przede wszystkim za niezwykłe wsparcie, motywację, cenne uwagi i poświęcony czas, a także za godziny dyskusji i cierpliwość.

Mojej wspaniałej rodzinie, mężowi Jarosławowi i córce Hannie, za ocean cierpliwości i zrozumienia oraz wsparcie, we wcale nierzadkich chwilach zwątpienia.

Mojej przyjaciółce Małgorzacie, za wsparcie, doping i przypominanie o odpoczynku.

Osobne, równie ważne podziękowania składam współpracownikom z Zakładu Patomorfologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Olsztynie, za wsparcie techniczne niniejszego badania, wyrozumiałość, cierpliwość, a także nieocenioną pomoc w znajdowaniu wyrazów bliskoznacznych i trafnych sformułowań oraz obiektywną ocenę tworzącej się rozprawy.

Spis treści

Indeks skrótów stosowanych w pracy 3

1. Rak trzonu macicy 5

1.1. Trzon macicy i endometrium 5

1.2. Cykl menstruacyjny 7

1.3. Epidemiologia raka trzonu macicy 10

1.4. Czynniki ryzyka 10

1.5. Patofizjologia, histopatologia i karcynogeneza raka trzonu macicy 11

1.6. Hormon anty-Müllerowski i jego receptory 15

1.6.1. Rola fizjologiczna hormonu anty-Müllerowskiego 15

1.6.2. Struktura hormonu hormonu anty-Müllerowskiego 16

1.6.3. Szlaki sygnalizacyjne hormonu anty-Müllerowskiego 16

1.6.4. Struktura i fizjologiczna ekspresja AMHR-II 18

1.6.5. Rola hormonu anty-Müllerowskiego i jego receptorów w chorobach nowotworowych 19

1.7. Niestabilność mikrosatelitarna 20

1.7.1. Naprawa błędnie sparowanych zasad i niestabilność mikrosatelitarna20

1.7.2. Geny odpowiedzialne za MMR i ich nieprawidłowości 20

1.7.2.1.MLH1 21

1.7.2.2.MSH2 21

1.7.2.3.MSH6 22

1.7.2.4.PMS2 22

1.7.3. Proces wykrywania i naprawy błędnie sparowanych zasad 23

1.7.4. Molekularne podłoże niestabilności mikrosatelitarnej i jej rola w karcynogenezie 25

2. Cel badania 29

3. Materiały i metody 30

3.1. Materiał badawczy 30

3.2. Charakterystyka grupy badanej oraz kryteria włączenia i wyłączenia 30

3.2.1. Charakterystyka ogólna grupy badanej 30

3.2.2. Kryteria włączenia pacjentek do badania 31

3.2.3. Kryteria wyłączenia pacjentek z badania 31

3.2.4. Charakterystyka szczegółowa grupy badanej 32

3.3. Preparatyka tkankowa 33

3.3.1. Przygotowanie materiału pooperacyjnego i badanie histopatologiczne 33

3.3.2. Mikromacierze tkankowe 34

3.3.3. Barwienia immunohistochemiczne 35

3.3.4. Ocena mikroskopowa barwień immunohistochemicznych 36

3.4. Badania molekularne statusu MMR metodą RT-PCR 37

3.4.1. Kryteria włączenia pacjentek do badania molekularnego 37

3.4.2. Opis zastosowanego systemu RT-PCR 38

3.5. Analiza statystyczna 40

4. Wyniki 42

4.1. Podział grupy badanej, wyniki barwień immunohistochemicznych i reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym 42

4.2. Zróżnicowanie ekspresji AMH 48

4.3. Zróżnicowanie ekspresji AMHRII 49

4.4. Zróżnicowanie statusu MMRd 50

5. Dyskusja 54

6. Wnioski 62

7. Spis rycin i tabel 63

8. Bibliografia 65

9. Streszczenie 78

10. Summary 79

Indeks skrótów stosowanych w pracy

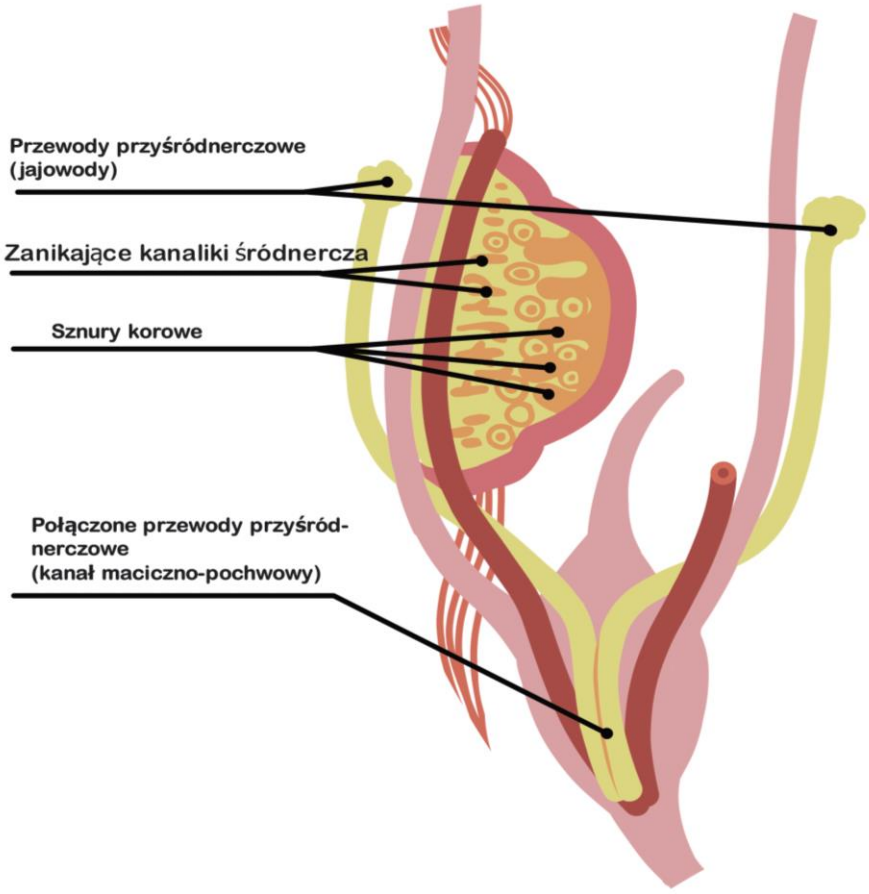
ACVR2A (ang. *Activin A Receptor Type 2A*) Receptor aktywiny A typu 2A
AMH (ang. *Anti-Mullerian Hormone*) hormon anty-Mullerowski
AMHC (ang. *Anti-Mullerian Hormone C-mature region*) region dojrzały C-końcowy hormonu anty-Mullerowskiego
AMHRII (ang. *Anti-Mullerian Hormone Receptor type II*) receptor typu II dla hormonu anty-Mullerowskiego
ATP-aza (ang. *adenosine 5'triphosphatase*) adenozyno 5'-trifosfataza
BER (ang. *Base Excision Repair*) naprawa przez wycięcie zasady
BMI (ang. *Body Mass Index*) indeks masy ciała
BMP (ang. *Bone Morphogenic Protein*) białko morfogenetyczne kości
BTBD7 (ang. *BTB Domain Containing 7*) białko 7 zawierające domenę BTB
CAP (ang. *College of American Pathologists*) Szkoła Patologów Amerykańskich
DAB 3,30-diaminobenzydyna
DHT dihydrotestosteron
DIDO1 (ang. *Death Inducer - Obliterator 1*) obliterator 1 indukujący śmierć
DNA (ang. *Deoxyribonucleic Acid*) kwas deoksyrybonukleinowy
EPCAM (ang. *Epithelial Cell Adhesion Molecule*) molekuła przylegania komórki nabłonkowej
ER (ang. *estrogene receptor*) receptor dla estrogenu
EXO1 (ang. *exonuclease 1*) egzonukleaza 1
FIGO (ang. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa
G (1,2,3) (ang. *grade*) stopień dojrzałości histologicznej
H&E (ang. *haematoxylin and eosin*) hematoksylina i eozyna
HDI (ang. *Human Development Index*) Wskaźnik Rozwoju Społecznego
HIFU (ang. *High-Intensity Focused Ultrasound*) fale ultradźwiękowe o dużym natężeniu
HMGB1 (ang. *High Mobility Group Box 1*) białko o wysokiej mobilności grupy 1
HNPCC (ang. *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością
HRR (ang. *Homologous Recombination Repair*) naprawa przez homologiczną rekombinację
HTZ hormonalna terapia zastępcza
IHC immunohistochemia
KP karmienie piersią
MHN (ang. *Anti-Mullerian Hormone N-pro-region*) proregion N-końcowy hormonu anty-Mullerowskiego
miR-155 (ang. *micro-ribonucleic acid 155*) mikro - kwas rybonukleinowy - 155
miR-21 (ang. *micro-ribonucleic acid 21*) mikro - kwas rybonukleinowy - 21
MIS (ang. *Mullerian Inhibiting Substance*) Mullerowska Substancja Hamująca
MLH MutL homolog 1
MMR (ang. *Mismatch Repair*) system naprawy błędnie sparowanych zasad

MMRd (ang. *Mismatch Repair deficient*) deficyt systemu naprawy błędnie sparowanych zasad
MRE11 (ang. *MRE11A double strand break repair nuclease*) nukleaza naprawiająca pękniecia dwuniciowe typu MRE11A
mRNA (ang. *Messenger ribonucleic acid*) przekaźnikowy kwas rybonukleinowy
MSH2 MutS homolog 2
MSH3 MutS homolog 3
MSH6 MutS homolog 6
MSI (ang. *Microsatellite Instability*) niestabilność mikrosatelitarna
MSI-H (ang. *Microsatellite Insatbility - High*) wysoka niestabilność mikrosatelitarna
MSI-L (ang. *Microsatellite Instability - Low*) niska niestabilność mikrosatelitarna
MSS (ang. *Microsatellite Stable*) stabilność mikrosatelitarna
NCI (ang. *National Cancer Institute*) Amerykański Narodowy Instytut Nowotworów
NER (ang. *Nucleotide Excision Repair*) naprawa przez wycięcie nukleotydu
NSMP (ang. *No Specific Molecular Profile*) bez specyficznego profilu molekularnego
OM ostatnia miesiączka
PCNA (ang. *Proliferatng Cell Nuclear Antigen*) antygen jądrowy komórki dzielącej się
PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) reakcja łańcuchowa polimerazy
PMS2 PMS1 homolog 2
PMS3 PMS1 homolog 3
POLE (ang. *DNA polymerase epsilon catalytic subunit*) podjednostka katalityczna DNA polimerazy epsilon
PR (ang. *progesterone receptor*) receptor dla progesteronu
proAMH (ang. *pro - anti-Mullerian hormone*) prekursor hormonu anty-Mullerowskiego
ProMisE (ang. *Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer*) Proaktywny Molekularny Klasyfikator Ryzyka Raka Endometrialnego
RFC (ang. *Replication factor C*) czynnik replikacyjny C
RPA (ang. *Replication protein A*) białko replikacyjne A
RT-PCR (ang. *real-time polymerase chain reaction*) reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RYR3 (ang. *Ryanodine receptor 3*) receptor rianodynowy 3
SBE (ang. *Smad Binding Element*) element wiążący Smad
SEC31A (ang. *Protein transport protein Sec31A*) Białko Sec31A trensportujące białka
SPECT (ang. *Single Photon Emission Computed Tomography*) tomografia komputerowa emisyjna pojedynczych fotonów
ssDNA (ang. *single-strand deoxyribonucleic acid*) jednoniciowy kwas deoksyrybonukleinowy
SSRs (ang. *Simple Sequence Repeats*) powtórzenia prostej sekwencji
SULF2 (ang. *extracellular sulfatase Sulf-2*) pozakomórkowa sulfataza Sulf-2
TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlaas Research Network*) Sieć Badań nad Atlasem Genomu Raka
TGF-β (ang. *Transforming Growth Factor - Beta*) transformujący czynnik wzrostu beta
TMA (ang. *Tissue Microarrays*) mikromacierze tkankowe
WHO (ang. *World Health Organisation*) Światowa Organizacja Zdrowia

1. Rak trzonu macicy

1.1. Trzon macicy i endometrium

Rozwój płodowy narządów żeńskiego układu rozrodczego jest procesem złożonym i wieloetapowym. Narządy rozrodcze u kobiet podzielić można na trzy główne części: gonady, drogi rodne oraz narządy płciowe zewnętrzne. Wszystkie wymienione elementy wywodzą się z czterech pierwotnych źródeł: mezodermy, pierwotnych komórek zarodkowych, nabłonka jamy ciała (coelomy) oraz mezenchymy **[1]**. Macica, a z nią również jajowody, szyjka macicy i trzecia górna część pochwy, powstają podczas procesu organogenezy przez przekształcenie parzystych przewodów przyśródnerczowych (przewodów Müllera) w okresie od około 8 do 12 tygodnia ciąży (***Rycina 1***) **[2]**.



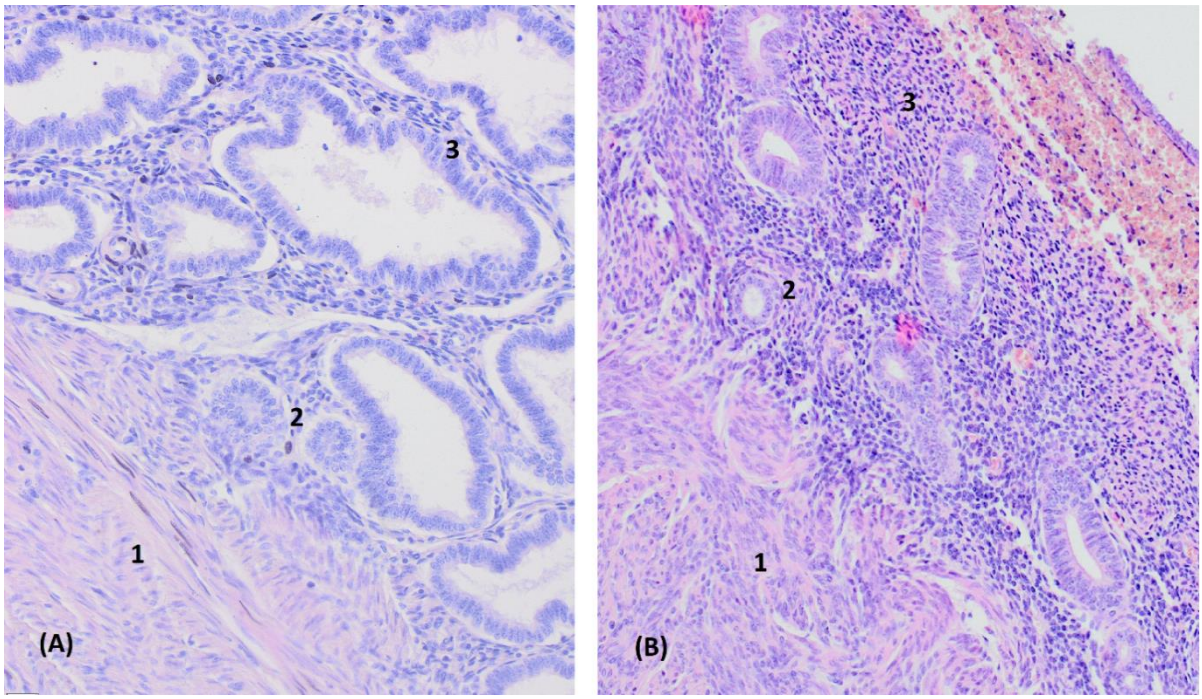
Rycina 1. *Narządy płciowe wewnętrzne u płci żeńskiej, około 8 tygodnia ciąży.*
(opracowanie: Maja Szadurska, wykorzystano za zgodą autorki).

W okresie dziecięcym macica ma kształt stożka o ściętym szczycie i wklęsłej podstawie skierowanej dogłowowo, zaś ostateczny, gruszkowaty kształt trzon macicy przyjmuje w okresie pokwitania.

Anatomicznie trzon macicy położony jest w części środkowej jamy miednicy mniejszej, skierowany ku przodowi i przylegający w dolnej części swojej ściany przedniej do pęcherza

moczowego. Otrzewna ciągłym fałdem pokrywa dno pęcherza, tworzy płytki zachyłek pęcherzowo-maciczny i przechodzi na trzon macicy pokrywając jego 2/3 ściany przedniej, dno i ścianę tylną. Następnie otrzewna tworzy głęboki zachyłek maciczno-odbytniczy, zwany też jamą Douglasa i przechodzi na strukturę sąsiadującą z częścią tylną trzonu macicy – odbytnicę **[3]**. Prawidłowe położenie macicy niecięŜarnej u kobiety w okresie popokwitaniowym określone jest jako pośrodkowe i osiowe, fizjologicznie nieco pochylone ku przodowi (tzw. przodopochylenie), a ponadto trzon pozostaje w miernie nasilonym zgięciu ku przodowi (tzw. przodozgięcie) **[4]**.

Ściana trzonu macicy zbudowana jest z trzech głównych warstw, łatwo rozróżnialnych makroskopowo na przekrojach poprzecznych. Zewnętrzną warstwę stanowi otrzewna, zwana omaciczem. Jest to cienka warstwa luźnej tkanki łącznej włóknistej z leżącym bezpośrednio na niej nabłonkiem jednowarstwowym kostkowym - międzybłonkiem (łac. *mesothelium*). Podotrzewnowo znajduje się środkowa (mierząca zwykle 1-1,5cm), najgrubsza warstwa ściany macicy – błona mięśniowa, która stanowi tzw. mięsień maciczny (łac. *myometrium*). Histologicznie, *myometrium* składa się z wrzecionowatych komórek mięśni gładkich ułożonych w tworzące zwarty układ pęczki, zaś pośród nich widoczna jest również niewielka ilość luźnej tkanki łącznej, stanowiącej swoiste rusztowanie zarówno dla pęczków mięśniowych, jak i dla licznych naczyń krwionośnych i chłonnych **[5]**. Wewnętrzną warstwą wyścielającą jamę macicy jest błona śluzowa (łac. *endometrium*) (***Rycina 2*****)**, która leży bezpośrednio na błonie mięśniowej. W ścianie trzonu macicy nie stwierdza się natomiast błony podśluzowej, której rolę w innych narządach zastępuje w macicy dwuwarstwowy układ endometrium. Cienka warstwa podstawna mająca bezpośredni kontakt z mięśniówką zawiera liczne rozgałęziające się kandelabrowato naczynia oraz liczne komórki macierzyste dla łącznotkankowego podścieliska i nabłonka gruczołowego. Warstwa czynnościowa o zmiennej, zależnej od fazy cyklu menstruacyjnego grubości, leżąca dośrodkowo, na warstwie podstawnej zbudowana jest z leżących wśród zasadochłonnych, nieco wrzecionowatych, komórek podścieliska, wyścielonych nabłonkiem walcowatym lub kostkowym cewkowych struktur gruczołów macicznych oraz licznych naczyń krwionośnych o spiralnym przebiegu odchodzących od opisanych wyżej naczyń warstwy podstawnej **[6]**.



Rycina 2. *Budowa histologiczna błony śluzowej trzonu macicy (endometrium): (A) endometrium w okresie rozrodczym (faza wydzielnicza, powiększenie 200x); (B) endometrium w okresie spoczynku (pomenopauzalnym, powiększenie 100x).1 – mięśniówka gładka trzonu macicy (myometrium), 2 – warstwa podstawna błony śluzowej, 3 – warstwa czynnościowa błony śluzowej. (opracowanie własne).*

1.2. Cykl menstruacyjny

Cykliczne, trwające przeciętnie 28 dni zmiany histologiczne i funkcjonalne błony śluzowej trzonu macicy wywoływane i regulowane są siecią wzajemnych powiazań hormonalnych związanych z dojrzewaniem komórki jajowej, pęknięciem pęcherzyka jajnikowego i wytworzeniem się jajnikowego ciałka żółtego.

W wieku wczesnodziecięcym, endometrium jest nieaktywne, a wraz z dojrzewaniem pierwszego pęcherzyka jajnikowego, zwykle w wieku 10-15 lat rozpoczyna swoją cykliczną przemianę i pozostaje czynne aż do około 45-55 roku życia. Kiedy rezerwa pęcherzyków jajnikowych zostaje wyczerpana, endometrium pozbawione stymulacji hormonalnej staje się nieaktywne i zanikowe (atroficzne) **[7]**. O ile nie dojdzie do zapłodnienia komórki jajowej, cykl przemian endometrium fizjologicznie składa się z pięciu faz o różnej względem siebie długości:

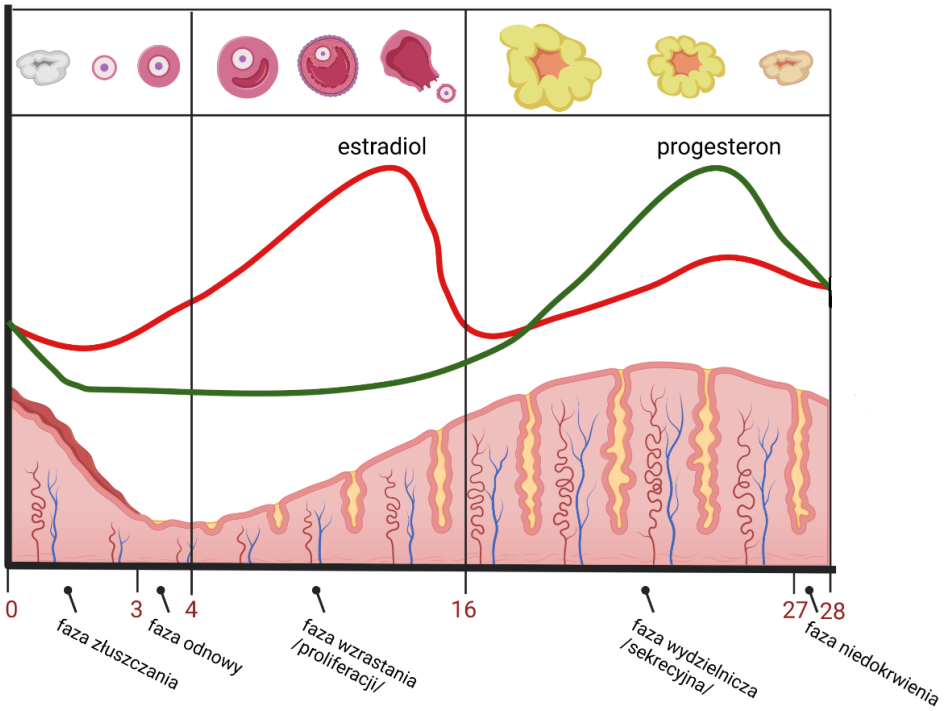
- **Faza wzrastania** (faza proliferacyjna) trwa około 11 dni (od 5 do 16 dnia cyklu menstruacyjnego). Hormonami dominującymi w tej fazie są estrogeny, zwłaszcza estron, pobudzające proliferację komórek macierzystych warstwy podstawnej. W tej fazie histologicznie endometrium charakteryzuje się dużą komórkowością, regularnymi odległościami między okrągłymi lub cewkowymi na przekrojach gruczołami macicznymi. Nabłonek gruczołów jest walcowaty, jednowarstwowy z tzw. pseudostratyfikacją czyli pozorną warstwowością wynikającą ze stłoczenia komórek.

W warstwie podstawnej w tej fazie widoczne są liczne figury podziału zarówno w komórkach nabłonkowych, jak i podścieliskowych.

- **Faza wydzielnicza** (faza sekrecyjna) trwająca również około 11 dni (od 16 do 27 dnia cyklu). Pod wpływem pęknięcia pęcherzyka jajnikowego dochodzi do uwolnienia oocytu i ukształtowania z ulegających luteinizacji komórek ziarnistych i tekalnych hormonalnie czynnego ciałka żółtego. Przewaga progestagenów nad estrogenami stanowi sygnał dla endometrium do ostatecznych przygotowań na przyjęcie potencjalnie zapłodnionej komórki jajowej. Naczynia spiralne warstwy czynnościowej poszerzają się, gruczoły fałdują się, rozszerzają i silnie skręcają się zmieniając przebieg na spiralny, co z kolei sprawia wrażenie znaczącego zmniejszenia się przestrzeni podścieliska zawartego między poszczególnymi gruczołami. Komórki nabłonka rozpoczynają intensywną aktywność wydzielniczą, co mikroskopowo widoczne jest jako tworzenie pod- i nadjądrowych wodniczek i sprawia wrażenie "klawiszy fortepianu". W świetle gruczołów pojawia się znacząca ilość śluzu, a komórki podścieliska początkowo oddalają się od siebie wskutek narastającego obrzęku międzykomórkowego. Ponadto, zwiększają stosunek jądrowo-cytoplazmatyczny, a ich jądra stają się nadbarwliwe (hyperchromatyczne), by w końcowym okresie fazy wydzielniczej przyjąć wygląd nieco przypominający doczesną (tzw. komórki predecydualne). Przedostatniego i ostatniego dnia fazy zaobserwować można migrację granulocytów obojętnochłonnych do przestrzeni międzykomórkowej podścieliska.
- **Faza niedokrwienia** trwająca krótko, zwykle około 24 godzin, ma miejsce w 27 lub 28 dniu cyklu menstruacyjnego, o ile nie dojdzie do zapłodnienia komórki jajowej. Ciałko żółte kończy czynność wydzielniczą, a poziom estrogenów wzrasta, co powoduje dość gwałtowny skurcz tętnic spiralnych warstwy czynnościowej endometrium i następowe jej niedokrwienie.
- **Faza złuszczania** trwa przeciętnie 2-3 dni (osobniczo może być nieco dłuższa). Naczynia ponownie rozszerzają się i pękają, głównie za sprawą naporu krwi tętniczej. Fragmenty obumarłych wskutek uprzedniego niedokrwienia struktur podścieliska i gruczołów macicznych, razem z wydzieliną śluzową i krwią odpływają na zewnątrz. Początek obserwowanego makroskopowo krwawienia miesięcznego, czyli pierwszy dzień krwawienia stanowi zarazem pierwszy dzień nowego cyklu.
- **Faza odnowy** trwa około 1-2 dni i rozpoczyna się z chwilą ustania krwawienia. W komórkach nabłonkowych i podścieliskowych warstwy podstawnej rozpoczyna się

intensywna aktywność mitotyczna, co skutkuje rozplemem nabłonka na powierzchni odsłoniętej złuszczaniem powierzchni warstwy podstawnej. Faza odnowy płynnie przechodzi w fazę wzrastania **(*Rycina 3*) [5]**.

Fizjologicznie warstwa podstawna endometrium podlega wpływom hormonalnym w stopniu mniejszym niż warstwa czynnościowa i w warunkach prawidłowych nie ulega złuszczaniu. Obserwując zależności zachodzące między stanem i funkcją błony śluzowej trzonu macicy a dynamiką zmian stężenia hormonów płciowych wysnuć można wnioski, że progestageny mają działanie antyproliferacyjne i kierują funkcją komórek endometrium tak, by produkcja i wydzielanie śluzu dominowały nad podziałami komórkowymi, co określane jest terminem przemiany przeddoczesnowej. Celem opisanych zmian jest stworzenie optymalnych warunków do zagnieżdżenia potencjalnie zapłodnionego oocytu. Estrogeny z kolei, wykazują działanie dokładnie odwrotne, stymulując nabłonek i podścielisko warstwy podstawnej do rozrostu. Przeciwstawna rola w regulacji cyklu komórkowego w endometrium, oprócz fizjologicznej – wzbudzaniai utrzymywania cyklu menstruacyjnego, ma również istotne skutki patologiczne w najbardziej skrajnej swojej formie – inicjacji karcynogenezy **[5, 6]**.



Rycina 3. *Cykl menstruacyjny. Zależność architektoniki błony śluzowej endometrium od fazy cyklu jajnikowego oraz poziomu estrogenów i progesteronu. Na osi poziomej (x) przedstawiono poszczególne dni cyklu. (opracowanie własne).*

1.3. Epidemiologia raka trzonu macicy

Rak trzonu macicy jest najczęstszym nowotworem złośliwym żeńskiego układu rozrodczego w krajach uznanych przez Organizację Narodów Zjednoczonych za te, o wysokim indeksie Wskaźnika Rozwoju Społecznego (ang. *Human Development Index, HDI*), zaś biorąc pod uwagę populację ogólnoświatową – drugim najczęstszym **[8, 9]**. Do krajów z dynamicznie rosnącym odsetkiem zachorowań sukcesywnie dołączają te, które w ostatnich kilku dziesięcioleciach znacząco poprawiają status socjoekonomiczny swoich obywateli, a więc Chiny, Brazylia czy Republika Południowej Afryki **[10]**. Statystyki światowe bardzo dobrze oddają trendy zachorowalności w Polsce, gdzie według danych Krajowego Rejestru Nowotworów na rok 2019, rak trzonu macicy zajmuje miejsce czwarte pod względem częstości zachorowań na nowotwory złośliwe u kobiet ogółem i pierwsze miejsce pod względem zachorowalności na nowotwory złośliwe żeńskiego układu rozrodczego **[11]**.

W krajach rozwiniętych odsetek przeżyć 5-letnich od chwili diagnozy jest wysoki i sięga nawet 80%. Według statystyk światowych rak trzonu macicy zajmuje dopiero 14-te miejsce pod względem umieralności z powodu nowotworów, będąc przyczyną około 90000 zgonów rocznie. Współczynniki zgonów standaryzowane względem wieku, na rok 2018, wahają się od <1 zgonu na 100000 chorych/rok w krajach o niskiej zachorowalności, do 6 zgonów na 100000 chorych /rok w krajach o zachorowalności wysokiej lub średniej ale o ograniczonym dostępie społeczeństwa do opieki zdrowotnej **[10]**. Polskie dane plasują raka trzonu macicy na miejscu szóstym pod względem umieralności kobiet na nowotwory ogółem i na miejscu drugim, zaraz po raku jajnika, pod względem umieralności na nowotwory żeńskiego układu rozrodczego. Ponadto, wraz z dynamicznym rozwojem naszego kraju pod względem gospodarczym, socjalnym i ekonomicznym od roku 2005 obserwowany jest gwałtowny trend wzrostu liczby zachorowań, jak i śmiertelności **[11]**.

1.4. Czynniki ryzyka

Z uwagi na wysoką zachorowalność na raka endometrium, czynniki wpływające na zwiększone ryzyko rozwoju są przedmiotem wielu badań i przeglądów systematycznych. W ich toku wyodrębniono trzy kategorie stanów sprzyjających karcynogenezie w obrębie endometrium. Pierwszą kategorię stanowią osobnicze odmienności anatomiczne i fizjologiczne, przede wszystkim nadwaga lub otyłość, bezdzietność, wczesna pierwsza miesiączka i późna menopauza, cykle bezowulacyjne i wiek powyżej 55 roku życia. Drugą kategorię stanowią choroby powiązane swoją patofizjologią z dużym ryzykiem wzbudzenia przemiany nowotworowej, takie jak zespół Lyncha, zespół Cowdena, oraz nowotwory jajnika

aktywnie wydzielające estrogeny. Trzecią, ostatnią grupę tworzą znane czynniki egzogenne uznane za wpływające na wzrost zachorowań na raka endometrium **[12]**. W tej grupie przede wszystkim zwraca się uwagę na przedłużoną ekspozycję na zewnątrzpochodne estrogeny np. terapię tamoksyfenem oraz stosowanie jednoskładnikowej hormonalnej terapii zastępczej **[13]**. Związek rozwoju raka endometrium z występowaniem nadciśnienia tętniczego i cukrzycy wydaje się być nadal przedmiotem wielu kontrowersji. Zaledwie jedno na cztery badania kohortowe wykazały istotny statystycznie wynik w kontekście zakładanej dodatniej korelacji pomiędzy nimi. **[14-17]**.

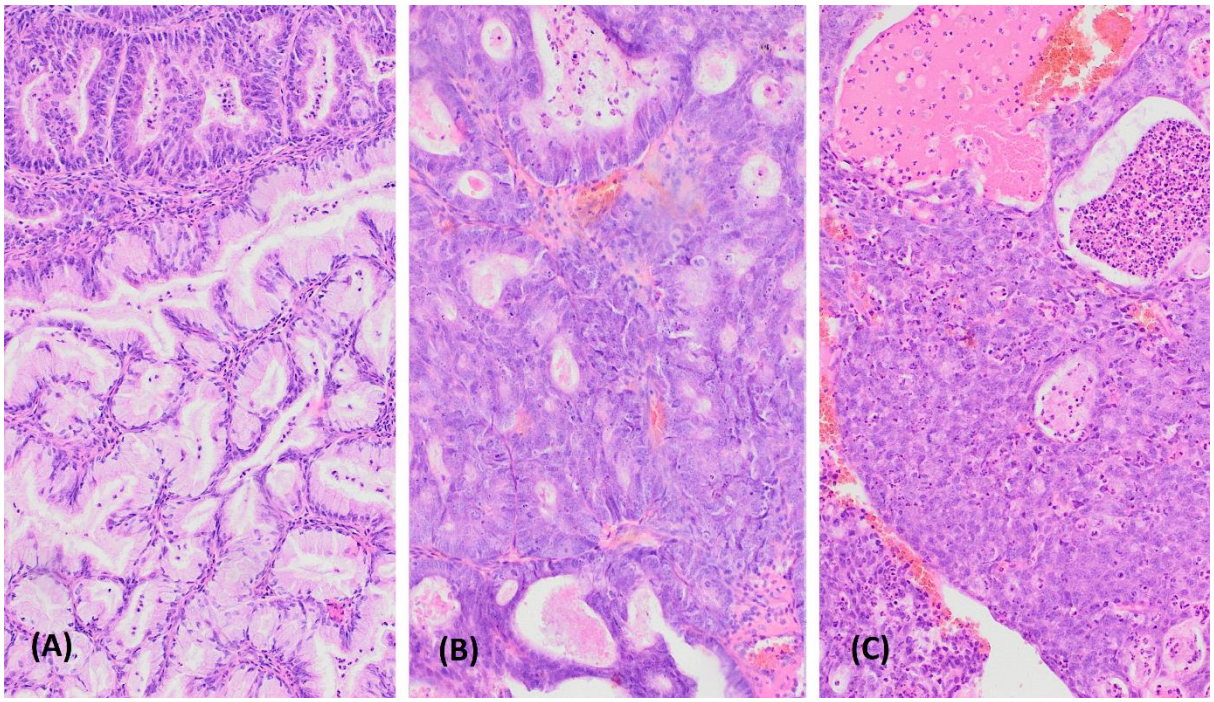
Niekwestionowaną rolę wśród faktorów inicjujących i promujących rozwój raka trzonu macicy pełnią estrogeny, a dokładnie ich przedłużająca się relatywna przewaga stężenia nad progestagenami, co skutkuje nadmierną sygnalizacją dla komórek warstwy podstawnej endometrium do proliferacji. Bez względu na źródło nadmiaru estrogenów, czy są one pochodzenia endogennego, produkowane przez nadmiernie rozwiniętą tkankę tłuszczową, czy ich nadmiar stanowi wynik braku równowagi hormonalnej wskutek cyklu miesięcznego bez owulacji, czy też są dostarczane do organizmu z zewnątrz w formie leku, ostateczny efekt jest taki sam – nadmierny rozrost błony śluzowej trzonu macicy **[12]**.

1.5. Patofizjologia, histopatologia i karcynogeneza raka trzonu macicy

Rak endometrioidny jest najczęstszym typem histologicznym raka endometrium, stanowiąc około 85% jego przypadków. Jest on związany i często poprzedzony stymulowanym nadmiarem estrogenów, specyficznymi zmianami genetycznymi czy też rozrostem gruczołów endometrium ze znaczącym zwiększeniem stosunku gruczołowo-podścieliskowego. Rozrost endometrium jest procesem stanowiącym pewne kontinuum pogłębiającej się złożoności architektonicznej gruczołów i pojawiania się narastającej atypii komórkowej nabłonka **[18]**. Większość przypadków rozrostu ogółem nie ulegnie transformacji do raka, jednakże biorąc pod uwagę tylko zaawansowaną formę rozrostu – rozrost z atypią, szacuje się że blisko 25% pacjentek, jeśli nie leczona, rozwinie na jego podłożu raka endometrium **[19]**. Ponadto, spośród pacjentek, u których na podstawie biopsji endometrium lub wyskrobin trzonu macicy zdiagnozowano rozrost endometrium z atypią i wkrótce po diagnozie wykonano histerektomię, aż u 45% w materiale pooperacyjnym odnaleziono ogniska raka endometrioidnego **[20]**.

Stopień dojrzałości histologicznej (ang. *grade*) raka endometrium określa się za pomocą skali dojrzałości histologicznej według Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa (ang. *International Federation of Gynecology and Obstetrics,* FIGO*)* wyróżniającej grade 1 (G 1 / wysoko dojrzały), grade 2 (G 2 / średnio dojrzały) i grade 3 (G 3

/ nisko dojrzały). Kryterium przyporządkowania raka do jednego ze stopni jest odsetek utkania litego, nie płaskonabłonkowego, odpowiednio </= 5% - grade 1; 6-50% - grade 2 i >50% grade 3 (***Rycina 4***). Obecność znacznej atypii cytologicznej w większości komórek raka (>50% komórek) pozwala niezależnie od odsetka komponenty litej podnieść stopień dojrzałości histologicznej FIGO o jeden punkt, a raki: surowiczy i jasnokomórkowy endometrium wyłączone są z jego określania, gdyż ich biologia oraz obraz mikroskopowy każdorazowo odpowiadają rakom nisko dojrzałym **[21]**.

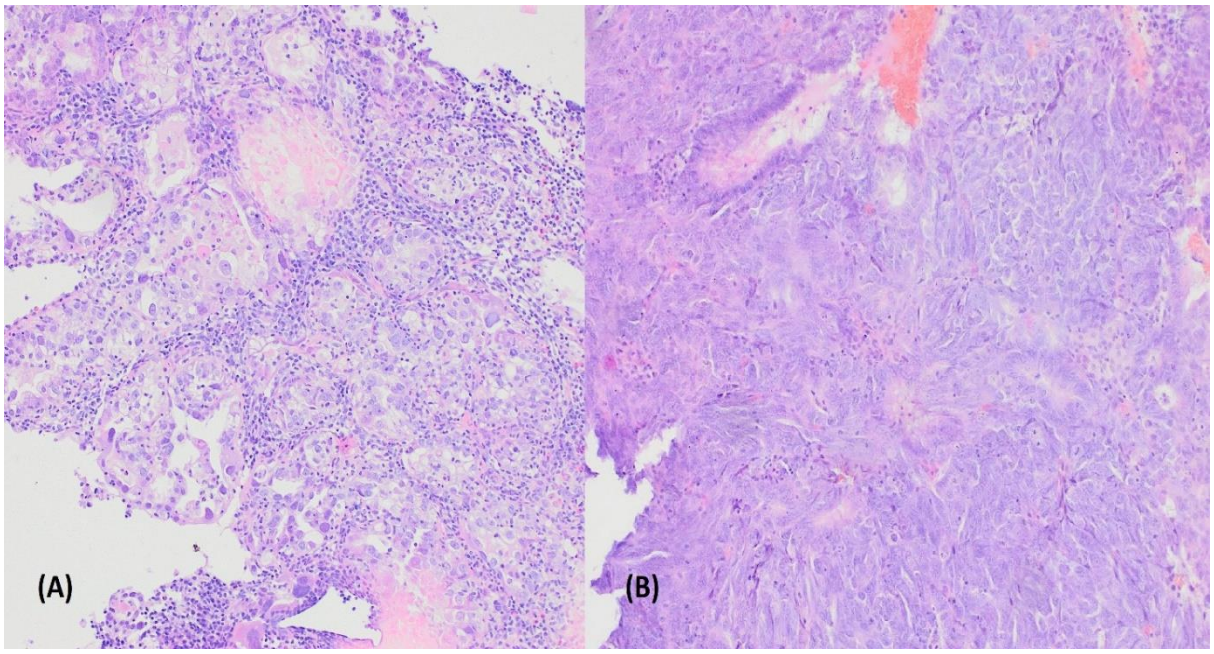


Rycina 4. *Rak endometrioidny o różnych stopniach dojrzałości histologicznej wg FIGO (skala dojrzałości histologicznej według Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa, ang. International Federation of Gynecology and Obstetrics). (A) rak endometrioidny wysoko dojrzały, grade 1/G1 – obecnie zalecane: o niskim stopniu złośliwości histologicznej /low-grade/ (powiększenie 100x). (B) rak endometrioidny średnio dojrzały, grade 2/G2 – obecnie zalecane: o niskim stopniu złośliwości histologicznej /low-grade/ (powiększenie 100x). (C) rak endometrioidny nisko dojrzały, grade 3/G3 – obecnie zalecane: o wysokim stopniu złośliwości histologicznej /high-grade/ (powiększenie 100x). (opracowanie własne).*

W roku 2019 Międzynarodowe Towarzystwo Patologów Ginekologicznych (ang. *International Society of Gynecological Pathologists*), a w roku 2020 również Grupa Klasyfikacyjna Guzów Światowej Organizacji Zdrowia przy Międzynarodowej Agencji Badań nad Nowotworami (ang. *World Health Organistaion /WHO/ Calssification of Tumours Group, International Agency for Research on Cancer*) rekomendowała uproszczenie klasyfikacji stopnia dojrzałości do systemu zaledwie dwustopniowego gdzie niski stopień złośliwości histologicznej (ang. *low-grade*) zawiera guzy wysoko (grade 1) i średnio dojrzałe (grade 2),

a wysoki stopień złośliwości histologicznej (ang. *high-grade*) stanowią guzy nisko dojrzałe (grade 3) **[22]**.

Współcześnie rozpoznanie raka endometrium stawiane jest na podstawie jego morfologii na poziomie mikroskopowym. Zgodnie z podziałem zaproponowanym przez Bokhmana, wyróżnia się dwa główne typy patogenetyczne. Typ I stanowią raki endometrioidne, zwykle o niskim lub pośrednim stopniu złośliwości histologicznej, związane z hyperestrogenizmem o dowolnej przyczynie, często o przebiegu indolentnym. Typ II to tzw. guzy nieendometrioidne, o wysokim stopniu złośliwości tak histologicznej, jak i klinicznej, niezwiązane bezpośrednio z nadmierną ekspozycją na estrogeny. Do tej grupy zaliczane są przede wszystkim raki jasnokomórkowe i surowicze trzonu macicy **[23] (*Rycina 5*)**.



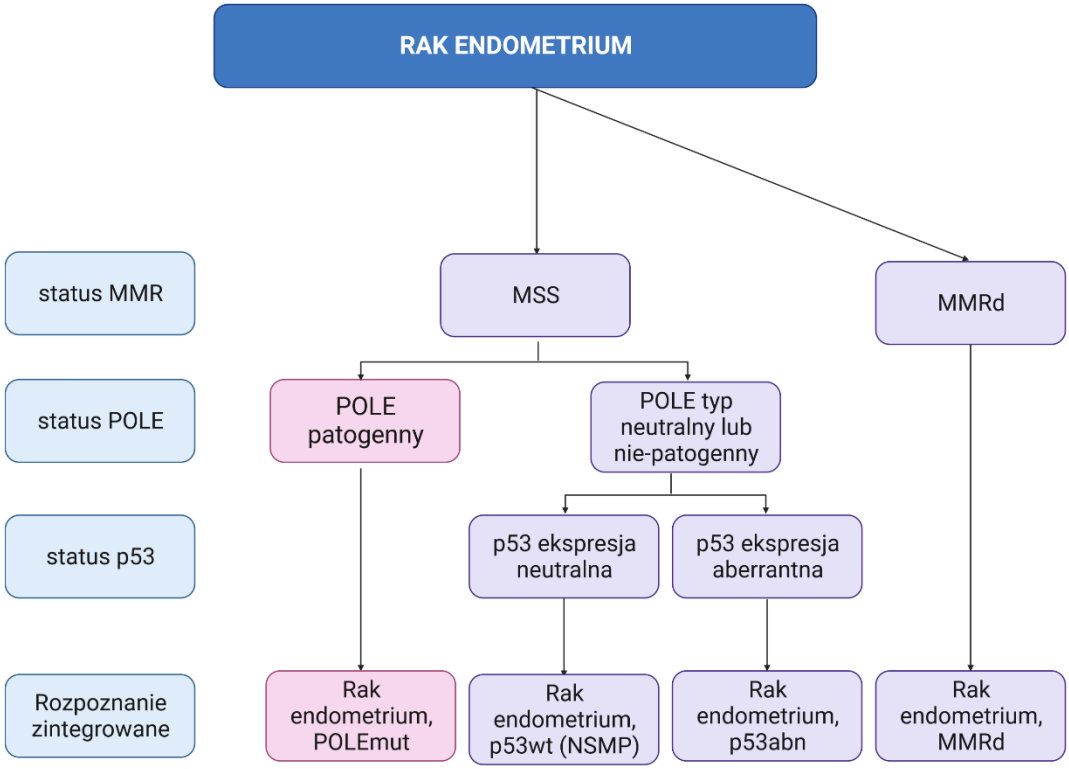
Rycina 5. *Przykłady raków endometrium określanych jako typ II wg Bokhmana. Typy histologiczne przedstawione na zdjęciach według Klasyfikacji Guzów Nowotworowych 5 edycji wg Światowej Organizacji Zdrowia, Guzy Żeńskich Narządów Rozrodczych (ang. WHO Classification of the Tumours Fifth edition, Female Genital Tumours.) (A) rak jasnokomórkowy trzonu macicy (ang. clear cell carcinoma of the uterine corpus) (powiększenie 100x). (B) rak surowiczy trzonu macicy (ang. serous carcinoma of the uterine corpus) (powiększenie 100x). Raki nieendometrioidne nie podlegają stopniowaniu dojrzałości histologicznej, wszystkie bowiem wykazują wysoki stopień agresywności i są związane ze złą prognozą nawet przy niskim stopniu zaawansowania klinicznego. (opracowanie własne).*

Pomimo początkowej jasności przekazu takiego podziału, jego dużej użyteczności i atrakcyjności do celów edukacyjnych i epidemiologicznych, w drugiej dekadzie XXI wieku zaczęto coraz częściej zaznaczać, że klasyfikacja Bokhmana nie pozwala na jasną i oczywistą stratyfikację guzów trzonu macicy. Postępy w dziedzinie biologii molekularnej i onkologii zwróciły uwagę na takie kliniczne, histopatologiczne, patofizjologiczne i molekularne cechy

guzów, które ostatecznie nie pozwalały na klasyfikację niektórych z nich do żadnego z typów Bokhmana **[24]**. Ponadto, o ile w przypadku większości raków o niskim stopniu złośliwości histologicznej, zgodność diagnozy histopatologicznej pomiędzy różnymi patomorfologami badającymi te same przypadki, była niemal stuprocentowa, to w przypadku części raków o wysokim stopniu złośliwości histologicznej, z nakładającymi się z obu typów Bokhmana, niejednoznacznie pozwalającymi się sklasyfikować cechami molekularnymi, rozbieżność opinii tej samej grupy patomorfologów, w zakresie stawianych rozpoznań była już istotna **[25]**.

W roku 2013, grupa badaczy skupiona wokół Sieci Badań nad Atlasem Genomu Raka (ang. *The Cancer Genome Atlas Research Network* - TCGA), stworzyła i opublikowała zintegrowaną charakterystykę genomową raka endometrium, w której wyodrębniła cztery różniące się prognostycznie odmienne molekularnie grupy: grupa 1 z mutacjami POLE charakteryzująca się dobrym rokowaniem, grupa 2 z deficytem naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. *Mismatch repair deficient, MMRd*) z rokowaniem pośrednim, grupa 3 wykazująca alteracje molekularne z małą ilością kopii również związana z pośrednim rokowaniem, oraz grupa 4 guzów z mutacją w genie *TP53* i alteracjami molekularnymi z dużą ilością kopii charakteryzująca się złym rokowaniem **[26]**

Kilka zespołów badawczych podjęło próby zaimplementowania grup molekularnych określonych przez TCGA do praktyki klinicznej, opracowując i proponując ograniczony panel oznaczeń immunohistochemicznych (IHC) wraz z oceną molekularną mutacji POLE, służący do zakwalifikowania danego przypadku raka endometrium do jednej z czterech grup. Próby te, w kontekście określania prognozy i przewidywania przebiegu klinicznego, okazały się użyteczne zwłaszcza w stosunku do raków endometrioidnych nisko zróżnicowanych, a potencjalnie również pomocne w pozostałych typach histologicznych raka endometrium **[27, 28]**. Jak się wydaje, obecnie najbardziej praktycznym modelem jest opracowany w roku 2015, a ostatecznie w roku 2018 zwalidowany na grupie 452 pacjentek chorujących na raka endometrioidnego alogrytm: Proaktywny Molekularny Klasyfikator Ryzyka Raka Endometrialnego (ang. *Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer, ProMisE)* **[29] (*Rycina 6*)**. Określenie charakterystyki molekularnej wraz z cechami mikroskopowymi wydaje się współcześnie najbardziej optymalnym podejściem do stratyfikacji pacjentek ze względu na prognozę, jednakże z uwagi na wysoki koszt takiej diagnostyki w zestawieniu z wysoką i stale rosnącą częstością zachorowań, powszechne, zaawansowane, multidyscyplinarne podejście do diagnostyki raka trzonu macicy wydaje się być ciągle trudne do osiągnięcia w codziennej praktyce klinicznej.



Rycina 6. *Algorytm diagnostyczny zintegrowanego, histopatologiczno-molekularnego rozpoznania raka endometrium. Zgodnie z założeniami Proaktywnego Molekularnego Klasyfikatora Ryzyka Raka Endometrioidnego ProMisE, (ang. Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer)oraz Sieci Badań nad Atlasem Genomu Raka (ang. The Cancer Genome Atlas Research Network - TCGA), algorytm winien być stosowany jako integralna część procesu diagnostycznego każdego przypadku raka endometrium, niezależnie od jego typu histologicznego, włączając mięsakoraki (ang. carcinosarcomas). MMR – naprawa błędnie sparowanych zasad (ang. Mismatch Repair), MSS – stabilność mikrosatelitarna (ang. Microsatellite Stable), MMRd – deficyt systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. Mismatch Repair deficient), NSMP – bez specyficznego profilu molekularnego (ang. no specific molecular profile) (opracowanie własne).*

1.6. Hormon anty-Müllerowski i jego receptory

1.6.1. Rola fizjologiczna hormonu anty-Müllerowskiego

Hormon anty-Müllerowski (ang. *Anti-Müllerian Hormone,* AMH), znany również pod nazwą Müllerowskiej substancji hamującej (ang. *Müllerian Inhibiting Substance* MIS) został opisany po raz pierwszy przez Alfreda Josta w latach 50-tych ubiegłego wieku. Początkowo badania prowadzone na modelu zwierzęcym (myszy) wykazały, że począwszy od końca siódmego tygodnia ciąży, komórki Sertolego u zarodków płci męskiej, produkują znaczące ilości AMH, co powoduje regresję przewodów Müllera, a pozostające pod wpływem produkowanego przez komórki Leydiga testosteronu przewody Wolffa zostają zachowane **[30]**. Kształtowanie męskich narządów płciowych zewnętrznych jest promowane przekształceniem testosteronu w dihydrotestosteron (DHT). U płci żeńskiej natomiast, gdzie to przewody Müllerowskie muszą zostać zachowane dla prawidłowego rozwoju układu rozrodczego,

sekrecja AMH przez komórki warstwy ziarnistej jajnika – pre-antralne i małe antralne pęcherzyki jajnikowe (<8mm) rozpoczyna się około 36 tygodnia ciąży. Najwyższe stężenia AMH obserwuje się u kobiet około 25 roku życia natomiast wraz z końcem rezerwy jajnikowej poziom AMH obniża do wartości bliskich zeru **[31]**.

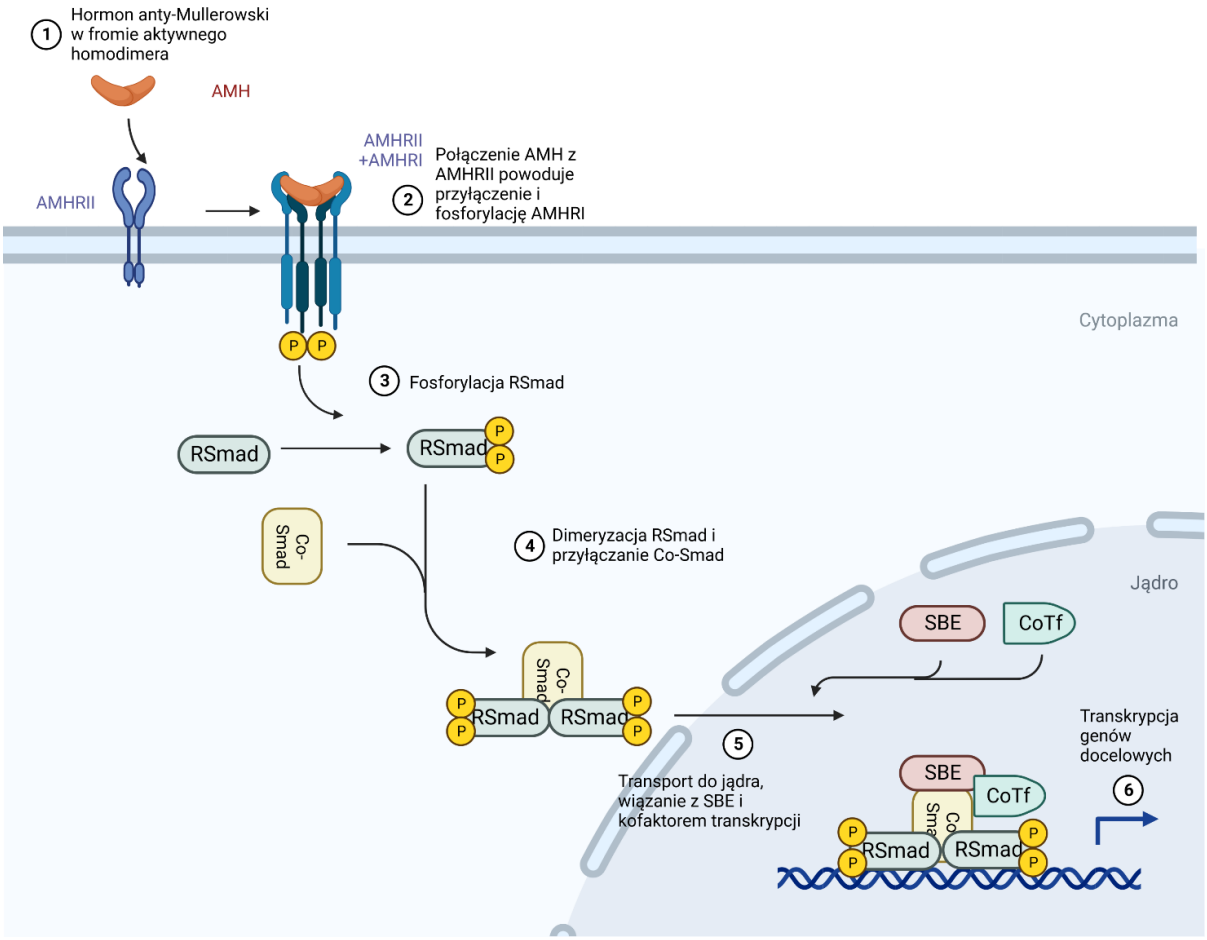
1.6.2. Struktura hormonu anty-Müllerowskiego

Hormon anty-Müllerowski należy do nadrodziny transformujących czynników wzrostu TGF-β. Chemicznie, cząsteczka AMH jest glikoproteiną o masie 140 kDa. U człowieka, gen kodujący AMH złożony z 275 par zasad podzielonych na 5 exonów, znajduje się na ramieniu krótkim chromosomu 19 (19p13.3), a jego bezpośrednim produktem jest 560-cio aminokwasowy prekursor – proAMH. Zanim nastąpi glikozylacja, usuwany jest fragment złożony z 24 aminokwasów. Tak powstała, glikozylowana cząsteczka proAMH ma masę zaledwie 70 kDa i aby uzyskać swoją ostateczną konformację musi zostać połączona mostkami siarczkowymi z drugą, identyczną cząsteczką. Domena C-końcowa o masie 25 kDa, zwana regionem dojrzałym (ang. *AMHC/mature region*), odpowiedzialna za aktywność biologiczną hormonu i wiązanie się z właściwym sobie receptorem aby czynnie pełnić swoją funkcję, w przeciwieństwie do innych członków nadrodziny TGF-β, potrzebuje domeny N-końcowejo masie 115 kDa, zwanej proregionem (ang. *MHN/ pro-region*) **[32, 33]**.

1.6.3. Szlaki sygnalizacyjne hormonu anty-Müllerowskiego

Tak jak pozostali członkowie rodziny TGF-β, szlaki sygnalizacyjne hormonu anty-Müllerowskiego rozpoczynają się od połączenia z receptorami o aktywności kinaz serynowo-treoninowych **(*Rycina 7*)**. Receptorem pierwszorzędowym jest typ II (ang. *Anti-Müllerian Hormone Receptor type II*, AMHR-II), który po połączeniu z ligandem fosforyluje receptor typu I (ang. *Anti-Müllerian Hormone Receptor type I,* AMHR-I), by ten z kolei spowodował fosforylację pierwszego efektora cytoplazmatycznego, tzw. Smad receptorowego (R-Smad). W takiej aktywnej formie, kompleks wchodzi w interakcję z Smad4, efektorem cytoplazmatycznym zwanym też Smad wspólnym (ang. *Common Smad*). Następnym krokiem na szlaku sygnalizacji jest transport powstałego kompleksu do jądra komórkowego, gdzie wiąże się on z elementem wiążącym Smad (ang. *Smad Binding Element,* SBE), będącym częścią promotorów genów docelowych lub tzw. genów raportowych (ang. *reporter genes*) **[34]**. Do tej pory odkryto zaledwie jeden typ receptora II dla rodziny TGF-β, wiążącego się wybiórczo z AMH, którym jest AMHR-II, ale aż trzy receptory typu I: Alk2, Alk3 i Alk6 biorące udział w AMH-zależnym szlaku sygnalizacji. Ponadto, o ile jedynym ligandem dla AMHR-II jest

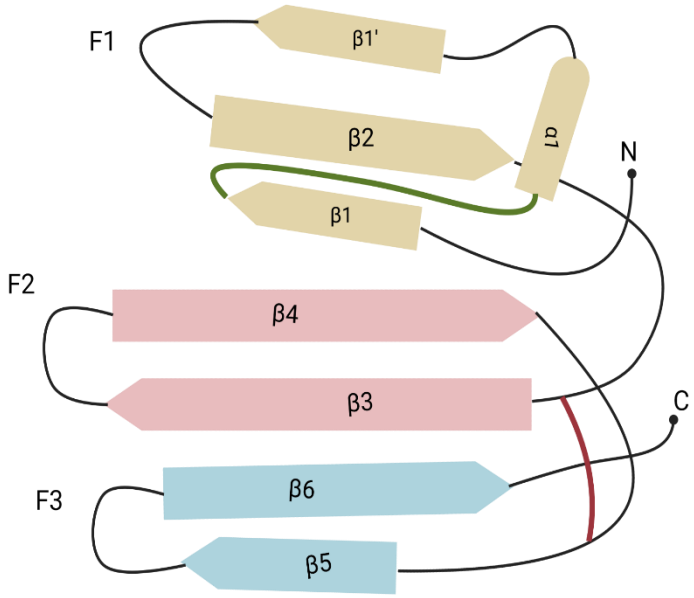
właśnie AMH, to wspomniane receptory typu I nie są już tak wybiórcze i biorą udział również w sygnalizacji mediowanej przez białka morfogenetyczne kości (ang. *bone mophogenic proteins,* BMPs) **[35]**.



Rycina 7. *Szlak sygnalizacyjny hormonu anty-Müllerowskiego. AMH – hormon anty-Müllerowski, AMHRI – receptor dla hormonu anty-Müllerowskiego typu I, AMHRII – receptor dla hormonu anty-Müllerowskiego typu II, RSmad – receptorowy efektor cytoplazmatyczny, Co-Smad – efektor cytomplazmatyczny wspólny, SBE – element wiążący Smad, CoTf – kofaktor transktypcyjny, P – reszta fosforanowa. (opracowanie własne).*

1.6.4. Struktura i fizjologiczna ekspresja AMHR-II

Gen kodujący receptor typu II dla hormonu anty-Müllerowskiego (AMHR-II) zlokalizowany jest na chromosomie 12q13.13. To zawierające 573 aminokwasy białko, strukturalnie złożone jest z N-końcowej domeny pozakomórkowej, kodowanej przez pierwsze trzy eksony, pojedynczej domeny transbłonowej, kodowanej przez kolejny, jeden ekson oraz C-końcowej domeny wewnątrzkomórkowej o aktywności kinazy serynowo-treoninowej, kodowanej przez ostatnie siedem eksonów. Łącznie, gen AMHRII zawiera zatem 11 eksonów obejmujących ponad 8kb sekwencji nukleotydowej, zaś jego produkt zaklasyfikować można, dzięki charakterystycznej konformacji, do białek błonowych typu I **[36] (*Rycina 8*)**.



Rycina 8. *Uproszczona struktura przestrzenna receptora dla hormonu anty-Müllerowskiego typu II (AMHRII). Budowa receptorów białkowych tradycyjnie porównywana jest do dłoni. Tak, jak inne receptory typu II z rodziny TGF-β, białko AMHRII posiada trzy pętle tworzące palce (ang. finger loops) oznaczone jako F1, F2 i F3. Region pętli palca F1 zaznaczono kolorem zielonym, mostki dwusiarczkowe nadające i utrzymujące domenie kształt tzw. wklęsłej dłoni (ang. concave palm) zaznaczono kolorem czerwonym. (opracowanie własne).*

Fizjologicznie ekspresja AMHRII występuje w przewodach Müllera oraz gonadach obu płci. W badaniach prowadzonych w pierwszej połowie lat 90-tych XX wieku, Baarends oraz niezależnie diClemente wykazali za pomocą hybrydyzacji *in situ*, obecność mRNA AMHR-II w komórkach mezenchymalnych otaczających nabłonek przewodów Müllera **[37-39]**. Ponadto, Allard w roku 2000 wskazał na zmienny ilościowo poziom jego ekspresji, który tworzy specyficzny gradient. Najsilniejsza ekspresja obserwowana jest w części dogłowowej przewodów Müllera, jedynie śladowa w ich części doogonowej, a w końcu u płci męskiej zupełnie zanika razem z ostateczną regresją przewodów Müllera **[40]**. W jajniku, AMHRII

obecne jest na komórkach ziarnistych pęcherzyków preantralnych oraz antralnych. Ekspresja AMHRII w jądrze (np. na komórkach Leydiga) wykazuje zmienność gatunkową zanikając po okresie pokwitania (np. u królika) lub utrzymując się przez całe życie (np. u szczura i człowieka) **[40, 41]**.

1.6.5. Rola hormonu anty-Müllerowskiego i jego receptorów w chorobach nowotworowych

Ze względu na fizjologiczną rolę AMH w różnicowaniu płci, w aspekcie klinicznym, rutynowo wykorzystuje się oznaczenia stężenia AMH w surowicy krwi w przypadkach obojnactwa prawdziwego i u chłopców bez palpacyjnie wyczuwalnych jąder, celem udowodnienia ich obecności **[42]**. Zaś u kobiet, AMH sosowany jest jako marker oceny rezerwy jajnikowej i wskaźnik przewidywanej odpowiedzi na wprowadzenie zygoty do jamy macicy, w protokołach zapłodnienia *in vitro* **[43-45]**. Równocześnie ze wzrostem zainteresowania wykorzystania tego parametru w tzw. medycynie reprodukcyjnej i endokrynologii, zaczęto zastanawiać się nad potencjalnym wykorzystaniem AMH i ekspresji jego receptorów w onkologii.

Oczywistym, biorąc pod uwagę typ komórek wydzielających AMH u obu płci, było skierowanie uwagi na niektóre guzy podścieliskowe ze sznurów płciowych (ang. *sex-cord stromal tumours)* oraz ziarniszczaki dorosłych (ang. *adult granulosa-cell tumours*). W przypadkach obu grup guzów oznaczenie poziomu stężenia AMH w surowicy stanowi istotny wskaźnik w diagnostyce i monitorowaniu efektów leczenia tych nowotworów. **[46-49]**. Ponadto, zwiększoną ekspresję AMHRII wykazano m.in. w czerniaku gałki ocznej **[50]**, raku stercza **[51]**, raku piersi **[51, 52]**, raku szyjki macicy **[53]**, raku jajnika **[54]**, a także w raku endometrium **[55-57]**.

W błonie śluzowej trzonu macicy, zarówno w fazie proliferacji, jak i sekrecji u kobiet w wieku rozrodczym, a także w endometrium atroficznym – pomenopauzalnym obserwowany jest zauważalny, choć niski poziom ekspresji receptora AMHRII, który to wzrasta w rozroście i raku endometrium **[55-57]**. Dotychczas, wysiłki naukowców skupione były na potencjalnym wykorzystaniu ekspresji AMHRII w terapii raka jajnika. W roku 2018, Deshayes z zespołem proponowali znakowane izotopem promieniotwórczym przeciwciała przeciwko AMHRII jako alternatywną terapię adjuwantową po operacji cytoredukcyjnej ze skutkiem zadowalającym u pacjentek z drobnoogniskowym zajęciem otrzewnej. Ponadto, w swojej pracy dowodzili, że zastosowanie odpowiednio dobranego izotopu gwarantuje efekt zarówno terapeutyczny, jak i diagnostyczny dzięki metodzie tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (ang. *single*

photon emission computed tomography, SPECT) pozwalającej na uwidocznienie sygnału wysyłanego przez znakowane tymże izotopem przeciwciało połączone z docelowym receptorem **[58]**.

Te badania nie tylko dają nadzieję na „skrojoną na miarę" terapię pacjentkom z rakiem jajnika, ale w korelacji z udowodnioną zwiększoną ekspresją AMHRII również w innych nowotworach, w tym przede wszystkim w raku endometrium, otwierają pole do wzmożenia wysiłków celem poszukiwania nowych rozwiązań terapeutyczno-diagnostycznych.

Analizując obecnie znane fakty, rodzi się również pytanie w jaki sposób wyselekcjonować, już na samym początku procesu diagnostycznego, na etapie diagnostyki patomorfologicznej, grupy pacjentek z rakiem endometrium, które z takiej potencjalnej terapii odniosłyby największą korzyść od tych pacjentek, u których korzyść byłaby znikoma lub nie byłoby jej wcale. Pytanie to na razie pozostaje otwarte **[59, 60]**.

1.7. Niestabilność mikrosatelitarna

1.7.1. Naprawa błędnie sparowanych zasad i niestabilność mikrosatelitarna

Integralność genomu komórki utrzymywana jest dzięki procesowi naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. *mismatch repair,* MMR). Jest to proces naprawy błędów powstałych w kwasie deoksyrybonukleinowym (ang. d*eoxyribonucleic acid, DNA*) w wyniku nieprawidłowego sparowania zasad azotowych podczas replikacji, czyli tworzenia kopii matrycowego DNA, gdzie każda zasada azotowa w jednej nitce DNA musi stworzyć komplementarną parę z odpowiednią zasadą, na odpowiednim miejscu drugiego łańcucha, aby utworzyć finalnie poprawny dwuniciowy łańcuch DNA **[61]**. W przypadku nieprawidłowego sparowania par przez enzymy syntetyzujące kopię łańcucha matrycowego, MMR wykrywa błędy i wycina nieprawidłowe zasady wstawiając na ich miejsce właściwe. Pozostawienie nieprawidłowych sparowań skutkuje zmianami długości DNA mikrosatelitarnego czyli niestabilności mikrosatelitarnej (ang. *microsatellite instability,* MSI) i co za tym idzie, podatności takiego łańcucha na rozerwanie i wystąpienie wielu kolejnych, znacznie poważniejszych błędów, które kumulując się mogą prowadzić do inicjacji karcynogenezy, taka sytuacja nosi nazwę fenotypu mutatorowego (ang. *mutator phenotype*) **[62]**.

1.7.2. Geny odpowiedzialne za MMR i ich nieprawidłowości

Nieprawidłowe warianty genów uczestniczących w procesie naprawy niesparowanych zasad najczęściej dotyczą genów *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* oraz *PMS2*. Mutacje te mogą być

nabyte, tzw. sporadyczne (ang. *aquired* a.k.a. *sporadic*) lub wrodzone, tzw. linii zarodkowej (ang. *germline*) **[63, 64]**.

1.7.2.1. MLH1

Gen *MLH1* (MutL homolog 1) zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 3 (3p22.2) i zawiera 24 eksony. Pierwotnie odkryty u bakterii *Escherichia coli*, koduje białko MLH1 tworzące w procesie MMR heterodimer z białkami PMS2 (najczęściej), PMS3 lub MLH3 (rzadziej), który to tworząc kompleks z innym heterodimerem – MSH2-MSH6 umożliwia inicjację procesu naprawy błędów sparowania zasad **[65, 66]**. W zdecydowanej mniejszości nowotworów sporadycznych ze stwierdzoną niestabilnością mikrosatelitarną nieprawidłowość genu *MLH1* ma formę mutacji, najczęstszą bowiem formą alteracji są tu zmiany epigenetyczne, które redukują lub całkowicie wyciszają ekspresję *MLH1* **[67]**. Wśród najczęstszych, a zarazem najistotniejszych zmian epigenetycznych wymienia się metylację regionu promotora genu *MLH1* oraz nadekspresję regulatorowego mikroRNA – *miR-155* pełniącego fizjologicznie rolę wyciszającą niektóre geny podlegające silnej ekspresji. Potwierdzeniem dla takiego zjawiska jest odwrotna proporcjonalna korelacja pomiędzy wykrywalnym poziomem ekspresji białka MLH1 oraz MSH2 a poziomem ekspresji *miR-155* **[68]**.

O niezwykle istotnej roli białka MLH1 w utrzymaniu stabilności genomowej świadczy również jego udział w mejotycznym procesie *crossing-over*, gdy heterodimer MLH1-MLH3 jest niezbędny do utworzenia chiazm między siostrzanymi chromosomami i zakończenia drugiej metafazy. Podczas spermatogenezy skutkuje to przedwczesnym oddzielaniem się chromosomów od siebie, zatrzymaniem w pierwszym podziale mejotycznym a w konsekwencji wysokim ryzykiem uszkodzenia plemników i niepłodnością **[69-71]**.

1.7.2.2. MSH2

Gen *MSH2* (MutS homolog 2) zlokalizowany jest na chromosomie 2p21-p16.3 i zawiera 46 eksony. Produkt białkowy o nazwie tożsamej z nazwą genu, ma możliwości stworzenia aktywnego homomultimeru, jednak zjawiskiem częstszym jest łącznie się z białkiem MSH6 w heterodimeryczny kompleks MutSα, a łącząc się z MSH3 – MutSβ **[72]**. Oprócz niezaprzeczalnie istotnej roli w naprawie błędnie sparowanych zasad, MSH2 bierze również udział w innych, niezwiązanych bezpośrednio z MMR procesach naprawy przez wycięcie nukleotydów (ang. *nucleotide excision repair,* NER), naprawy przez wycięcie zasady (ang. *base excision repair,* BER) oraz w procesie naprawy przez homologiczną rekombinację

(ang. *homologous recombination repair,* HRR) **[73, 74]**. Zatem niedostateczna aktywność MSH2 lub jej brak wpłynie na zmniejszenie lub całkowite zniesienie aktywności wyżej wspomnianych procesów jednocześnie. Nieprawidłowość funkcji genu *MSH2* ma zwykle formę mutacji w nowotworach w przebiegu zespołów wrodzonych, a dodatkowo u niewielkiego odsetka pacjentów w wyniku delecji genu *EPCAM* leżącego na chromosomie 2 tuż przed *MSH2*, usunięty może zostać, niejako „przypadkowo" pierwszy ekson genu *MSH2* będący jego regionem promotorowym. Natomiast w nowotworach sporadycznych, obserwowane są zmiany epigenetyczne z metylacją regionu promotora i nadekspresją *miR-155* oraz *miR-21***[68, 75, 76]**.

1.7.2.3. MSH6

Gen *MSH6* (MutS homolog 6 a.k.a G/T binding protein /GTBP/ a.k.a. p160) zlokalizowany jest na chromosomie 2p16.3 i zawiera 19 eksonów. MSH6 jest niewielkim białkiem (1360 aa), o aktywności wewnętrznej adenozyno 5'-trifosfatazy (ang. a*denosine 5'-triphosphatase,* ATPase/ATP-aza), które aktywne jest jedynie wtedy, gdy wraz z opisanym wcześniej białkiem MSH2, stworzy heterodimer. Pomimo ścisłego związku z MSH2, aberrantna funkcja genu dla *MSH6* jest odpowiedzialna za fenotyp mutatorowy o zaledwie średniej lub małej mocy sprawczej, podczas gdy zmieniony w dowolny sposób, przez mutację czy też epigentycznie, *MSH2* odpowiedzialny jest za powstanie silnego fenotypu mutatorowego **[77, 78]**.

1.7.2.4. PMS2

Gen *PMS2* (PMS1 homolog 2) zlokalizowany jest na chromosomie 7p22.1 i zawiera 18 eksonów. Produktem genu jest białko PMS2 o aktywności enzymu – endonukleazy latentnej, czyli takiej, która aktywna jest jedynie w formie związanej. W przypadku PMS2 konieczne jest jego związanie z bardzo stałym w swojej konformacji motywem wiążącym metal (ang. *metal-binding motif*) na homologach MutL: PMS2 i MLH1 – MutLα oraz PMS2 i MLH3 – MutLγ. Aktywność PMS2 jako endonukleazy sprowadza się do podziałów DNA w taki sposób, że kompleks rozpoznaje niepoprawną wskutek błędnego sparowania sekwencję, a następnie PMS2 przecina obie nici DNA w okolicach tej sekwencji, ale tylko jedna nić – ta z „błędną" zasadą, przecinana jest na całej długości, druga natomiast przecięta zostaje tylko częściowo lub wręcz pozostaje nieuszkodzona. Cały ten proces określa się mianem „niktowania" (ang. *nicking*), czyli tworzenia tzw. podziałów **[79]**. Dominującymi zmianami

genu skutkującymi nieprawidłową jego funkcją, są mutacje, zazwyczaj w regionie promotora **[80]**.

1.7.3. Proces wykrywania i naprawy błędnie sparowanych zasad

Punktem wyjścia do badań nad procesem wykrywania i naprawy błędnie sparowanych zasad u człowieka, jest szlak MMR u bakterii *Escherichia coli*, który szeroko i intensywnie badany pozwolił na scharakteryzowanie go zarówno pod względem biochemicznym, jak i genetycznym **[81]**. W toku badań dowiedziono że proces MMR jest niezwykle stały i wykazuje następujące, bardzo istotne podobieństwa filogenetyczne pomiędzy Prokaryota i Eukariota:

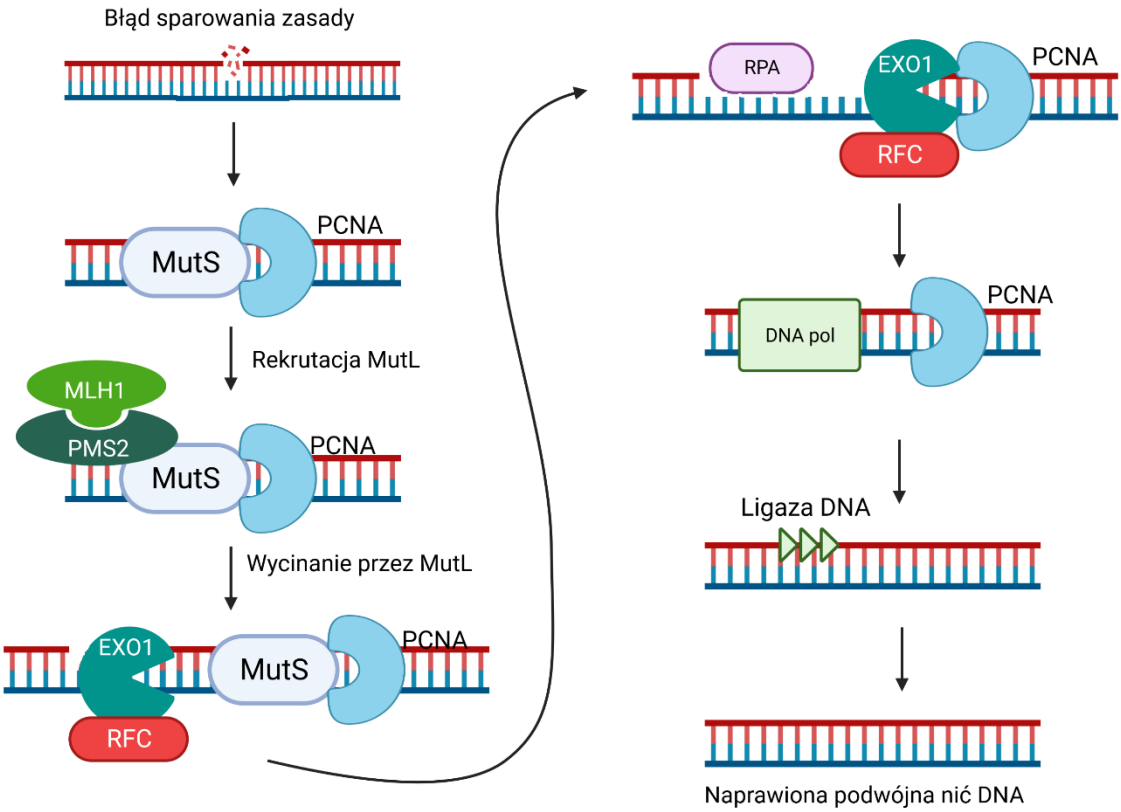
- specyficzność kierunkowa wobec nici DNA z podziałem (ang. *nick-directed strand specificity*) - naprawa jest ograniczona tylko do jednej nici, nowo syntetyzowanej, bez przerywania ciągłości nici matrycowej;
- dwukierunkowość procesu – naprawa może toczyć się w dwóch, przeciwnych kierunkach: 5'- 3' i 3'- 5' a punktem rozpoczęcia jest punkt podziału nici (ang. *nick*);
- specyficzność substratu – naprawa służy przywróceniu komplementarności nici względem siebie a może dotyczyć zarówno błędu prostego, nie wymuszonego dodatkowymi zdarzeniami podczas syntezy nowej nici, jak i błędu sparowania będącego skutkiem małej insercji lub małej delecji **[81-83]**.

Proces MMR rozpoczynają heterodimery MutSα i MutSβ, składające się odpowiednio z MSH2 i MSH6 oraz MSH2 i MSH3, posiadające aktywność ATP-azy. MutSα rozpoznaje proste błędy sparowania pojedynczej pary zasad oraz bardzo krótkie sekwencje błędów małej insercji lub delecji, podczas gdy MutSβ odpowiedzialny jest za rozpoznawanie nieco dłuższych sekwencji błędów małej insercji lub delecji. Heterodimery MutL powstają przez połączenie MLH1 z PMS2 tworząc w ten sposób MutLα; MLH1 z PMS1 tworzy MutLβ, i wreszcie MLH1 z MLH3 tworzy MutLγ. O ile rola MutLα oraz MutLγ jest znana i opisana dość dobrze, pierwszy pełni istotną funkcję w procesie MMR, zaś drugi uczestniczy w mejozie, to rola biologiczna MutLβ pozostaje zagadką **[81]**.

MutLα jest heterodimerem, o jak się wydaje sporych możliwościach. Posiadając aktywność ATP-azy wewnętrznej reguluje terminację wycinania zasady rozpoznanej jako błędnej, tak by system białek w MMR zaangażowanych niejako „siłą rozpędu" nie spowodował wycięcia również zasady matrycowej lub prawidłowo sparowanych zasad sąsiednich **[83]**. Ciekawym jest, że oprócz roli regulatora, ten dimer sam posiada aktywność endonukleazy,

a dokładnie endonukleazy PCNA/RFC-zależnej (ang. *proliferating cell nuclear antigen/ replication factor C*), która jest jednym z kluczowych enzymów MMR zależnego od podziału nici, 3'-ukierunkowanego, w który to proces włączona zostaje Egzonukleaza 1 – EXO1. PCNA uważane jest za czynnik inicjujący MMR i resyntetyzujący DNA. Wchodząc w interakcję z MSH6 i MSH3 wspomagają tworzone przez nie kompleksy MutS w lokalizacji błędu sparowania. EXO1 działa jako dwukierunkowa egzonukleaza, tzn. w kierunkach, 3'-5' i 5'-3'. Jednakże, o ile z łatwością rozpoczyna swoje działanie w kierunku 5' jedynie przy wspomagającej obecności MutS i RPA (ang. *replication protein A*), to aby działać w kierunku przeciwnym, 3', EXO1 potrzebuje endonukleazy MutLα **[84-86]**.

Innymi katalizatorami dla procesu naprawy błędnie sparowanych zasad są, wspomniane wyżej, RPA i RFC, a także HMGB1 (ang. *high mobility group box 1 protein*) i DNA pol δ (ang. *DNA polymerase delta /δ/*). RPA zaangażowane jest w proces MMR na wszystkich jego etapach, bowiem wiąże przerwany heterodupleks DNA zanim MutS rozpoczną wycinanie zasady, ochrania wytworzony w ten sposób pozbawiony zasady region ssDNA (ang. *single stranded DNA*) i ułatwia resyntezę prawidłowej zasady. Aktywność RPA regulowana jest za pomocą jego fosforylacji i defosforylacji. Ufosforylowany RPA dużo efektywniej stymuluje resyntezę DNA niż forma defosforylowana, ta zaś dużo efektywniej stymuluje wycinanie błędnie sparowanej zasady niż forma ufosforylowana **[87, 88]**. HMGB1 jest białkiem wiążącym się z błędnie sparowaną zasadą, które rozwija helisę DNA w miejscu docelowym i poprzez niewielkie zagięcie podwójnej nici eksponuje je dla procesu MMR **[89]**. *In vitro* HMGB1 wchodzi w interakcję z MSH2 i MSH6, a także może pełnić rolę substytutu RPA w przypadku braku tego ostatniego. Opisane zależności wydają się tłumaczyć, dlaczego dysfunkcja lub całkowity brak MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 stanowią poważne zaburzenie procesu wykrywania i naprawy błędnie sparowanych zasad, podczas gdy zaburzenia w funkcjonowaniu RPA, RFC, HMGB1, EXO1 czy PCNA stanowią problem, który można naprawić przez prostą substytucję funkcji jednego z białek innym **[88-90]** (***Rycina 9***).



Rycina 9. *Schemat prawidłowego rozpoznawania i naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. mismatch repair, MMR). Proces w uproszczeniu podzielić można na trzy fazy. Faza pierwsza, rozpoznania – PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen) i kompleks MutS złożony z MSH2 i MSH6 odnajduje błąd i rekrutuje kompleks MutL złożony z MLH1 i PMS2. Faza druga, wycięcia – MutL nacina nić syntezowaną, w procesie biorą udział również egzo- i endonukleazy EXO1 (ang. exonuclease 1) i RPA (ang. replication protein A) przy udziale katalizatora RFC (ang. replication factor C). Faza trzecia, resyntezy – miejsce uprzedniego wycięcia uzupełniane jest przy udziale polimerazy i ligazy, na matrycy nici macierzystej, która nie ulega przecięciu podczas całego procesu. (opracowanie własne).*

1.7.4. Molekularne podłoże niestabilności mikrosatelitarnej i jej rola w karcynogenezie

Mikrosatelity czyli tzw. powtórzenia prostej sekwencji (ang. *simple sequence repeats,* SSRs), to złożone z 1-6 par zasad powtarzające się, ulokowane obok siebie, jedna za drugą fragmenty DNA. Stanowią one około 3% genomu ludzkiego i są podstawą do określenia „genetycznego odcisku palca", bowiem są zmienne osobniczo, indywidualne dla danego osobnika, a co więcej każdy osobnik posiada mikrosatelity określonej dla siebie długości **[91]**. Mikrosatelity związane są najczęściej z regionami niekodującymi: intronami i sekwencjami międzygenowymi. Ekspansja mikrosatelit pod postacią zmiany dystrybucji i częstości powtórzeń jest zwykle skutkiem i odzwierciedleniem konkretnej mutacji lub grupy mutacji, stąd chętnie wykorzystuje się je jako markery genetyczne. Fizjologicznie w regionach kodujących mechanizmy zapobiegające przesunięciu ramki odczytu, mocno ograniczają

możliwość wydłużania sekwencji trójnukleotydowych, z uwagi na możliwość modyfikacji funkcji kodowanego białka. W przypadku niedostatecznie sprawnego procesu naprawy błędnie sparowanych zasad, spowodowanego przez upośledzoną funkcję jednego lub kilku białek kluczowych (MLH1, MSH2, MSH6 lub PMS2), błędy w replikacji kumulują się w postaci licznych nowych mikrosatelit zarówno w regionach kodujących, jak i niekodujących **[92]**. Ponieważ do powstania błędu dochodzi w procesie replikacji DNA, w fazie „S" – syntezy cyklu komórkowego, tymże błędem obarczona jest jedynie nić nowosyntetyzowana, a nić matrycowa pozostaje niezmieniona. Polimeraza DNA ślizga się, wskutek błędu sparowania i tworzy pętlę insercyjno-delecyjną, a gdy MMR nie funkcjonuje prawidłowo i nie jest w stanie naprawić powstałego błędu nici potomnej, dochodzi na niej do trwałego przesunięcia ramki odczytu, a w efekcie kodowane na takiej matrycy białko ma nieprawidłowy skład aminokwasowy i jest niefunkcjonalne lub też nie powstaje wcale. Takie zjawisko nazywane jest niestabilnością mikrosatelitarną **[93]**.

Niestabilność mikrosatelitarna jest procesem unikalnym względem polimorfizmów DNA, ponieważ błędy replikacji mają charakter ilościowy, nie jakościowy, co wprost oznacza, że nieprawidłowe sekwencje różnią się nie kolejnością zasad w sekwencji a długością powtórzeń określonej, stałej sekwencji. Częstość mutacji powstających na podłożu MSI zależne jest od *locus*, w którym błędy powtórzeń występują, a dodatkowo, im dłuższa jest nieprawidłowa sekwencja mikrosatelitarna, tym prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji i ich częstość jest wyższa **[92]**.

Podstawą do określenia szczegółowego statusu niestabilności mikrosatelitarnej była początkowo metoda reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction,* PCR), gdzie porównywano *loci* mikrosatelit DNA guza z DNA referencyjnym, pochodzącym z tkanki zdrowej. Amerykański Narodowy Instytut Nowotworów (ang. *National Cancer Institue,* NCI) zarekomendował sprawdzanie tą metodą dwóch *loci* powtórzeń pojedynczego nukleotydu: BAT-25 i BAT-26 oraz trzech *loci* powtórzeń wielonukleotydowych: D2S123, D5346 i D17S250. Niestabilność w tylko jednym *locus* uznano za status niskiej niestabilności mikrosatelitarnej – MSI-Low /MSI-L/, w dwóch lub więcej, za wysoką niestabilność mikrosatelitarną - MSI-High /MSI-H/, zaś brak jakiejkolwiek aberracji w wymienionych *loci* określono mianem stabilności mikrosatelitarnej – MSS. Obecnie, coraz częściej podnosi się jednak temat różnic w potencjale mutagennym między nowotworami MSI-L i MSS wskazując różnice na tyle małe, że w zasadzie część badaczy uznaje rozdział wspomnianych grup za niepotrzebny **[94]**.

Nowotworami, w których udowodniona jest rola MSI w karcynogenezie są m.in. rak jelita grubego **[93]**, rak żołądka **[95]**, rak jajnika **[96]**, rak wątroby i dróg żółciowych **[97]**, rak urotelialny **[98]**, niektóre nowotwory pierwotne ośrodkowego układu nerwowego **[99]**, nowotwory skóry **[100, 101]** czy też przedmiot niniejszych badań – rak endometrium **[102, 103]**. MSI stwierdzane w tkance nowotworowej, może mieć swoje podłoże w spontanicznej, nabytej zmianie na poziomie epigenetycznym lub być efektem odziedziczonej w sposób autosomalny dominujący mutacji w jednym z genów kluczowych dla MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*) lub w genie *EPCAM*. Wrodzony defekt w naprawie błędnie sparowanych zasad jako zespół predysponujący do nowotworzenia wielu tkanek i narządów, zwykle w wieku młodszym niż w przypadku nowotworów sporadycznych, po raz pierwszy opisany został w roku 1913 przez Alfreda S. Warthina **[104]**. Obserwacje te potwierdził w roku 1971 Henry T. Lynch, którego imię nadano temuż zespołowi w latach 80-tych XX wieku i jakkolwiek nazwą zalecaną dla niego jest dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (ang. *hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC*), to wydaje się ona nie oddawać istoty zaburzenia i nieprawdziwie zawężać je jedynie do raka jelita grubego **[105]**.

W komórkach prawidłowego endometrium oraz w komórkach linii eksperymentalnej dobrze zróżnicowanego raka endometrioidnego, tzw. komórkach Ishikawy zaobserwowano indukowany estradiolem wzrost ekspresji genów *MLH1* i *MSH2* **[106]**. Ponadto, obniżony poziom ekspresji białek MMR koreluje z obniżoną ekspresją receptorów progesteronowych (ang. *progesterone receptor*, PR) i estrogenowych (ang. *estrogene receptor*, ER), a dla tych pierwszych jest to wartość istotna statystycznie **[107]**. I wreszcie, dość istotnym zjawiskiem w karcynogenezie raka endometrium wydaje się wykazanie znacząco większego potencjału do transaktywacji receptora estrogenowego alfa (ER alpha), gdy ten związany jest poprzez domenę interakcyjną MSH3/MSH6 z białkiem MSH2 **[108]**. Chociaż szczegółowe szlaki karcynogenezy MMRd-zależnej są ciągle przedmiotem badań, to wyłania się obraz pewnej wzajemnej relacji między hyperestrogenizmem a niestabilnością mikrosatelitarną, na drodze nowotworzenia.

Niezwykle ciekawym i otwierającym nową perspektywę na karcynogenezę MMRd-zależną, wydaje się fakt, iż w obrębie genu kodującego typ II receptora dla TGF-β odnaleziono dwa regiony powtórzeń mikrosatelitarnych. Mutacja w sekwencji BAT-RII domeny pozakomórkowej TGF-βRII powoduje znaczący spadek ekspresji tego receptora i silnie dodatnio koreluje ze statusem MSI-H **[109]**. Dodatkowo, udokumentowano również, jako przyczynę inhibicji funkcji tego receptora, insercję dodatkowych fragmentów GT (guanina-tymina) w mikrosatelitarny region kodujący poly(GT)3 **[110]**. Podobieństwa pomiędzy

receptorami typu II dla białek z rodziny TGF-β, zarówno na poziomie struktury genu, konformacji białka, tworzonych kompleksów i ich funkcji w szlakach sygnalizacyjnych są na tyle istotne, że stanowić mogą teoretyczny punkt wyjścia do rozważań czy MMRd przyczynia się do powstania raków endometrium wykazujących ekspresję AMHRII.

2. Cel badania

Cele główne:

- Ocena wzajemnej korelacji pomiędzy poziomem ekspresji AMH i AMHRII a statusem deficytu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) w raku endometrium.
- Ocena wpływu wybranych zmiennych ilościowych (np. wiek pacjentki, BMI pacjentki itp.) i jakościowych (np. typ raka wg Bokhmana, stopień zaawansowania wg FIGO itp..), na status korelacji pomiędzy poziomem ekspresji AMH i AMHRII a deficytem naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) w raku endometrium.

Cele poboczne badania

- Ocena częstości występowania deficytu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) w raku endometrium, w grupie pacjentek operowanych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym w Olsztynie w latach 2006-2010
- Ocena wzajemnych korelacji poszczególnych ocenianych zmiennych ilościowych i jakościowych ze statusem stabilności mikrosatelitarnej w raku endometrium, w grupie pacjentek operowanych w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym w Olsztynie w latach 2006-2010.
- Ocena poziomu zgodności wyników oznaczeń immunohistochemicznych ekspresji białek MMR z wynikami badania metodą RT-PCR przy pomocy zamkniętego, automatycznego systemu Idylla MSI Test.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał badawczy

Badania zostały przeprowadzone w oparciu o materiał zarchwizowany w Zakładzie Patomorfologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Olsztynie, stanowiący bloki parafinowe zawierające wycinki tkankowe raka endometrium, pochodzące od 230 pacjentek. Zakres zabiegu operacyjnego obejmował histerektomię z obustronną salpingoooferektomią, w większości przypadków dodatkowo poszerzoną o limfadenektomię i płukanie otrzewnej (ang. *washing*). Wszystkie zabiegi wykonano w Oddziale Klinicznym Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Olsztynie, w latach 2006-2010. Przeprowadzenie badań zostało poprzedzone uzyskaniem zgody Komisji Bioetycznej Warmińsko-Mazurskiej Izby Lekarskiej w Olsztynie (OIL.164/15/Bioet; 2 kwietnia 2015).

3.2. Charakterystyka grupy badanej oraz kryteria włączenia i wyłączenia z grupy badanej

3.2.1. Charakterystyka ogólna grupy badanej

Celem zebrania danych demograficznych oraz klinicznych przeanalizowano dostępną dokumentację medyczną i ostatecznie sklasyfikowano pacjentki na podstawie potwierdzonego przez dwóch lekarzy specjalistów z zakresu patomorfologii wyniku badania histopatologicznego materiału pooperacyjnego. Zebrane dane obejmowały typ histologiczny raka trzonu macicy określony według obowiązującej w czasie pierwotnie przeprowadzonego badania histopatologicznego Klasyfikacji Guzów Nowotworowych Światowej Organizacji Zdrowia: Patologia i Genetyka Guzów Piersi i Żeńskich Narządów Rozrodczych (ang. *World Health Organisation Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*) **[111]**, stopień zaawansowania choroby nowotworowej według Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa (ang. *International Federation of Gynecology and Obstetrics,* FIGO) do roku 2009 według wytycznych z roku 1988 **[112]**, zaś od roku 2009 zgodnie z wytycznymi ówcześnie nowo wprowadzonymi **[113]**. Dodatkowo zgromadzono dane dotyczące statusu hormonalnego, statusu cyklów miesiączkowych, współistniejącego nadciśnienia tętniczego i cukrzycy typu 2, stosowania hormonalnej terapii zastępczej, liczby porodów, czasu karmienia piersią, wieku pacjentki oraz indeksu masy ciała (ang. *body mass index,* BMI).

BMI obliczono zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia, gdzie wartości uznane za niedowagę zawierają się w BMI <18,5 kg/m2; waga prawidłowa: BMI = 18,5-25kg/m2; nadwaga: BMI = 25-30 kg/m2 oraz otyłość: BMI >30 kg/m2 **[114]**. Status cyklów miesiączkowych określono zgodnie z wytycznymi brytyjskimi wydanymi przez Narodowe Centrum Współpracy na Rzecz Zdrowia Kobiet i Dzieci (ang. *National Collaborating Centre for Women's and Children's Health*), gdzie okres przedmenopauzalny zdefiniowano jako czas nieregularnie występujących miesiączek i wazomotorycznych objawów ogólnych, zaś okres menopauzy rozpoznawany jest wówczas, gdy miesiączka nie występuje przez co najmniej 12 kolejnych miesięcy, pod warunkiem nie stosowania przez pacjentkę antykoncepcji hormonalnej **[115]**.

Na podstawie ponownej oceny mikroskopowej preparatów, znajdujących się w zasobach Archiwum Zakładu Patomorfologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Olsztynie, dokonano reewaluacji i weryfikacji uprzednio postawionych rozpoznań histopatologicznych zgodnie z obecnie obowiązującymi: 5 edycją Klasyfikacji Guzów Nowotworowych według Światowej Organizacji Zdrowia, Guzy Żeńskich Narządów Rozrodczych **[116]** oraz Klasyfikacją Stopnia Zaawansowania Raka Trzonu Macicy według Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa z roku 2018 **[117]**.

3.2.2. Kryteria włączenia pacjentek do badania

Do badania włączono pacjentki ze zweryfikowanym rozpoznaniem raka endometrium, niezależnie od stopnia zaawansowania, pod warunkiem kompletności innych, wyszczególnionych wyżej, danych klinicznych uzyskanych z archiwalnej dokumentacji medycznej.

3.2.3. Kryteria wyłączenia pacjentek z badania

Z badania zostały wyłączone pacjentki, u których po weryfikacji rozpoznania stwierdzono nowotwór mezenchymalny lub nowotwór mieszany nabłonkowo-mezenchymalny lub zmianę prekrusorową dla raka endometrium lub zmianę nienowotworową. Zdyskwalifikowano również pacjentki, u których ponowna ocena histopatologiczna nie była możliwa, z powodu braku materiału w zasobach Archiwum Zakładu Patomorfologii (materiał uległ zniszczeniu lub wypożyczeniu do innej jednostki prowadzącej leczenie pooperacyjne pacjentki). Do badania nie dopuszczono także materiału, który w procesie weryfikacji rozpoznania okazał się być suboptymalnym ze względów ilościowych (zbyt mało utkania raka) lub jakościowych (zbyt duży odsetek martwicy o dowolnej przyczynie w utkaniu raka).

3.2.4. Charakterystyka szczegółowa grupy badanej

Z grupy 230 pacjentek po szczegółowej analizie i zastosowaniu kryteriów włączenia i wyłączenia z badania wyodrębniono 218 pacjentek (*n*=218). Dane zebrane od badanej grupy obejmowały typ histologiczny guza, stopień zaawansowania guza trzonu macicy wg FIGO, a także szereg zmiennych ilościowych oraz jakościowych przedstawionych w ***Tabeli 1.*** Analizowane parametry ilościowe obejmowały liczbę porodów i poronień, średnią masę urodzeniową dziecka probantki, średni czas karmienia piersią, wiek wystąpienia ostatniej miesiączki oraz BMI **(*Tabela 2*)**.

	0	**1**	**Razem pacjentek**
Cukrzyca t. 2	165	53	218
Nadciśnienie	134	84	
Palenie papierosów	191	27	
Antykoncepcja hormonalna	212	6	
HTZ	198	20	

Tabela 1. *Zestawienie analizowanych zmiennych jakościowych dla grupy badanej (n = 218). 0 - wartość ujemna, odnosząca się do liczby pacjentek nieposiadających danej cechy. 1 - wartość dodatnia, odnosząca się do liczby pacjentek posiadających daną cechę. HTZ – hormonalna terapia zastępcza.*

	Zakres wartości	**Średnia**	**Mediana**
Liczba porodów	0 - 12	2,7	2
Liczba poronień	0-3	1,1	0
Średnia masa urodzeniowa dziecka	1900-4790	3478,8	3500
Średni czas karmienia piersią	0-48	6,2	9,2
Wiek wystąpienia ostatniej miesiączki	31-62	50,6	51
BMI	17,1-49,2	30,5	32,1

Tabela 2. *Zestawienie obrazujące analizowane zmienne ilościowe, zakresy ich wartości, wartość średnią i medianę wartości obserwowanych w grupie badanej. Średnią masę urodzeniową dziecka wyrażono w gramach. Średni czas karmienia piersią wyrażono w miesiącach. Indeks masy ciała (ang. body mass index, BMI) wyrażono za pomocą iloczynu masy ciała w kilogramach i wysokości ciała w metrach podniesionej do potęgi drugiej [kg/m^2].*

W grupie badanej u 49 pacjentek rozpoznano raka endometrioidnego G1 trzonu macicy G1 (*n* = 49), u 146 raka endometrioidnego G2 trzonu macicy (*n* = 146), u 6 raka endometrioidnego G3 trzonu macicy (*n* = 6), u 8 raka surowiczego trzonu macicy (*n* = 8), u 4

raka jasnokomórkowego trzonu macicy (n = 4), a u 5 pacjentek raka mieszanego trzonu macicy (n = 5).

Najliczniej reprezentowanym stopniem zaawansowania raka trzonu macicy wg FIGO był stopień I (n = 156), z czego stopień IA stwierdzono u 100 pacjentek (n = 100), a IB u 56 pacjentek (n = 56). Stopień FIGO II stwierdzono u 30 pacjentek (n = 30). Stopień III stwierdzono łącznie u 29 pacjentek (n = 29), z czego stopień IIIA u 10 pacjentek (n = 10), stopień IIIB u 3 pacjentek (n = 30, stopień IIIC1 u 14 pacjentek (n = 14), a stopień IIIC2 stwierdzono u 2 pacjentek (n = 2). Stopień IV stwierdzono u 3 pacjentek (n = 3), z czego stopień zaawansowania choroby u wszystkich z nich oceniono na IVB wg FIGO. W badanej grupie nie stwierdzono występowania stopnia IVA.

3.3. Preparatyka tkankowa

3.3.1. Przygotowanie materiału pooperacyjnego i badanie histopatologiczne

Preparaty tkankowe, w trakcie zabiegu operacyjnego, natychmiast po ich chirurgicznym usunięciu, były umieszczane w czystym pojemniku wypełnionym 4% zbuforowanym (bufor fosforanowy) roztworem formaldehydu, co odpowiada 10% zbuforowanemu roztworowi formaliny o pH zawierającym się w zakresie 7,2-7,4. Objętość utrwalacza stanowiła każdorazowo co najmniej dziesięciokrotność objętości preparatu tkankowego. Materiał w opisanych, zgodnych ze skierowaniem pojemnikach transportowany był w możliwie najkrótszym czasie, zwykle nie przekraczającym 30 min. do Zakładu Patomorfologii. Następnie, materiał został poddany obróbce wstępnej, polegającej na nacięciu preparatu trzonu macicy w poprzek tak, aby ułatwić penetrację tkanek przez roztwór formaliny. Czas utrwalania materiału liczony od chwili umieszczenia w utrwalaczu do chwili rozpoczęcia badania makroskopowego wynosił od 12 do 24h. Opis makroskopowy oraz pobranie odpowiednich wycinków dokonywane były przez lekarza specjalistę patomorfologii lub lekarza w trakcie specjalizacji, posiadającego odpowiednie przeszkolenie i wiedzę w zakresie badania makroskopowego. Uprzednio utrwalone wycinki preparatu operacyjnego umieszczono w ponumerowanych, zgodnie z obowiązującym w zakładzie patomorfologii systemem oznaczania, kasetkach. W celu wysycenia materiału parafiną, kasetki w kolejności pobrania umieszczono w koszykach stalowych, a te w procesorze tkankowym. Standardowym protokołem przepajania zastosowanym na opisywanym materiale był zalecany przez producenta (Leica), protokół 10-cio godzinny. Bloki parafinowe przygotowano na platformach do zatapiania wycinków tkankowych, tzw. histoembederach, przez odpowiednio przeszkolonych diagnostów laboratoryjnych. Z tak przygotowanych bloków parafinowych,

przy użyciu mikrotomów saneczkowych, wykonano skrawki o grubości 6 μm, które umieszczono na powierzchni czystej wody o temperaturze 37°C celem ich wypłaszczenia i rozprostowania powstałych w czasie skrawania zagnieceń. Skrawki zostały umieszczone na szkiełkach mikroskopowych podstawowych, które następnie suszono w temperaturze 37°C. Barwienie rutynowe preparatów hematoksyliną i eozyną (H&E) wykonano w zamkniętych barwiarkach automatycznych. Wybarwione preparaty przykryto szkiełkami nakrywkowymi w zamkniętych nakrywarkach automatycznych. Ocena mikroskopowa została dokonana przez jednego z lekarzy specjalistów patomorfologii, a diagnoza nowotworu złośliwego w każdym przypadku została potwierdzona niezależnie przez innego członka zespołu diagnostycznego zakładu, również lekarza specjalistę patomorfologii. Typ histologiczny guza został określony w chwili przeprowadzania badania histopatologicznego według obowiązującej wówczas (w latach 2006-2010) Klasyfikacji Nowotworów Światowej Organizacji Zdrowia – „Patologia i Genetyka Guzów Piersi i Narządów Żeńskiego Układu Rozrodczego" **[111]** a stopień zaawansowania określany był w latach 2006-2009 według Klasyfikacji Stopnia Zaawansowania Raka Trzonu Macicy według Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa z roku 1988 **[112]**, zaś w latach 2009-2010 według edycji tejże klasyfikacji obowiązującej od roku 2009 **[113]** ***(Suplement 1).*** Proces preparatyki tkankowej oraz oceny makro- i mikroskopowej materiału w latach przeprowadzania diagnostyki wybranych do niniejszych badań przypadków, tj. 2006-2010, odbywał się zgodnie z wytycznymi zawartymi w Praktycznym Przewodniku Obchodzenia się z Materiałem w Patologii Chirurgicznej (ang. *The Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology*) wydanym przez Szkołę Patologów Amerykańskich (ang. *The College of American Pathologists,* CAP) **[118]**.

3.3.2. Mikromacierze tkankowe

Spośród preparatów mikroskopowych barwionych metodą H&E, zawierających fragmenty raka endometrium, pochodzących od każdej z badanych pacjentek wybrano jeden reprezentatywny, zawierający co najmniej 5 mm^2 utkania raka. Wyselekcjonowane w ten sposób preparaty zostały zeskanowane przy użyciu urządzenia Panoramic MIDI II, 3DHistech, a za pomocą dedykowanego programu komputerowego – Panoramic Viewer, 3DHistech wyznaczono z każdego z preparatów po trzy obszary o powierzchni 1,5 mm^2. Z odpowiadających oznaczonym preparatom bloków parafinowych, tzw. bloków donorowych, wycięto wyznakowane rdzenie o kształcie walca (o polu podstawy równym 1,5mm^2), pogrupowano i opisano je w kolejności odpowiadającej numerom bloków rosnąco, a następnie zatopiono rdzenie ponownie w blokach parafinowych, tzw. blokach akceptorowych,

zawierających po 81 takich rdzeni tkankowych. Uzyskane w ten sposób bloki mikromacierzy tkankowych (ang. *tissue microarrays* TMA) spreparowano za pomocą urządzenia TMA Grand Master, 3DHistech, zgodnie z protokołem wyznaczonym przez producenta.

3.3.3. Barwienia immunohistochemiczne

Do barwień immunohistochemicznych wykorzystano skrawki bloków parafinowych zawierających mikromacierze, o grubości 4 μm. Proces skrawania i nanoszenia na szkiełko mikroskopowe podstawowe odbywał się według opisanego wyżej (vide: 5.3.1) protokołu.

- **AMHRII**

Barwienie metodą immunohistochemii wykonano przy użyciu barwiarki automatycznej DakoAutostainer Link48. Celem uzyskania odczynu barwnego odzwierciedlającego ekspresję AMHRII, przygotowane w opisany wyżej sposób preparaty TMA poddano deparafinizacji, uwodnieniu oraz odsłonięciu antygenów poprzez podgrzewanie ich w temperaturze 97^{o}C przez 20 minut w roztworze o pH 9, wskazanym przez producenta - EnVision FLEX Target Retrieval Solution, na platformie PTLink Dako. Następnie, celem inhibicji aktywności endogennej peroksydazy, preparaty inkubowano przez 5 min. w roztworze EnVison FLEX peroxidase-Blocking Reagent. Kolejnym krokiem była 20 min. inkubacja z przeciwciałami anty-AMHRII (ab197148; 1:1600, Abcam) oraz roztworem EnVision FLEX/HRP przez kolejnych 20 min. Aby uwidocznić reakcję barwną antygenu z przeciwciałem, preparaty inkubowano (10 min.) w każdorazowo świeżo przygotowanym roztworze 3,30-diaminobenzydyny (DAB). Kontrbarwienie (ang. *counterstaining*) przeprowadzono za pomocą roztworu hematoksyliny zalecanego przez producenta platformy – ENVision FLEX Hematoxylin, a proces ten trwał, zgodnie z protokołem, 5 min. Na koniec, celem odwodnienia tkanki, każdy z preparatów płukano w roztworach alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu 70%, 96% oraz w alkoholu absolutnym, a także w ksylenie. Następnie, na preparaty naniesiono Dako Mounting Medium (pełniące rolę spoiwa szkiełek i środowiska poprawiającego właściwości optyczne gotowego preparatu) i nakryto szkiełkami mikroskopowymi nakrywkowymi. Jako tkankową kontrolę pozytywną dla AMHRII zastosowano wycinki ludzkiego stercza.

- **MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2**

Do wykonania barwienia immunohistochemicznego dla MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 zastosowano platformę automatyczą BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems. Celem uzyskania reakcji barwnej postępowano zgodnie ze standardowym, rekomendowanym przez producenta protokołem do zestawu OptiView DAB IHC Detection Kit. Preparaty TMA zostały

deparafinizowane i uwodnione, a poszukiwane antygeny odsłonięto poprzez 4-minutową inkubację w temperaturze 72ºC, a następnie płukanie preparatów roztworem EZ Prep. Po ponownym podgrzaniu preparatów do 100ºC dodano utrwalacz komórkowy Ventana Cell Conditioner, z którym to inkubowano materiał przez 64 minuty dla MLH1, MSH2 i MSH6 oraz 92 minuty dla PMS2. Następnie, preparaty płukano w buforze reakcyjnym Ventana Reaction Buffer, oraz inkubowano przez 4 min. w roztworze Ventana OV PEROX IHBTR, w celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy. Czas inkubacji z poszczególnymi przeciwciałami zgodny był z indywidualnymi protokołami każdego z barwień dodatkowych i wynosił: 24 min. dla Ventana anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody, 32 min. dla Ventana anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody oraz 12 min. dla Ventana anti-MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Primary Antibody i Ventana anti-MSH6 (SP93) Rabbit Monoclonal Primary Antibody. Następnie wszystkie preparaty inkubowano przez 8 min. w roztworze OptiView HQ Linker i kolejne 8 min. w OptiView HRP Multimer. Zgodnie z zaleceniami producenta, zastosowano kontrbarwienie dwuetapowe, składające się z 4-minutowej inkubacji w hematoksylinie (Ventana Hematoxylin II) oraz 4-minutowej inkubacji w Ventana Bluing Agent. Kontrolą pozytywną dla wszystkich czterech odczynów była ściana ludzkiej okrężnicy.

3.3.4. Ocena mikroskopowa barwień immunohistochemicznych

Wszystkie odczyny immunohistochemiczne ocenione zostały przy użyciu mikroskopu świetlnego, dla AMHRII w oparciu o skalę IRS (ang. *immunoreactive score of Remmele and Stegner*) **(*Tabela 3*) [119]**, zaś dla MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2, w oparciu o zalecaną przez producenta przeciwciał skalę MMR RxDx panel scoring algorithm **(*Tabela 4*) [120]**.

A	B
0 – brak komórek z odczynem dodatnim	**0** – odczyn ujemny
1 – <10% komórek z odczynem dodatnim	**1** – odczyn słabo dodatni
2 – 11-50% komórek z odczynem dodatnim	**2** – odczyn średnio dodatni
3 – 51-80% komórek z odczynem dodatnim	**3** – odczyn silnie dodatni
4 – >80% komórek z odczynem dodatnim	

Tabela 3. *Skala IRS wg Remmele i Stegnera: odsetek komórek z odczynem dodatnim (A) i intensywność odczynu barwnego (B). Iloczyn obu parametrów (A x B) stanowi wynik półilościowej skali IRS Remmele i Stegnera.*

Interpretacja	Charakterystyka reakcji barwnej
Dodatni (zachowany) /+/	Komórki raka wykazujące odczyn barwny jądrowy o dowolnej intensywności przewyższającej intensywność wybarwienia tła.
Ujemny (utracony) **/-/**	Komórki raka nie wykazujące jądrowego odczynu barwnego, wykazujące odczyn barwny inny niż jądrowy pod warunkiem braku odczynu jądrowego lub odczyn jądrowy barwy szarej.

Tabela 4. *Algorytm oceny odczynu immunohistochemicznego panelu Ventana MMR RxDx, zastosowany w ocenie i interpretacji odczynów barwnych odzwierciedlających ekspresję białek MMR: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2.*

W ocenie ekspresji zarówno AMHRII, jak i panelu MMR, niezależnie dla każdego preparatu przed przystąpieniem do analizy i interpretacji odczynu barwnego oceniono jakość techniczną wykonanej preparatyki pod kątem adekwatnej do oceny morfologii oraz charakterystyki tła według kryteriów opisanych w ***Tabeli 5***. W przypadku stwierdzenia niediagnostyczności danego preparatu, proces barwienia immunohistochemicznego powtarzano, uprzednio rewidując poprawność zastosowanego protokołu technologicznego barwienia specjalnego, immunohistochemicznego.

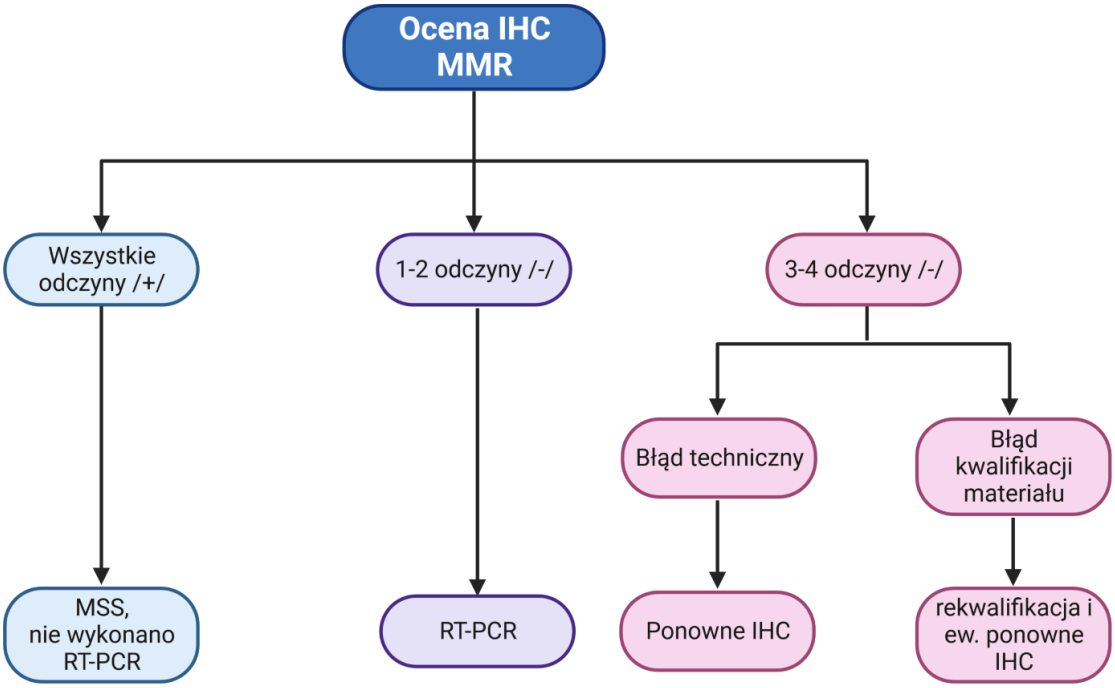
	Preparat diagnostyczny	Preparat niediagnostyczny
Morfologia	Komórki i struktury komórkowe dobrze widoczne	Komórki i/lub struktury komórkowe niewidoczne lub widoczne ale obarczone dowolnym artefaktem uniemożliwiającym ocenę
Tło	Nieinterferujące z komórkami i/lub strukturami komórkowymi podlegającymi ocenie	Interferujące z komórkami i/lub strukturami komórkowymi w sposób znacznie utrudniający lub uniemożliwiający ocenę

Tabela 5. *Algorytm walidacji przydatności diagnostycznej preparatu barwionego metodą immunohistochemii.*

3.4. Badania molekularne statusu MMR metodą RT-PCR

3.4.1. Kryteria włączenia pacjentek do badania molekularnego

Do testu molekularnego metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction* RT-PCR) zakwalifikowano próbki tkanki raka trzonu macicy pochodzące od pacjentek, które w co najmniej jednym, dowolnym oznaczeniu immunohistochemicznym białek MMR uzyskały status „**/-/** ujemny”. Algorytm doboru próby do badań molekularnych obrazuje ***Rycina 10***.



Rycina 10. *Algorytm kwalifikacji materiału do oceny statusu mechanizmu naprawy błędnie sparowanych zasad - MMR (ang. mismatch repair) metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym - RT-PCR (ang. real-time polymerase chain reaction). Kwalifikacja materiału dokonywana była na podstawie reakcji barwnej przeciwciał skierowanych przeciw czterem głównym białkom naprawy błędnie sparowanych zasad. Sposób oceny reakcji barwnej opisano w* ***Tabeli 2****. MSS - Stabilność mikrosatelitarna (ang. microsatellite stable). (opracowanie własne)*

3.4.2. Opis zastosowanego systemu RT-PCR

Analizę określonego uprzednio metodami immunohistochemii statusu MMRd wykonano z zastosowaniem automatycznego zamkniętego systemu Biocartis Idylla MSI Test. System ten jest złożony z konsoli połączonej z instrumentem testowym, w którym za pomocą jednorazowych kartridży przeprowadzana jest amplifikacja, a jej rezultaty po zakończonej procedurze, przy użyciu dedykowanego oprogramowania MSI Test Type Package widoczne są w formie skróconego raportu na ekranie konsoli. Raporty pełne przesyłane są i przechowywane w dysku wirtualnym (tzw. „chmurze"), indywidualnej dla pracowni wykonującej test i możliwe do odczytania tylko dla upoważnionych pracowników tejże jednostki. Raporty generowane są w formie zabezpieczonych, nieedytowalnych plików. Ogólną zgodność wyników pomiędzy zastosowanym w niniejszych badaniach systemem Biocartis Idylla MSI Test a metodą referencyjną – systemem Promega MSI Analysis System v1.2, producent określa na poziomie 99,7%, zaś zgodność z oznaczeniami IHC na poziomie 97,5% **[121]**.

Test Idylla MSI testuje panel siedmiu biomarkerów monomorficznych: ACVR2A – receptor typu II z rodziny TGF-β; BTBD7 – regulator ekspresji genów odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe, DIDO1 – induktor apoptozy, MRE11 – białko o aktywności

egzo- i endonukleazy, RYR3 – receptor rianodynowy, regulator gospodarki wapniowej w komórce, SEC31A – białko wspomagające transport z retikulum endoplazmatycznego i SULF2 – koreceptor wspomagający sygnalizację receptorów typu II rodziny TGF-β **[12]**.

Do testów, w każdym z badanych przypadków użyto materiału pochodzącego z tych samych bloków parafinowych, z których uprzednio wyodrębniono rdzenie mikromacierzy tkankowych. Z każdego z nich, wykonano preparat barwiony metodą H&E w celu zakwalifikowania materiału do badania i wyznaczenia obszaru do późniejszej makrodysekcji na skrawkach niebarwionych o grubości 6μm. Komórki nowotworu w obszarze wyznaczonym stanowiły >20% komórek w obszarze ogółem, a obszar każdorazowo wynosił 48-50mm^2, przy czym aby spełnić warunek dotyczący odpowiedniej komórkowości możliwe było użycie tkanki pochodzącej z więcej niż jednego skrawka danego obszaru. Wyznaczony przez producenta poziom komórkowości podyktowany jest potencjalną możliwością uzyskania wyników fałszywie ujemnych z powodu nie braku, lecz niewystarczającej do detekcji odsetkowej ilości alleli zmutowanych w próbce.

Przygotowany materiał umieszczono w kartridżu, zaś ten w instrumencie testowym. Zawarte w kartridżu enzymy i odczynniki chemiczne w połączeniu z wytwarzanymi przez urządzenie ciepłem oraz falami ultradźwiękowymi o dużym natężeniu (ang. *high-intensity focused ultrasound,* HIFU) powodują deparafinizację, lizę komórek i uwolnienie kwasów nukleinowych. Reakcja PCR odbywa się przy użyciu stabilnych starterów, specyficznych dla wyżej wymienionych biomarkerów. Detekcja i analiza tychże, możliwa jest dzięki markerom molekularnym znakowanym fluorescencyjnie, które dzięki różnej temperaturze topnienia oraz typu występowania docelowych biomarkerów (typ dziki vs amplikon zmutowany) wykrywane są jako różnice w profilach fluorescencji, a po analizie dokonanej przez oprogramowanie, wyrażane w formie wyniku genetycznego dla biomarkera i statusu MSI dla całej próbki.

Czas przetwarzania pojedynczego testu, a więc pojedynczej próbki, wynosi w użytym do badania systemie 150 minut. Wynik testu interpretowany jest automatycznie przez oprogramowanie systemu i zostaje udostępniony na ekranie konsoli w formie skróconej natychmiast po ukończeniu testu **(*Rycina 11*)**, a w formie rozszerzonej, wynik jest dostępny online na indywidualnym koncie w chmurze zakładu wykonującego test. W formie skróconej przedstawiany jest on jako ogólny status MSI: MSS/MSI-H/Nieprawidłowy oraz indywidualnie dla każdego biomarkera: Nie wykryto mutacji/Wykryto mutację/Nieprawidłowy. Cały przeprowadzony dla danej próbki test uważa się za wykonany prawidłowo jeśli co najmniej 5 z 7 biomarkerów wykazuje wynik inny niż „Nieprawidłowy". Status próbki określony zostaje jako niestabilność mikrosatelitarna jeśli w co najmniej 2 z 7 biomarkerów wykryto mutację.

Wynik testu (1) Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro. Do użytku w procedurach diagnostycznych.

Idylla™ MSI Test

Status próbki MSI	**MSI-H**
ACVR2A	**Nie wykryto mutacji**
Wynik MSI	0.08
BTBD7	**Wykryto mutację**
Wynik MSI	1.00
DIDO1	**Wykryto mutację**
Wynik MSI	0.87
MRE11	**Wykryto mutację**
Wynik MSI	0.92
RYR3	**Wykryto mutację**
Wynik MSI	0.92
SEC31A	**Nie wykryto mutacji**
Wynik MSI	0.01
SULF2	**Wykryto mutację**
Wynik MSI	0.96
Status jakości	**7 biomarkerów MSI zostało wzmocnionych prawidłowo, w związku z czym wynik testu jest WAŻNY.**

Report printed from Idylla™ Explore.

Strona 1 z 2

BIOCARTIS

Rycina 11. *Przykładowy raport skrócony wykonanego testu "Idylla MSI Test". Status niestabilności mikrosatelitarnej (ang. microsatellite instability) określony został osobno, dla każdego z 7 badanych biomarkerów, a ponadto na podstawie ogólnej ilości wzmocnień biomarkerów, dla całej próbki określono status jakości.*

3.5. Analiza statystyczna

Zależności pomiędzy poziomem ekspresji AMH i AMHR a obecnością MSI-H, przy udziale pozostałych zmiennych – ilościowych (wiek pacjentki, indeks BMI pacjentki, liczba porodów, liczba poronień, średnia masa noworodka, średni czas karmienia piersią) i jakościowych (typ nowotworu wg Bokhmana, stopień zaawansowania wg FIGO, stosowanie antykoncepcji, stosowanie hormonalnej terapii zastępczej, obecność cukrzycy, palenie) poszukiwano wykorzystując uogólnione modele liniowe (GLZ). Budowę modeli przeprowadzono dla wszystkich badanych efektów oraz poszukiwano najlepszego podzbioru zmiennych wyjaśniających stosując kryterium informacyjne Akaike. Budowę modeli prowadzono dla różnych kombinacji zmiennych, co wynikało z konfiguracji podklas, jako realizacji wariantów wyróżnianych kategorii zmiennych.

Zależności pomiędzy zdiagnozowaną obecnością MMRd, a niezależnymi pozostałymi badanymi zmiennymi zakodowanymi jako dwustanowe (TAK; NIE), tj. porodami, występowaniem poronień, stosowaniem antykoncepcji hormonalnej, stosowaniem hormonalnej terapii zastępczej, cukrzycy typu 2, nadciśnieniem tętniczym były testowane dwustronnym testem dokładnym Fishera **[123]**.

Związki pomiędzy obecnością MMRd, a badanymi zmiennymi ilościowymi, tj. liczbą porodów, współczynnikiem BMI pacjentki i jej wiekiem były testowane w modelu regresji logistycznej **[124],** uwzględniając wszystkie zmienne, jak również w modelach z pojedynczymi niezależnymi zmiennymi, gdyż model regresji logistycznej nie wyjaśnia efektów interakcji zmiennych niezależnych. Modelowano prawdopodobieństwo obecności MMRd [p (MMRd)=1] zależnie od zmiennych niezależnych. Poszukiwanie najlepszego układu dla tych zmiennych zostało przeprowadzone metodą estymacji Rosenbrocka i quasi Newtona, a w przypadku budowy modelu dla związku prawdopodobieństwa MMRd zależnie do masy urodzeniowej dziecka metoda Hooke'a-Jeevesa przemieszczania układu **[125]**.

Model regresji logistycznej był estymowany metodą największej wiarygodności a współczynniki regresji (parametry modelu) testowano funkcją Walda **[124]**. Metoda największej wiarygodności polega na estymacji funkcji wiarygodności wyznaczonych parametrów modelu na postawie prób, odpowiadającej zaobserwowanemu zdarzeniu, zależnemu od szukanych (estymowanych) parametrów, a następnie a posteriori na znalezieniu takich wartości parametrów, dla których funkcja ta osiąga największą wartość.

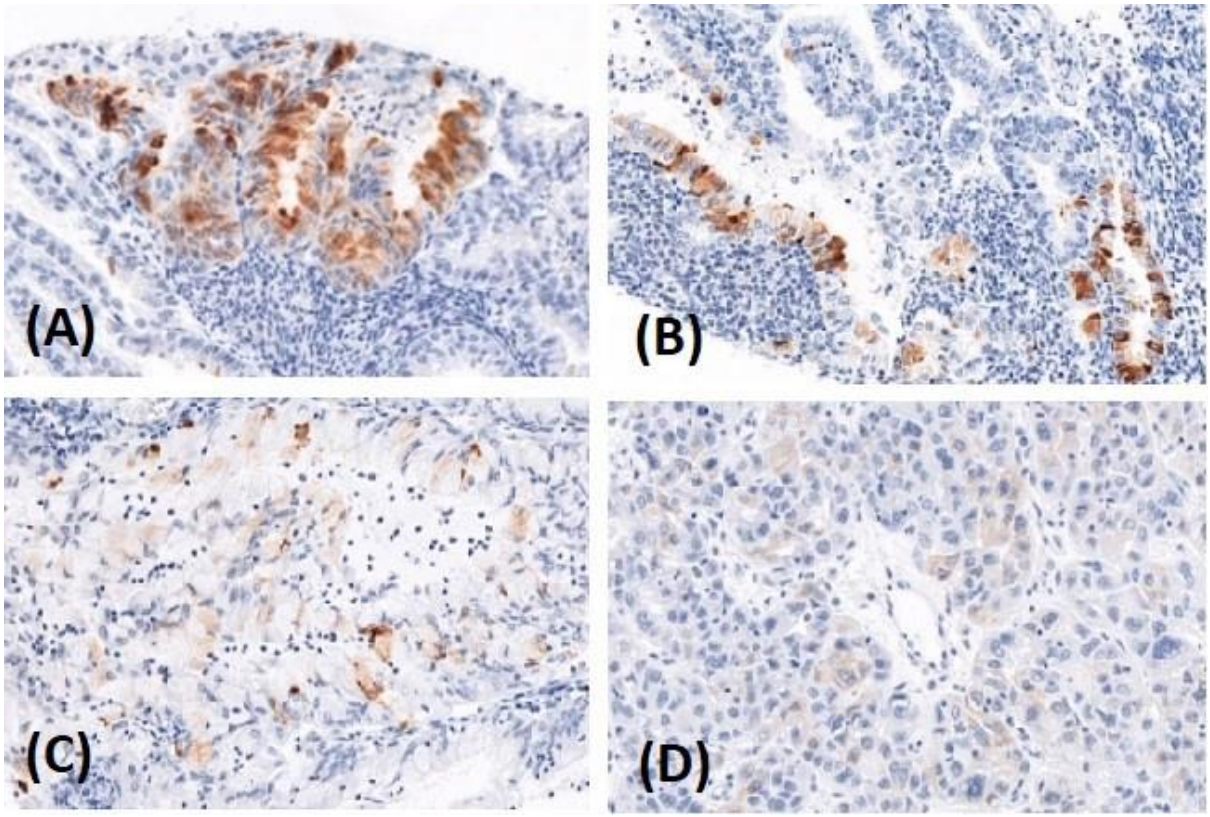
Powiązanie obecności MMRd ze stopniem zaawansowania nowotworów wg klasyfikacji FIGO przetestowano testem niezależności chi-kwadrat, przy czym z uwagi na niewielką liczbę danych w niektórych kategoriach, dokonano grupowania klas rozwojowych w trzy kategorie (FIGO I; FIGO II i FIGO III&IV), aby spełnić założenia funkcji testowej **[126]**.

W przypadku takiego grupowania liczba obserwacji w każdej kategorii była wyższa od 5, a wartości oczekiwane dla wyznaczonych kategorii wynosiły odpowiednio Figo I – 25.23, FIGO II – 4.72 i FIGO III&IV –5.04. W analizie zastosowano wersję testu chi-kwadrat Pearsona z poprawką na ciągłość. W przypadku analizy powiązania częstość występowania MMRd zależnie od typów nowotworów porównano liczbę zdarzeń z obecnością MMRd w raku endometrioidnym G2 względem wszystkich pozostałych. Taka klasyfikacja wynikała również z niewielkiej liczby przypadków w wyróżnionych grupach nowotworów oraz wymogów formalnych stosowania testów statystycznych. W tej analizie, w sytuacji tabeli 2x2 zastosowano dwustronny test dokładny Fishera **[123]**.

4. Wyniki

4.1. Podział grupy badanej, wyniki barwień immunohistochemicznych i reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

Badana grupa 218 pacjentek została podzielona na 6 podgrup, na podstawie typu histologicznego raka według klasyfikacji WHO i stopnia zróżnicowania według FIGO **[109, 110]**: rak endometrioidny Grade 1 (n = 49), rak endometrioidny Grade 2 (n = 146), rak endometrioidny Grade 3 (n = 6), rak surowiczy (n = 8), rak jasnokomórkowy (n = 4), rak mieszany endometrium (n = 5). Ekspresję AMH, po postacią cytoplazmatycznej reakcji barwnej o różnym stopniu nasilenia, zaobserwowano w materiale pochodzącym od 23/218 pacjentek **(*Rycina 12*)**. Wartości średnie ekspresji AMH ocenionej według skali Remmele i Stegnera przedstawiono w ***Tabeli 6.***

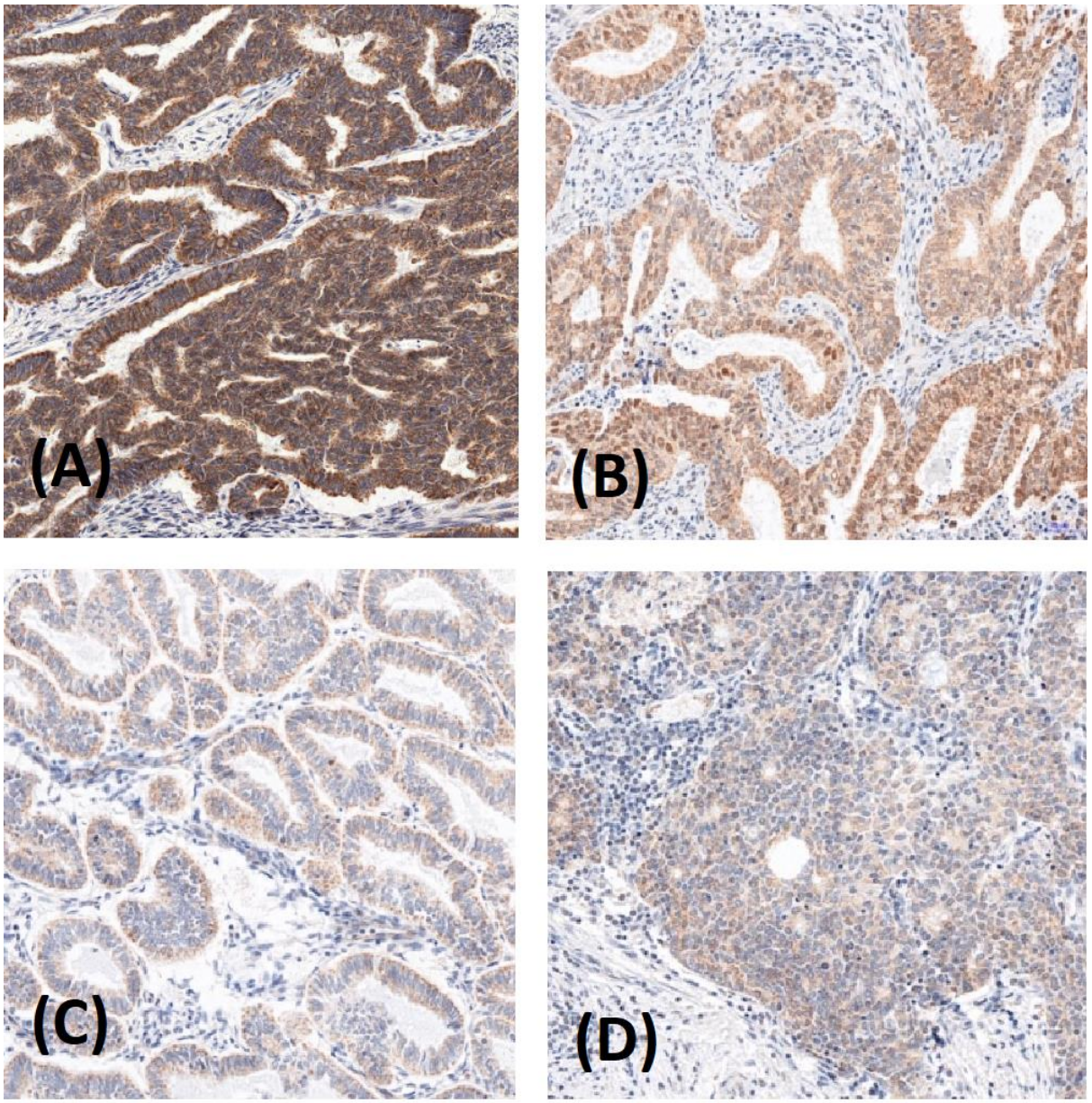


Rycina 12. *Przykłady odczynu barwnego, cytoplazmatycznego, uzyskanego metodą immunohistochemii z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko hormonowi anty-Müllerowskiemu, AMH (ang. anti-Müllerian hormone). (A) rak endometrioidny G1, ogniskowy silny odczyn cytoplazmatyczny. (B) rak endometrioidny G 1 ogniskowy średni odczyn cytoplazmatyczny. (C) rak mieszany endometrium, ogniskowy słaby odczyn cytoplazmatyczny w komponencie śluzowej. (D) rak surowiczy, ogniskowy słaby odczyn cytoplazmatyczny. (Powiększenie 200x)*

Typ histologiczny	Liczebność grupy	Liczba pacjentek z dodatnią ekspresją AMH	Średnia wartość ekspresji AMH	Min. wartość ekspresji AMH	Maks. wartość ekspresji AMH	SD
Rak endometrioidny G1	49	3	1.78	1.0	3.0	1.072
Rak endometrioidny G2	146	15	1.33	0.67	2.33	0.590
Rak endometrioidny G3	6	0	-	-	-	-
Rak surowiczy	8	0	-	-	-	-
Rak jasnokomórkowy	4	3	2.0	1.33	2.67	0.667
Rak mieszany	5	0	-	-	-	-

Tabela 6. *Wartości ekspresji hormonu anty-Müllerowskiego, AMH (ang. anti-Müllerian hormone) w poszczególnych podgrupach zróżnicowanych ze względu na typ histologiczny raka endometrium. Podane wartości ekspresji oparte są o wyniki oceny barwienia immunohistochemicznego, dokonanej przy pomocy skali Remmele i Stegnera. Wartość średnia ekspresji stanowi średnią arytmetyczną wszystkich wartości podanych przez oceniającego dla materiału o dodatniej ekspresji w danej podrugpie. SD – odchylenie standardowe (ang. standard deviation).*

Ekspresję AMHRII, w postaci odczynu barwnego, cytoplazmatyczno-błonowego obserwowano we wszystkich objętych badaniem typach histologicznych raka endometrium **(*Rycina 13*)**. Wartości średnie ekspresji dla wszystkich podgrup były podobne **(*Tabela 7*)**.

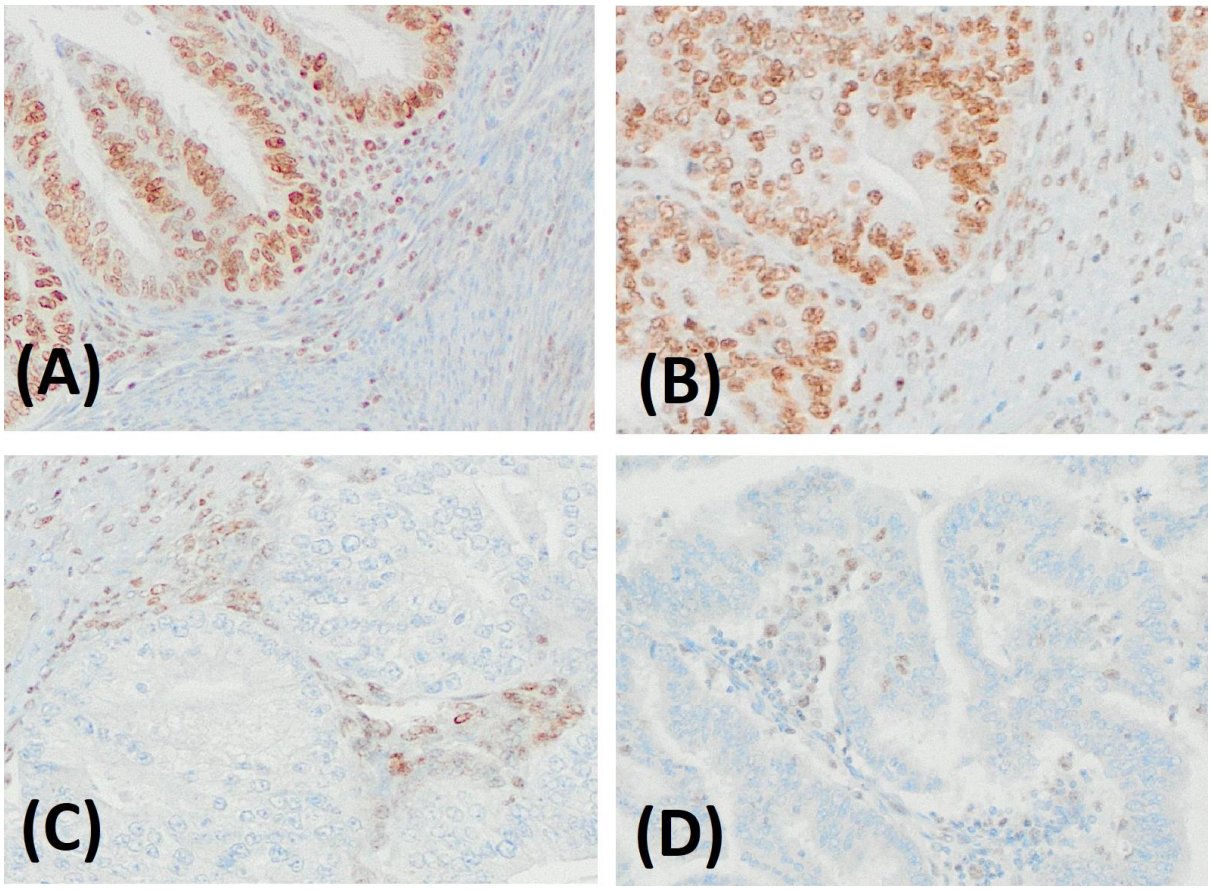


Rycina 13. *Przykłady odczynu barwnego, cytoplazmatyczno-błonowego, uzyskanego metodą immunohistochemii z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko receptorowi typu II dla hormonu anty-Müllerowskiego, AMHRII (ang. anti-Müllerian hormone receptor type II). (A) rak endometrioidny G2, silny odczyn cytoplazmatyczno-błonowy. (B) rak endometrioidny G1 , średni odczyn cytoplazmatyczno-błonowy. (C) rak endometrioidny G1, słaby odczyn cytoplazmatyczno-błonowy. (D) rak endometrioidny G3, słaby odczyn cytoplazmatyczno-błonowy. (Powiększenie 200x)*

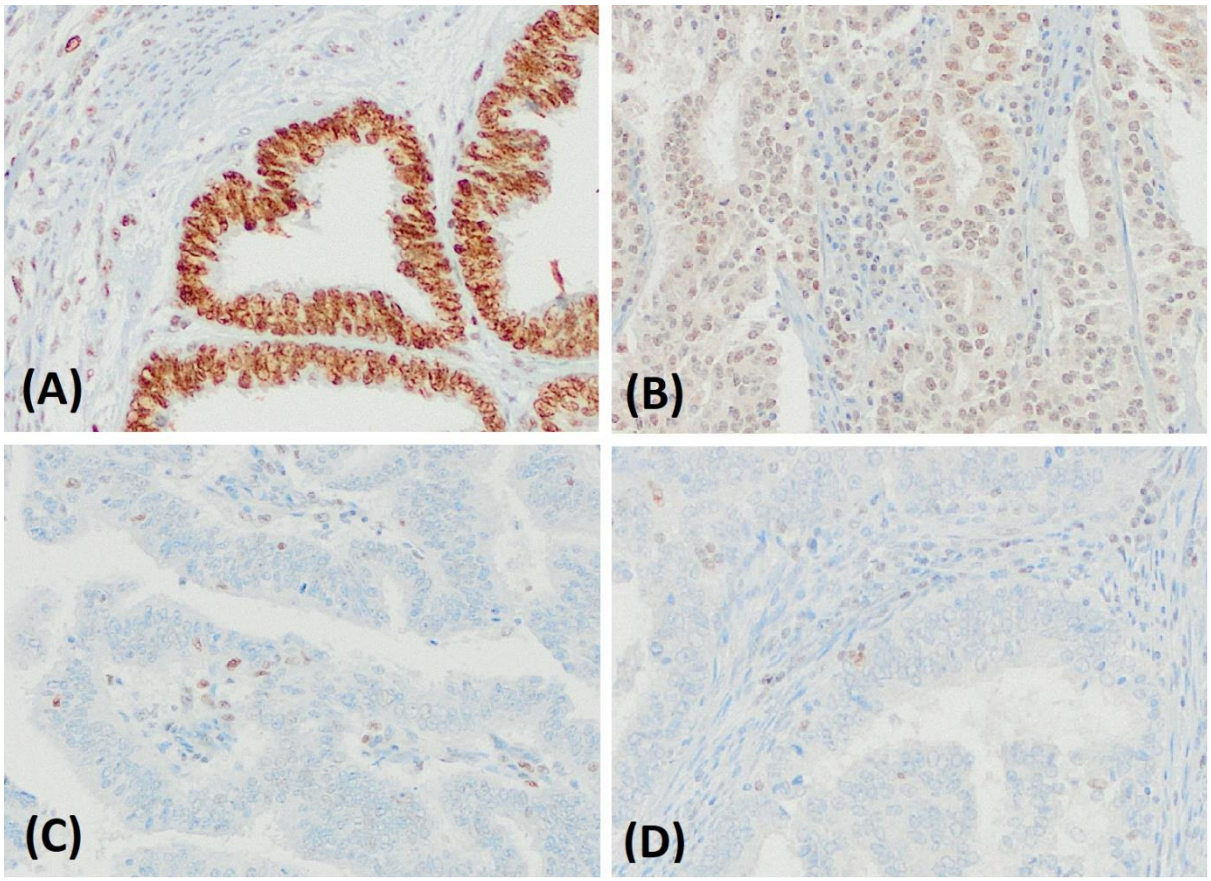
Typ histologiczny	Liczebność grupy	Średnia wartość ekspresji AMHRII	Min. wartość ekspresji AMHRII	Maks. wartość ekspresji AMHRII	SD
Rak endometrioidny G1	49	5.69	2.67	8.0	1.645
Rak endometrioidny G2	146	6.32	2.33	12.0	1.801
Rak endometrioidny G3	6	6.44	4.67	8.0	1.559
Rak surowiczy	8	6.25	4.00	8.0	1.591
Rak jasnokomórkowy	4	6.83	4.67	8.0	1.575
Rak mieszany	5	7.60	6.00	8.0	0.894

Tabela 7. *Wartości ekspresji receptora typu II dla hormonu anty-Müllerowskiego, AMHRII (ang. anti-Müllerian hormone receptor type II) w poszczególnych podgrupach zróżnicowanych ze względu na typ histologiczny raka endometrium. Podane wartości ekspresji oparte są o wyniki oceny barwienia immunohistochemicznego, dokonanej przy pomocy skali Remmele i Stegnera. Wartość średnia ekspresji stanowi średnią arytmetyczną wszystkich wartości podanych przez oceniającego dla materiału o dodatniej ekspresji w danej podrugpie. SD – odchylenie standardowe (ang. standard deviation).*

Ekspresja białek MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2, należących do grupy MMR, w barwieniach specjalnych metodami immunohistochemii ma charakter odczynu barwnego jądrowego i oceniana jest przy użyciu algorytmu *Ventana MMR RxDx,* określonego przez producenta panelu przeciwciał. Prawidłowy odczyn jądrowy oznacza obecność danego białka, zaś brak reakcji barwnej świadczy o niestabilności mikrosatelitarnej w kontekście funkcji danej składowej grupy białek MMR **(*Rycina 14, Rycina 15*)**. Status deficytu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) w obrębie całej grupy badanej, stwierdzony przy pomocy IHC, zaobserwowano ogółem w 21,56% przypadków, zaś przy użyciu RT-PCR w 16,05% przypadków, co stanowi 74,45% pacjentek ze stwierdzonym w IHC statusem MMRd **(*Tabela 8*)**.



Rycina 14. *Przykłady odczynu barwnego, jądrowego, uzyskanego metodą immunohistochemii z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko białkom MLH1 (ang. MutL protein homolog 1)(A i C) oraz MSH2 (ang. MutS homolog 2) (B i D). Jądrowy odczyn w komórkach podścieliska i komórkach nacieku zapalnego stanowi dowód na obecność funkcjonalnych białek MLH1 i MSH2 w tych komórkach, co pozwala uważać je za tzw. kontrolę wewnętrzną poprawności technicznej wykonanych odczynów immunohistochemicznych. (A) rak endometrioidny G1 z zachowaną ekspresją jądrową MLH1. (B) rak edometrioidny G1 z zachowaną ekspresją jądrową MSH2. (C) rak endometrioidny G2, nieobecny odczyn jądrowy oznacza brak funkcjonalnego białka MLH1. (D) rak endometrioidny G1, nieobecny odczyn jądrowy oznacza brak funkcjonalnego białka MSH2. (Powiększenie 100x)*



Rycina 15. *Przykłady odczynu barwnego, jądrowego, uzyskanego metodą immunohistochemii z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko białkom MSH6 (ang. MutS homolog 2)(A i C) oraz PMS2 (ang. PMS1 protein homolog 2) (B i D). Jądrowy odczyn w komórkach podścieliska i komórkach nacieku zapalnego stanowi dowód na obecność funkcjonalnych białek MSH6 i PMS2 w tych komórkach, co pozwala uważać je za tzw. kontrolę wewnętrzną poprawności technicznej wykonanych odczynów immunohistochemicznych. (A) rak endometrioidny G1 z zachowaną ekspresją jądrową MSH6. (B) rak edometrioidny G2 z zachowaną ekspresją jądrową PMS2. (C) rak endometrioidny G1, nieobecny odczyn jądrowy oznacza brak funkcjonalnego białka MSH6. (D) rak endometrioidny G1, nieobecny odczyn jądrowy oznacza brak funkcjonalnego białka PMS2. (Powiększenie 100x)*

Typ histologiczny	Liczebność grupy	MMRd IHC	MMRd RT-PCR	Odsetek pacjentek MMRd w grupie
Rak endometrioidny G1	49	7	4	14%
Rak endometrioidny G2	146	36	29	25%
Rak endometrioidny G3	6	1	1	17%
Rak surowiczy	8	2	1	25%
Rak jasnokomórkowy	4	0	0	0%
Rak mieszany	5	1	0	20%

Tabela 8. *Liczba pacjentek (wyrażona w wartościach bezwzględnych) oraz odsetek pacjentek ze stwierdzonym deficytem naprawy błędnie sparowanych zasad, MMRd (ang. Mismatch repair deficient) w materiale pochodzącym z guza endometrium w zależności od jego typu histologicznego. MMRd IHC – deficyt naprawy błędnie sparowanych zasad stwierdzony za pomocą panelu immunohistochemicznego. MSI RT-PCR - deficyt naprawy błędnie sparowanych zasad stwierdzony za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym na grupie pacjentek ze stwierdzonym MMRd metodą IHC.*

4.2. Zróżnicowanie ekspresji AMH

Poziom ekspresji AMH nie zależał od statusu MMRd **(*Tabela 9*)**, a redukcja zmiennych do najlepszego podzbioru **(*Tabela 10*)**, wskazuje, że poziom AMH zależał od średniego czasu karmienia piersią, indeksu BMI pacjentki, liczby poronień i typu nowotworu wg Bokhmana ($p < 0,05$).

Efekt	Średnia - Test naj. wiar. typu 1 (AMH_MMRd) Rozkład: NORMALNY F. wiążąca: LOG			
	Stopnie Swobody	Log-Naj.wiar	Chi-Kwadr.	p
Wyraz wolny	1	-138,606		
Średnia masa noworodka	1	-138,401	0,4106	0,521644
Średni czas KP	1	-134,366	8,0697	0,004501
OM	1	-134,165	0,4016	0,526256
BMI	1	-130,570	7,1907	0,007328
Porody	1	-130,379	0,3828	0,536083
Poronienia	1	-109,097	42,5638	0,000000
Cukrzyca	1	-119,148		
MMRd [IHC]	1	-118,680	0,9353	0,333477
Nadciśnienie	1	-112,518	12,3246	0,000447
Antykoncepcja hormonalna	0	-112,518	0,0000	
HTZ	1	-117,845		
Papierosy	0	-117,843	0,0038	
Typ nowotworu	4	-60,312	115,0617	0,000000

Tabela 9. *Poziom ekspresji hormonu anty-Müllerowskiego, AMH, model ogólny ze wszystkim efektami. KP – karmienie piersią, OM – ostatnia miesiączka, BMI – indeks masy ciała (ang. body mass index), MMRd – deficyt naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. Mismatch repair deficiency), IHC – immunohistochemia, HTZ – hormonalna terapia zastępcza. p - prawdopodobieństwo I rodzaju, tj. odrzucenia hipotezy zerowej.*

Efekt	Średnia - Test naj. wiar. typu 1 (AMH_MMRd) Rozkład: NORMALNY F. wiążąca: LOG			
	Stopnie Swobody	Log-Naj.wiar	Chi-Kwadr.	p
Wyraz wolny	1	-138,606		
Średnia masa noworodka	1	-138,401	0,41064	0,521644
Średni czas KP	1	-134,366	8,06975	0,004501
OM	1	-134,165	0,40162	0,526256
BMI	1	-130,570	7,19065	0,007328
Porody	1	-130,379	0,38285	0,536083
Poronienia	1	-109,097	42,56383	0,000000
Typ nowotworu	2	-90,579	37,03494	0,000000

Tabela 10. *Poziom ekspresji hormonu anty-Müllerowskiego, model z zastosowaną redukcją zmiennych do najlepszego podzbioru. KP – karmienie piersią, OM – ostatnia miesiączka, BMI – indeks masy ciała (ang. body mass index). p - prawdopodobieństwo I rodzaju, tj. odrzucenia hipotezy zerowej.*

4.3. Zróżnicowanie ekspresji AMHRII

Poziom ekspresji AMHRII, podobnie jak w przypadku AMH, nie zależał od statusu MSI-H **(*Tabela 11*)** a najlepiej dopasowany model sprowadza zależność ekspresji receptora AMH typu II tylko od typu nowotworu *(p* = 0,05664, na granicy istotności statystycznej).

Efekt	Średnia - Test naj. wiar. typu 3 (AMHR_MMRd) Rozkład: NORMALNY F. wiążąca: LOG			
	Stopnie Swobody	Log-Naj.wiar	Chi-Kwadr.	p
Średnia masa noworodka	1	-376,175	0,89766	0,343411
Średni czas KP	1	-375,942	0,43146	0,511275
OM	1	-375,727	0,00114	0,973119
BMI	1	-376,411	1,37011	0,241793
Porody	1	-375,822	0,19067	0,662360
Poronienia	1	-375,727	0,00144	0,969731
MMRd [IHC]	1	-375,756	0,05994	0,806584
Typ nowotworu	5	-381,100	10,74668	0,056640

Tabela 11. *Poziom ekspresji receptora typu II dla hormonu anty-Müllerowskiego, AMHRII, model ogólny ze wszystkimi efektami. Na czerwono zaznaczono typ nowotworu jako jedyny parametr wykazujący związek z ekspresją AMHRII na poziomie zbliżonym do granicy istotności statystycznej. KP – karmienie piersią, OM – ostatnia miesiączka, BMI – indeks masy ciała (ang. body mass index), MSI-H – wysoka niestabilność mikrosatelitarna (ang. microsatellite instability – high), IHC – immunohistochemia, HTZ – hormonalna terapia zastępcza. p - prawdopodobieństwo I rodzaju, tj. odrzucenia hipotezy zerowej.*

4.4. Zróżnicowanie statusu MMRd

Wszystkie badane zależności pomiędzy obecnością MMRd, a pozostałymi zmiennymi zakodowanymi jako dwustanowe, tj. porodami, występowaniem poronień, stosowaniem antykoncepcji hormonalnej, hormonalnej terapii zastępczej, cukrzycą typu 2, diagnozowanym nadciśnieniem były nieistotne statystycznie **(*Tabela 12*)**.

Zmienna		MMRd		Test dokładny Fishera
		(0)	(1)	*p*
Palenie	NIE	158	33	*0.382*
	TAK	22	2	
Nadciśnienie	NIE	72	11	*0.448*
	TAK	108	24	
Antykoncepcja hormonalna	NIE	176	35	*1.000*
	TAK	4	0	
Poronienia	NIE	148	25	*0.163*
	TAK	32	10	
Porody	NIE	20	1	*0.211*
	TAK	160	34	
Htz	NIE	165	32	*1.000*
	TAK	15	3	
Cukrzyca	NIE	138	26	*0.828*
	TAK	42	9	

Tabela 12. *Zależności pomiędzy zdiagnozowaną obecnością MMRd, a niezależnymi badanymi zmiennymi zakodowanymi jako dwustanowe testowane dwustronnym testem dokładnym Fishera. MMRd – deficyt systemu naprawy błędnie sparowanych zasad. (0) - nieobecne. (1) - obecne. HTZ – hormonalna terapia zastępcza. p - prawdopodobieństwo I rodzaju, tj. odrzucenia hipotezy zerowej.*

Prawdopodobieństwo obecności MMRd nie wiązało się z wiekiem pacjentki, liczbą porodów i wskaźnikiem BMI pacjentki (model całościowy: funkcja straty: 87.084; $\chi^2_{(df=6)}$=5.527; p=0.478), żadna ze zmiennych nie wykazywała istotnego powiązania z prawdopodobieństwem MMRd **(*Tabela 13*)**. Również modele budowane tylko dla pojedynczych zmiennych niezależnych wskazywały na nieistotność związku (wiek pacjentki: funkcja straty: 94.811; $\chi^2_{(df=1)}$=1.413; p=0.234; BMI pacjentki: funkcja straty: 95.479; $\chi^2_{(df=1)}$=0.078; p=0.779; liczba porodów: funkcja straty: 94.070; $\chi^2_{(df=1)}$=2.895; p=0.089). Prawdopodobieństwo obecności MMRd nie wiązało się z masą noworodka (funkcja straty: 89.720; $\chi^2_{(df=1)}$=0.255; p=0.614), ze średnim czasem karmienia piersią (funkcja straty: 95.517; $\chi^2_{(df=1)}$=0.0009; p=0.976), jak również liczbą poronień (funkcja straty: 95.022; $\chi^2_{(df=1)}$=0.991; p=0.320).

	Stała B0	Wiek matki	BMI	Liczba porodów	Liczba poronień	Masa noworodka	Średni czas karmienia piersią
Parametr regresji	-1.944	0.040	-0.011	0.151	0.320	-0.001	-0.151
Błąd standardowy	2.7683	0.0446	0.0328	0.1011	0.2855	0.0004	0.1011
-95% p.u.	-7.404	-0.048	-0.076	-0.048	-0.244	-0.001	-0.080
+95% p.u.	3.518	0.128	0.053	0.351	0.883	0.0003	0.043
Chi-kwadrat Walda	0.493	0.795	0.114	2.239	1.252	1.860	0.347
p	0.483	0.372	0.735	0.135	0.263	0.1735	0.556

Tabela 13. *Model regresji logistycznej wyjaśniającej prawdopodobieństwo obecności deficytu systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) [p (MMRd)=1] zależnie od wieku pacjentki, liczby porodów, liczby poronień, indeksu masy ciała (ang. body mass index, BMI), masy noworodka i średniego czasu karmienia piersią.*

Różnice pomiędzy obserwowanymi, a oczekiwanymi liczbami przypadków obecności statusu MMRd w wyróżnionych trzech kategoriach stopni zaawansowania nowotworów wg FIGO, wskazują na związek statystycznie istotny (ch-2-6.852; df=2, *p*=0.033), a obecność MMRd, była częściej notowana w przypadku stopnia FIGO I (IA i IB), natomiast rzadziej w wyższych stopniach zaawansowania **(*Tabela 14*)**. Obecność MMRd była także częściej obserwowana w przypadku raka endometrioidnego G2 w porównaniu do innych typów (test dokładny Fishera: *p*=0.047)**(*Tabela 15*)**.

MMRd	FIGO I	FIGO II	FIGO III & IV	Razem
0	130 (123.30) **6.70**	20 (23.26) **-3.26**	21 (25.83) **-4.83**	171
1	26 (32.70) **-6.70**	10 (6.74) **3.26**	11 (6.17) **4.83**	47
Razem	156	30	32	218

Tabela 14. *Różnice pomiędzy liczbą stwierdzonych i oczekiwanych przypadków występowania deficytu systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) zależnie od stopnia zaawansowania raka trzonu macicy wg Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa (FIGO). Zastosowano wersję testu chi-kwadrat Pearsona z poprawką na ciągłość. Różnice pomiędzy wartością obserwowaną i oczekiwaną oznaczono w tabeli kolorem czerwonym; liczebności obserwowane podano przed nawiasem; wartości obserwowane podano w nawiasie.*

MMRd	Rak endometrioidny G2	Pozostałe typy raka	Razem
0	107 (114.28) **-7.28**	64 (58.60) **5.40**	171
1	39 (31.72) **7.28**	8 (13.40) **-5.40**	47
Razem	146	72	218

Tabela 15. *Różnice pomiędzy liczbą stwierdzonych i oczekiwanych przypadków występowania deficytu systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) zależnie od typów histologicznych i stopnia dojrzałości raka endometrium. Zastosowano dwustronny test dokładny Fischera. Różnice pomiędzy*

wartością obserwowaną i oczekiwaną oznaczono w tabeli kolorem czerwonym; liczebności obserwowane podano przed nawiasem; wartości obserwowane podano w nawiasie.

5. Dyskusja

Określenie nowego, opartego na charakterystyce molekularnej, podziału raka endometrium rzuciło nowe światło na współczesne rozumienie patogenezy i przebiegu tego nowotworu. Wyróżnienie czterech grup: ultra-zmutowanej POLE, hyper-zmutowanej MMRd, z mutacją w genie TP53 i alteracjami molekularnymi z dużą ilością kopii oraz najliczniejszej, bez specyficznego wzoru molekularnego, stworzyło z jednej strony podstawy, a z drugiej szerokie możliwości do dociekań na temat innych uprzednio znanych czynników tak o potwierdzonym, jak i o niepewnym wpływie na rozwój i przebieg tej choroby.

W kontekście klasyfikacji molekularnej, raki endometrium należące do kategorii MMRd stanowią drugą, pod względem liczebności grupę, a ich częstość występowania w dużych badaniach kohortowych waha się od 22,8% do 30,7 % **[121, 127-129]**. Jednocześnie, pacjentki z alteracjami genetycznymi i epigenetycznymi w zakresie systemu MMR w guzie endometrium, stosunkowo łatwo jest wyodrębnić tanimi i prostymi metodami diagnostycznymi, takimi jak rekomendowany przez światowe towarzystwa naukowe panel immunohistochemiczny zawierający cztery typy przeciwciał: anty-MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 **[129]**. W dwóch, przeprowadzonych na dużych grupach pacjentek, badaniach prospektywnych **[130, 131]** oraz piętnastu retrospektywnych **[132-146]** stwierdzono, że korzyści z przeprowadzania identyfikacji grupy MMRd metodami IHC są nieporównywalnie wyższe od potencjalnych aspektów negatywnych takiego postępowania pod postacią np. przypadków zakwalifikowanych błędnie do grupy NSMP z powodu błędów technicznych barwień czy też suboptymalnej oceny uzyskanych reakcji. Ponadto, pomimo swoistości równej 100%, czułość innych, bardziej zaawansowanych metod biologii molekularnej, wśród których najprostszą i najbardziej dostępną wydaje się RT-PCR, jest znacznie niższa niż czułość IHC **[147, 148]**. W przypadku Idylla MSI Test, w ośmiu dostępnych analizach porównawczych, waha się ona dla raka endometrium w zakresie od 58% do 94%, przy czym dla raka jelita grubego czułość tej metody jest wyższa i zawiera się w przedziale 95-99,8% **[147-154]**. Przyjmując IHC za metodę referencyjną, wyniki badania Idylla MSI Test w grupie pacjentek objętych niniejszą analizą (n=218) nie odbiegają od wcześniej wspomnianych danych literaturowych . Status MMRd wyznaczony za pomocą IHC uzyskało 47 pacjentek, co odpowiada 21,56% całej grupy badanej, zaś za pomocą RT-PCR, Idylla MSI Test 35 pacjentek, co odpowiada 16,05% całej grupy. Zgodność oznaczeń RT-PCR z IHC oceniono zatem na 74,47%.

Raki endometrium w porównaniu do raków jelita grubego, znacznie częściej wykazują tylko minimalne zmiany w mikrosatelitach, obejmujące zaledwie jedno do trzech powtórzeń sekwencji w *locus* niestabilnym **[150, 155, 156]**. Fałszywie ujemne wyniki oznaczeń testem Idylla MSI obserwuje się zwłaszcza w przypadkach z mutacją germinalną w genie hMSH6. Tłumaczyć to można kilkoma zaobserwowanymi w licznych doniesieniach okolicznościami. Obrót komórkowy (ang. *epithelial turnover)* w nabłonku jelita grubego zachodzi w czasie krótszym niż w nabłonku gruczołowym endometrium, stąd liczba replikacji komórkowych zachodzących w jelicie jest większa, a w konsekwencji nieprawidłowe pętle insercyjno-delecyjne są dłuższe **[157, 158]**. Co więcej, niemal wszystkie (11/12 przypadków) obserwowane w niniejszym badaniu przypadki raków o statusie MMRd potwierdzonym w IHC, które w Idylla MSI Test uzyskały status MSS prezentowały niski stopień zaawansowania klinicznego FIGO (FIGO IA-FIGO II), co może oznaczać relatywnie niską sumaryczną liczbę podziałów komórkowych od momentu powstania raka, a tym samym oznaczać nie zwiększenie ogólnej liczby powtórzeń błędnie sparowanych zasad, a znacznie mniejszą liczbę powtórzeń nukleotydu lub sekwencji w obrębie pętli insercyjno-delecyjnych **[156]**. Ponadto, brak stuprocentowej zgodności, poza błędami technicznymi preparatyki, które zostały wykluczone, tłumaczyć można również specjalizacją poszczególnych heterodimerów systemu MMR. Kompleks MSH2-MSH6 zaangażowany jest w naprawę błędnego sparowania pojedynczej pary zasad i dwunukleotydowych pętli insercyjno-delecyjnych, podczas gdy MSH2-MSH3 odpowiedzialny jest za pętle dłuższe, składające się z 2-13 nukleotydów **[159]**. Ta, zaledwie drobna nieprawidłowość w MMR w zależności od czułości metody (IHC vs RT-PCR), zdaniem niektórych autorów, może oznaczać dodatni wynik (MMRd) w IHC, zaś w RT-PCR ujemny, przy czym sytuacja odwrotna zaobserwowana została w zaledwie 4-6% przypadków **[150, 159, 160]**.

Niewątpliwie, w aspekcie rewolucji w charakterystyce molekularnej raka endometrium, która rozpoczęła się w roku 2015 od doniesienia TCGA i jak się wydaje, nadal trwa, palącą staje się potrzeba odnalezienia i dopasowania roli w karcynogenezie dla wcześniej odkrytych czynników. Wśród nich, niezwykle ciekawą wydaje się ewentualna protekcyjna rola AMH i w powstawaniu i rozwoju tego nowotworu **[161]**. AMH, którego stężenie osoczowe koreluje z progesteronem i estradiolem, obecne jest w dzielących się komórkach endometrium i wykazuje potencjał proapoptotyczny **[162]**. Jego rola, jako inhibitora nadmiernie wyrażonej proliferacji endometrium w fazie wzrostu jest zauważalna u kobiet w wieku rozrodczym, zaś wraz z początkiem menopauzy stężenie AMH w surowicy wykazuje wartości bliskie zeru. Wydaje się więc, że hormon ten może wykazywać skuteczne działanie antagonistyczne

w stosunku do estrogenów, które w niezrównoważonym progesteronem nadmiarze mogą promować karcynogenezę. Dodatkowym potwierdzeniem takiego założenia jest też fakt, iż znakomita większość przypadków raka endometrium – 80,49%, zaobserwowana została u pacjentek po okresie menopauzy, ze średnią wieku 62,5 lat **[163]**, kiedy stężenie AMH w surowicy krwi spada poniżej granicy wykrywalności standardowymi metodami laboratoryjnymi. Mimo, że wiek nie jest jedynym czynnikiem determinującym ekspresję AMH w komórkach nabłonka gruczołowego endometrium, wyniki wskazują na brak obecności AMH w utkaniu raka u wszystkich chorych kobiet w wieku przedmenopauzalnym (0/24) **[55].** Można zatem stwierdzić, że AMH osoczowy i lokalny, tkankowy współpracują ze sobą w kontekście protekcyjnym chroniąc endometrium przed rozwojem raka. Wieloczynnikowość i wysoki poziom skomplikowania inicjacji i rozwoju raka endometrium znajduje również potwierdzenie w dość zaskakującym fakcie braku różnicy w ekspresji AMHRII w zależności od wieku pacjentek **[56, 164, 165]**, co skłania do konkluzji, że powiązania pomiędzy stężeniem AMH a poziomem ekspresji jego receptora pozostają pod wpływem innych zmiennych. W grupie badanej średni wiek zachorowania (61,7) nie odbiegał od danych światowych statystyk **[163, 166, 167]**, zaś pomiędzy statusem MMR a wiekiem pacjentek nie stwierdzono zależności *(p* = 0,372). Co więcej, w żadnym z badań kohortowych, wieloparametrowych przeprowadzonych na grupie pacjentek z rakiem endometrium MMRd wiek zachorowania nie różnił się w sposób istotny od wieku zachorowania na raka w ogóle **[163, 167]**. Wśród pacjentek ze stwierdzonym zespołem Lyncha, czyli wrodzonym defektem jednego lub kilku genów systemu MMR, rak endometrium jest stwierdzany średnio w wieku 50-59 lat **[168]**. Należy zaznaczyć, że w grupie molekularnej raków MMRd, stanowiącej 20-30% wszystkich raków endometrium **[169]**, zawierają się również te przypadki, w których niestabilność mikrosatelit ma podłoże epigenetyczne lub mutacja w genach MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2 ma charakter sporadyczny. Zaledwie 5% wszystkich zachorowań na raka endometrium stanowią pacjentki z zespołem Lyncha **[170]**. Świadomość statystyki występowania dziedzicznego deficytu systemu MMR pozwala na zrozumienie różnic w wieku zachorowania na raka endometrium we wspomnianych grupach i tłumaczy wynik niniejszego badania.

Ponieważ wysoki, niezrównoważony progestagenami poziom estrogenów ma udowodniony, niezaprzeczalny, prokarcynogenny wpływ na błonę śluzową trzonu macicy, każdy z czynników zmniejszających całkowity czas ekspozycji endometrium na nie, może potencjalnie hamować promocję i rozwój raka **[12, 13, 171]**. Mechanizmy endokrynne wywołujące i sterujące procesem laktacji należą do jednych z najbardziej złożonych sieci zależności hormonalnych. Substancją kluczową jest prolaktyna, której wydzielanie regulowane

jest w mechanizmie auto- i parakrynnym m.in.. przez oksytocynę, serotoninę czy histaminę, zaś endokrynnie, na poziomie podwzgórza i przysadki przez dopaminę, z modulującym wpływem hormonów jajnikowych przez dopaminę, z modulującym wpływem estrogenów i progesteronu **[172]**. Wywoływana wysokim poziomem prolaktyny supresja wydzielania estrogenu wydaje się być, w kontekście skrócenia całkowitego czasu ekspozycji na niego, mechanizmem istotnym w zapobieganiu rozwojowi raka endometrium **[173]**. W trzech dużych metaanalizach badających wnioski z różnych badań kohortowych, obejmujących łącznie 783356 kobiet, z których 6452 rozwinęło raka endometrium stwierdzono, że całkowity czas karmienia piersią ujemnie koreluje z ryzykiem rozwinięcia tego nowotworu, zmniejszając je o ok. 11% **[174-176]**. Zgodnie z tymi danymi, zakładając protekcyjną rolę AMH w karcynogenezie, osoczowy poziom tego hormonu powinien być tym wyższy, im dłuższy był całkowity okres laktacji. Ta teoria, nie znajduje potwierdzenia w doniesieniu amerykańskim (n=2419; p=0,009), gdzie pomimo znacząco większej grupy badanych, również w zakresie dzietności, wyniki analiz nie korelują z poziomem AMH **[177]**. Polemikę z danymi amerykańskimi stanowi badanie przeprowadzone na mniejszej grupie badawczej **[55]**, w którym wykazano, że ekspresja AMH w utkaniu raka endometrium rośnie istotnie pod warunkiem co najmniej 10-cio miesięcznego czasu karmienia piersią.

Dane dotyczące związku karmienia piersią a poziomu ekspresji AMHRII i statusu MMR w raku endometrium są bardzo skąpe. Analizy kohortowe, w tym niniejsza, nie ujawniły jak dotąd takich korelacji **[169, 170]**. Wydaje się zatem, że w aspekcie jakościowym, jak i ilościowym obecność AMHRII na komórkach tego nowotworu podlega innym czynnikom regulującym i tak jak deficyt systemu naprawy błędnie sparowanych zasad pozostaje niezależną od czasu karmienia piersią.

Szerokie zastosowanie pomiarów poziomu AMH w diagnostyce niepłodności a zwłaszcza w określaniu tzw. rezerwy jajnikowej, doprowadziło do badań nad potencjalnym znaczeniem poziomu AMH w nawracających poronieniach zwanych “nawykowymi”. Bez względu na wiek pacjentki oraz zagnieżdżenie zarodka czy brak zagnieżdżenia, ten rodzaj niepowodzeń położniczych związany był ze znacząco wyższym, niż w populacji ogólnej, poziomem AMH **[178-181]**. Dostępne analizy wskazują na nieliniową, ujemną korelację między dzietnością, rozumianą jako całkowita liczba żywych urodzeń, a ryzykiem rozwoju raka trzonu macicy **[182, 183]**. Tylko nieliczni autorzy w swoich pracach używają pojęcia nie dzietności, lecz całkowitej liczby ciąż, rozróżniając przy tym te zakończone poronieniem i urodzeniem martwym, od zakończonych urodzeniem żywym. Jak do tej pory, brak jest wiarygodnych dowodów na bezpośredni związek poronień z rozwojem raka endometrium. Trzy

na cztery badania kohortowe wskazują na brak korelacji między liczbą poronień a ryzykiem rozwoju raka macicy **[184-186]**, zaś pomimo, że w jednym z nich wskazano, że ryzyko to jest niższe o 13%, to porównywane dwie grupy pacjentek składały się z kobiet, które w swojej historii położniczej miały jedynie wczesne poronienia, bez urodzeń (żywych czy martwych) oraz z kobiet nigdy nie będących w ciąży **[187]**. W tym kontekście, w wyselekcjonowanej z całej puli badanych pacjentek (n = 218), podgrupie z historią poronień (n=42), rola wysokiej ekspresji AMH jest nadal zagadkowa i wymaga dalszych badań przeprowadzonych na znacznie większej próbie.

Spośród czynników o dobrze udokumentowanym, kancerogennym wpływie na endometrium, szczególne miejsce zajmuje nadwaga i otyłość **[188]**. Śledząc europejskie i światowe dane epidemiologiczne obrazujące odsetek populacji kobiet z BMI >25 w poszczególnych krajach na przestrzeni ostatnich 10 lat, należy dojść do wniosku, że średnia masa ciała w społeczeństwach krajów uznawanych przez ONZ za rozwinięte stale rośnie **[189]**. Co więcej, gdy porówna się dane dotyczące otyłości ze statystykami zachorowalności na raka endometrium **[190]**, okazuje się, że trend wzrostowy obu tych parametrów w ujęciu globalnym, jest niemalże wprost proporcjonalny, co podkreśla silną rolę hiperestrogenizmu powodowanego nadmiernie obfitą tkanką tłuszczową w rozwoju raka trzonu macicy. Należy jednak zaznaczyć, że etiologia i przebieg tego nowotworu są złożone i wieloczynnikowe, o czym świadczyć mogą doniesienia udowadniające lepszą przeżywalność pacjentek z rakiem endometrium dotkniętych jedynie otyłością, w porównaniu do pacjentek z rakiem trzonu macicy, oraz otyłością i cukrzycą typu 2 **[191-194]**. W metaanalizie obejmującej 13 badań kohortowych, łącznie 1214 kobiet, z czego 403 spełniały kryteria otyłości według WHO (BMI >30), w 5/13 prac stwierdzono odwrotnie proporcjonalną zależność stężenia AMH w surowicy krwi od masy ciała. Jednak, pomimo że w większości z analizowanych badań (8/13) takiej zależności nie stwierdzono, zaznacza się, że każde z tych badań osobno, przeprowadzone zostało na małej grupie kobiet, więc nie jest możliwym wyciągnięcie z tych prac jednoznacznych wniosków **[195]**. Niniejsze badanie, swoimi wynikami przychyla się do opinii, że otyłość związana jest z wyższą, niż u kobiet o prawidłowej masie ciała, ekspresją AMH w raku endometrium.

Wśród badaczy nie ma zgodności, co do związku otyłości ze statusem MMRd w raku trzonu macicy. W analizach przeprowadzonych przez cztery niezależne ośrodki stwierdzono istotną statystycznie większą częstość występowania raków MSS u pacjentek otyłych **[196-199]**. Należy tu zaznaczyć, że w 3/4 badaniach grupy były o około 50% mniejsze niż w niniejszej analizie, zaś jedynie w badaniu McCourt i wsp.(2007) grupa obejmowała 473 pacjentki z rakiem trzonu macicy. Wyniki przeciwstawne przedstawiła grupa kanadyjska

porównując 525 kobiety z tym nowotworem i 1052 kobiety zdrowe **[200]**. W badaniach Amankwah i wsp.(2013) otyłość częściej występowała u pacjentek z grupy MMRd. Niniejsze badanie nie wykazało istotnego statystycznie związku między BMI a statusem systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (p = 0,779). Tłumaczyć to można liczebnością grupy badanej (n = 218), pośrednią wobec wspomnianych analiz oraz homogennością etniczną grupy **[201]**.

Przedmiotem kontrowersji pozostaje zależność poziomu ekspresji AMH i AMHRII od typu histologicznego raka endometrium, określonego według 5 edycji Klasyfikacji Guzów Nowotworowych WHO. W niniejszym badaniu stwierdzono istotną statystycznie zależność, p<0,001 dla AMH i zbliżoną do granicy istotności statystycznej, p=0.056 zależność dla AMHRII. Najwyższy średni poziom ekspresji AMH stwierdzono w raku jasnokomórkowym a całkowity brak ekspresji odnotowano w rakach surowiczym, endometrioidnym G3 i mieszanym. Najwyższą średnią ekspresją AMHRII charakteryzują się w badanej grupie raki mieszane i jasnokomórkowe, natomiast najniższą raki endometrioidne G1. Dane literaturowe dotyczące związku hormonu anty-Müllerowskiego i jego receptora z typem histologicznym raka endometrium są bardzo skąpe. W pracy Dogana i wsp. (2015) zgłębiającej m.in. tą zależność choć średnie wartości ekspresji AMH, jak i AMHRII, zostały określone jako najwyższe w rakach typu II według Bokhmana – rakach nieendometrioidnych, to poziom istotności statystycznej nie pozwala na uznanie takiej korelacji za pewną (p=0,352 dla AMH i p=0,699 dla AMHRII). Podobna konkluzja dotyczyła stopnia dojrzałości histologicznej raka endometrioidnego. Tak, jak i w niniejszym badaniu, średni poziom ekspresji AMH w opisywanym opracowaniu Dogana kształtował się na poziomie podobnym dla wszystkich raków endometrioidnych, niezależnie od stopnia dojrzałości histologicznej (p=0,127), a w kontekście średniego poziomu ekspresji AMHRII, najniższą wykazywały guzy dobrze zróżnicowane, choć i tu autor nie znalazł istotności statystycznej (p=0,285) **[165]**. Należy zaznaczyć, że zarówno w niniejszej, jak i wyżej przytaczanej pracy, grupy pacjentek z rzadkimi typami raka endometrium (np. jasnokomórkowym) były nieliczne, a przez to wiarygodność wyników i danych statystycznych jest wątpliwa i wymaga potwierdzenia przez badania przeprowadzone na dużej grupie przypadków, podzielonej na równoliczne pod względem typu histologicznego i stopnia zróżnicowania raka podgrupy. Taki projekt badawczy pomimo swojej atrakcyjności, z uwagi na niską zachorowalność na niektóre z typów histologicznych, wydaje się trudny do realizacji na poziomie pozwalającym na wyciągnięcie wiarygodnych danych statystycznych.

Dostępne analizy wykonane zarówno na małych (Dougleraki i wsp. (2019) *n*= 101), jak i dużych grupach pacjentek (Amankwah i wsp. (2013) *n* = 524) zgodnie potwierdzają, że typ I raków endometrium wg Bokhmana znacząco przeważa nad typem II w kontekście deficytu systemu błędnie sparowanych zasad **[169, 196, 198-200]**. Potwierdzają to również wyniki niniejszej analizy (p = 0,047), gdzie wśród pacjentek ze stwierdzonym dMMR aż 93,6% (44/47) stanowił typ I wg Bokhmana, a znacząca większość spośród tych przypadków (83%; 39/47) prezentowała pośredni stopień dojrzałości histologicznej wg FIGO (G2). Część autorów polemizuje z dostępnymi statystykami twierdząc, że raki mieszane, surowicze czy jasnokmórkowe z deficytem systemu MMR mogły zostać błędnie ocenione, a w rzeczywistości stanowić nisko dojrzałe raki endometrioidne z wieloogniskową, rozlaną metaplazją upodabniającą je do raków nieendometrioidnych. Nieprawidłowa ocena histopatologiczna w takich przypadkach wynika zwykle z niejednoznacznej morfologii komórek raka oraz dużego stopnia atypii komórkowej przypominającej tą, która charakteryzuje raka surowiczego **[198]**.

Związki AMH, AMHRII ze stopniem zaawansowania raka endometrium pozostają wątpliwe. Zaledwie jedno badanie potwierdza korelację pomiędzy zajęciem szyjki macicy, a więc stopniem FIGO II a podwyższonym poziomem osoczowego AMH, jednocześnie stwierdzając, że w miarę postępu choroby, w wyższych stopniach zaawansowania poziom ten ponownie się obniża **[165]**. Należy podkreślić, że wspomniane badanie przeprowadzone zostało na małej grupie pacjentek (n = 51), a ponadto brano w nim pod uwagę stężenie osoczowe AMH, pomijając jego ekspresję w komórkach raka. Natomiast niniejsza analiza, nie potwierdza związku ekspresji AMH ani AMHRII ze stopniem zaawansowania nowotworu.

Dane pochodzące od różnych grup badawczych, a dotyczące korelacji między statusem MMRd a stopniem zaawansowania raka trzonu macicy są sprzeczne. Przeważająca część analiz, w tym niniejsza, dostrzega, iż raki ograniczone do trzonu macicy (FIGO I) częściej niż guzy ją przekraczające, wykazuje deficyt w systemie naprawy błędnie sparowanych zasad (p = 0,033). Trzy obszerne, wieloparametrowe badania **[169, 196, 202]** wskazują niezależnie, że choć brak jest zgodności w kwestii klasyfikacji pacjentek do podgrup wyniki pozostają podobne. Podczas gdy Doghri i wsp. (2019) dzieli pacjentki na podgrupę ze stwierdzonym zespołem Lyncha i tą ze sporadycznym deficytem MMR **[202]**, Nagle i wsp. (2018) oraz Gonzalez Villa i wsp. (2022) rozpatrują zależność stopnia zaawansowania od statusu MMR nie różnicując grupy ze względu na pierwotne jego podłoże **[169, 196]**. Niniejsze badanie przychyla się do rozpatrywania grupy MMRd jako całości, gdyż pośrednim jego celem jest charakteryzacja deficytu MMR jako wspólnej cechy pewnej grupy raków endometrium, heterogennej pod względem podstaw molekularnych powstania tej cechy. Dougleraki

i wsp.(2019) w swoich badaniach nie stwierdził związku między stopniem zaawansowania a statusem MMR, natomiast na podkreślenie zasługuje fakt, iż rozpatrywaną w tej analizie grupę badawczą stanowiły jedynie raki endometrioidne o niskim stopniu dojrzałości histologicznej (FIGO G3) i raki nieendometrioidne, co w kontekście opisanej już zależności MMRd od typu histologicznego może wyjaśniać taki wynik **[198]**. Badania przeprowadzone przez Gordhandas i wsp.(2020) oraz Pina i wsp.(2018) przeczą przedstawionym wyżej, stwierdzając istotną statystycznie (odpowiednio: $p < 0{,}01$ i $p < 0{,}001$) przewagę raków o wysokim stopniu zaawansowania w grupie MMRd **[127, 203]**. Analizy te oparte były o znacząco większe grupy badawcze (odpowiednio: $n = 1612$ i $n = 245$), a ponadto obaj autorzy różnicują raki MMRd ze względu na rodzaj zaburzenia molekularnego powodującego deficyt. Jak się wydaje, istnieje duża potrzeba przeprowadzenia dalszych badań na większej grupie aby ostatecznie rozstrzygnąć ten problem.

6. Wnioski

1. Brak jest zależności pomiędzy statusem deficytu systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) a ekspresją receptora typu II dla hormonu anty- Müllerowskiego (AMRHII) i hormonu anty- Müllerowskiego (AMH) w raku endometrium.

2. Na brak korelacji pomiędzy statusem deficytu systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) a ekspresją receptora typu II dla hormonu anty- Müllerowskiego (AMRHII) i hormonu anty- Müllerowskiego (AMH) w raku endometrium, nie wpływają żadne z badanych zmiennych tj. wiek pacjentki, BMI, wiek ostatniej miesiączki, stosowanie antykoncepcji hormonalnej, stosowanie hormonalnej terapii zastępczej, liczba porodów i poronień, średnia masa urodzeniowa dziecka probantki, czas karmienia piersią, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca typu 2 czy palenie papierosów.

3. W grupie pacjentek operowanych z powodu raka endometrium w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym w Olsztynie w latach 2006-2010, defiicyt systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd) stwierdzono za pomocą immunohistochemii u 47/218 pacjentek, tj. 21,56%, a potwierdzenie tego statusu za pomocą RT-PCR uzyskano u 35/218 pacjentek, tj. 16,05%.

4. Status MMRd najczęściej występował u pacjentek z rakiem endometrioidnym (typ I Bokhmana), w tym najczęściej w raku endometrioidnym o średnim stopniu dojrzałości histologicznej (FIGO G2). Rak endometrium ze statusem MMRd najczęściej prezentował niski stopień zaawansowania (FIGO I). Pozostałe zmienne jakościowe i ilościowe pozostawały bez związku ze statusem systemu naprawy błędnie sparowanych zasad.

5. W grupie badanej 218 pacjentek, za pomocą panelu immunnohistochemicznego składającego się z czterech przeciwciał (anty-MLH1, anty-MSH2, anty-MSH6 i anty-PMS2) stwierdzono deficyt systemu naprawy błędnie sparowanych zasad u 47 pacjentek, co stanowi 21,56% całej grupy. Przy pomocy zamkniętego, automatycznego systemu Idylla MSI Test, w grupie pacjentek ze statusem MMRd oznaczonym immunohistochemicznie, status ten potwierdzono w 35 przypadkach co stanowi 16,05% całej grupy badanej. Zgodność wyników dwóch zastosowanych metod wynosi 74,47% (35/47).

7. Spis rycin i tabel

Ryciny:

Rycina 1. *Narządy płciowe wewnętrzne u płci żeńskiej, około 8 tygodnia ciąży.*

Rycina 2. *Budowa histologiczna błony śluzowej trzonu macicy.*

Rycina 3. *Cykl menstruacyjny.*

Rycina 4. *Rak endometrioidny o różnych stopniach dojrzałości histologicznej wg FIGO*

Rycina 5. *Przykłady raków endometrium określanych jako Typ II wg Bokhmana*

Rycina 6. *Algorytm diagnostyczny zintegrowanego histopatologiczno-molekularnego rozpoznania raka endometrium.*

Rycina 7. *Szlak sygnalizacyjny hormonu anty-Mullerowskiego.*

Rycina 8. *Uproszczona struktura przestrzenna receptora dla hormonu anty-Mullerowskiego, typu II.*

Rycina 9. *Schemat prawidłowego rozpoznawania i naprawy błędnie sparowanych zasad.*

Rycina 10. *Algorytm kwalifikacji materiału do oceny statusu mechanizmu naprawy błędnie sparowanych zasad metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym.*

Rycina 11. *Przykładowy raport skrócony wykonanego testu "Idylla MSI Test".*

Rycina 12. *Przykłady odczynu barwnego, cytoplazmatycznego uzyskanego metodą IHC z wykorzystaniem przeciwciał anty-AMH.*

Rycina 13. *Przykłady odczynu barwnego, cytoplazmatyczno-błonowego uzyskanego metodą IHC z wykorzystaniem przeciwciał anty-AMHRII.*

Rycina 14. *Przykłady odczynu barwnego, jądrowego uzyskanego metodą IHC z wykorzystaniem przeciwciał anty-MLH1 i anty-MSH2.*

Rycina 15. *Przykłady odczynu barwnego, jądrowego uzyskanego metodą IHC z wykorzystaniem przeciwciał anty-MSH6 i anty-PMS2.*

Tabele:

Tabela 1. *Zestawienie analizowanych zmiennych jakościowych dla grupy badanej.*

Tabela 2. *Zestawienie analizowanych zmiennych ilościowych, zakresy ich wartości, wartość średnią i medianę wartości obserwowanych w grupie badanej.*

Tabela 3. *Skala IRS wg Remmele i Stegnera*

Tabela 4. *Algorytm oceny odczynu immunohistochemicznego panelu Ventana MMR RxDx*

Tabela 5. *Algorytm walidacji przydatności diagnostycznej preparatu barwionego metodą IHC.*

Tabela 6. *Wartości ekspresji AMH w poszczególnych podgrupach zróżnicowanych ze względu na typ histologiczny raka endometrium.*

Tabela 7. *Wartości ekspresji AMHRII w poszczególnych podgrupach zróżnicowanych ze względu na typ histologiczny raka endometrium.*

Tabela 8. *Liczba pacjentek oraz odsetek pacjentek ze stwierdzonym deficytem naprawy błędnie sparowanych zasad.*

Tabela 9. *Poziom ekspresji AMH, model ogólny ze wszystkimi efektami.*

Tabela 10. *Poziom ekspresji AMH, model z zastosowaną redukcją zmiennych do najlepszego podzbioru.*

Tabela 11. *Poziom ekspresji AMHRII, model ogólny ze wszystkimi efektami.*

Tabela 12. *Zależności pomiędzy zdiagnozowaną obecnością MMRd, a niezależnymi badanymi zmiennymi zakodowanymi jako dwustanowe testowane dwustronnym testem dokładnym Fishera.*

Tabela 13. *Model regresji logistycznej wyjaśniającej prawdopodobieństwo obecności MMRd zależnie od zmiennych ilościowych.*

Tabela 14. *Różnice pomiędzy liczbą stwierdzonych i oczekiwanych przypadków występowania MMRd zależnie od stopnia zaawansowania raka trzonu macicy wg FIGO*

Tabela 15. *Różnice pomiędzy liczbą stwierdzonych i oczekiwanych przypadków występowania MMRd zależnie od typów histologicznych i stopnia dojrzałości raka endometrium.*

8. Bibliografia

[1] Cunha GR, Baskin L. *Development of human male and female urogenital tracts.* Differentiation. 2018 Sep-Oct;103:1-4.

[2] Moncada-Madrazo M, Rodríguez Valero C. *Embryology, Uterus*. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.

[3] Mahadevan H, Ellis V . *Clinical anatomy applied anatomy for students and junior doctors* (13th ed.). 2013 Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.

[4] Nizić D, Pervan M, Kos I, Šimunović M, *Flexion and version of the uterus on pelvic ultrasound examination*. Acta Med Croatica. 2014 Jun;68(3):311-5.

[5] Deligdisch L, *Hormonal pathology of the endometrium.* Mod Pathol. 2000 Mar;13(3):285-94.

[6] Ferenczy A, Bergeron C. *Histology of the human endometrium: from birth to senescence.* Ann N Y Acad Sci. 1991;622:6-27.

[7] Gunn HM, Tsai MC, McRae A, Steinbeck KS. *Menstrual Patterns in the First Gynecological Year: A Systematic Review.* J Pediatr Adolesc Gynecol. 2018 Dec;31(6):557-565.e6.

[8] ECIS - European Cancer Information System From https://ecis.jrc.ec.europa.eu, accessed on 01/06/2023 © European Union, 2022

[9] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. *Cancer statistics for the year 2020: An overview.* Int J Cancer. 2021 Apr 5.

[10] Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, Jemal A. *International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence*, 1978-2013. J Natl Cancer Inst. 2018 Apr 1;110(4):354-361.

[11] Wojciechowska U, Didkowska J, *Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce.* Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. Dostępne na stronie http://onkologia.org.pl/raporty/ dostęp z dnia 01/06/2023.

[12] Raglan O, Kalliala I, Markozannes G, Cividini S, Gunter MJ, Nautiyal J, Gabra H, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Tsilidis KK, Kyrgiou M. *Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature.* Int J Cancer. 2019 Oct 1;145(7):1719-1730.

[13] Wijayabahu AT, Egan KM, Yaghjyan L. *Uterine cancer in breast cancer survivors: a systematic review.* Breast Cancer Res Treat. 2020 Feb;180(1):1-19.

[14] Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A. *Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis.* Diabetologia. 2007 Jul;50(7):1365-74.

[15] Terry P, Baron JA, Weiderpass E, Yuen J, Lichtenstein P, Nyrén O. *Lifestyle and endometrial cancer risk: a cohort study from the Swedish Twin Registry.* Int J Cancer.1999 Jul 2;82(1):38-42.

[16] Anderson KE, Anderson E, Mink PJ, Hong CP, Kushi LH, Sellers TA, Lazovich D, Folsom AR. *Diabetes and endometrial cancer in the Iowa women's health study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Jun;10(6):611-6.

[17] Luo J, Beresford S, Chen C, Chlebowski R, Garcia L, Kuller L, Regier M, Wactawski-Wende J, Margolis KL. *Association between diabetes, diabetes treatment and risk of developing endometrial cancer.* Br J Cancer. 2014 Sep 23;111(7):1432-9.

[18] Cohen A, Tsur Y, Tako E, Levin I, Gil Y, Michaan N, Grisaru D, Laskov I. *Incidence of endometrial carcinoma in patients with endometrial intraepithelial neoplasia versus atypical endometrial polyp.* Int J Gynecol Cancer. 2022 Dec 8:ijgc-2022-003991.

[19] Beavis AL, Blechter B, Najjar O, Fader AN, Katebi Kashi P, Rositch AF. *Identifying women 45 years and younger at elevated risk for endometrial hyperplasia or cancer*. Gynecol Oncol. 2023 May 10;174:98-105.

[20] Garuti G, Sagrada PF, Frigoli A, Fornaciari O, Finco A, Mirra M, Soligo M. *Hysteroscopic biopsy compared with endometrial curettage to assess the preoperative rate of atypical hyperplasia underestimating endometrial carcinoma.* Arch Gynecol Obstet. 2023 May 9.

[21] Buza N. *Immunohistochemistry in gynecologic carcinomas: Practical update with diagnostic and clinical considerations based on the 2020 WHO classification of tumors.* Semin Diagn Pathol. 2022 Jan;39(1):58-77.
[22] Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, Parkash V, Carlson J, McCluggage WG, Gilks CB. *Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists.* Int J Gynecol Pathol. 2019 Jan;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S64-S74.
[23] Bokhman JV. *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma.* Gynecol Oncol. 1983 Feb;15(1):10-7.
[24] Mitric C, Bernardini MQ. *Endometrial Cancer: Transitioning from Histology to Genomics.* Curr Oncol. 2022 Jan 31;29(2):741-757.
[25] Gilks CB, Oliva E, Soslow RA. *Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma.* Am J Surg Pathol. 2013 Jun;37(6):874-81.
[26] Cancer Genome Atlas Research Network; Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma.* Nature. 2013 May 2;497(7447):67-73. Erratum in: Nature. 2013 Aug 8;500(7461):242.
[27] Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, Yang W, Senz J, Boyd N, Karnezis AN, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN. *A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers.* Br J Cancer. 2015 Jul 14;113(2):299-310.
[28] Bosse T, Nout RA, McAlpine JN, McConechy MK, Britton H, Hussein YR, Gonzalez C, Ganesan R, Steele JC, Harrison BT, Oliva E, Vidal A, Matias-Guiu X, Abu-Rustum NR, Levine DA, Gilks CB, Soslow RA. *Molecular Classification of Grade 3 Endometrioid Endometrial Cancers Identifies Distinct Prognostic Subgroups.* Am J Surg Pathol. 2018 May;42(5):561-568.
[29] Kommoss S, McConechy MK, Kommoss F, Leung S, Bunz A, Magrill J, Britton H, Kommoss F, Grevenkamp F, Karnezis A, Yang W, Lum A, Krämer B, Taran F, Staebler A, Lax S, Brucker SY, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN, Talhouk A. *Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series.* Ann Oncol. 2018 May 1;29(5):1180-1188.
[30] Josso N. *Professor Alfred Jost: the builder of modern sex differentiation.* Sex Dev. 2008;2(2):55-63.
[31] Victoria M, Labrosse J, Krief F, Cédrin-Durnerin I, Comtet M, Grynberg M. *Anti Müllerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function.* J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2019 Jan;48(1):19-24.
[32] Rzeszowska M, Leszcz A, Putowski L, Hałabiś M, Tkaczuk-Włach J, Kotarski J, Polak G. *Anti-Müllerian hormone: a critical factor for female fertility and reproductive health.* Ginekol Pol. 2016;87(7):532-7.
[33] Josso N, Picard JY. *Genetics of anti-Müllerian hormone and its signaling pathway.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2022 Jan;36(1):101634.
[34] Tzavlaki K, Moustakas A. *TGF-β Signaling*. Biomolecules. 2020 Mar 23;10(3):487.
[35] Umer S, Sammad A, Zou H, Khan A, Weldegebriall Sahlu B, Hao H, Zhao X, Wang Y, Zhao S, Zhu H. *Regulation of AMH, AMHR-II, and BMPs (2,6) Genes of Bovine Granulosa Cells Treated with Exogenous FSH and Their Association with Protein Hormones.* Genes (Basel). 2019 Dec 12;10(12):1038.
[36] Goder V, Spiess M. *Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics.* FEBS Lett. 2001 Aug 31;504(3):87-93.
[37] Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. *Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger*

ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. Endocrinology. 1995 Nov;136(11):4951-62.
[38] Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, De Rooij DG, Parvinen M, Themmen AP, Grootegoed JA. *Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat.* Endocrinology. 1995 Dec;136(12):5614-22.
[39] di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R. *Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone.* Mol Endocrinol. 1994 Aug;8(8):1006-20.
[40] Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC, Picard JY, Xavier F. *Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin.* Development. 2000 Aug;127(15):3349-60.
[41] Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferré A, Huhtaniemi I, Josso N, di Clemente N. *Receptors for anti-müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jan 20;95(2):594-9.
[42] Kanakatti Shankar R, Dowlut-McElroy T, Dauber A, Gomez-Lobo V. *Clinical Utility of Anti-Mullerian Hormone in Pediatrics*. J Clin Endocrinol Metab. 2022 Jan 18;107(2):309-323.
[43] Arnanz A, Bayram A, Elkhatib I, Abdala A, El-Damen A, Patel R, Lawrenz B, Melado L, Fatemi H, De Munck N. *Antimüllerian hormone (AMH) and age as predictors of preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) cycle outcomes and blastocyst quality on day 5 in women undergoing in vitro fertilization (IVF).* J Assist Reprod Genet. 2023 May 5.
[44] Iwase A, Osuka S, Goto M, Murase T, Nakamura T, Takikawa S, Kikkawa F. *Clinical application of serum anti-Müllerian hormone as an ovarian reserve marker: A review of recent studies.* J Obstet Gynaecol Res. 2018 Jun;44(6):998-1006.
[45] Royland Marpaung F, Surya Priyanto A, Ayu Kusumawati F, Soehita S, Aryati. *Determination of serum anti-Mullerian hormone levels in a low-prognosis women treated in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: A cohort study.* Int J Reprod Biomed. 2023 Apr 14;21(3):255-262.
[46] Kitajima M, Kajimura I, Kitajima Y, Murakami N, Matsumura A, Matsumoto K, Harada A, Hasegawa Y, Miura K. *AMH producing purely cystic virilizing adult granulosa cell tumor in 17 years old girl: a case report and review of literatures.* J Ovarian Res. 2023 Mar 15;16(1):52.
[47] Li X, Tian B, Liu M, Miao C, Wang D. *Adult-type granulosa cell tumor of the ovary.* Am J Cancer Res. 2022 Aug 15;12(8):3495-3511.
[48] Chen S, Yang B, Fan J. *Diagnostic value of Anti-Mullerian hormone in ovarian granulosa cell tumor: A meta-analysis.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2020 Oct;253:266-272.
[49] de Campos Vieira Abib S, Chui CH, Cox S, Abdelhafeez AH, Fernandez-Pineda I, Elgendy A, Karpelowsky J, Lobos P, Wijnen M, Fuchs J, Hayes A, Gerstle JT. *International Society of Paediatric Surgical Oncology (IPSO) Surgical Practice Guidelines.* E-cancer medical science. 2022 Feb 17;16:1356.
[50] Parry RL, Chin TW, Epstein J, Hudson PL, Powell DM, Donahoe PK. *Recombinant human mullerian inhibiting substance inhibits human ocular melanoma cell lines in vitro and in vivo.* Cancer Res. 1992 Mar 1;52(5):1182-6.
[51] Hoshiya Y, Gupta V, Segev DL, Hoshiya M, Carey JL, Sasur LM, Tran TT, Ha UT, Maheswaran S, *Mullerian Inhibiting Substance induces NFkB signaling in breast and prostate cancer cells,* Molecular and Cellular Endocrinology,Volume 211, Issues 1–2,2003,Pages 43-49.
[52] Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P, Jung M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S. *Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway.* J Biol Chem. 2000 Sep 15;275(37):28371-9.

[53] Barbie TU, Barbie DA, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Donahoe PK. *Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23;100(26):15601-6.
[54] Chauvin M, Garambois V, Colombo PE, Chentouf M, Gros L, Brouillet JP, Robert B, Jarlier M, Dumas K, Martineau P, Navarro-Teulon I, Pépin D, Chardès T, Pèlegrin A. *Anti-Müllerian hormone (AMH) autocrine signaling promotes survival and proliferation of ovarian cancer cells*. Sci Rep. 2021 Jan 26;11(1):2231.
[55] Gowkielewicz M, Lipka A, Piotrowska A, Szadurska-Noga M, Nowakowski JJ, Dzięgiel P, Majewski MK, Jozwik M, Majewska M. *Anti-Müllerian Hormone Expression in Endometrial Cancer Tissue.* Int J Mol Sci. 2019 Mar 15;20(6):1325.
[56] Gowkielewicz M, Lipka A, Majewska M, Piotrowska A, Szadurska-Noga M, Nowakowski JJ, Wiszpolska M, Dzięgiel P, Wasniewski T, Majewski MK, Jozwik M. *Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor Expression in Endometrial Cancer Tissue.* Cells. 2020 Oct 17;9(10):2312.
[57] Kim, S.M., Kim, Y.O., Lee, M.K., Chung, Y.J., Jeung, I.C., Kim, M.R., & Kim, J.H. *Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone type II receptor protein and mRNA expression in the healthy and cancerous endometria.* Oncology Letters, (2019) 17, 532-538.
[58] Deshayes E, Ladjohounlou R, Le Fur P, Pichard A, Lozza C, Boudousq V, Sevestre S, Jarlier M, Kashani R, Koch J, Sosabowski J, Foster J, Chouin N, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Kotzki PO, Navarro-Teulon I, Pouget JP. *Radiolabeled Antibodies Against Müllerian-Inhibiting Substance Receptor, Type II: New Tools for a Theranostic Approach in Ovarian Cancer.* J Nucl Med. 2018 Aug;59(8):1234-1242.
[59] Dubová O, Zikán M. *Anti-Müllerian hormone - clinical use and future possibilities.* Ceska Gynekol. 2023;88(2):126-130.
[60] Makker V, Green AK, Wenham RM, Mutch D, Davidson B, Miller DS. *New therapies for advanced, recurrent, and metastatic endometrial cancers.* Gynecol Oncol Res Pract. 2017 Dec 2;4:19.
[61] Wang Y, Wang Y, Li J, Cragun J, Hatch K, Chambers SK, Zheng W. *Lynch syndrome related endometrial cancer: clinical significance beyond the endometrium.* J Hematol Oncol. 2013 Mar 25;6:22.
[62] Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. *A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines.* J Natl Cancer Inst. 1997 Dec 3;89(23):1758-62.
[63] Dörk T, Hillemanns P, Tempfer C, Breu J, Fleisch MC. *Genetic Susceptibility to Endometrial Cancer: Risk Factors and Clinical Management.* Cancers (Basel). 2020 Aug 25;12(9):2407.
[64] Olave MC, Graham RP. *Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important.* Genes Chromosomes Cancer. 2022 Jun;61(6):314-321.
[65] Rath A, Radecki AA, Rahman K, Gilmore RB, Hudson JR, Cenci M, Tavtigian SV, Grady JP, Heinen CD. *A calibrated cell-based functional assay to aid classification of MLH1 DNA mismatch repair gene variants.* Hum Mutat. 2022 Dec;43(12):2295-2307.
[66] Kavun A, Veselovsky E, Lebedeva A, Belova E, Kuznetsova O, Yakushina V, Grigoreva T, Mileyko V, Fedyanin M, Ivanov M. *Microsatellite Instability: A Review of Molecular Epidemiology and Implications for Immune Checkpoint Inhibitor Therapy.* Cancers (Basel). 2023 Apr 13;15(8):2288.
[67] Bernstein C, Bernstein H. *Epigenetic reduction of DNA repair in progression to gastrointestinal cancer.* World J Gastrointest Oncol. 2015 May 15;7(5):30-46. doi: 10.4251/wjgo.v7.i5.30.
[68] Adamowicz M, Stukan I, Milkiewicz P, Bialek A, Milkiewicz M, Kempinska- Podhorodecka A. *Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis.* Int J Mol Sci. 2022 Apr 28;23(9):4905.
[69] Krausz C, Cioppi F. *Genetic Factors of Non-Obstructive Azoospermia: Consequences on Patients' and Offspring Health.* J Clin Med. 2021 Sep 5;10(17):4009.

[70] Biswas K, Mohammed A, Sharan SK, Shoemaker RH. *Genetically engineered mouse models for hereditary cancer syndromes.* Cancer Sci. 2023 May;114(5):1800-1815.
[71] Huang Y, Roig I. *Genetic control of meiosis surveillance mechanisms in mammals.* Front Cell Dev Biol. 2023 Feb 23;11:1127440.
[72] Yao H, Cao Z, Yong H, Zhang X, Zhang X, Li W, Zhi S, Wu W. *A Pan-Cancer Analysis on the Systematic Correlation of MutS Homolog 2 (MSH2) to a Malignant Tumor.* J Oncol. 2022 Mar 24;2022:9175402.
[73] Kadyrova LY, Mieczkowski PA, Kadyrov FA. *Genome-wide contributions of the MutSα- and MutSβ-dependent DNA mismatch repair pathways to the maintenance of genetic stability in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem. 2023 May;299(5):104705.
[74] Acurzio B, Cecere F, Giaccari C, Verma A, Russo R, Valletta M, Hay Mele B, Angelini C, Chambery A, Riccio A. *The mismatch-repair proteins MSH2 and MSH6 interact with the imprinting control regions through the ZFP57-KAP1 complex.* Epigenetics Chromatin. 2022 Aug 2;15(1):27.
[75] Lin L, Cheng X, Yin D. *Aberrant DNA Methylation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Biological and Clinical Implications.* Front Oncol. 2020 Oct 23;10:549850.
[76] Machowska M, Galka-Marciniak P, Kozlowski P. *Consequences of genetic variants in miRNA genes.* Comput Struct Biotechnol J. 2022 Nov 19;20:6443-6457.
[77] Bruekner SR, Pieters W, Fish A, Liaci AM, Scheffers S, Rayner E, Kaldenbach D, Drost L, Dekker M, van Hees-Stuivenberg S, Delzenne-Goette E, de Konink C, Houlleberghs H, Dubbink HJ, AlSaegh A, de Wind N, Förster F, Te Riele H, Sixma TK. *Unexpected moves: a conformational change in MutSα enables high-affinity DNA mismatch binding.* Nucleic Acids Res. 2023 Feb 22;51(3):1173-1188.
[78] Pal A, Greenblatt HM, Levy Y. *Prerecognition Diffusion Mechanism of Human DNA Mismatch Repair Proteins along DNA: Msh2-Msh3 versus Msh2-Msh6.* Biochemistry. 2020 Dec 29;59(51):4822-4832.
[79] Biswas K, Couillard M, Cavallone L, Burkett S, Stauffer S, Martin BK, Southon E, Reid S, Plona TM, Baugher RN, Mellott SD, Pike KM, Albaugh ME, Maedler-Kron C, Hamel N, Tessarollo L, Marcus V, Foulkes WD, Sharan SK. *A novel mouse model of PMS2 founder mutation that causes mismatch repair defect due to aberrant splicing.* Cell Death Dis. 2021 Sep 6;12(9):838.
[80] Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, Schrock A, Campbell B, Shlien A, Chmielecki J, Huang F, He Y, Sun J, Tabori U, Kennedy M, Lieber DS, Roels S, White J, Otto GA, Ross JS, Garraway L, Miller VA, Stephens PJ, Frampton GM. *Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden.* Genome Med. 2017 Apr 19;9(1):34.
[81] Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ. *DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells.* Mutat Res Rev Mutat Res. 2017 Jul;773:174-187.
[82] Mas-Ponte D, McCullough M, Supek F. *Spectrum of DNA mismatch repair failures viewed through the lens of cancer genomics and implications for therapy.* Clin Sci (Lond). 2022 Mar 18;136(5):383-404.
[83] Fishel R. *Mismatch repair.* J Biol Chem. 2015 Oct 30;290(44):26395-403.
[84] Putnam CD. *Strand discrimination in DNA mismatch repair.* DNA Repair (Amst). 2021 Sep;105:103161.
[85] Kadyrova LY, Kadyrov FA. *Endonuclease activities of MutLα and its homologs in DNA mismatch repair.* DNA Repair (Amst). 2016 Feb;38:42-49.
[86] DuPrie ML, Palacio T, Calil FA, Kolodner RD, Putnam CD. *Mlh1 interacts with both Msh2 and Msh6 for recruitment during mismatch repair.* DNA Repair (Amst). 2022 Nov;119:103405.
[87] Par S, Vaides S, VanderVere-Carozza PS, Pawelczak KS, Stewart J, Turchi JJ. *OB-Folds and Genome Maintenance: Targeting Protein-DNA Interactions for Cancer Therapy.* Cancers (Basel). 2021 Jul 3;13(13):3346.

[88] Chatterjee N, Walker GC. *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis.* Environ Mol Mutagen. 2017 Jun;58(5):235-263.
[89] Vozáriková V, Kunová N, Bauer JA, Frankovský J, Kotrasová V, Procházková K, Džugasová V, Kutejová E, Pevala V, Nosek J, Tomáška Ľ. *Mitochondrial HMG-Box Containing Proteins: From Biochemical Properties to the Roles in Human Diseases.* Biomolecules. 2020 Aug 16;10(8):1193.
[90] Zhang J, Zhao X, Liu L, Li HD, Gu L, Castrillon DH, Li GM. *The mismatch recognition protein MutSα promotes nascent strand degradation at stalled replication forks*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Oct 4;119(40):e2201738119.
[91] Hu N, Cong B, Li S, Ma C, Fu L, Zhang X. *Current developments in forensic interpretation of mixed DNA samples (Review).* Biomed Rep. 2014 May;2(3):309-316.
[92] Weisburd B, Tiao G, Rehm HL. *Insights from a genome-wide truth set of tandem repeat variation.* bioRxiv [Preprint]. 2023 May 8:2023.05.05.539588.
[93] De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, Gaiani F, Negri F. *Microsatellite instability in colorectal cancer.* Acta Biomed. 2018 Dec 17;89(9-S):97-101.
[94] Yang RK, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Rashid A, Alvarez H, Routbort M, Patel KP, Luthra R, Medeiros LJ, Toruner GA. *Clinical Testing for Mismatch Repair in Neoplasms Using Multiple Laboratory Methods.* Cancers (Basel). 2022 Sep 20;14(19):4550.
[95] Ratti M, Lampis A, Hahne JC, Passalacqua R, Valeri N. *Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches.* Cell Mol Life Sci. 2018 Nov;75(22):4151-4162.
[96] Deshpande M, Romanski PA, Rosenwaks Z, Gerhardt J. *Gynecological Cancers Caused by Deficient Mismatch Repair and Microsatellite Instability.* Cancers (Basel). 2020 Nov 10;12(11):3319.
[97] Eso Y, Shimizu T, Takeda H, Takai A, Marusawa H. *Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers.* J Gastroenterol. 2020 Jan;55(1):15-26.
[98] Kinney N, Titus-Glover K, Wren JD, Varghese RT, Michalak P, Liao H, Anandakrishnan R, Pulenthiran A, Kang L, Garner HR. *CAGm: a repository of germline microsatellite variations in the 1000 genomes project*. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8;47(D1):D39-D45.
[99] Pećina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. *Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer*. Front Mol Biosci. 2020 Jun 26;7:122.
[100] Akagi K, Oki E, Taniguchi H, Nakatani K, Aoki D, Kuwata T, Yoshino T. *Real-world data on microsatellite instability status in various unresectable or metastatic solid tumors.* Cancer Sci. 2021 Mar;112(3):1105-1113.
[101] Kubeček O, Kopecký J. *Microsatellite instability in melanoma: a comprehensive review.* Melanoma Res. 2016 Dec;26(6):545-550.
[102] Saeki H, Hlaing MT, Horimoto Y, Kajino K, Ohtsuji N, Fujino K, Terao Y, Hino O. *Usefulness of immunohistochemistry for mismatch repair protein and microsatellite instability examination in adenocarcinoma and background endometrium of sporadic endometrial cancer cases.* J Obstet Gynaecol Res. 2019 Oct;45(10):2037-2042.
[103] Kurnit KC, Westin SN, Coleman RL. *Microsatellite instability in endometrial cancer: New purpose for an old test.* Cancer. 2019 Jul 1;125(13):2154-2163.
[104] Warthin AS. *Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913*. Arch Intern Med. 12, s. 546-55, 1913.
[105] Lynch HT, Krush AJ. *Cancer family "G" revisited: 1895-1970*. Cancer. 27, s. 1505-11, 1971.
[106] Joehlin-Price AS, Perrino CM, Stephens J, Backes FJ, Goodfellow PJ, Cohn DE, Suarez AA. *Mismatch repair protein expression in 1049 endometrial carcinomas, associations with body mass index, and other clinicopathologic variables*. Gynecol Oncol. 2014 Apr;133(1):43-7.

[107] Garg K, Soslow RA. *Endometrial carcinoma in women aged 40 years and younger.* Arch Pathol Lab Med. 2014 Mar;138(3):335-42.
[108] Sun Z, Yu X, Wang H, Zhang S, Zhao Z, Xu R. *Clinical significance of mismatch repair gene expression in sporadic colorectal cancer.* Exp Ther Med. 2014 Nov;8(5):1416-1422.
[109] Itatani Y, Kawada K, Sakai Y. *Transforming Growth Factor-β Signaling Pathway in Colorectal Cancer and Its Tumor Microenvironment*. Int J Mol Sci. 2019 Nov 20;20(23):5822.
[110] Fraune C, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, Büscheck F, Amin T, Viol F, Fehrle W, Dum D, Höflmayer D, Burandt E, Clauditz TS, Perez D, Izbicki J, Wilczak W, Sauter G, Steurer S, Schrader J. *Homogeneous MMR Deficiency Throughout the Entire Tumor Mass Occurs in a Subset of Colorectal Neuroendocrine Carcinomas.* Endocr Pathol. 2020 Jun;31(2):182-189.
[111] WHO Classification of Tumours Editorial Board. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs IARC Press: Lyon 2003 (WHO Classification of Tumours, 3rd Edition, Volume 4).
[112] Shepherd JH. *Revised FIGO staging for gynaecological cancer.* Br J Obstet Gynaecol. 1989 Aug;96(8):889-92. Erratum in: Br J Obstet Gynaecol 1992 May;99(5):440.
[113] Haltia UM, Bützow R, Leminen A, Loukovaara M. *FIGO 1988 versus 2009 staging for endometrial carcinoma: a comparative study on prediction of survival and stage distribution according to histologic subtype.* J Gynecol Oncol. 2014 Jan;25(1):30-5.
[114] WHO Discussion Paper: Draft recommendations for the prevention and management of obesity over the life course, including potential target, dostęp z dnia: 02.06.2023, *https://www.who.int/publications/m/item/who-discussion-paper-draft-recommendations-for-the-prevention-and-management-of-obesity-over-the-life-course-including-potential-targets.*
[115] Chard, J., Sarri, G., *National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Diagnosis of perimenopause and menopause. In Menopause: Full Guideline; NICE Guideline No 23;*National Institute for Health and Care Excellence: London, UK, 12 November 2015; pp. 49–62.
[116] WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female genital tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 4). https://publications.iarc.fr/592. , dostęp z dnia 02.06.2023.
[117] Amant F, Mirza MR, Koskas M, Creutzberg CL. *Cancer of the corpus uteri.* Int J Gynecol Obstet, (2018) 143: 37-50.
[118] Lott R, Tunnicliffe J, Sheppard E, Santiago J, Hladik C, Nasim M, Zeitner K, Haas T, Kohl S, Movahedi-Lankarani S., *Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology;* College of American Pathologists (CAP): Northfield, IL, USA, November 2015; pp. 24–52.
[119] Remmele W, Stegner HE, *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive Score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue.* Pathologe 1987, 8, 138–140.
[120] Yamashita H, Nakayama K, Ishikawa M. *Microsatellite instability is a biomarker for immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer.* Oncotarget. 2017:9(5):5652-5664.
[121] Post CCB, Stelloo E, Smit VTHBM, Ruano D, Tops CM, Vermij L, Rutten TA, Jürgenliemk-Schulz IM, Lutgens LCHW, Jobsen JJ, Nout RA, Crosbie EJ, Powell ME, Mileshkin L, Leary A, Bessette P, Putter H, de Boer SM, Horeweg N, Nielsen M, Wezel TV, Bosse T, Creutzberg CL. *Prevalence and Prognosis of Lynch Syndrome and Sporadic Mismatch Repair Deficiency in Endometrial Cancer.* J Natl Cancer Inst. 2021 Sep 4;113(9):1212-1220.
[122] De Craene B, Van de Velde J, Rondelez E, Vandenbroeck L, Peeters K, Vanhoey T, Elsen N, Vandercruyssen G, Melchior L, Willemoe GL, Jones A, Hongxiang L, Henrique R, Teixeira M, Zhao H, Lambrechts D, Decanniere K, Sablon E, Maertens GG. *Detection of microsatellite instability (MSI) in colorectal cancer samples with a novel set of highly sensitive markers by means of the Idylla MSI Test prototype.* J Clin Onc 36, no. 15_suppl.

[123] Zar J. *Biostatistical analysis. 5th Ed*. 2010, Pearson Prentice Hall., Pearson Education Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
[124] Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Methods in Epidemiological Research.* 2012 Charlottetown, PEI, CA: VER.
[125] Chong EKP, Żak SH. *An Introduction to Optimization. 4th ed*. 2013, Wiley Series in Discrete Mathematics and Optimization, John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, New Jersey.
[126] Fienberg SE. *The analysis of cross-classifed categorical data. 2nd ed* (2007). Springer, New York.
[127] Gordhandas S, Kahn RM, Gamble C, Talukdar N, Maddy B, Baltich Nelson B, Askin G, Christos PJ, Holcomb K, Caputo TA, Chapman-Davis E, Frey MK. *Clinicopathologic features of endometrial cancer with mismatch repair deficiency*. Ecancermedicalscience. 2020 Jun 18;14:1061.
[128] Manning-Geist BL, Liu YL, Devereaux KA, Paula ADC, Zhou QC, Ma W, Selenica P, Ceyhan-Birsoy O, Moukarzel LA, Hoang T, Gordhandas S, Rubinstein MM, Friedman CF, Aghajanian C, Abu-Rustum NR, Stadler ZK, Reis-Filho JS, Iasonos A, Zamarin D, Ellenson LH, Lakhman Y, Mandelker DL, Weigelt B. *Microsatellite Instability-High Endometrial Cancers with MLH1 Promoter Hypermethylation Have Distinct Molecular and Clinical Profiles.* Clin Cancer Res. 2022 Oct 3;28(19):4302-4311.
[129] BartleyAN, Mills AM, Konnick E, Overman M, Ventura CB, SouterL, Colasacco C, Stadler ZK, Kerr K, Howitt BE, Hampel H, Adams SF, Johnson W, Magi-Galluzzi C, Sepulveda AR, Broaddus RR; *Mismatch Repair and Microsatellite Instability Testing for Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: Guideline From the College of American Pathologists in Collaboration With the Association for Molecular Pathology and Fight Colorectal Cancer*. Arch Pathol Lab Med 2022 Oct 1; 146 (10): 1194–1210.
[130] Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, Sánchez-Heras AB, Castillejo MI, Rojas E, Barberá VM, Cigüenza S, Lopez JA, Piñero O, Román MJ, Martínez-Escoriza JC, Guarinos C, Perez-Carbonell L, Aranda FI, Soto JL. *Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers.* PLoS One. 2013 Nov 7;8(11):e79737.
[131] Leenen CH, van Lier MG, van Doorn HC, van Leerdam ME, Kooi SG, de Waard J, Hoedemaeker RF, van den Ouweland AM, Hulspas SM, Dubbink HJ, Kuipers EJ, Wagner A, Dinjens WN, Steyerberg EW. *Prospective evaluation of molecular screening for Lynch syndrome in patients with endometrial cancer ≤ 70 years.* Gynecol Oncol. 2012 May;125(2):414-20.
[132] Takehara Y, Nagasaka T, Nyuya A, Haruma T, Haraga J, Mori Y, Nakamura K, Fujiwara T, Boland CR, Goel A. *Accuracy of four mononucleotide-repeat markers for the identification of DNA mismatch-repair deficiency in solid tumors.* J Transl Med. 2018 Jan 12;16(1):5.
[133] Waalkes A, Smith N, Penewit K, Hempelmann J, Konnick EQ, Hause RJ, Pritchard CC, Salipante SJ. *Accurate Pan-Cancer Molecular Diagnosis of Microsatellite Instability by Single-Molecule Molecular Inversion Probe Capture and High-Throughput Sequencing.* Clin Chem. 2018 Jun;64(6):950-958.
[134] Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. *Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients*. Cancer Med. 2018 Mar;7(3):746-756.
[135] Middha S, Zhang L, Nafa K, Jayakumaran G, Wong D, Kim HR, Sadowska J, Berger MF, Delair DF, Shia J, Stadler Z, Klimstra DS, Ladanyi M, Zehir A, Hechtman JF. *Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data.* JCO Precis Oncol. 2017;2017:PO.17.00084.
[136] Dong F, Costigan DC, Howitt BE. *Targeted next-generation sequencing in the detection of mismatch repair deficiency in endometrial cancers.* Mod Pathol. 2019 Feb;32(2):252-257.
[137] Haruma T, Nagasaka T, Nakamura K, Haraga J, Nyuya A, Nishida T, Goel A, Masuyama H, Hiramatsu Y. *Clinical impact of endometrial cancer stratified by genetic mutational profiles, POLE mutation, and microsatellite instability.* PLoS One. 2018 Apr 16;13(4):e0195655.

[138] Stelloo E, Jansen AML, Osse EM, Nout RA, Creutzberg CL, Ruano D, Church DN, Morreau H, Smit VTHBM, van Wezel T, Bosse T. *Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer.* Ann Oncol. 2017 Jan 1;28(1):96-102.
[139] Bruegl AS, Ring KL, Daniels M, Fellman BM, Urbauer DL, Broaddus RR. *Clinical Challenges Associated with Universal Screening for Lynch Syndrome-Associated Endometrial Cancer.* Cancer Prev Res (Phila). 2017 Feb;10(2):108-115.
[140] Wang Y, Shi C, Eisenberg R, Vnencak-Jones CL. *Differences in Microsatellite Instability Profiles between Endometrioid and Colorectal Cancers: A Potential Cause for False-Negative Results?* J Mol Diagn. 2017 Jan;19(1):57-64.
[141] Libera L, Sahnane N, Carnevali IW, Cimetti L, Cerutti R, Chiaravalli AM, Riva C, Tibiletti MG, Sessa F, Furlan D. *Microsatellite analysis of sporadic and hereditary gynaecological cancer in routine diagnostics.* J Clin Pathol. 2017 Sep;70(9):792-797.
[142] McConechy MK, Talhouk A, Li-Chang HH, Leung S, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN. *Detection of DNA mismatch repair (MMR) deficiencies by immunohistochemistry can effectively diagnose the microsatellite instability (MSI) phenotype in endometrial carcinomas.* Gynecol Oncol. 2015 May;137(2):306-10.
[143] Buchanan DD, Tan YY, Walsh MD, Clendenning M, Metcalf AM, Ferguson K, Arnold ST, Thompson BA, Lose FA, Parsons MT, Walters RJ, Pearson SA, Cummings M, Oehler MK, Blomfield PB, Quinn MA, Kirk JA, Stewart CJ, Obermair A, Young JP, Webb PM, Spurdle AB. *Tumor mismatch repair immunohistochemistry and DNA MLH1 methylation testing of patients with endometrial cancer diagnosed at age younger than 60 years optimizes triage for population-level germline mismatch repair gene mutation testing.* J Clin Oncol. 2014 Jan 10;32(2):90-100.
[144] Moline J, Mahdi H, Yang B, Biscotti C, Roma AA, Heald B, Rose PG, Michener C, Eng C. *Implementation of tumor testing for lynch syndrome in endometrial cancers at a large academic medical center.* Gynecol Oncol. 2013 Jul;130(1):121-6.
[145] Peterson LM, Kipp BR, Halling KC, Kerr SE, Smith DI, Distad TJ, Clayton AC, Medeiros F. *Molecular characterization of endometrial cancer: a correlative study assessing microsatellite instability, MLH1 hypermethylation, DNA mismatch repair protein expression, and PTEN, PIK3CA, KRAS, and BRAF mutation analysis.* Int J Gynecol Pathol. 2012 May;31(3):195-205.
[146] Yoon SN, Ku JL, Shin YK, Kim KH, Choi JS, Jang EJ, Park HC, Kim DW, Kim MA, Kim WH, Lee TS, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP, Jeong SY, Park JG. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in endometrial cancer patients.* Int J Cancer. 2008 Mar 1;122(5):1077-81. Erratum in: Int J Cancer. 2009 Apr 15;124(8):1997.
[147] Ukkola I, Nummela P, Pasanen A, Kero M, Lepistö A, Kytölä S, Bützow R, Ristimäki A. *Detection of microsatellite instability with Idylla MSI assay in colorectal and endometrial cancer.* Virchows Arch. 2021 Sep;479(3):471-479.
[148] Rafaniello-Raviele P, Betella I, Rappa A, Vacirca D, Tolva G, Guerrieri-Gonzaga A, Bertario L, Barberis M, Bonanni B, Marabelli M. *Microsatellite instability evaluation: which test to use for endometrial cancer?* J Clin Pathol. 2023 Jan;76(1):29-33.
[149] Siemanowski J, Schömig-Markiefka B, Buhl T, Haak A, Siebolts U, Dietmaier W, Arens N,Pauly N, Ataseven B, Büttner R, Merkelbach-Bruse S. *Managing Difficulties of Microsatellite Instability Testing in Endometrial Cancer-Limitations and Advantages of Four Different PCR-Based Approaches.* Cancers (Basel). 2021 Mar 12;13(6):1268.
[150] Dedeurwaerdere F, Claes KB, Van Dorpe J, Rottiers I, Van der Meulen J, Breyne J, Swaerts K, Martens G. *Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer*. Sci Rep. 2021 Jun 18;11(1):12880.
[151] Gatius S, Velasco A, Varela M, Cuatrecasas M, Jares P, Setaffy L, Bonhomme B, Santon A, Lindemann K, Croce S, Davidson B, Lax S, Palacios J, Matias-Guiu X. *Comparison of the Idylla™ MSI*

assay with the Promega™ MSI Analysis System and immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of endometrial carcinoma: results from an international, multicenter study. Virchows Arch. 2022 May;480(5):1031-1039.

[152] Malapelle U, Parente P, Pepe F, De Luca C, Pisapia P, Sgariglia R, Nacchio M, Gragnano G, Russo G, Conticelli F, Bellevicine C, Vigliar E, Iaccarino A, Covelli C, Balistreri M, Clemente C, Perrone G, Danza A, Scaramuzzi F, Fassan M, Troncone G, Graziano P. *Evaluation of Micro Satellite Instability and Mismatch Repair Status in Different Solid Tumors: A Multicenter Analysis in a Real World Setting.* Cells. 2021 Jul 24;10(8):1878.

[153] Libera L, Sahnane N, Pepe F, Pisapia P, De Luca C, Russo G, Parente P, Covelli C, Chiaravalli AM, Sessa F, Malapelle U, Furlan D. *Critical aspects of microsatellite instability testing in endometrial cancer: a comparison study.* Hum Pathol. 2022 Oct;128:134-140.

[154] Pécriaux A, Favre L, Calderaro J, Charpy C, Derman J, Pujals A. *Detection of microsatellite instability in a panel of solid tumours with the Idylla MSI Test using extracted DNA.* J Clin Pathol. 2021 Jan;74(1):36-42.

[155] Wu X, Snir O, Rottmann D, Wong S, Buza N, Hui P. *Minimal microsatellite shift in microsatellite instability high endometrial cancer: a significant pitfall in diagnostic interpretation.* Mod Pathol. 2019 May;32(5):650-658.

[156] Wang Y, Shi C, Eisenberg R, Vnencak-Jones CL. *Differences in Microsatellite Instability Profiles between Endometrioid and Colorectal Cancers: A Potential Cause for False-Negative Results?* J Mol Diagn. 2017 Jan;19(1):57-64.

[157] Marshman E, Booth C, Potten CS. *The intestinal epithelial stem cell.* Bioessays. 2002 Jan;24(1):91-8.

[158] Gargett CE, Nguyen HP, Ye L. *Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells.* Rev Endocr Metab Disord. 2012 Dec;13(4):235-51.

[159] Gilson P, Levy J, Rouyer M, Demange J, Husson M, Bonnet C, Salleron J, Leroux A, Merlin JL, Harlé A. *Evaluation of 3 molecular-based assays for microsatellite instability detection in formalin-fixed tissues of patients with endometrial and colorectal cancers.* Sci Rep. 2020 Oct 2;10(1):16386.

[160] Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, de Vries EG, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CH, van der Zee AG, Hofstra RM, Kleibeuker JH. *Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant.* Am J Hum Genet. 2002 Jan;70(1):26-37.

[161] Kim J.H., MacLaughlin D.T., Donahoe P.K. *Mullerian inhibiting substance/anti-Mullerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors.* Obstetr. Gynecol. Sci. 2014;57:343– 357.

[162] di Clemente N, Racine C, Rey RA. *Anti-Müllerian Hormone and Polycystic Ovary Syndrome in Women and Its Male Equivalent.* Biomedicines. 2022 Oct 7;10(10):2506.

[163] National Cancer Institute. *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer Stat Facts: Uterine Cancer*; National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, 2021.

[164] Fortner RT, Schock H, Jung S, Allen NE, Arslan AA, Brinton LA, Egleston BL, Falk RT, Gunter MJ, Helzlsouer KJ, Idahl A, Johnson TS, Kaaks R, Krogh V, Lundin E, Merritt MA, Navarro C, Onland-Moret NC, Palli D, Shu XO, Sluss PM, Staats PN, Trichopoulou A, Weiderpass E, Zeleniuch-Jacquotte A, Zheng W, Dorgan JF. *Anti-Mullerian hormone and endometrial cancer: a multi-cohort study.* Br J Cancer. 2017 Oct 24;117(9):1412-1418.

[165] Dogan NU, Kerimoglu OS, Karabagli P, Pekin A, Yilmaz SA, Incesu F, Celik C. *Anti-Müllerian hormone is associated with extrauterine involvement and stage of disease in patients with endometrial cancer.* J Obstet Gynaecol. 2015 Feb;35(2):178-82.

[166] Uterine corpus Statistics | American Cancer Society - Cancer Facts & Statistics, https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#!/cancer-site/Uterine%20corpus , dostęp z dnia 02.06.2023.

[167] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics, 2017.* CA Cancer J. Clin. 2017, *67*, 7-30.

[168] Zhao S, Chen L, Zang Y, Liu W, Liu S, Teng F, Xue F, Wang Y. *Endometrial cancer in Lynch syndrome*. Int J Cancer. 2022 Jan 1;150(1):7-17.
[169] Nagle CM, O'Mara TA, Tan Y, Buchanan DD, Obermair A, Blomfield P, Quinn MA, Webb PM, Spurdle AB; *Australian Endometrial Cancer Study Group. Endometrial cancer risk and* 5*survival by tumor MMR status.* J Gynecol Oncol. 2018 May;29(3):e39.
[170] Zhan B, Liu X, Li F, Zhang D. *Breastfeeding and the incidence of endometrial cancer: A meta-analysis.* Oncotarget. 2015 Nov 10;6(35):38398-409.
[171] Dottino JA, Zhang Q, Loose DS, Fellman B, Melendez BD, Borthwick MS, McKenzie LJ, Yuan Y, Yang RK, Broaddus RR, Lu KH, Soliman PT, Yates MS. *Endometrial biomarkers in premenopausal women with obesity: an at-risk cohort.* Am J Obstet Gynecol. 2021 Mar;224(3):278.e1-278.e14.
[172] Buhimschi CS. *Endocrinology of lactation.* Obstet Gynecol Clin North Am. 2004 Dec;31(4):963-79, xii.
[173] Gust K, Caccese C, Larosa A, Nguyen TV. *Neuroendocrine Effects of Lactation and Hormone-Gene-Environment Interactions*. Mol Neurobiol. 2020 Apr;57(4):2074-2084.
[174] Wang L, Li J, Shi Z. *Association between Breastfeeding and Endometrial Cancer Risk: Evidence from a Systematic Review and Meta-Analysis*. Nutrients. 2015 Jul 14;7(7):5697-711.
[175] Jordan SJ, Na R, Johnatty SE, Wise LA, Adami HO, Brinton LA, Chen C, Cook LS, Dal Maso L, De Vivo I, Freudenheim JL, Friedenreich CM, La Vecchia C, McCann SE, Moysich KB, Lu L, Olson SH, Palmer JR, Petruzella S, Pike MC, Rebbeck TR, Ricceri F, Risch HA, Sacerdote C, Setiawan VW, Sponholtz TR, Shu XO, Spurdle AB, Weiderpass E, Wentzensen N, Yang HP, Yu H, Webb PM. *Breastfeeding and Endometrial Cancer Risk: An Analysis From the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium.* Obstet Gynecol. 2017 Jun;129(6):1059-1067.
[176] Yasin HK, Taylor AH, Ayakannu T. *A Narrative Review of the Role of Diet and Lifestyle Factors in the Development and Prevention of Endometrial Cancer.* Cancers (Basel). 2021 Apr 29;13(9):2149.
[177] Grimes NP, Whitcomb BW, Reeves KW, Sievert LL, Purdue-Smithe A, Manson JE, Hankinson SE, Rosner BA, Bertone-Johnson ER. *The association of parity and breastfeeding with anti-Müllerian hormone levels at two time points*. Maturitas. 2022 Jan;155:1-7.
[178] Bunnewell SJ, Honess ER, Karia AM, Keay SD, Al Wattar BH, Quenby S. *Diminished ovarian reserve in recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis.* Fertil Steril. 2020 Apr;113(4):818-827.e3.
[179] Busnelli A, Somigliana E, Cirillo F, Levi-Setti PE. *Is diminished ovarian reserve a risk factor for miscarriage? Results of a systematic review and meta-analysis.* Hum Reprod Update. 2021 Oct 18;27(6):973-988.
[180] McCormack CD, Leemaqz SY, Furness DL, Dekker GA, Roberts CT. *Anti-Müllerian hormone levels in recurrent embryonic miscarriage patients are frequently abnormal, and may affect pregnancy outcomes.* J Obstet Gynaecol. 2019 Jul;39(5):623-627.
[181] Pils S, Stepien N, Kurz C, Nouri K, Promberger R, Ott J. *Anti-Mullerian hormone is linked to the type of early pregnancy loss in idiopathic recurrent miscarriage: a retrospective cohort study.* Reprod Biol Endocrinol. 2017 Aug 2;15(1):60.
[182] Wu QJ, Li YY, Tu C, Zhu J, Qian KQ, Feng TB, Li C, Wu L, Ma XX. *Parity and endometrial cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies.* Sci Rep. 2015 Sep 16;5:14243.
[183] Tai YJ, Chiang CJ, Chiang YC, Wu CY, Lee WC, Cheng WF. *Age-specific trend and birth cohort effect on different histologic types of uterine corpus cancers.* Sci Rep. 2023 Jan 19;13(1):1019.
[184] Troisi R, Bjørge T, Gissler M, Grotmol T, Kitahara CM, Myrtveit Saether SM, Ording AG, Sköld C, Sørensen HT, Trabert B, Glimelius I. *The role of pregnancy, perinatal factors and hormones in maternal cancer risk: a review of the evidence.* J Intern Med. 2018 May;283(5):430-445.
[185] Mikkelsen AP, Egerup P, Ebert JFM, Kolte AM, Nielsen HS, Lidegaard Ø. *Pregnancy Loss and Cancer Risk: A Nationwide Observational Study.* EClinicalMedicine. 2019 Oct 9;15:80-88.

[186] Charach R, Sheiner E, Beharier O, Sergienko R, Kessous R. *Recurrent pregnancy loss and future risk of female malignancies*. Arch Gynecol Obstet. 2018 Oct;298(4):781-787.
[187] Zhan Y, Wang Y, Qu Y, Zhang L, Liu X, Liu R, Xue P, Wang J, Qin D, Yue H, Yu C, Lyu J, Guo Y, Chen Z, Jiang Y, Li L, Kadoorie Biobank Collaborative Group C. *Pregnancy Loss in Relation to the Risks of Female-Specific Cancers in a Population-Based Cohort and Mendelian Randomization Study - China, 2004-2017.* China CDC Wkly. 2023 May 12;5(19):413-418.
[188] McDonald ME, Bender DP. *Endometrial Cancer: Obesity, Genetics, and Targeted Agents.* Obstet Gynecol Clin North Am. 2019 Mar;46(1):89-105.
[189] Women living with obesity, Newest available data (worldobesity.org), https://data.worldobesity.org/maps/?action=pdf&area=trends&group=F&year=2020 dostęp z dnia 02.06.2023.
[190] Uterine Cancer: Statistics | Cancer.Net https://www.cancer.net/cancer-types/uterine-cancer/statistics , dostęp z dnia 02.06.2023
[191] Chia VM, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Hampton JM. *Obesity, diabetes, and other factors in relation to survival after endometrial cancer diagnosis.* Int J Gynecol Cancer. 2007 Mar-Apr;17(2):441-6.
[192] Rao JS, Kobetz E, Yu H, Baeker-Bispo J, Bailey Z. *Partially Recursively Induced Structured Moderation (PRISM) for modeling racial differences in endometrial cancer survival.* PLoS One. 2023 Jan 31;18(1):e0268221.
[193] Lee E, Kawaguchi ES, Zhang J, Kim SE, Deapen D, Liu L, Sheidaee N, Hwang AE, Kang I, Sandhu K, Ursin G, Wu AH, Garcia AA. *Bariatric surgery in patients with breast and endometrial cancer in California: population-based prevalence and survival.* Surg Obes Relat Dis. 2022 Jan;18(1):42-52.
[194] Kokts-Porietis RL, McNeil J, Morielli AR, Cook LS, Courneya KS, Friedenreich CM. *Prospective Cohort Study of Pre- and Postdiagnosis Obesity and Endometrial Cancer Survival.* J Natl Cancer Inst. 2022 Mar 8;114(3):409-418.
[195] Oldfield AL, Kazemi M, Lujan ME. *Impact of Obesity on Anti-Mullerian Hormone (AMH) Levels in Women of Reproductive Age.* J Clin Med. 2021 Jul 20;10(14):3192.
[196] González Villa I, González Dávila EF, Afonso IJE, Blanco LIM, Ferrer JFL, Galván JJC. *An effective algorithm to detect the possibility of being MSI phenotype in endometrial cancer given the BMI status and histological subtype: a statistical study.* Clin Transl Oncol. 2022 Sep;24(9):1809-1817.
[197] Cohn DE, Pavelka JC, Frankel WL, Morrison CD, Hampel H, Copeland LJ, Fowler JM. *Correlation between patient weight and defects in DNA mismatch repair: is this the link between an increased risk of previous cancer in thinner women with endometrial cancer?* Int J Gynecol Cancer. 2008 Jan-Feb;18(1):136-40.
[198] Doulgeraki T, Vagios S, Kavoura E, Yiannou P, Messini I, Nonni A, Papadimitriou C, Vlachos A, Pavlakis K. *Mismatch repair status in high-grade endometrial carcinomas of endometrioid and non-endometrioid type.* J BUON. 2019 Sep-Oct;24(5):2020-2027.
[199] McCourt CK, Mutch DG, Gibb RK, Rader JS, Goodfellow PJ, Trinkaus K, Powell MA. *Body mass index: relationship to clinical, pathologic and features of microsatellite instability in endometrial cancer.* Gynecol Oncol. 2007 Mar;104(3):535-9.
[200] Amankwah EK, Friedenreich CM, Magliocco AM, Brant R, Courneya KS, Speidel T, Rahman W, Langley AR, Cook LS. *Anthropometric measures and the risk of endometrial cancer, overall and by tumor microsatellite status and histological subtype.* Am J Epidemiol. 2013 Jun 15;177(12):1378-87.
[201] Stasenko M, Feit N, Lee SSK, Shepherd C, Soslow RA, Cadoo KA, Alektiar K, Da Silva EM, Martins Sebastião AP, Leitao MM Jr, Gardner G, Selenica P, Abu-Rustum NR, Weigelt B, Mueller JJ. *Clinical patterns and genomic profiling of recurrent 'ultra-low risk' endometrial cancer.* Int J Gynecol Cancer. 2020 Jun;30(6):717-723.

[202] Doghri R, Houcine Y, Boujelbène N, Driss M, Charfi L, Abbes I, Mrad K, Sellami R. *Mismatch Repair Deficiency in Endometrial Cancer: Immunohistochemistry Staining and Clinical Implications.* Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2019 Oct;27(9):678-682.
Pina A, Wolber R, McAlpine JN, Gilks B, Kwon JS. *Endometrial Cancer Presentation and Outcomes Based on Mismatch Repair Protein Expression From a Population-Based Study.* Int J Gynecol Cancer. 2018 Oct;28(8):1624-1630.

9. Streszczenie

W krajach o wysokim indeksie rozwoju społecznego, w tym w Polsce, rak trzonu macicy jest najczęstszym nowotworem złośliwym żeńskiego układu rozrodczego. W związku ze zidentyfikowaniem jego czterech grup molekularnych: grupa 1 z mutacjami w genie POLE, grupa 2 z deficytem systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMRd), grupa 3 z alteracjami molekularnymi o niskiej liczbie kopii i grupa 4 z mutacją w genie TP53 i alteracjami molekularnymi o dużej liczbie kopii, zaczęto badać związki między grupami molekularnymi raka endometrium a czynnikami, które wpływają na patogenezę choroby. Drugą najliczniejszą grupą molekularną raka endometrium, zaraz po rakach z alteracjami molekularnymi o niskiej liczbie kopii, są raki z deficytem MMRd. Jednymi zaś, z obiecujących czynników mogących mieć wpływ na karcynogenezę są hormon anty-Müllerowski (AMH) i jego receptor typu II (AMHR-II). W kontekście onkologii AMH i jego receptory są badane jako potencjalne markery diagnostyczne i terapeutyczne, zwłaszcza w kontekście znakowania przeciwciałami promieniotwórczymi przeciwko AMHR-II. Istnieje również potrzeba identyfikacji podgrup pacjentek, które mogłyby najbardziej skorzystać z terapii opartych na AMH i receptorach AMHR-II.

Celem przeprowadzonej pracy było zbadanie związku między deficytem MMRd a ekspresją receptora AMHR-II w raku endometrium, oraz ocena związku MMRd z ekspresją AMH i wpływu czynników środowiskowych na te korelacje.

Badania zostały przeprowadzone na materiałach zarchiwizowanych pochodzących od pacjentek operowanych z powodu raka trzonu macicy w latach 2006-2010 w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym w Olsztynie. Badaną grupę stanowiło 218 pacjentek. Dane demograficzne i kliniczne pacjentek zostały zebrane z dokumentacji medycznej. Przeanalizowano mikroskopowe preparaty nowotworów oraz wykonano panel barwień immunohistochemicznych (IHC) i testy diagnostyczne metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR Idylla MSI Test) w celu oceny statusu MMRd.

Analiza wyników wykazała brak korelacji między statusem MMRd a ekspresją receptora AMHR-II. Niemniej jednak, stwierdzono powiązanie między ekspresją AMHR-II a typem nowotworu. Wykazano również, że poziom ekspresji AMH nie zależy od statutu MMRd, ale może być zależny od czynników, takich jak czas karmienia piersią, BMI, liczba poronień i typ nowotworu. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zależności między obecnością MMRd a innymi zmiennymi, takimi jak porody, poronienia, antykoncepcja hormonalna, hormonalna terapia zastępcza, cukrzyca typu 2, nadciśnienie tętnicze, wiek pacjentki, BMI, liczba porodów, średnia masa urodzeniowa dziecka, czas karmienia piersią i palenie papierosów. Największe występowanie MMRd zaobserwowano w rakach endometrium o niskim stopniu zaawansowania i typie endometrioidalnym. Stwierdzono obecność MMRd u 21,56% pacjentek badanej grupy za pomocą IHC i u 16,05% pacjentek za pomocą testu RT-PCR. Zgodność wyników obu metod wyniosła 74,47%.

Podsumowując, wyniki badania sugerują brak związku między statusem MMRd a ekspresją receptorów AMH i AMHR-II w raku endometrium. Jednak istnieje pewne powiązanie między ekspresją AMHR-II a typem nowotworu, a rak endometrium o niskim stopniu zaawansowania i typie endometrioidalnym częściej wiąże się z MMRd. Dodatkowo, analizowane czynniki, takie jak wiek pacjentki, BMI, historia porodów i poronień, nie wpływają na obecność MMRd.

10. Summary

In countries with a high Human Development Index, including Poland, endometrial cancer is the most common malignant tumor of the female reproductive system. Along with the identification of its four molecular groups: group 1 with POLE gene mutations, group 2 with mismatch repair deficiency (MMRd), group 3 with molecular alterations of low copy number, and group 4 with *TP53* gene mutations and molecular alterations of high copy number, research has begun to establish the associations between the molecular groups of endometrial cancer and factors that influence its development and progression. The second most prevalent molecular group of endometrial cancer, right after the tumors with molecular alterations of low copy number, are MMRd cancers. Two of the promising factors, that may impact carcinogenesis are the anti-Müllerian hormone (AMH) and its type II receptor (AMHR-II). In oncology, AMH and its receptors are being investigated as potential diagnostic and therapeutic markers, particularly in the context of radioimmunotherapy targeting AMHR-II with radiolabeled antibodies. There is also a need to identify subgroups of patients who may benefit the most from AMH and AMHR-II-based therapies.

The aim of the conducted study was to examine the relationship between MMRd deficiency and the expression of the AMHR-II receptor in endometrial cancer, as well as to evaluate the association between MMRd and AMH expression and the impact of other factors on these correlations.

The study was conducted on archived materials from patients who underwent surgery for endometrial cancer at the Voivodeship Specialized Hospital in Olsztyn between 2006 and 2010. The study group consisted of 218 patients. Demographic and clinical data of the patients were collected from medical records. Microscopic slides of tumors were analyzed, and immunohistochemical staining panels and the Idylla MSI RT-PCR test were performed to assess the MMRd status.

The analysis of the results showed no correlation between MMRd status and the expression of the AMHR-II receptor. However, an association was observed between AMHR-II expression and the tumor type. It was also demonstrated that the level of AMH expression is independent of MMRd status but may be influenced by other factors such as breastfeeding duration, body mass index (BMI), number of miscarriages, and tumor type. No statistically significant relationships were observed between MMRd presence and other variables such as childbirth, miscarriages, hormonal contraception, hormone replacement therapy, type 2 diabetes, hypertension, patient age, BMI, number of pregnancies, average birth weight, breastfeeding duration, and smoking. The highest occurrence of MMRd was observed in low-grade endometrioid endometrial cancers. MMRd was detected in 21.56% of the patients in the study group using immunohistochemistry and in 16.05% of the patients using the RT-PCR test. The concordance between the results of both methods was 74.47%.

In conclusion, the study results suggest no association between MMRd status and the expression of AMH and AMHR-II receptors in endometrial cancer. However, there is a certain correlation between AMHR-II expression and tumor type, with low-grade endometrioid endometrial cancer being more frequently associated with MMRd. Additionally, analyzed factors such as patient age, BMI, childbirth and miscarriage history do not affect the presence of MMRd.