

Polimorfizmy receptora estrogenowego α u kobiet chorych na raka piersi i ich znaczenie kliniczne

Oestrogen receptor alpha polymorphisms in women with breast cancer and their clinical significance

Marcin Makowski, Ireneusz Połać, Tomasz Pertyński

Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi;
kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

Przeгляд Menopauzalny 2009; 1: 40–44

Streszczenie

Receptor estrogenowy α ma bardzo szeroki zakres działania. Biorąc pod uwagę jego występowanie w różnych narządach, należy podejrzewać możliwe do wystąpienia implikacje kliniczne. Dotychczasowe badania nie rozstrzygają, czy występowanie polimorfizmów w obrębie genu dla receptora estrogenowego ma znaczenie kliniczne i czy ich oznaczanie może przydać się w codziennej praktyce lekarskiej, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki i leczenia raka piersi. W niniejszym opracowaniu przedstawiono przegląd informacji na temat wpływu polimorfizmu receptora estrogenowego na występowanie raka piersi, ze szczególnym zwróceniem uwagi na wykorzystanie tego zjawiska w warunkach klinicznych.

Słowa kluczowe: polimorfizm receptora estrogenowego, rak piersi

Summary

Oestrogen receptors have a wide spectrum of activity. Their prevalence in many organs suggests possible clinical ramifications. The tests that have been carried out until now do not determine whether prevalence of oestrogen receptor polymorphism has clinical significance and whether it can be put into everyday practice, especially with diagnostics and treatment of breast cancer. In this review we present a roundup of information about the influence of oestrogen receptor polymorphism on breast cancer occurrence and its clinical ramifications.

Key words: oestrogen receptor polymorphism, breast cancer

Wstęp

Rak piersi jest najistotniejszym problemem onkologicznym i społecznym w populacji kobiet zarówno na świecie, jak i w Polsce, rocznie zapada na niego ponad milion kobiet [1]. Najczęściej rozpoznawany nowotwór złośliwy u kobiet, stanowiący 18% wszystkich nowotworów. Dopiero na drugim miejscu znajduje się rak szyjki macicy – 15% zachorowań na nowotwory złośliwe [2]. Najwyższe współczynniki zachorowalności i umieralności notuje się w wysoko rozwiniętych krajach zachodnich. W Stanach Zjednoczonych Ameryki standaryzowany współczynnik umieralności z powodu tego nowotworu wynosi prawie 90/100 tys. kobiet rasy białej. Dla krajów

Europy Zachodniej parametr ten waha się od 36 do 72 przypadków/100 tys. kobiet. Najrzadziej chorują na ten nowotwór kobiety rasy czarnej oraz mieszkanki Dalekiego Wschodu [3]. Polska należy do krajów o średniej zachorowalności na raka piersi, obecnie zachoruje co 12. kobieta. W 2004 r. zanotowano 12 049 nowych przypadków raka piersi, a standaryzowany współczynnik zachorowalności wynosi 40,7/100 tys. kobiet [4]. Prowadzone od lat 60. ubiegłego stulecia badania epidemiologiczne wykazują stały wzrost zachorowalności na raka piersi, który stanowi obecnie 20% wszystkich nowotworów złośliwych u polskich kobiet. Podobnie przedstawiają się dane epidemiologiczne dotyczące zgonów. Rocznie z powodu tego nowotworu umiera blisko 5 tys. kobiet

Adres do korespondencji:

Marcin Makowski, Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

(w 2004 r. zmarło 4887), przy standaryzowanym współczynnikiem umieralności wynoszącym 14,5 zgonów/100 tys. kobiet [5].

Hormony płciowe mogą mieć wpływ na rozwój wielu nowotworów, m.in. raka endometrium, piersi, prostaty, a także innych, np. raka okrężnicy [3]. Związek pomiędzy rakiem piersi a estrogenami wydaje się jednakże mieć wyjątkowe znaczenie. Estradiol jest najistotniejszym z estrogenów, którego podstawowym źródłem syntezy w okresie dojrzałości płciowej kobiety są jajniki. Ryzyko wystąpienia raka sutka jest zwiększone przy wydłużonej ekspozycji na hormony jajnika. W związku z tym wczesna miesiączka (przed 12. rokiem życia) i późna menopauza (po 55. roku życia) stanowią czynniki ryzyka wystąpienia raka sutka [6]. Tezę tę potwierdza fakt, że u kobiet po chirurgicznej menopauzie przed 45. rokiem życia ryzyko wystąpienia raka sutka jest 2–5 razy mniejsze. Zachorowanie na raka piersi ma bezpośredni związek z wiekiem, w którym kobieta rodzi pierwsze dziecko. Pierwsza ciąża w młodym wieku, tzn. w ciągu 7 lat od pierwszej miesiączki, wydaje się mieć ochronne znaczenie. Pierwsza ciąża po 30. roku życia stanowi większe ryzyko wystąpienia raka sutka niż występuje to u wieloródek. Kobiety, które nie rodziły, mają większe ryzyko wystąpienia raka sutka niż wieloródki [7]. Estradiol odgrywa podwójną rolę, jeśli chodzi o wpływ na ryzyko wystąpienia raka piersi [8]. Ma on działanie preinicyjujące, inicjujące oraz promocyjne dla raka piersi [9]. W większości przypadków estrogeny kojarzone są z działaniem promującym istniejący już w sutku proces kancerogenezy. Jednakże estrogeny i ich metabolity mogą indukować bezpośrednio lub pośrednio wolnorodnikowe uszkodzenia DNA, niestabilności genetyczne oraz mutacje komórkowe [10]. Mogą także służyć w procesach preinicytacji. Estrogen wpływa na komórki poprzez receptory estrogenowe znajdujące się w jądrze komórkowym i cytoplazmie [11].

Rys historyczny

Pierwszym badaczem, który zasugerował, że rak piersi jest nowotworem hormonozależnym, był Schinzinger [12]. Miało to miejsce w 1889 r. Hipotezę Schinzingera potwierdził 7 lat później Beatson, wykonując obustronne usunięcie jajników u kobiety przed menopauzą z nieoperacyjną wznową raka piersi. Po upływie 8 mies. od zabiegu autor stwierdził u chorej całkowity zanik tkanki nowotworowej [13]. Zaobserwowany związek między czynnością jajników a przebiegiem raka piersi stanowił punkt wyjścia do dalszych badań, które nabrały tempa po wyizolowaniu estrogenów z płynu pęcherzykowego jajników przez Allena w 1923 r. [14]. Przełom w badaniach nad hormonozależnością nastąpił w latach 60. XX w., kiedy opisano mechanizm łączenia estradiolu i progesteronu ze swoistymi receptorowymi białka-

mi cytoplazmatycznymi w komórkach. Dalsze badania nad receptorem estrogenowym potwierdziły, że oprócz udziału w fizjologicznych przemianach zachodzących w czasie rozwoju i różnicowania gruczołu piersiowego, pełni on również kluczową funkcję w mechanizmie zależności hormonalnej raka piersi [15].

Receptor estrogenowy – budowa i mechanizm działania

Klasyczne działanie hormonów steroidowych polega na oddziaływaniu poprzez wewnątrzkomórkowe receptory na transkrypcję i translację, co prowadzi do powstania nowych białek. Niektóre z efektów biologicznych wywoływanych zwłaszcza przez hormony płciowe, takie jak estradiol, zachodzą w czasie znacznie krótszym niż niezbędny do uruchomienia drogi genomowej [16]. Szybki sposób działania estradiolu, nazywany pozagenomowym, wiąże się z działaniem tego steroidu przez receptory lub inne białka obecne w błonie komórkowej [17].

Receptory estrogenowe ER- α i ER- β są czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi ligandem. Należą do rodziny receptorów jądrowych. Oba aktywują bądź hamują transkrypcję wielu genów, czasami działając antagonistycznie w stosunku do siebie po związaniu takiego samego liganda [18]. Z powodu obecności dwóch receptorów, wykazujących odmienną funkcję, dystrybucję tkankową i zdolność wiązania różnych kofaktorów, odpowiedź komórki na estrogeny jest bardzo zróżnicowana [19]. Receptor estrogenowy ER- α jest białkowym czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym takimi ligandami, jak 17 β -estradiol, estron i estriol [20]. Receptor ten jest obecny w największej ilości w jądrze komórkowym, mniej jest go w cytoplazmie. Istnieją jednakże doniesienia, że ER- α występuje także w błonie komórkowej niektórych komórek. Wszystkie receptory jądrowe wykazują ten sam schemat budowy [21]. Na N-końcu znajduje się domena transaktywująca, w środku znajdują się struktury domeny wiążącej DNA (*DNA binding domain* – DBD) rozpoznające i wiążące DNA, na C-końcu jest domena wiążąca ligand (*ligand binding domain* – LBD) i rejony odpowiedzialne za transaktywację. Oczywiście, każdy receptor jądrowy zawiera sygnał lokalizacji jądrowej (*nuclear localization signal* – NLS), niezbędny w translokacji receptora do jądra [22]. Receptory dla steroidów należą do nadrodziny receptorów, do której oprócz steroidowych zalicza się receptory tyroksynowe/retinoidowe/sieroce. Dzieli się ona na dwie klasy. W pierwszej, charakterystycznej dla receptorów steroidowych, receptory tworzą homodimery. Druga klasa skupia receptory tworzące heterodimery. Wyjątkiem jest receptor estrogenowy, który wprawdzie też tworzy homodimery, ale rozpoznaje sekwencję palindromową charakterystyczną dla receptorów tworzących heterodimery [23].

Istnieją dwie możliwości oddziaływania klasycznych receptorów z DNA:

1. Bezpośrednie wiązanie z DNA; tu receptor związany z ligandem wiąże się z ERE i bezpośrednio oddziałuje z koaktywatorami i kompleksem inicjującym polimerazy RNA, co wywołuje inicjację transkrypcji.
2. Receptor nie wiąże DNA, ale oddziałuje z innym czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym DNA, co powoduje stabilizację kompleksu DNA-czynnik transkrypcyjny i/lub przyłącza koaktywatory [24].

Polimorfizmy receptora estrogenowego α – znaczenie kliniczne

Odsetek raków wykazujących ekspresję receptorów estrogenowych jest zróżnicowany i zależy m.in. od stanu zaawansowania badanych raków piersi, wieku chorych, stanu menopauzalnego oraz od metod badawczych. Odsetek pierwotnych raków ER-dodatnich waha się od ok. 40 do ponad 80% [25]. Większość nowotworów piersi, szczególnie we wczesnym stadium, wykazuje wzmożoną ekspresję ER- α , ale z tego aż 70% jest niewrażliwych na hormonoterapię, ponieważ ich ER- α nie funkcjonują w komórce poprawnie [26].

Najbardziej szczegółowo badane są mutacje w ER- α , w kontekście nowotworów piersi, głównie dlatego, że w terapii przeciwnowotworowej stosuje się związki blokujące receptor estrogenowy bądź modulujące jego działanie (*specific estrogen receptor modulators* – SERMs). Wiele mutacji w obrębie ER- α to mutacje „milczące”, lecz część z nich może mieć implikacje kliniczne. Mutacji tych jest bardzo dużo i powodują wiele modyfikacji zarówno strukturalnych, jak i funkcjonalnych receptora ER- α , a wiele z nich warunkuje agresywność nowotworu i szanse przeżycia chorego. Do takich polimorfizmów zalicza się polimorfizmy T35246C oraz C35293T, zlokalizowane w intronie 1 genu *ESR1* [27].

Podstawowe znaczenie kliniczne polimorfizmów receptora estrogenowego α pozostaje w związku z wykorzystaniem go jako czynnika predykcyjnego, umożliwiającego podjęcie decyzji terapeutycznych. Prace badawcze prowadzone obecnie skupiają się na oznaczeniach kilku zasadniczych polimorfizmów: *Pvull*, *Xbal*, i innych znacznie rzadziej oznaczanych (rs746432, rs2077647 i rs532010). Obejmują one ocenę znaczenia tych polimorfizmów w przypadku chorób endometrium, osteoporozy, prostaty, a także sutka. Doniesienia o znaczeniu tych polimorfizmów w raku sutka są sprzeczne. Jedne ośrodki wykazały brak związku pomiędzy polimorfizmem *Pvull* i *Xbal* z poziomem receptora ER- α w komórkach nowotworowych oraz z wiekiem pacjentki, w którym rozpoznano raka piersi. Andersen i wsp. zanotowali częstsze wystąpienie allele x w grupie osób chorych na raka piersi w porównaniu z grupą kontrolną, szczególnie w grupie kobiet po menopauzie. W tych sa-

mych badaniach nie odnotowano różnic w przypadku polimorfizmu *Pvull* między grupą badaną a kontrolną. Nie było również żadnego związku pomiędzy danym polimorfizmem a poziomem receptora ER- α w badanych komórkach, zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych [28]. Parl i wsp. wykazali, że polimorfizmy *Pvull* i *Xbal* nie mają wpływu na wystąpienie choroby nowotworowej piersi, ale genotypy pp i xx miały związek z rozpoznaniem raka piersi u kobiet przed 40. rokiem życia [29]. Podobny wpływ genotypów pp i xx na wiek kobiet, u których po raz pierwszy zdiagnozowano raka piersi, zaobserwowali Yaich i wsp. [30]. W dużych badaniach kohortowych przeprowadzonych w Holandii Onland-Moret i wsp. przebadali grupę 380 pomenopauzalnych kobiet z rakiem sutka, oceniając wpływ polimorfizmów *Pvull* i *Xbal* receptora ER- α . Wyniki tych badań sugerują, że polimorfizm *Pvull*, prawdopodobnie w powiązaniu z inną nieznaną mutacją w obrębie ER- α przy współistnieniu dużego stężenia estradiolu może zwiększać ryzyko wystąpienia raka sutka [31].

Inne ośrodki donoszą o możliwości korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmów receptora estrogenowego a rakiem sutka w różnych grupach wiekowych. Andersen i wsp. zanotowali częstszą obecność allele x w grupie osób chorych na raka piersi w porównaniu z grupą kontrolną, szczególnie u kobiet po menopauzie. W tych samych badaniach nie odnotowano różnic w przypadku polimorfizmu *Pvull* między grupą badaną a kontrolną. Nie było również żadnego związku pomiędzy danym polimorfizmem a poziomem receptora ER- α w badanych komórkach zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych. Również Shin i wsp. wykazali związek genotypu xx z wystąpieniem raka piersi. W 2003 r. po przebadaniu rozkładu genotypów dla polimorfizmów *Pvull* i *Xbal* w intronie 1 genu *ESR1* u 1069 kobiet chorych na raka piersi i w 1166-osobowej dobranej wiekowo grupie kontrolnej wykazano jednak związek genotypu TT polimorfizmu *Pvull* z podwyższonym ryzykiem raka piersi. Nie odnotowano żadnego wpływu polimorfizmu *Xbal* na ryzyko wystąpienia tej choroby w grupie badanej, jak również nie wykazano żadnej zależności między poziomem receptora ER- α w komórkach a badanymi polimorfizmami [32]. Zhonghua i wsp. stwierdzili, że genotyp CC w przypadku polimorfizmu *Xbal* wyraźnie zmniejsza ryzyko zachorowania na raka piersi, zwłaszcza u kobiet po menopauzie. Nie stwierdzono żadnego wpływu polimorfizmu *Pvull* na ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu. Do podobnych wniosków doszli Aesun i wsp., którzy przebadali 205 koreańskich kobiet chorych na raka piersi. Stwierdzili oni, że polimorfizm *Xbal* modyfikuje indywidualne prawdopodobieństwo wystąpienia raka sutka, natomiast *Pvull* nie ma istotnego wpływu [33]. W pracy z ośrodka autorów, w której przebadano 103 kobiety chore na raka piersi pod kątem rozkładu polimorfizmów *Pvull* i *Xbal* genu receptora estrogenowego α , Sobczuk i wsp. nie stwierdzili istotnych

statystycznie różnic w rozkładach genotypów i częstości alleli P i p w porównaniu z rozkładem Hardy'ego-Weinberga ($p > 0,05$) [34]. Hsiao i wsp. sugerują nawet w swoich badaniach, że oznaczanie polimorfizmu receptora estrogenowego α może być wykorzystywane do przedoperacyjnej oceny ewentualnej obecności przerzutów nowotworowych w obrębie węzłów chłonnych [35].

Badania polimorfizmów receptora estrogenowego α dotyczyły także chorób innych niż rak sutka. Wykazano, że polimorfizmy PvuII i XbaI w intronie 1 mają wpływ na gęstość kości (*bone mineral density* – BMD), jednakże mechanizm tego wpływu pozostaje nadal niejasny. Gospodarka wapniowa jest regulowana przez estrogeny i zmiany w poziomie ekspresji ER- α wpływają na nią. Ryzyko zachorowania na osteoporozę kobiet po menopauzie jest odwrotnie proporcjonalne do ryzyka zachorowania na raka piersi. Ma to związek z ekspozycją na estrogeny i poziomem ekspresji ER- α w tej grupie kobiet. Kobiety z małym stężeniem estrogenów (bądź niskiej ekspresji ER- α) częściej zapadają na osteoporozę [36–38], jednak kobiety po menopauzie narażone na nadmierną ekspozycję na estrogeny (bądź wykazujące nadmierną ekspresję ER- α) są w grupie podwyższonego ryzyka zachorowania na raka piersi. Wpływ polimorfizmów PvuII i XbaI był analizowany również u chorych na inne choroby i stwierdzono, że genotyp pp występował częściej u chorych na bielactwo nabyte [39], a genotyp xx częściej u chorych na cukrzycę typu 2 [40], w której jednocześnie nie stwierdzono żadnego związku z polimorfizmem PvuII. U chorych na zapalenie śluzówki macicy najczęściej występował genotyp pp, a u chorych na chorobę wieńcową genotyp PP [41]. Biorąc pod uwagę to, że estrogeny chronią przed chorobą Alzheimera (*Alzheimer disease* – AD) poprzez wzmaganie wydzielania i metabolizm prekursorów amyloidu i tworzenie synaps, polimorfizmy PvuII i XbaI były również badane u chorych na AD, ale nie wykazano żadnego związku pomiędzy tymi dwoma polimorfizmami a wystąpieniem tej choroby [42].

Podsumowanie

Receptor estrogenowy α ma bardzo szeroki zakres działania zarówno jako czynnik transkrypcyjny w komórkach, jak i pozajądrowy aktywator szlaków sygnalizacji komórkowej. Biorąc pod uwagę występowanie receptora estrogenowego w różnych narządach, należy podejrzewać możliwe do wystąpienia implikacje kliniczne. Dotychczasowe badania nie rozstrzygają, czy występowanie polimorfizmów w obrębie genu dla receptora estrogenowego ma znaczenie kliniczne i czy oznaczanie tych polimorfizmów może przydać się w codziennej praktyce lekarskiej ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki i leczenia raka piersi. Konieczne są dalsze ba-

dania, uwzględniające także inne, mniej dotychczas poznane, polimorfizmy, jak rs746432, rs2077647 i rs532010.

Piśmiennictwo

1. Cancer incidence in five continents. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L (eds). Vol. VII. IARC Scientific Publications, Lyon 1997; 143.
2. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321: 624-8.
3. Sharma BK, Ray A. Breast and prostate cancer. *Indian J Clin Biochem* 2000; 15 (suppl.): 110.
4. Wojciechowska U, Didkowska J, Tarkowski W, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2004 roku. Warszawa: Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie 2006; 44-6.
5. Jassem J. Masowe badania przesiewowe. W: Rak sutka. Jassem J i wsp. (red.). Springer PWN, Warszawa 1998; 127-36.
6. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 819-35.
7. Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest* 2001; 6: 245-54.
8. Liehr JG. Is estradiol genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000; 21: 40-54.
9. Russo J. Biological and molecular bases of mammary carcinoma. *Lab Invest* 1999; 57: 112-37.
10. Schinzinger A. Über carcinoma mammae. Bericht über die Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. Kongressals Beilage zum Centralblatt für Chir 1889; 29: 55. In: Bland KI, Copeland EM. The breast. WB Sanders Company, Philadelphia 1991.
11. Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 1886; ii: 104-7.
12. Liehr JG. Is estradiol genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000; 21: 40-54.
13. Russo J. Biological and molecular bases of mammary carcinoma. *Lab Invest* 1999; 57: 112-37.
14. Allen E, Doisy EA. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA* 1923; 81: 891-21.
15. Jensen EV. Steroid receptors in breast cancer: historical perspective. *Cancer* 1980; 46 (12 suppl.): 2759-61.
16. Conneely OM. Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology* 2001; 142: 2194-9.
17. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, et al. Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Rev* 2000; 52: 513-55.
18. Zivadinovic D, Watson CS. Membrane estrogen receptor-alpha levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 130-44.
19. Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, et al. Polymorphism in ER gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. *Clinical Res* 2005; 11: 1093-8.
20. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 1951-9.
21. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 2002; 67: 471-5.
22. Hayashi S-I, Eguchi H, Tanimoto K, et al. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Related Cancer* 2003; 10: 193-202.
23. EORTC Breast Cancer Group. Prognostic and predictive factors. In: Manual for clinical research in breast cancer. 5th ed. Glasgow, UK 2004; 38-42.
24. Sokół-Misiak W. Receptory jądrowe. W: Receptory – struktura, charakterystyka, funkcja. Nowak JZ, Zawilska JB (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
25. Driggers PH, Segars JH. Estrogen action and cytoplasmic signalling pathways. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 11-6.
26. McDonnell DP, Norris JD. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 2002; 296: 1642-44.

27. Kulig E. Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance. *Post Bioch* 1994; 40: 222-9.
28. Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, et al. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Hum Genet* 1994; 94: 665-70.
29. Parl FF, Cavener DR, Dupont WD. Genomic DNA analysis of the estrogen receptor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1989; 14: 57-64.
30. Vasconcelos A, Medeiros R, Veiga I, et al. Analysis of estrogen receptor polymorphism in codon 325 by PCR-SSCP in breast cancer. Association with lymph node metastasis. *Breast J* 2002; 8: 226-9.
31. Shin A, Kang D, Nishio H, et al. Estrogen receptor-alpha polymorphism and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80: 127-31.
32. Försti A, Zhao C, Israelsson E, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor beta gene and risk of breast cancer: no association. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79: 409-13.
33. Onland-Moret NC, van Gils CH, Roest M, et al. The estrogen receptor α gene and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control* 2005; 16: 1195-202.
34. Sobczuk A, Pertyński T, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H. Analiza polimorfizmów PvuII i XbaI genu receptora estrogenowego α (ER- α) u kobiet chorych na raka piersi w wieku pomenopauzalnym. *Prz Menopauz* 2007; 3: 22-7.
35. Hsiao WC, Young KC, Lin SL, Lin PW. Estrogen receptor-alpha polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R180-6.
36. Boot AM, van der Sluis IM, de Muinck Keizer-Schrama SM, et al. Estrogen receptor- α gene polymorphisms and bone mineral density in healthy children and young adults. *Calcif Tissue Int* 2004; 74: 495-500.
37. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 306-11.
38. Gennari L, Becherini L, Falchetti A, et al. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 81: 1-24.
39. Jin SY, Park HH, Li GZ, et al. Association of estrogen receptor 1 intron 1 C/T polymorphism in Korean vitiligo patients. *J Derm Science* 2004; 35: 181-6.
40. Speer G, Cseh K, Winkler G, et al. Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and in android type obesity. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 385-9.
41. Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, et al. Oestrogen receptor-alpha gene polymorphism is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata. *Hum Reprod* 2001; 16: 51-5.
42. Maruyama H, Toji H, Harrington CR, et al. Lack of an association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 2000; 57: 236-40.