



Honorata Łukasiewicz

**Badanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego
alfa (ER α , ESR1) u kobiet chorych na raka jajnika.**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. n. med. Beata Smolarz

**Zakład Patomorfologii Klinicznej
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi**

Łódź, 2025

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi, Pani Profesor Beacie Smolarz,
za wsparcie naukowe, niezwykle cenne wskazówki i życzliwość, jaką
okazywała mi na każdym etapie powstawania niniejszej rozprawy
doktorskiej.

Dziękuję za inspirujące rozmowy oraz motywację do nieustannego
pogłębiania wiedzy.

Wykaz najczęściej stosowanych skrótów:

BRCA1/2	gen raka piersi 1/2 (ang. breast cancer gene)
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
ER	receptor estrogenowy
ER α	receptor estrogenowy α
ER β	receptor estrogenowy β
ESR 1/2	gen kodujący receptor estrogenowy 1/2 (ang. estrogen receptor)
ERE	element odpowiedzi na estrogeny (ang. estrogen responsive element)
FIGO	Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa (ang. International Federation of Gynecology and Obstetrics)
GnRH	gonadoliberyna
HNPCC	dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego (ang. hereditary non-polyposis colorectal cancer)
OR	iloraz szans (ang. odds ratio)
PARP	inhibitory polimerazy poli (ADP-rybozy) (ang. pharmacological inhibitors of the enzyme poly ADP ribose polymerase)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy –(ang. polymerase chain reaction)
PU	przedział ufności
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism)
ROMA	algorytm ryzyka wystąpienia nowotworu złośliwego jajnika (ang. Risk of Ovarian Malignancy Algorithm)
SNP	polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. single nucleotide polymorphism)
USG	badanie ultrasonograficzne, ultrasonografia
VNTR	zmienna liczba powtórzeń tandemowych (ang. ang. variable number of tandem repeats)

Spis treści

Nr rozdziału	Tytuł	Strona
1.	Wstęp	1
1.1.	Epidemiologia raka jajnika	1
1.2.	Czynniki ryzyka raka jajnika	3
1.3.	Profilaktyka raka jajnika	5
1.4.	Objawy raka jajnika	7
1.5.	Diagnostyka raka jajnika	7
1.6.	Typy morfologiczne nowotworów jajnika	9
1.7.	Klasyfikacja histopatologiczna raka jajnika	10
1.8.	Leczenie raka jajnika	14
1.9.	Rokowanie w raku jajnika	17
1.10.	Czynniki genetyczne	18
1.11.	Rola receptorów estrogenowych w onkogenezie raka jajnika	22
1.12.	Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów	26
2.	Cel pracy	32
3.	Materiały i metody	33
3.1.	Charakterystyka pacjentek	33
3.2.	Izolacja DNA	36
3.3.	Spektrofometryczna analiza czystości i stężenia DNA	38
3.4.	Analiza wybranych polimorfizmów genu <i>ESR1</i>	43
3.5.	Analiza statystyczna	46
3.6.	Analiza polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) w genie <i>ESR1</i>	47
3.7.	Analiza polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G) w genie <i>ESR1</i>	49

4.	Wyniki	51
5.	Wnioski	72
6.	Dyskusja	73
7.	Piśmiennictwo	82
8.	Streszczenie	97
9.	Summary	99
10.	Wykaz tabel zamieszczonych w pracy	101
11.	Wykaz rycin zamieszczonych w pracy	103
12.	Wykaz załączników zamieszczonych w pracy	105

1. Wstęp

1.1. Epidemiologia raka jajnika

W Polsce liczba chorych na nowotwory utrzymuje się na wysokim poziomie i są one drugą, zaraz po chorobach układu krążenia, główną przyczyną zgonów [1]. Podobnie jak na całym świecie odsetek osób zapadających na nowotwory znacząco się zwiększa.

Dane wskazują, że każdego roku w Polsce pojawia się aktualnie 146,2 tys. nowych zachorowań na nowotwory [2]. Krajowe Profile Dotyczące Nowotworów na rok 2023 podają, że umieralność z powodu nowotworów jest w Polsce o 15% większa niż w krajach Unii Europejskiej. Umieralność zmniejsza się też wolniej niż stanowi średnia europejska [3].

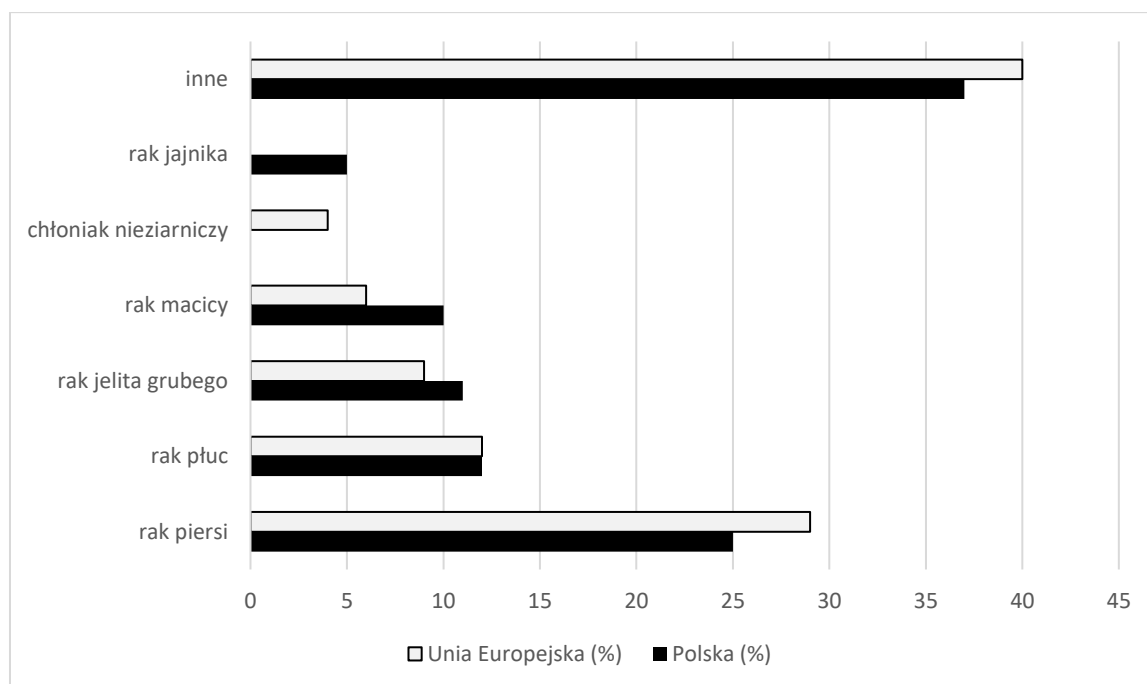
Rak płuc jest główną przyczyną zgonów powodowanych przez choroby nowotworowe, na drugim miejscu klasuje się rak jelita grubego. Czynniki ryzyka zwiększające zachorowanie na choroby nowotworowe jak: nadwaga, otyłość, spożywanie alkoholu czy zanieczyszczenie powietrza są w naszym kraju na wyższym poziomie niż w krajach Unii Europejskiej. Powyższe czynniki ryzyka przyczyniają się w Polsce do niemal połowy wszystkich zgonów (OECD 2021). Konieczne są zatem lepsze strategie w zakresie profilaktyki zdrowia [4].

Poniższa tabela przedstawia zachorowalność na nowotwory w Polsce w porównaniu do Unii Europejskiej w 2020 r.

Tabela 1. Zachorowalność na nowotwory w Polsce w porównaniu do Unii Europejskiej w 2020 r [3].

Nowotwór	Polska (%)	Unia Europejska (%)
Rak piersi	25	29
Rak płuc	12	12
Rak jelita grubego	11	9
Rak macicy	10	6
Chłoniaknieziarniczy	-	4
Rak jajnika	5	-
inne	37	40

Rycina 1. Zachorowalność na nowotwory w Polsce i w Unii Europejskiej w 2020 r [3].



Na świecie stwierdza się około 240 tys. zachorowań na raka jajnika rocznie. Najczęściej rozpoznawany jest w Europie, Ameryce Północnej oraz w Australii i Nowej Zelandii [5].

W Polsce rocznie przewiduje się około 43 000 nowych przypadków zachorowania na nowotwory rzadkie w tym najczęstsze nowotwory to płaskonabłonkowe raki krtani i szyjki macicy oraz gruczolakorak jajnika [6].

U kobiet w 2020 r. rak jajnika zarejestrowany był na piątym miejscu (4,1%) po nowotworach piersi (23,8%), płuca (9,9%), trzonu macicy (7,4%) i okrężnicy (5,9%) [2]. Standaryzowana zachorowalność (ESP2013) na raka jajnika wynosiła $15/10^5$. Rak jajnika znajdował się na czwartym miejscu największego odsetka zgonów nowotworowych stanowiąc 6% po nowotworach płuca (18%), piersi (15%) i okrężnicy (8%). Standaryzowany współczynnik umieralności dla raka jajnika wynosił w 2020 r. $15/10^5$, co stanowiło 4 miejsce po raku płuca $37/10^5$, piersi $33/10^5$ i okrężnicy $17/10^5$.

W 2022 r. największą chorobowość u kobiet zanotowano dla raka piersi (239,4 tys.), raka trzonu macicy (73,5 tys.), raka jelita grubego (64 tys.), raka tarczycy (47,8 tys.), raka

szyjki macicy (29,1 tys.), raka jajnika (28,3 tys.), raka płuca (23,9 tys.), czerniaka skóry (22, 7 tys.) [2].

W grupie kobiet w wieku 15-19 lat dominował rak tarczycy (29%) a następnie chłoniak Hodgkina (17%), nowotwory układu nerwowego (11%), rak jajnika (9%), białaczki 7%. W grupie 20-29 lat dominujący był rak tarczycy (26%). Rak jajnika znajdował się na czwartym miejscu (6%) po raku in situ szyjki macicy (17%), chłoniaku Hodgkina (8%) i raku piersi (7%).

W grupie 30-39 lat dominował rak piersi stanowiący 25% nowotworów w tej grupie. Rak jajnika znajdował się na piątym miejscu (4%) po raku tarczycy (20%), raku in situ szyjki macicy (12%), raku szyjki macicy (6%) i czerniaku skóry (5%) [2].

Rak jajnika jest najczęstszym nowotworem żeńskich narządów rodnych zaraz po raku trzonu macicy. Większość zachorowań na raka jajnika przypada po menopauzie. Na raka jajnika chorują głównie kobiety w wieku 55 - 70 lat. Szczyt zachorowań występuje pomiędzy 55 a 59 rokiem życia [7]. Około 70% nowotworów jajnika wykrywana jest w zaawansowanym stadium (FIGO III i IV)(ang. The International Federation of Gynecology and Obstetrics, Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa) [8].

1.2. Czynniki ryzyka raka jajnika

Nosicielstwo mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA 2* należy do najbardziej znanych czynników ryzyka zachorowania na raka jajnika; 10% - 15% wszystkich nowotworów jajnika ma podłoże genetyczne związane z tymi mutacjami. Ryzyko rozwoju raka jajnika dla nosicielek mutacji *BRCA1* wynosi około 44%, a u nosicielek mutacji *BRCA2* około 17% [2, 9]. Za około 10% nowotworów jajnika jest odpowiedzialny Zespół Lyncha (rodzinne występowanie niepolipowatego raka jelita grubego, choroba genetyczna, która charakteryzuje się zwiększoną skłonnością do zachorowania na różne nowotwory jak rak jajnika, rak endometrium, nowotwory układu moczowego) [10]. Inne czynniki ryzyka raka jajnika przedstawia poniższa tabela 2.

Tabela 2. Czynniki ryzyka raka jajnika.

Czynniki ryzyka raka jajnika
<ul style="list-style-type: none">• wiek powyżej 50 lat• przebycie menopauzy• endometrioza• zaburzenia hormonalne lub leczenie lekami hormonalnymi• wczesny wiek menarche (pierwszej miesiączki) i późna menopauza• bezdzietność, nieskuteczne stymulacje owulacji• pierwszy poród po 35 r.ż• długotrwałe leczenie hormonalne związane z próbami zapłodnienia pozaustrojowego• długotrwałe (więcej niż 10 lat) stosowanie estrogenowej terapii zastępczej• nadmierna masa ciała• cukrzyca

Ryzyko zachorowania na raka jajnika może zostać zmniejszone w wyniku: wycięcia macicy, karmienia piersią, zamknięcia jajowodów czy stosowania antykoncepcji hormonalnej [2, 11, 12].

Dane wskazują na spadek zachorowań nawet o 60% u kobiet stosujących doustne środki antykoncepcyjne przez 10 lat. Przyjmowanie doustnej antykoncepcji w krótszym, pięcioletnim okresie, również oddziałuje korzystnie, redukując zachorowania, ale już tylko o 20-30% [13].

Dowodzono, że cztery porody redukują ryzyko zachorowania o około 40% [14]. Dwie teorie tłumaczą ograniczenie zachorowań na skutek przebytych ciąż i porodów, a także w wyniku stosowania antykoncepcji. Pierwsza mówi, że u podstaw korzystnego oddziaływania przebytych ciąż i porodów leży hamowanie owulacji, której konsekwencją jest zapobieganie uszkodzeniom nabłonka na powierzchni jajnika. W wyniku tego procesu nie następuje rozwój torbieli inkluzyjnych a co za tym idzie rozpoczęcie nowotworzenia. Druga teoria tłumaczy tę sytuację apoptozą (naturalny proces programowanej śmierci komórki) indukowaną przez progesteron lub progestageny. W jej wyniku dochodzi do usunięcia komórek nowotworowych z jajnika [15].

Istnieją doniesienia, które wskazują na niemal dwudziestokrotny wzrost ryzyka zachorowania u kobiet poddanych procedurze in vitro, u których przyczyna niepłodności jest niejasna [16].

Ważny jest aspekt diety. Dieta bogata w warzywa oraz w owoce, a zwłaszcza w pomidory zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia raka jajnika o 70% [17, 18].

Niektóre typy histologiczne raków jajnika, mogą rozwijać się na podłożu endometriozy. U chorych na endometriozę ryzyko to wynosi 1,8% [19, 20]. Uważa się, że endometrioza dotyka około 11% kobiet w wieku rozrodczym, w tym 50%–60% kobiet i nastolatek cierpiących na ból miednicy i do 50% kobiet cierpiących na niepłodność [21]. Choć ból miednicy i niepłodność są najbardziej znanymi chorobami współistniejącymi endometriozy, uważa się również, że rak jajnika, piersi i błony śluzowej macicy również mogą być związane z endometriozą. Przegląd systematyczny i metaanaliza z 2021 r. wykazały, że kobiety z endometriozą mają prawie dwukrotnie większe ryzyko raka jajnika w porównaniu z kobietami bez endometriozy, chociaż powiązania różniły się w zależności od histotypu raka jajnika [22]. Istniały silne dowody potwierdzające powiązania między endometriozą a rakiem jajnika jasnokomórkowym, endometrioidalnym i surowiczym niskiego stopnia. Jednakże nie wykryto konsekwentnie takich powiązań w przypadku nowotworów surowiczych wysokiego stopnia lub śluzowych [22].

Lepsze zrozumienie związków między podtypami endometriozy a histotypami raka jajnika może dostarczyć nowych informacji na temat ścieżek etiologicznych obu chorób i wpłynąć na podejmowanie decyzji klinicznych u osób z endometriozą.

1.3. Profilaktyka raka jajnika

W chwili obecnej nie są prowadzone żadne systemowe badania populacyjne w kierunku wczesnego wykrywania raka jajnika. W przypadku chorych z obciążeniem dziedzicznym raka piersi i raka jajnika (będących nosicielami mutacji genu *BRCA1/2*) zalecane są kontrolne badania lekarskie i obrazowe. W ramach pierwszego etapu opieki nad rodzinami wysokiego, dziedzicznie uwarunkowanego ryzyka zachorowania na raka piersi lub raka jajnika przeprowadza się identyfikację osób, które posiadają wysokie, dziedzicznie uwarunkowane ryzyko zachorowania na nowotwór piersi i jajnika. Zostaje przeprowadzony szczegółowy wywiad rodzinny i jeżeli istnieją wskazania medyczne, wykonywane są badania genetyczne. W ramach drugiego etapu kobieta posiadająca wysokie, dziedzicznie uwarunkowane ryzyko

zachorowania na raka jajnika zostaje objęta specjalistyczną opieką. Nadzór nad takimi kobietami polega na systematycznym przeprowadzeniu badań diagnostycznych oraz konsultacjach lekarskich w celu szybkiego wykrycia ewentualnych nieprawidłowości. Każda kobieta powinna przeprowadzać regularne badania ginekologiczne. Zaleca się coroczne badanie ginekologiczne u kobiet powyżej 18. roku życia i coroczne badanie przez odbyty u kobiet powyżej 35. roku życia. Tym sposobem można wyczuć jajniki i okoliczne narządy, sprawdzając je pod kątem kształtu i rozmiaru.

Działaniem rekomendowanym w pracach naukowych jest usunięcie jajników i jajowodów u nosicielek mutacji *BRCA1/2* po zakończeniu prokreacji [23, 24]. Najwięcej korzyści profilaktyczna resekcja jajników i jajowodów daje w kontekście dziedzicznego zespołu raka piersi i jajnika. Postępowanie to może zmniejszyć ryzyko raka jajnika o 70-85%. Profilaktyczna resekcja redukuje poza tym ryzyko raka piersi o 54% oraz umieralność ogólną o 60-70% [25, 26].

Moment wykonywania owariektomii jest różny w zależności od mutacji. Dzieje się tak dlatego, że przeciętny wiek w momencie wykrycia nowotworu spowodowanego mutacją genu *BRCA1* wynosi około 10 lat mniej niż w przypadku mutacji genu *BRCA2*, a jeszcze później ustala się rozpoznanie w przypadku mutacji genów odpowiedzialnych za dziedzicznego raka jajnika (*RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*). Resekcja jajowodów jest rozwiązaniem u kobiet chcących poddać się sterylizacji albo u kobiet, które nie zgadzają się na owariektomię. W takim przypadku pacjentka powinna zostać poinformowana, że po pewnym czasie trzeba będzie usunąć również jajniki. W chwili obecnej jest znacznie mniej danych na temat skuteczności samej resekcji jajowodów w tej sytuacji.

Do głównych działań profilaktyki nowotworowej jajnika zalicza się prowadzenie prozdrowotnego trybu życia i regularne wizyty ginekologiczne (w tym USG przezpochwowe). Niestety do chwili obecnej nie udało się opracować skutecznego programu badań przesiewowych pozwalających wykryć nowotwór w I stopniu zaawansowania, czy to w oparciu o metody obrazowe, czy też o metody wykorzystujące biomarkery (Ca 125, HE4, Beta2-mikroglobulina, transferyna, apolipoproteina i prealbumina) [27].

1.4. Objawy raka jajnika

Niestety objawy raka jajnika są niecharakterystyczne i występują dopiero w zaawansowanym stadium choroby [28]. Dolegliwości dają o sobie znać, zazwyczaj dopiero gdy zmiana ma kilka cm. Objawami nowotworu są m.in. krwawienia z pochwy, ból w podbrzuszu, stały ból w obrębie brzucha lub miednicy, ból pleców w okolicy lędźwiowej, problemy z oddawaniem moczu (między innymi przez ucisk wywierany przez guz na sąsiednie narządy), objawy ze strony układu pokarmowego, na przykład wzdęcia, powiększenie obwodu brzucha, uczucie pełności, odbijanie, zaparcia lub biegunki, uczucie ciągłego silnego zmęczenia, niewyjaśnione chudnięcie.

W rozpoznaniu różnicowym w przypadku powyższych sytuacji zawsze powinno się brać pod uwagę możliwość raka jajnika. Chorą powinno się niezwłocznie skierować do specjalisty ginekologa, nawet jeśli wizyta miała miejsce w ciągu ostatnich 6 miesięcy. Takie postępowanie zmniejsza zwłokę w rozpoznaniu i leczeniu raka jajnika.

1.5. Diagnostyka raka jajnika

Guzy jajnika są diagnozowane na podstawie wywiadu oraz badań lekarskich jak:

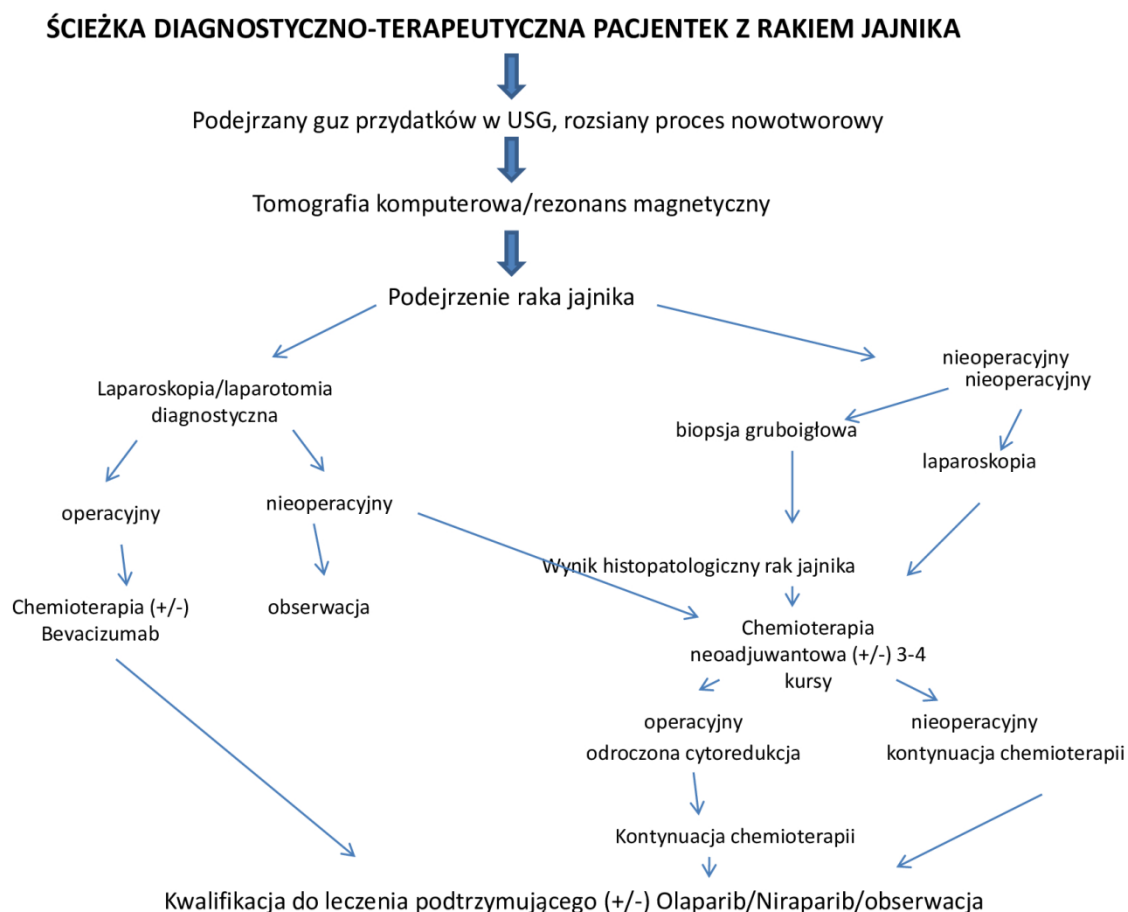
- podstawowe badania krwi i moczu,
- badanie ginekologiczne w połączeniu z badaniem USG jamy brzusznej oraz USG przezpochwowym (USG-TV – transvaginal),
- badanie wzornikiem dróg rodnych,
- badanie markerów nowotworowych CA125, HE4, test ROMA (Test ROMA (ang. Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) - algorytm pozwalający ocenić prawdopodobieństwo ryzyka wystąpienia nowotworu jajnika. Algorytm uwzględnia 3 elementy: ryzyko zachorowania na raka jajnika związane z okresem przed- lub pomenopauzalnym, poziom markerów nowotworowych CA125 i HE4 [29, 30]. Tabela 3 przedstawia interpretację wyników testu ROMA.
- badanie poziomu ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (beta HCG), alfa-fetoproteiny (AFP), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz inhibiny – oznaczane przy nowotworach nienabłonkowych jajnika,
- badanie rentgenowskie lub tomograficzne klatki piersiowej,
- tomografia komputerowa (TK) jamy brzusznej i miednicy,

Tabela 3. Interpretacja wyników test ROMA.

Wartość testu ROMA	Ryzyko wystąpienia raka jajnika
kobiety przed menopauzą	
< 11,4 %	niskie
> 11,4 %	wysokie
kobiety po menopauzie	
< 29,9 %	niskie
> 29,9 %	wysokie

Ostateczne potwierdzenie diagnozy opiera się na wynikach badania histopatologicznego. Do badania histopatologicznego pobiera się wycinek z tkanki nowotworowej (laparoskopowo lub z otwarciem jamy brzusznej). W rzadkich przypadkach można rozpoznać raka na podstawie obecności komórek raka w płynie z jamy opłucnej, otrzewnej i węzłów chłonnych. W wyniku przeprowadzonych badań można określić stopień zaawansowania choroby nowotworowej jajnika.

Rycina 2. Postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne w przypadku pacjentek z rakiem jajnika.



1.6. Typy morfologiczne nowotworów jajnika

Wyróżniamy typy morfologiczne nowotworów jajnika jak nowotwory, które powstają z nabłonka jajnika, stanowią one 90% wszystkich nowotworów jajnika. Pozostałe 10% stanowią nowotwory nienabłonkowe [31]. Nowotwory nienabłonkowe są rozpoznawane w niskim stopniu zaawansownia i najczęściej dotyczą kobiet w młodym wieku. Do nie nabłonkowych nowotworów jajnika zaliczamy guzy germinalne jajnika i guzy zarodkowe.

Guzy germinalne jajnika (ang. *Malignant ovary germ cell tumors*; MOGCT), są inaczej nazywane guzami zarodkowymi (ang. *Germ cell tumor*, GCT). Powstają z komórek rozrodczych, biorących udział w wytwarzaniu komórki jajowej. Należą one do rzadkich

nowotworów, pod względem częstości tworzą drugą (po nowotworach nabłonkowych) grupę nowotworów rozwijających się w jajnikach.

Guzy zarodkowe dotyczą najczęściej dziewcząt i młodych kobiet przed 30-tym rokiem życia. Rzadziej nowotwór ten diagnozuje się u mężczyzn – wówczas choroba rozwija się w jądrach. Poniższa tabela 4 prezentuje podział guzów germinalnych jajnika.

Tabela 4. Nowotwory germinalne jajnika z uwagi na typ histologiczny.

Rozrodczak jajnika (łac. <i>dysgerminoma</i>)	najczęstszy złośliwy nowotwór germinalny, osiąga duże rozmiary (ponad 10 cm), może rozwijać się obustronnie, charakteryzuje się dobrym rokowaniem
Rak zarodkowy (łac. <i>carcinoma embryonale</i>)	rzadko występuje, szybko tworzy przerzuty
Guz pęcherzyka żółtkowego (ang. <i>yolksac tumor</i> , YST)	rzadki nowotwór o wyjątkowo wysokiej złośliwości
Rak kosmówki (łac. <i>choriocarcinoma</i>) zwany nabłoniakiem kosmówkowym	rzadko występuje, jest bardzo agresywny, daje szybkie przerzuty do innych narządów
Potworniak (łac. <i>teratoma</i> ; w tym dojrzały potworniak, torbiel dermoidalna, niedojrzały potworniak i potworniak z transformacją złośliwą)	rzadka zmiana, która może mieć charakter złośliwy jak i łagodny
Guz germinalny mieszany	składa się przynajmniej z dwóch wyżej opisanych nowotworów

1.7. Klasyfikacja histopatologiczna raka jajnika

Nowotwory jajnika w około 95% wywodzą się z nabłonka pokrywającego ten narząd. Jest to zróżnicowana pod względem molekularnym grupa nowotworów. Pod względem molekularnym dzielimy je na dwa typy [32].

Typ I jest to rak jajnika o niskiej złośliwości (low-grade). Stanowi on 25% wszystkich nowotworów. Należą tu raki surowicze i endometrioidalne, raki śluzowe i raki jasnokomórkowe. Zmiany, z których rozwijają się te nowotwory noszą nazwę guzów

granicznych (borderline tumours). W rakach jajnika typu I stwierdza się w 65% przypadków obecność mutacji *BRAF* i *KRAS*; poza tym mutacje innych genów jak *HER2*, *PIK3CA*, *PTEN*. Raki jajnika Typu I charakteryzują się wolnym wzrostem i dobrze roszą. 5-letnie przeżycie obserwuje się u ok 55% chorych [33].

Typ II jest to rak jajnika o niskim stopniu dojrzałości i wysokim stopniu złośliwości (high-grade). Charakteryzuje się dużą dynamiką wzrostu i agresywnym przebiegiem. Stanowi 75% wszystkich nowotworów tego narządu, które wywodzą się najprawdopodobniej z dystalnego lub strzępkowego odcinka jajowodu. W rakach tego typu stwierdza się mutacje w genie *p53* (ok 90%) i w genie *BRCA*. Raki jajnika Typu II są zazwyczaj wykrywane późno, w zaawansowanym stanie choroby, z obecnością przerzutów. Przeżycie 5-letnie nie przekracza 30%. Podział raków jajnika przedstawia tabela 5.

Tabela 5. Podział raków jajnika.

Typ I (25% zachorowań)	Typ II (75% zachorowań)
Rak surowiczy G1 i G2	Rak surowiczy G3
Rak endometrioidalny G1 i G2	Rak endometrioidalny G3
Rak śluzowy	Rak niezróżnicowany G3
Rak jasnokomórkowy	Mięsakorak
Rak Brennera	
Wolny wzrost	Szybki wzrost
Mała wrażliwość na chemioterapię	Duża wrażliwość na chemioterapię
Rokowanie dobre (80% 5-letnich przeżyć)	Rokowanie złe (90% chorych umiera)

Stadia zaawansowania raka jajnika zostały określone według skali FIGO w stopniach I-IV, gdzie I to najmniej zaawansowana choroba, a IV to najbardziej zaawansowana choroba [34].

Klasyfikacja nowotworów jajnika u kobiet została zaktualizowana na początku 2014 roku i po raz pierwszy uwzględniono w niej również nowotwory jajowodu i otrzewnej [35]. Najważniejsze zmiany w nowej klasyfikacji raka jajnika, jajowodu i otrzewnej polegają na podzieleniu stopnia IC na trzy podgrupy obejmujące sytuacje związane z chirurgicznym uszkodzeniem torebki guza, pęknięciem torebki guza przed operacją i obecnością komórek

w płynie otrzewnowym. Stopień IIC został pominięty. Uznano, że chore z przerzutami ograniczonymi do węzłów chłonnych charakteryzują się lepszym rokowaniem niż osoby z przerzutami do otrzewnej i dlatego wyodrębniono tę grupę jako stopień IIIA1. Wyróżniono w niej dwie podgrupy na podstawie morfologii przerzutów do węzłów chłonnych. Mikroskopowe przerzuty do otrzewnej poza obszarem miednicy mniejszej zostały sklasyfikowane jako stopień IIIA2. W nowej klasyfikacji w stopniu IV wyodrębniono dwie podgrupy — stopień IVA, definiowany jako histopatologicznie lub cytologicznie potwierdzona obecność komórek nowotworowych w płynie z jam opłucnowych, oraz IVB — obejmujący przerzuty do miększu wątroby lub śledziony oraz przerzuty poza obszar jamy brzusznej. W tabeli 6 poniżej przedstawiono stopień zaawansowania raka według FIGO 2014.

Tabela 6. Stopień zaawansowania raka jajnika według FIGO [33].

Stopień zaawansowania	opis
I	Nowotwór ograniczony do jajników lub jajowodów
IA	Guz ograniczony do jednego jajnika lub jajowodu (nienaruszona ciągłość torebki guza), brak zmian na powierzchni jajnika lub jajowodu, brak komórek nowotworowych w płynie lub popłuczynach z otrzewnej
IB	Guz ograniczony do 2 jajników lub jajowodów (nienaruszona ciągłość torebki guza), brak zmian na powierzchni jajnika lub jajowodu, brak komórek nowotworowych w płynie lub popłuczynach z otrzewnej
IC	Guz ograniczony do 1 lub 2 jajników lub jajowodów z:
IC1	Śródoperacyjnym uszkodzeniem torebki
IC2	Naruszoną ciągłością torebki przed operacją lub obecnością guza na powierzchni jajnika lub jajowodu
IC3	Obecnością komórek nowotworowych w płynie lub popłuczynach z otrzewnej
II	Nowotwór ograniczony do jajników lub jajowodów z zajęciem struktury miednicy mniejszej (poniżej płaszczyzny wchodu miednicy) lub pierwotny rak otrzewnej
IIA	Zajęcie i/lub wszczepy na powierzchni macicy i/lub jajowodu i/lub jajników
IIB	Zajęcie innych struktur miednicy mniejszej
III	Nowotwór obejmujący 1 lub 2 jajniki/jajowody lub pierwotny rak otrzewnej z

	przerzutami do otrzewnej poza miednicą mniejszą i/lub przerzuty do węzłów chłonnych zaotrzewnowych
IIIA1	Przerzuty nowotworowe obecne tylko w węzłach chłonnych zaotrzewnowych (potwierdzone histopatologicznie)
IIIA1(i)	Przerzuty do węzłów chłonnych zaotrzewnowych w największym wymiarze \leq 10 mm
IIIA1(ii)	Przerzuty do węzłów chłonnych zaotrzewnowych w największym wymiarze $>$ 10 mm
IIIA2	Mikroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą (powyżej płaszczyzny wchodu miednicy) z obecnością lub bez przerzutów do węzłów chłonnych zaotrzewnowych
IIIB	Makroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą o średnicy \leq 2 cm w największym wymiarze z obecnością lub bez przerzutów do węzłów chłonnych zaotrzewnowych
IIIC	Makroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą o średnicy $>$ 2 cm w największym wymiarze z obecnością lub bez przerzutów do węzłów chłonnych zaotrzewnowych (włączając w to zajęcie przez nowotwór torebki wątroby i śledziony bez naciekania miększu narządu)
IV	Obecność przerzutów odległych (w tym przerzuty do otrzewnej)
IVA	Wysięk w jamie opłucnowej z potwierdzonym cytologicznie nowotworem
IVB	Śródmiąższowe przerzuty do wątroby oraz przerzuty do narządów poza jamą brzuszną (włączając w to węzły chłonne pachwinowe i węzły chłonne poza jamą brzuszną)

Grading, to stopień zróżnicowania histopatologicznego czyli ocena złośliwości histologicznej nowotworu, czyli, czy nowotwór ma charakter przerzutowy, czy też jest mniej podatny na rozprzestrzenianie. Ocena jest oparta na podstawie zróżnicowania struktury oraz cech cytologicznych komórek nowotworowych.

Wyróżniamy trzy typy histopatologicznego zróżnicowania:

- G1 – nowotwór dobrze zróżnicowany (komórki niezróżnicowane $<$ 5%);
- G2 – nowotwór średnio zróżnicowany (50% komórek niezróżnicowanych);
- G3 – nowotwór niezróżnicowany (komórki niezróżnicowane $>$ 50%)

1.8. Leczenie raka jajnika

Standardem postępowania w raku jajnika jest leczenie chirurgiczne. Niezwykle istotną procedurą jest kwalifikacja do zabiegu. Prawidłowa kwalifikacja powinna się opierać na wynikach badań obrazowych (tomografia komputerowa klatki piersiowej, jamy brzusznej i miednicy mniejszej) oraz doświadczeniu operatora. Wykonanie optymalnej operacji cytoredukcyjnej jest podstawowym elementem poza stopniem zaawansowania klinicznego decydującym o wyleczeniu chorej. Pierwotny zabieg operacyjny polega na całkowitym usunięciu macicy z przydatkami (jajniki i jajowody) oraz wycięciu węzłów chłonnych miednicznych i paraaortalnych do wysokości lewej żyły nerkowej. Rak jajnika wymaga leczenia skojarzonego z chemioterapią z zastosowaniem paklitekselu (leku cytostatycznego) oraz pochodnych platyny (innych leków cytostatycznych) [36]. Decyzję o zakwalifikowaniu chorej do operacji lub leczenia cytostatykami podejmuje zespół interdyscyplinarny. Z reguły podaje się 6 kursów chemioterapii. Wyjątkiem mogą być chore z zaawansowaniem nowotworu w stopniu IA lub IB wg klasyfikacji FIGO, z ograniczonym stopniem złośliwości G1 i G2. Radioterapia ma obecnie ograniczone znaczenie w zwalczaniu raka jajnika. Stosuje się ją zazwyczaj jako leczenie paliatywne lub objawowe [37, 38]. W przypadku młodych bezdzietnych kobiet, które chcą zachować zdolność do prokreacji stosuje się leczenie oszczędzające. Jeżeli choroba jest we wczesnym stadium zaawansowania zabieg polega na jednostronnym usunięciu chorego jajnika z jajowodem z adekwatnym zbadaniem stopnia zaawansowania za pomocą metod chirurgicznych i mikroskopowych. Przeżycia tych pacjentek w porównaniu z radykalną chirurgią są korzystne [39]. U pewnej grupy pacjentek z wczesnym stopniem zaawansowania i nowotworem dobrze zróżnicowanym można nie stosować chemioterapii po zabiegu operacyjnym. W przypadku pacjentek, u których rak jest znacznie zaawansowany i początkowo nie ma możliwości jego usunięcia, stosuje się często wstępnie chemioterapię. Gdy stwierdzi się wycofanie choroby stosuje się zabieg operacyjny.

W przypadku pacjentek, u których komórki raka są wrażliwe na działanie hormonów (mają receptory hormonalne) stosuje się hormonoterapię. Jest ona częścią leczenia wspomagającego. Leki hormonalne, które są stosowane w leczeniu raka jajnika obejmują: selektywne modulatory receptora estrogenowego – tamoksyfen, inhibitory aromatazy – letrozol, analogi; hormony uwalniające gonadotropiny – goserelina [40] (Tabela 7).

Tabela 7. Leki hormonalne stosowane w leczeniu raka jajnika.

Leki	Działanie
Tamoksyfen (selektywny modulator receptora estrogenowego)	Jest to jeden z rodzajów leków hormonalnych, czyli tzw. antyestrogenów, i jest stosowany w leczeniu nowotworów hormonozależnych. Należą do nich rak piersi, rak jajnika i rak prostaty. Wiąże się z receptorami estrogenowymi wewnątrz komórek nowotworowych w wyniku czego dochodzi do zahamowania syntezy czynników wzrostu i pobudza tworzenie receptorów progesteronowych. Efektem tego jest zmniejszenie podziału komórek nowotworowych (wrażliwych na działanie estrogenów).
Letrozol (inhibitor aromatazy)	Działanie polega na blokowaniu enzymu aromatazy, co prowadzi do zmniejszenia produkcji estrogenu w organizmie. Estrogen jest hormonem, który może przyspieszyć wzrost niektórych nowotworów. Obniżając poziom estrogenów, letrozol może spowolnić lub zatrzymać wzrost komórek rakowych.
Goserelina (analog gonadoliberyny (GnRH))	Działa poprzez hamowanie wydzielania hormonu luteinizującego (LH) i folikulotropowego (FSH) z przysadki mózgowej, co prowadzi do zmniejszenia produkcji testosteronu u mężczyzn oraz estrogenów u kobiet..

Hormonoterapia ma na celu spowolnienie rozwoju nowotworu oraz poprawę jakości życia. Wrażliwe na hormony komórki rakowe mają receptory hormonalne. Leki stosowane w terapii hormonalnej modulują transdukcję sygnału poprzez interakcję z receptorami hormonów płciowych i zmniejszają aktywność hormonalną danej tkanki. W tabeli 8 przedstawiono możliwości leczenia hormonalnego.

Tabela 8. Możliwości hormonalnego leczenia raka jajnika.

Leczenie hormonalne	Mechanizm działania	Opcje
Analogi receptora hormonu uwalniającego gonadotropiny	Kompetycyjnie wiąże GnRHR i zmniejsza wydzielanie hormonu folikulotropowego i hormonu luteinizującego	Agoniści GnRH I Tryptorelina Goserelin Histrelina Octan leuprolidu Antagoniści GnRH II Cetrorelix (Cetroreliks) Octan degareliksu
Estrogen	Blokada receptora estrogenowego	Antyestrogeny: Tamoksyfen Toremifen
	Supresja syntezy estrogenów	Inhibitory aromatazy: Anastrozol Eksemestan Letrozol
	Obniżenie ekspresji receptora estrogenowego	Antagoniści ER: Fulwestrant
	Ablacja hormonalna	Chirurgia Promieniowanie (rzadko stosowane)
Androgen	Blokada receptora androgenowego	Antyandrogeny: Flutamid Bikalutamid Enzalutamid
Progesteron	Blokada receptora progesteronu	Antagoniści PR: Mifepriston Medroksyprogesteron Octan megestrolu
	Zwiększenie poziomu progesteronu	Doustne tabletki antykoncepcyjne

		Ciąża Karmienie piersią
--	--	----------------------------

Z leczeniem hormonalnym wiążą się niestety działania niepożądane: bóle głowy, zmiany nastroju, zwiększenie masy ciała, zmęczenie. Rzadko mogą wystąpić poważne powikłania, jak zatorowość płucna, zakrzepica tętnic, udar niedokrwieny mózgu.

Leczenie podtrzymujące raka jajnika polega na stosowaniu inhibitorów PARP. Ich działanie koncentruje się na blokowaniu mechanizmów naprawczych komórki nowotworowej, uszkodzonej podczas chemioterapii [41]. W wyniku kumulacji uszkodzeń i braku mechanizmów regeneracji dochodzi do śmierci komórki nowotworowej.

Chore zdyskwalifikowane z leczenia operacyjnego to pacjentki, których stopień sprawności uniemożliwia wykonanie zabiegu operacyjnego. Najczęściej charakteryzuje je wysięk w opłucnej i potwierdzona histologicznie obecność komórek nowotworowych w płynie. Do leczenia operacyjnego nie kwalifikują się chore, u których w czasie leczenia neoadjuwantowego zaobserwowano progresję choroby. Otrzymują one chemioterapię oraz leczenie antyangiogenne [42].

1.9. Rokowanie w raku jajnika

Rokowanie u chorych z rakiem jajnika zależne jest od następujących czynników

- stopnia zaawansowania klinicznego,
- czy możliwy jest zabieg całkowitej cytoredukcji
- wrażliwości na pochodne platyny w leczeniu systemowym.

Tabela 9 prezentuje przeżycia 5-letnie w zależności od stopnia zaawansowania FIGO.

Tabela 9. Przeżycia 5-letnie w zależności od stopnia zaawansowania FIGO (www.onkonet.pl).

Stopień zaawansowania (FIGO)	Przeżycia 5-letnie (%)
FIGO I	89
FIGO II	70
FIGO III	32-46
FIGO IV	18

Indywidualizacja sposobów leczenia oraz nowe schematy lekowe pozwalają na poprawę rokowania w raku jajnika.

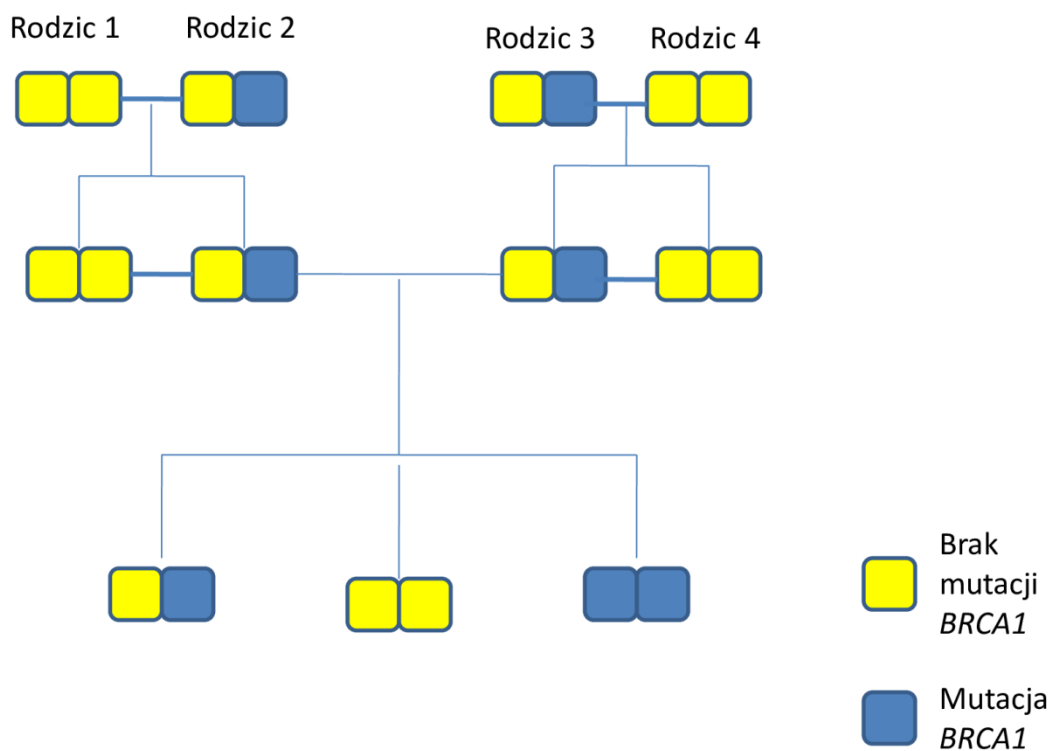
1.10. Czynniki genetyczne

Większość raków jajnika (75–90%), ma charakter sporadyczny i rozwija się w wyniku kumulacji mutacji somatycznych, czyli zmian niedziedzicznych, które nabywane są sukcesywnie w trakcie życia osobniczego [43].

Mutacje te ograniczone są do genomu komórek nowotworu czyli do tDNA – DNA wyizolowanego z komórek guza. Nowotwory sporadyczne rozpoznaje się zazwyczaj w wieku dojrzałym i nie są obciążone wywiadem rodzinnym. W przypadku dziedzicznych raków jajnika są one związane z nosicielstwem mutacji terminalnych genów *BRCA1/BRCA2*.

Posiadamy jako ludzie po 2 kopie tych genów, z których jedna została odziedziczona od matki, a druga od ojca. Mutacje te są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący. Oznacza to wyższe ryzyko zachorowania gdy zostanie odziedziczona jedna zmutowana kopia genu od jednego z rodziców. Zarówno kobiety jak i mężczyźni mogą być nosicielami mutacji. Każde dziecko rodzica, który jest nosicielem mutacji *BRCA1/2* ma 50% szans na jej odziedziczenie. Przykład rodzinnego dziedziczenia mutacji *BRCA1* przedstawiono na rycinie 3.

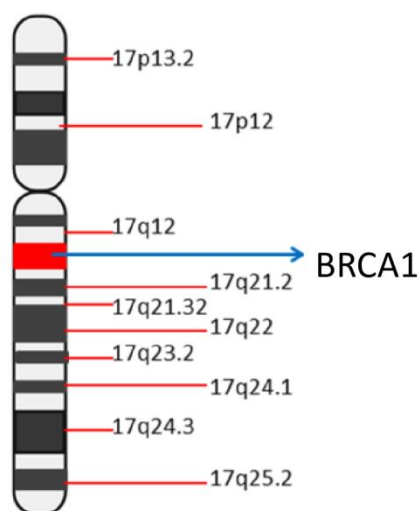
Rycina 3. Przykład rodzinnego wzorca dziedziczenia mutacji *BRCA1*.



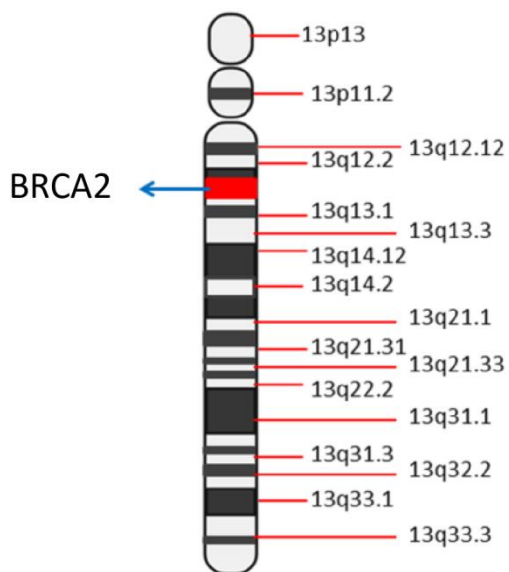
Geny *BRCA1/2* odpowiadają za zespół dziedzicznej predyspozycji do raka piersi i jajnika. *BRCA1* i *BRCA2* to geny supresorowe zlokalizowane odpowiednio na chromosomie 17q21 i 13q12, które odpowiadają za zwiększone ryzyko rozwoju raka piersi i jajnika.

Rycina 4. Schematyczne przedstawienie lokalizacji genów *BRCA1/2*.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>/<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/675>).

Chromosom 17



Chromosom 13



Białka kodowane przez geny *BRCA1/2* są odpowiedzialne za regulację procesów komórkowych oraz biorą udział w naprawie DNA. Jednym z rodzajów naprawy nici DNA jest zjawisko rekombinacji homologicznej (ang. Homologous recombination repair, HRR). Naprawa przez rekombinację homologiczną polega na wymianie podobnych lub identycznych części chromosomów. Błędy i uszkodzenia kumulują się w przypadku braku naprawy materiału genetycznego. Wynikiem gromadzenia błędów jest transformacja komórki zdrowej w komórkę nowotworową. Zaburzenia rekombinacji homologicznej (ang. Homologous recombination deficiency, HRD) dotyczą w większości genów *BRCA1* i/lub *BRCA2*, a w 6-27% dotyczą genów *RAD51D*, *ATM*, *NBN* i *PALB2*. Oprócz mutacji *BRCA1/2* z ryzykiem raka jajnika powiązane są też mutacje w innych genach jak: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*, *PMS2*. Odpowiedzialne są one za zespół dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego. Innymi mutacjami odpowiedzialnymi za rozwój tego nowotworu są mutacje germinalne w genach *BRIP1*, *RAD51C* lub *RAD51D* [44, 45].

W przypadku pacjentek chorych na raka jajnika rekomenduje się rozpoczęcie diagnostyki molekularnej od sekwencjonowania genów *BRCA1/2*. Jest to związane z rosnącym znaczeniem inhibitorów PARP w terapii nowotworów a obecność mutacji *BRCA1* lub *BRCA2* jest dobrym markerem predykcyjnym, który wskazuje na prawdopodobną wysoką efektywność inhibitorów PARP w terapii. Nowoczesne leczenie inhibitorem PARP dla grupy pacjentek obciążonych dziedzicznie *BRCA1/2* jest w Polsce refundowane od kilku lat. Jednak pozostałe 75–80 proc. pacjentek (bez obecności mutacji w genach *BRCA1/2*) nie mogło dotychczas liczyć na podobny standard leczenia. Od stycznia 2022 r. na liście leków refundowanych znalazł się niraparib we wskazaniu: raka jajnika bez mutacji w genach *BRCA1/2*. W grupie pacjentek stosujących niraparyb wykazano znamienne dłuższy czas do progresji oraz dłuższy czas do kolejnego leczenia niż w grupie otrzymującej placebo. Terapia podtrzymująca z użyciem niraparybu wydaje się obecnie bardzo dobrą opcją terapeutyczną [46].

Zaawansowany rak jajnika przed stosowaniem inhibitorów PARP wracał u 80% pacjentek. Nie ma jeszcze danych, jak ta grupa leków zmieni krajobraz w przypadku raka jajnika bez mutacji *BRCA1/2*, ale na podstawie wyników badań klinicznych przypuszcza się, że chore będą żyły znacznie dłużej. Badania pokazują, że stosowanie inhibitorów PARP wydłuża czas wolny od progresji choroby. Ponadto w wyniku identyfikacji mutacji *BRCA1* lub *BRCA2* wymagana jest weryfikacja charakteru wykrytej zmiany (mutacja germinalna – dziedziczna czy somatyczna – niedziedziczna). Weryfikacji tej dokonuje się poprzez analizę jej obecności w DNA wyizolowanym z komórek spoza nowotworu. Poradnictwem genetycznym oprócz chorych na nowotwór jajnika powinno obejmować się kobiety chore, u których nie zidentyfikowano mutacji w tDNA oraz kobiety, u których nie wykonano badań molekularnych na tDNA. Każda chora z rakiem jajnika kierowana do poradni genetycznych poddawana jest analizie rodowodowo-klinicznej oraz diagnostyce różnicowej z uwzględnieniem dziedzicznego raka piersi raka jajnika (hereditary breast-ovarian cancer – HBOC) oraz dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego. W przypadku chorych, których nie poddawano sekwencjonowaniu na *BRCA1* i *BRCA2* na tDNA, zalecany jest test genetyczny na DNA genomu konstytucyjnego w kierunku 5 mutacji fundatorowych genu *BRCA1*. Jeżeli pacjentki są obciążone rodzinnie test jest poszerzany następnie o sekwencjonowanie genów *BRCA1/2*. W wyniku powyższych działań udzielane są indywidualne zalecenia profilaktyczno-terapeutyczne. Jeżeli pacjentki z rakiem jajnika są obciążone dziedzicznie nowotworami a nie mają mutacji *BRCA1/2* mogą zostać poddane szerokopanelowym, komercyjnie dostępnym testom genetycznym sekwencjonowania

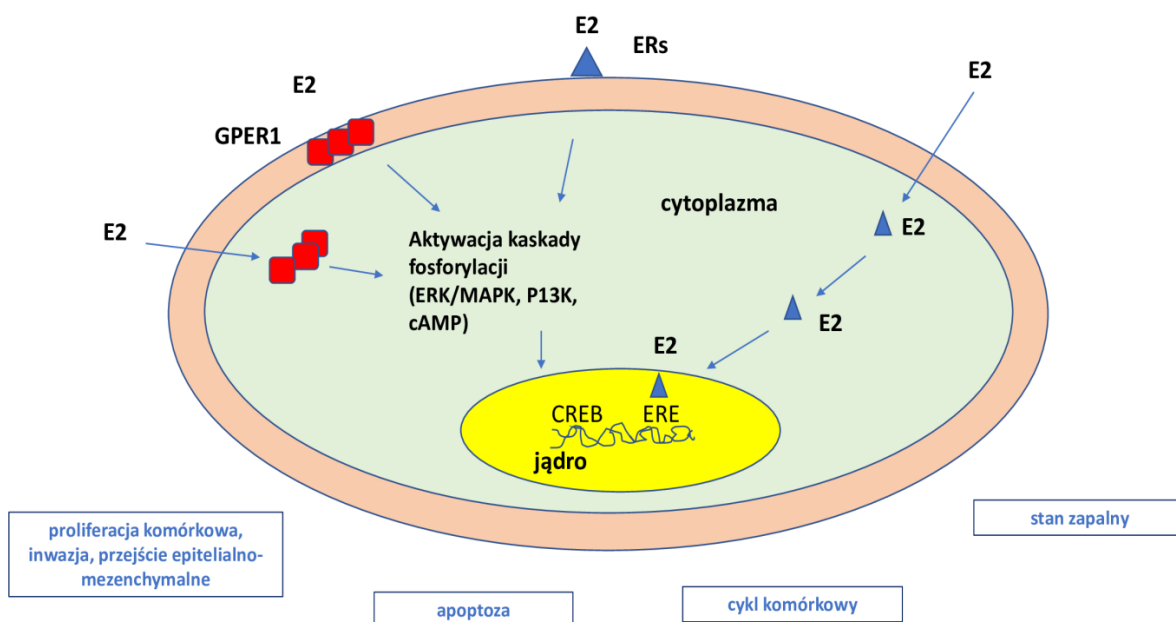
najnowszej generacji (NGS). Testy te pozwalają w ramach jednego badania na sekwencjonowanie wielu genów związanych z różnymi zespołami dziedzicznych predyspozycji do nowotworów. Wszystkie testy genetyczne mają jednak ograniczenia. W związku z tym jeżeli nie stwierdzi się mutacji nie jest to podstawą do wykluczenia podejrzanego zespołu dziedzicznej predyspozycji do nowotworów. Dlatego też finalne zalecenia powinny być formowane w wyniku pełnej całościowej analizy, która uwzględnia szereg wyników badań molekularnych i oceny rodowodowo-klinicznej. Jeżeli u pacjentki stwierdzi się mutację terminalną (dziedziczną) powinna zostać uświadomiona o ryzyku jej wystąpienia w rodzinie. Poradnictwem genetycznym powinna być objęta nie tylko pacjentka ale także wytypowani krewni [47].

1.11. Rola receptorów estrogenowych w onkogenezie raka jajnika

Choć rak jajnika nie należy do najczęstszych nowotworów atakujących kobiety, to jest jednym z najbardziej zabójczych, co jest spowodowane zbyt późną diagnozą. Dlatego prowadzi się badania, mające na celu poznanie nowych markerów predykcyjnych dla tej choroby. W badaniach zwraca się uwagę na receptory estrogenowe.

Jajniki są centralnymi narządami rozrodczymi kobiet. Produkują hormony, takie jak testosteron, progesteron i estrogen. Do estrogenów należą estron (E1), 17 β -estradiol (E2) i estriol (E3), z których E2 jest najbardziej dominującym estrogenem. Sygnalizacja komórkowa estrogenu odbywa się za pośrednictwem receptorów estrogenowych (ER). ER to rodzina czynników transkrypcyjnych, które kontrolują biologiczną funkcję estrogenów poprzez regulację transkrypcji genów za pomocą elementów odpowiedzi estrogenowej (ERE). Wśród receptorów estrogenowych można wyróżnić zarówno receptory klasyczne (ER α i ER β), jak i nieklasyczne (receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G 1 (GPER1)). Estrogeny mogą modulować biologię komórek nowotworowych, wpływając na procesy takie jak proliferacja komórek, inwazja, apoptoza, cykl komórkowy i stan zapalny [48, 49]. Główne mechanizmy zmian w biologii komórek raka jajnika wywołanego estrogenami przedstawiono na rycinie 5.

Rycina5. Schematyczne przedstawienie głównych mechanizmów zmian w biologii komórek raka jajnika indukowanych estrogenami. E2 - estradiol, ERs – receptory estrogenowe, GPER1 - receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G1, ERE - element odpowiedzi estrogenowej, CREB – białko wiążące element odpowiedzi cAMP.



Wyróżnia się 2 podtypy receptorów estrogenowych: alfa i beta. Receptor alfa jest kodowany przez gen *ESR1* zlokalizowany na chromosomie 6q25.1, receptor beta jest kodowany przez gen *ESR2* na chromosomie 14q23. Należą do rodziny receptorów jądrowych [50, 51].

Oba receptory mogą aktywować lub hamować proces transkrypcji wielu genów. Mogą też działać antagonistycznie w stosunku do siebie po związaniu takiego samego liganda [52]. Zapoczątkowanie procesu transformacji jest wynikiem połączenia estrogenów z białkiem receptorowym w wyniku czego dochodzi do zmiany konformacji i odsłonięcia tej części receptora, która łączy się z DNA. Oba receptory estrogenowe alfa i beta należą do czynników transkrypcyjnych aktywowanych ligandem. Ponieważ oba receptory wykazują różną i odmienną funkcję, rozmieszczenie tkankowe i wiążą różne kofaktory, odpowiedź komórki na estrogeny jest zróżnicowana [53].

Receptor estrogenowy ER α to białkowy czynnik transkrypcyjny ulegający aktywacji pod wpływem ligandów 17 β -estradiolu, estronu i estriolu [54]. W organizmie 17 β -estradiol i estron są produkowane przez komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego w warunkach fizjologicznych. U kobiet w wieku pomenopauzalnym z diagnozą nabłonkowego raka jajnika, wykrywa się podwyższone stężenie tych właśnie hormonów w krążeniu obwodowym. Wykazano, że zwiększony poziom estrogenów we krwi jest wynikiem ich wytwarzania przez komórki raka jajnika [55-57].

W komórkach nabłonka jajnikowego oraz guzach jajnika dochodzi do ekspresji genu aromatazy. Aromataza jest enzymem, który pełni istotną rolę w syntezie estrogenów u kobiet, zwłaszcza w okresie po menopauzie. W tym czasie kor nadnerczy staje się głównym źródłem estrogenów. Enzym ten katalizuje przekształcanie androgenów w estrogeny. Aromataza staje się głównym źródłem estrogenów w okresie menopauzy.

Podsumowując estrogeny tworzą środowisko hormonalne optymalne dla rozwoju nowotworu. Aktywnie uczestniczą w procesie regulowania namnażania komórek nowotworowych [56].

W prawidłowych komórkach zarówno nabłonka jajnikowego jak i w komórkach nabłonkowego raka jajnika stwierdzono obecność receptorów dla estrogenów. W 60% przypadków raka jajnika stwierdza się znacznie podwyższony poziom receptorów ER α [55, 56, 58]. ER α jest obecny w największej ilości w jądrze komórkowym, mniej w cytoplazmie. ER α występuje także w błonie komórkowej niektórych komórek [59].

Estrogeny działają poprzez dwa mechanizmy. Po pierwsze bezpośrednie wiązanie się z DNA poprzez element reagujący na estrogen ERE (ang. estrogen responsive element) oraz mechanizm pośredni za pomocą czynnika transkrypcyjnego AP1. Miejscem specyficznym w DNA, które oddziałuje z receptorem estrogenowym jest ERE. Drugi mechanizm polega oddziaływaniu aktywowanego receptora estrogenowego poprzez element wzmacniający ekspresję (ang. enhancer) typu AP1 [60, 61].

Ekspresja receptorów estrogenowych alfa i beta w komórkach raka jajnika jest zależna od typu histopatologicznego. Występowanie receptorów estrogenowych analizowano w różnych typach histopatologicznych raka jajnika [62].

Receptor ER-alfa znaleziono w 97% przypadków nowotworów o utkaniu surowiczym gruczolakoraka, w typie endometrioidalnym w 100 %, natomiast w typie śluzowym w 70 % [55]. Nie stwierdzono ekspresji receptora ER-alfa w typie gruczolakoraka jasnokomórkowego. Receptor ER-beta występował we wszystkich typach

histopatologicznych raka jajnika: nowotwór o utkaniu surowiczym 41%, typ śluzowy 30%, typ endometrioidalny 75%, rak jasnokomórkowy 39% [55].

Różną ekspresję receptorów ER α i - β wykazano pomiędzy prawidłowym nabłonkiem jajnika, guzami pierwotnymi i przerzutowymi raka jajnika [63, 64]. W prawidłowym nabłonku występowała ekspresja receptorów ER α i - β , w guzach pierwotnych obserwowano obniżoną ekspresję receptorów ER α , natomiast w guzach przerzutowych raka jajnika stwierdzono brak ekspresji receptora ER β [57, 58].

W badaniach na liniach komórkowych raka jajnika niezawierających receptora ER α (PEO14) oraz zawierających receptor ER α (BG1) wykazano, że ER α może wpływać na receptor progesteronowy w przeciwieństwie do ER β [65-67].

Stwierdzono przeciwny wpływ ER α i - β na aktywność cykliny D1, białka cyklu komórkowego [68]. ER β zmniejsza ekspresję genu cykliny D1, podczas gdy ER α zwiększa jej poziom [69]. Cyklina D1 to onkogen, którego nadmierna ekspresja może przyczyniać się do rozwoju nowotworów.

W badaniach będących metaanalizą dotyczących częstości ekspresji receptorów dla hormonów płciowych w raku surowiczym jajnika uzyskano następujące wyniki [70]. Rak surowiczy jajnika o niskim stopniu złośliwości w 81% wykazywał ekspresję receptorów dla estrogenów a w 54% przypadków receptorów dla progestagenów. W przypadku raka surowiczego o wysokim stopniu złośliwości odsetki te wynosiły odpowiednio 62% i 31%.

Rak surowiczy o niskim stopniu złośliwości w dużym procencie wykazuje ekspresję receptorów dla hormonów płciowych. Guz tego typu ma bardziej indolentny charakter oraz jest mniej wrażliwy na chemioterapię. Dlatego zastosowanie hormonoterapii mogłoby być opcją terapeutyczną w przypadku tego guza. W przypadku raka surowiczego gdy obserwowany jest wysoki stopień złośliwości, następuje dynamiczny wzrost oraz większa wrażliwość na chemioterapię. Sugeruje się, że u dużej części pacjentek można by było w takim przypadku dodatkowo zastosować hormonoterapię.

W procesie nowotworzenia istotna jest kumulacja mutacji w protoonkogenach i genach supresorowych. Jednak istotne znaczenie mogą mieć również polimorfizmy genetyczne. Są to zmiany na poziomie genu mogące warunkować zmianę w sekwencji aminokwasowej białek. Polimorfizmy wpływają na miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych. Polimorfizmy mogą wpływać zarówno na zmianę ryzyka zachorowania na nowotwór jak i na efektywność terapii odgrywając istotną rolę w farmakogenetyce leków przeciwnowotworowych w tym w transporcie, metabolizmie oraz dystrybucji tkankowej i eliminacji leku.

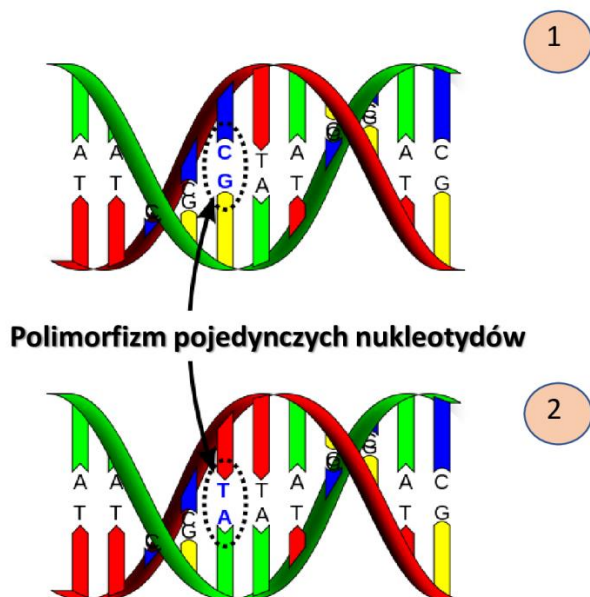
Zmiany zachodzące w sekwencji ludzkiego DNA mogą zmieniać odpowiedź organizmu na pewne patogeny, substancje chemiczne, leki czy wywoływać choroby. Jednak największe znaczenie mają badania porównawcze DNA osób chorujących na dane schorzenie i bez tej choroby (marker genetyczny). Podstawowe znaczenie kliniczne polimorfizmów receptora estrogenowego α pozostaje w związku z wykorzystaniem ich jako czynnika predykcyjnego, umożliwiającego podjęcie decyzji terapeutycznych. Prace badawcze prowadzone obecnie skupiają się na oznaczeniach kilku zasadniczych polimorfizmów: PvuII, XbaI i innych znacznie rzadziej oznaczanych (rs746432, rs2077647 i rs532010). Obejmują one ocenę znaczenia tych polimorfizmów w przypadku raka endometrium [71], osteoporozy [72, 73], raka prostaty [74], raka sutka [75-77] a także raka jajnika [78].

1.12. Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP)

Z polimorfizmem mamy do czynienia gdy zmiana genetyczna (dany allel konkretnego genu) występuje w populacji z częstością większą niż 1%. Wyróżniamy polimorfizmy pojedynczego nukleotydu i polimorfizm sekwencji mini i -mikrosatelitarnych [79-81].

SNP to zjawisko zmienności sekwencji DNA. Jest to zamiana jednego nukleotydu (G, C, T lub A) pomiędzy osobnikami danego gatunku lub drugim odpowiadającym chromosomem danego osobnika [82, 83]. Schemat SNP został przedstawiony na rycinie 6.

Rycina 6. Polimorfizm pojedynczych nukleotydów – schematyczne przedstawienie.



SNP determinuje występowanie zjawiska zmienności DNA, które szacuje się na ok. 90% całej zmienności w ludzkim genomie. Występowanie SNP może dotyczyć zarówno sekwencji kodującej, niekodującej lub regionów międzygenowych. Bardzo często SNP determinują występowanie wielu chorób a zwłaszcza nowotworów złośliwych poprzez zmiany w sekwencji DNA [84].

Polimorfizm i mutacja to nie to samo. Najczęstszą przyczyną wystąpienia mutacji jest działanie czynnika mutagennego (część mutacji może powstawać również spontanicznie), natomiast wystąpienie polimorfizmu może wynikać z przystosowywania się organizmu do zmiennych czynników środowiskowych. Polimorfizm występuje w populacji z częstością większą niż 1% podczas gdy mutacja jest rzadsza dotyczy mniej niż 1% populacji.

W procesie transformacji nowotworowej oprócz mutacji w protoonkogenach i genach supresorowych istotne znaczenie mogą mieć również polimorfizmy genetyczne warunkujące zmianę w sekwencji aminokwasowej białek lub wpływające na miejsce wiązania czynników transkrypcyjnych [85].

Polimorfizmy te, w tym polimorfizmy pojedynczych nukleotydów mogą wpływać zarówno na zmianę ryzyka zachorowania na nowotwór jak i na efektywność terapii odgrywając istotną rolę w transporcie, metabolizmie oraz dystrybucji tkankowej i eliminacji leku [86, 87].

Od wersji polimorficznej genu może zależeć regulacja ekspresji przez onkogeny, co może mieć znaczenie dla rokowania w raku. Jeżeli bowiem, wśród alleli genu znajdzie się taki, którego ekspresja wskutek oddziaływania z aktywnymi onkogenami lub ich produktami będzie podwyższona w stosunku do innych alleli, to jego wykrycie we krwi pozwoli na dobór odpowiedniej terapii na przykład radykalnego zabiegu chirurgicznego z następującymi po nim chemio- i radioterapią. Dodatkowa terapia nie musiałaby towarzyszyć operacji w przypadku wystąpienia wersji allelicznej, której ekspresja jest utrzymywana na niezmiennym poziomie bez względu na proces transformacji nowotworowej w komórce. Stwarza to potencjalne możliwości wykorzystania polimorfizmów jako łatwo dostępnych markerów prognostycznych w chorobach nowotworowych.

Można rozważać także sytuację, w której allel o prawidłowym poziomie ekspresji ulega mutacji na skutek procesów transformacji nowotworowej. Wersja zmutowana genu może być podatna na oddziaływanie z onkogenami lub ich produktami, powodując podwyższony poziom jego ekspresji. W takiej sytuacji zmieniona wersja genu, nie będąca wersją konstytutywną, nie mogłaby być wykrywana we krwi, lecz jedynie w tkance objętej procesem nowotworzenia, jednakże także wówczas możliwe jest zastosowanie polimorfizmów jako markerów prognostycznych w raku. Na podstawie badań genetycznych wariantów danego polimorfizmu można segregować pacjentki do grupy zwiększonego ryzyka rozwoju raka.

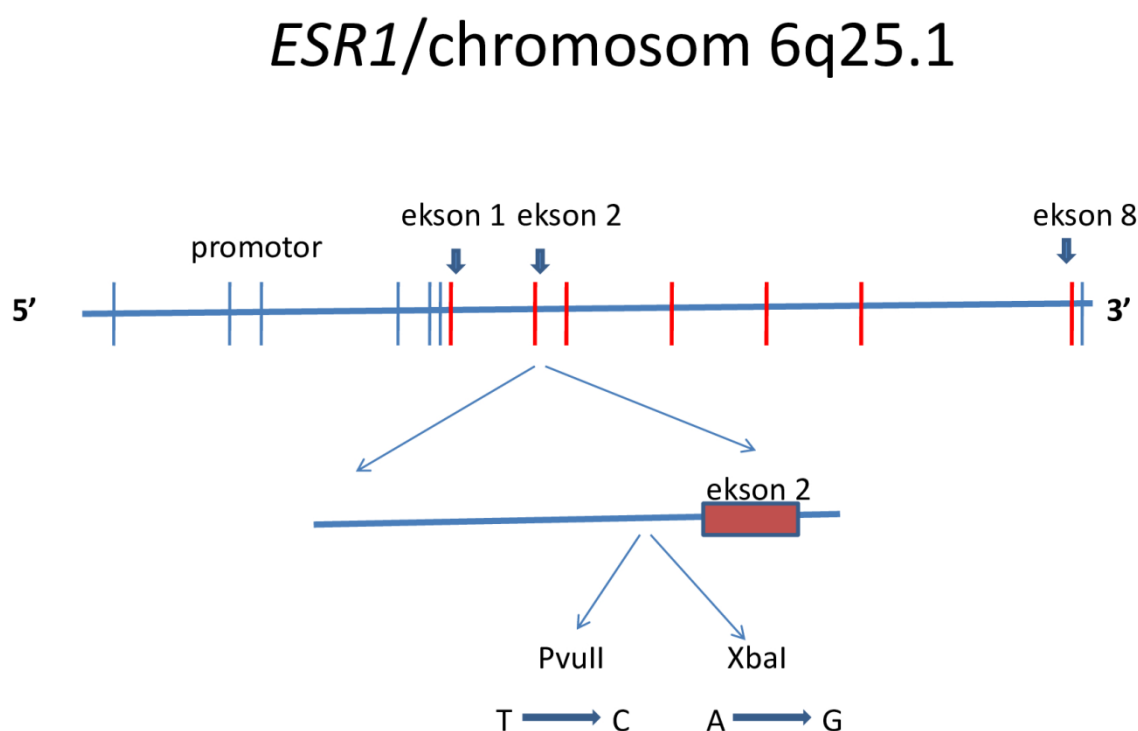
Polimorfizm w genach kodujących receptory hormonalne korelowano ze zmianami czynników reprodukcyjnych i zwiększonym ryzykiem raka jajnika w różnych populacjach. Spośród receptorów hormonalnych receptor estrogenowy był szeroko badany odnośnie różnych grup etnicznych. Estrogeny to grupa związków mających szczególne znaczenie dla procesów rozrodczych. Działanie estrogenu jest stymulowane poprzez receptor estrogenowy, dimeryczne białko jądrowe, które wiąże się z DNA i kontroluje ekspresję genów. Ekspresja ER zachodzi w określonych tkankach, jajnika, macicy i piersi [88, 89].

Zwiększone powinowactwo estrogenu do wiązania się z jego receptorem jest kluczowym mechanizmem w kontrolowaniu efektów biologicznych [90,91].

ER i regulowany przez niego receptor progesteronu są szczególnie interesujące, ponieważ ich poziomy białka są zawsze podwyższone w komórkach stopnia przednowotworowego i złośliwego [92]. Podwyższona ekspresja ER zachodzi w raku piersi i związana jest z korzystniejszym rokowaniem [93]. Istnieją dwa typy ER, ER α i ER β . Gen *ER α* (*ESR1*) został zmapowany na 6q25.1, a jego dwa najczęściej opisywane polimorfizmy pojedynczego nukleotydu to *ER α* -397 PVUII (rs2234693) i *ER α* -351 XbaI (rs9340799).

Polimorfizmy te znajdują się w pierwszym intronie genu *ESR1* (Rycina 7) i zostały już powiązane z kilkoma jednostkami chorobowymi kobiet, takimi jak występowanie osteoporozy [72, 73], raka piersi i jajnika [75-78].

Rycina 7. Struktura genu receptora estrogenowego α z uwzględnieniem położenia wariantów polimorficznych XbaI i PvuII.



Badania wykazały znaczący związek polimorfizmów rs9340799 i rs2234693 ze zwiększonym ryzykiem raka jajnika [94, 95].

Weiderpass i wsp. donieśli, że polimorfizm genu receptora α w raku jajnika może wpływać na proliferację komórek i antyapoptozę (mechanizmy lub substancje, które hamują lub zapobiegają apoptozie, czyli zaprogramowanej śmierci komórki) w związku z czym może wpływać na podatność danej osoby na występowanie raka jajnika [96].

Bardin i wsp. wykazali, że nie było znaczących różnic w poziomach mRNA *ESR1* w prawidłowych tkankach jajnikach, łagodnych guzach i rakach jajnika [97].

Badanie przeprowadzone przez Doherty'ego i wsp. wykazało, że allel T rs2295190 był związany ze zwiększonym ryzykiem inwazyjnego raka jajnika [98].

Przeprowadzone w przedstawionej pracy badania dotyczyły znaczenia polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu *ESR1* jako czynnika ryzyka wystąpienia nowotworów jajnika. Badania te są niezwykle istotne ze względu na fakt, że w chwili obecnej nie ma metody, która spełniałaby warunki screeningu w przypadku raka jajnika. Niezwykle istotne jest więc wyodrębnienie pacjentek z grup „wysokiego ryzyka” oraz ich ścisła kontrola. Przeprowadzone badania mogą przyczynić się do poznania podłoża molekularnego rozwoju badanego nowotworu. Mogą mieć także implikacje kliniczne umożliwiając poprawę wcześniejszego rozpoznawania chorób nowotworowych a w efekcie wydłużenie czasu przeżycia chorych na raka jajnika.

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu ze względu na ich dużą częstotliwość i stosunkowo równomierne rozmieszczenie w genomie człowieka znalazły zastosowanie jako markery genetyczne. Polimorfizmy wykorzystuje się do dokładnego mapowania loci chorobowych i do badań asocjacji genów kandydujących. Analiza asocjacji i powiązań z zastosowaniem SNP są interesujące w aspekcie ich diagnostycznego wykorzystania. To wykorzystanie jest możliwe dzięki ich stabilnemu dziedziczeniu przez pokolenia. W publicznych bazach danych dostępna jest duża liczba SNPs. Dlatego badania asocjacji i dokładne mapowanie loci chorobowych są bardzo praktyczne i szeroko wykorzystywane.

Podsumowując przytoczone wcześniej informacje według danych statystycznych z ostatnich lat zachorowalność na raka jajnika na świecie stale rośnie. Bardzo zróżnicowaną częstość występowania obserwuje się na różnych kontynentach, regionach geograficznych, rasach i grupach etnicznych. Nowotwory te najczęściej dotyczą kobiet po menopauzie i są zwykle diagnozowane (70%) w późnych stadiach. Pomimo ulepszeń w technikach chirurgicznych i wprowadzenia nowych metod chemioterapii, pięcioletni wskaźnik przeżycia pacjentek z rakiem jajnika pozostał zasadniczo niezmieniony i wynosi obecnie około 30-40%. W analizie epidemiologicznej wyróżnia się szereg czynników związanych z występowaniem raka jajnika. Stopień zaawansowania jest najważniejszym czynnikiem prognostycznym. W celu oceny stopnia zaawansowania klinicznego złośliwych nowotworów jajnika Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa (FIGO) opracowała odpowiednią klasyfikację tych nowotworów. Guzy jajnika charakteryzują się dużą różnorodnością cech morfologicznych i biologicznych. Na podstawie ustalonego stadium klinicznego i dojrzałości dobiera się optymalną metodę leczenia chirurgicznego i chemioterapii w celu osiągnięcia jak największej cytoredukcji guza. Około 5-10% przypadków raka jajnika jest dziedzicznych. Zlokalizowano dwa geny podatności na raka jajnika: *BRCA1* i *BRCA2*, których mutacje dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący. Należy dodać, że badania wyżej

wymienionych genów nie wyjaśniają wszystkich rodzinnych skupisk przypadków raka jajnika. Alternatywnym modelem jest założenie kombinacji licznych, częstych wariantów genetycznych niskiego ryzyka, na przykład różnych alleli polimorficznych. W 60% przypadków raka jajnika stwierdza się znacznie podwyższony poziom receptorów ER α . Receptor ER α jest kodowany przez gen *ESR1*, więc jego polimorfizmy mogą być badane jako potencjalne markery molekularne raka jajnika. Badane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów mogą stanowić grupę nowych czynników ryzyka rozwoju nowotworów, a ich analiza może być wykorzystana do kwalifikacji pacjentów do grupy pacjentów o wysokim ryzyku rozwoju choroby. Ponadto mogą być niezwykle przydatne w ocenie indywidualnego ryzyka rozwoju choroby u osób bez objawów raka. Wyniki badań w przyszłości mogą zostać wykorzystane do poprawy wczesnej diagnostyki nowotworów i w efekcie wydłużenia czasu przeżycia pacjentów z tymi nowotworami.

2. Cel pracy

Celem pracy jest:

1. Określenie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów rs2234693 genu *ESR1* w preparatach raka jajnika kobiet w porównaniu do materiału kontrolnego,
2. Określenie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów rs9340799 genu *ESR1* w preparatach raka jajnika kobiet w porównaniu do materiału kontrolnego,
3. Badanie korelacji polimorfizmów pojedynczych nukleotydów rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* z uznanymi klasycznymi czynnikami kliniczno-patologicznymi,
4. Badanie korelacji między polimorfizmami pojedynczych nukleotydów rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* a ryzykiem rozwoju raka jajnika.

3. Materiały i metody

3.1. Charakterystyka pacjentek

W badaniu wzięło udział 100 pacjentek z histologicznie potwierdzonym rozpoznaniem raka jajnika. Do badań wykorzystano materiał archiwalny zgromadzony w archiwum Zakładu Patomorfologii Klinicznej (w latach 2019-2023) w postaci bloczków parafinowych zawierających wycinki z guzów nowotworowych jajnika. Wszystkie zdiagnozowane guzy klasyfikowano według kryteriów Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa (FIGO). Typowanie histologiczne i klasyfikację wykonywano zgodnie z klasyfikacją WHO. Prawidłową tkankę jajnika pobrano od kobiet poddanych laparoskopii z powodu chorób niezłośliwych (zmiany łagodne jajnika). 100 bloczków parafinowych, zawierających wycinki z wyżej opisanych łagodnych zmian jajnika, zgromadzonych w archiwum Zakładu Patomorfologii Klinicznej ICZMP w Łodzi stanowiło grupę kontrolną. Aby upewnić się, że wybrany materiał histologiczny jest reprezentatywny dla tkanki nowotworowej i nienowotworowej, każda próbka tkanki, zakwalifikowana do ekstrakcji DNA, została początkowo sprawdzona przez patologa. DNA z prawidłowej tkanki jajnika ($n = 100$) służyło jako kontrola. Grupę kontrolną stanowiły osoby niespokrewnione, bez chorób przewlekłych i bez historii nowotworów jajników lub innych.

Z bloczków parafinowych zostały pobrane po 2 skrawki grubości 5 mikrometrów do 2 ml probówek typu Eppendorf. Badania histopatologiczne i genetyczne zostały przeprowadzone w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej ICZMP i Pracowni Genetyki Nowotworów Zakładu Patomorfologii Klinicznej ICZMP. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej nr 34/2025 przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi.

Tabela 10. Liczba i wiek pacjentek z grupy badanej i grupy kontrolnej.

	grupa badana (%)	grupa kontrolna (%)
Liczebność grupy	n=100	n=100
Wiek (zakres)	35-72	37-69
Wiek, średnia	52,11 ± 10,65	59,10±10,11
<50 lat	16 (16,0)	26 (26,0)
≥50 lat	84 (84,0)	74 (74,0)

Tabela 11. Charakterystyka typów histologicznych nowotworów jajnika użytych do badań.

	zmienna	grupa badana (%)
typ histologiczny	surowiczy	40 (40,0)
	śluzowy	4 (4,0)
	endometrioidalny	31 (31,0)
	jasnokomórkowy	2 (2,0)
	niezróżnicowany	23 (23,0)

Tabela 12. Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy badanej.

	zmienna	Grupa badana (%)
Stopień zróżnicowania histopatologicznego G (grading)	G1	40 (40,0)
	G2	18 (53,0)
	G3	42 (7,0)
stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji FIGO (staging)	I	39 (39,0)
	II	13 (13,0)
	III	48 (48,0)
rozmiar guza (mm)	>5cm	41 (41,0)
	<5cm	59 (59,0)

3.2. Izolacja DNA

Ekstrakcję DNA z materiału przeprowadzono przy użyciu dostępnego w sprzedaży zestawu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy), zgodnie z instrukcją producenta.

I. Proces deparafinizacji próbki

Procedura deparafinizacji próbki (skrawek parafinowy grubości 5 mikrometrów umieszczony w probówce typu Eppendorf)

1. Do próbki umieszczonej w probówce Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodawano 1200 μ l ksylenu i mieszano przez worteksowanie pulsacyjne około 15s.
2. Wirowano próbkę 5 min w temperaturze pokojowej przy prędkości 12 000 RPM.
3. Usuwano delikatnie supernatant aby nie uszkodzić osadu.
4. Dodawano 1200 μ l etanolu (96%) do osadu i mieszano przez worteksowanie pulsacyjne około 15 s.
5. Wirowano próbkę 5 min w temperaturze pokojowej przy prędkości 12 000 RPM.
6. Usuwano delikatnie supernatant aby nie uszkodzić osadu.
7. Powtarzano etapy 1-6 siedem razy.
8. Uzyskany osad pozostawiano do drugiego dnia w temperaturze pokojowej w celu odparowania etanolu i wysuszenia osadu.
9. Rozpuszczano wysuszony osad w 180 μ l buforu ATL dostępnego w zestawie do izolacji QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Niemcy) i przystępowano do etapu izolacji DNA.

II. Izolacja DNA

1. Do uzyskanej w punkcie 9 mieszaniny dodawano 20 μ l proteinazy K; mieszano przez worteksowanie pulsacyjne i inkubowano próbkę w 56°C w łaźni wodnej do całkowitej lizy – około 2 h
2. Po inkubacji mieszano próbkę przez worteksowanie pulsacyjne i dodawano 200 μ l buforu AL dostępnego w zestawie QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Ponownie worteksowano.
3. Wprowadzano 200 μ l 96% etanolu i mieszano przez worteksowanie 15 s.
4. Przenoszono zawartość probówki do kolumnienek dostarczonych w zestawie do izolacji i wirowano przy 8 000 RPM przez 1 min.

5. Usuwano probówkę zbierającą z płynem i umieszczano kolumnę w nowej probówce zbierającej; dodawano 500 µl roztworu płuczącego AW1 dostępnego w zestawie do kolumny i wirowano przy obrotach 8 000 RPM przez 1 min.
6. Przemycano kolumnienki ponownie 500 µl roztworem płuczącym AW2 wirując przy 14 000 RPM przez 3 min.
7. Usuwano probówkę z płynem i prowadzono elucję z użyciem 100 µl roztworu elucyjnego dostępnego w zestawie wirując przy 8 000 RPM 1 min.
8. Usuwano kolumnę, probówkę z przesączem zawierającym oczyszczone DNA szczelnie zamykano i przechowywano w temp. -20°C.

3.3. Spektrofotometryczna analiza czystości i stężenia DNA

Czystość otrzymanych preparatów DNA określano metodą spektrofotometryczną poprzez dwukrotny pomiar absorbancji każdej z próbek przy długości fali 260 nm i 280 nm. Przyjętym kryterium czystości DNA była wartość A260/A280 mieszcząca się w granicach 1,8-2,0. Stężenie DNA określano metodą spektrofotometryczną na podstawie wartości absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm. Wartość ta odpowiadała następującym zależnościom:

$$1\text{OD} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$$

Charakterystykę stopnia czystości oraz stężenia DNA w preparatach badanych oraz materiale kontrolnym zawarto w tabelach 13 oraz 14.

Tabela 13. Charakterystyka DNA wyizolowanego z preparatów grupy badanej.

L.p.	C [$\mu\text{g/ml}$]	A260/280	A260	A280
1.	112,8	1,64	0,056	0,034
2.	1776,4	1,91	0,888	0,464
3.	256	1,74	0,128	0,074
4.	1642,7	1,86	0,821	0,442
5.	3117	1,88	1,559	0,829
6.	2452,9	1,93	1,226	0,636
7.	1137,8	1,81	0,569	0,314
8.	1816,7	1,77	0,908	0,513
9.	2017,56	1,86	0,742	0,483
10.	5581,6	1,87	2,791	1,492
11.	1557,7	1,81	0,779	0,43
12.	3882,5	1,88	1,941	1,032
13.	609,2	1,55	0,305	0,197
14.	141,2	1,49	0,071	0,047
15.	1353,1	1,82	0,677	0,371
16.	4217,2	1,89	2,109	1,113
17.	2161,9	1,84	1,081	0,589
18.	2051	1,86	1,025	0,55
19.	1492,4	1,86	0,746	0,4
20.	3569,9	1,86	1,785	1,961
21.	782,5	1,85	0,391	0,211
22.	2051,2	1,85	1,026	0,555
23.	5829,3	1,77	2,915	1,651
24.	760,8	1,67	0,38	0,228

25.	951,7	1,45	0,476	0,329
26.	5066,2	1,85	2,533	1,37
27.	2559,6	1,87	1,28	0,686
28.	257,1	1,39	0,129	0,093
29.	2255,9	1,9	1,128	0,595
30.	294,6	1,54	0,147	0,094
31.	98,9	1,49	0,049	0,033
32.	333,9	1,58	0,165	0,105
33.	110,2	1,78	2,755	1,588
34.	976,4	1,67	0,488	0,292
35.	647,7	1,66	0,324	0,195
36.	655,2	1,58	0,328	0,208
37.	534,9	1,64	0,267	0,163
38.	2017,9	1,84	1,009	0,549
39.	635,8	1,49	0,318	0,213
40.	543,6	1,14	0,272	0,239
41.	899,1	1,48	0,45	0,303
42.	741	1,54	0,371	0,241
43.	1603,8	1,6	0,802	0,501
44.	871,8	1,51	0,436	0,288
45.	1272,2	1,64	0,636	0,388
46.	745,7	1,53	0,373	0,243
47.	977,4	1,54	0,489	0,317
48.	878,8	1,56	0,439	0,282
49.	1494,5	1,66	0,747	0,45
50.	1019,4	1,6	0,51	0,319
51.	1769,7	1,23	0,885	0,72
52.	94,75	1,69	0,05	0,04
53.	1492,18	1,97	0,87	0,49
54.	215,04	1,79	0,13	0,08
55.	1379,87	1,92	0,80	0,46
56.	2618,28	1,94	1,53	0,87
57.	2060,44	1,99	1,20	0,67
58.	955,75	1,86	0,56	0,33
59.	1526,03	1,82	0,89	0,54
60.	1694,75	1,92	0,73	0,51
61.	4688,54	1,93	2,74	1,57
62.	1308,47	1,86	0,76	0,45
63.	3261,30	1,94	1,90	1,08
64.	511,73	1,60	0,30	0,21
65.	118,61	1,53	0,07	0,05
66.	1136,60	1,87	0,66	0,39
67.	3542,45	1,95	2,07	1,17

68.	1816,00	1,90	1,06	0,62
69.	1722,84	1,92	1,00	0,58
70.	1253,62	1,92	0,73	0,42
71.	2998,72	1,92	1,75	2,06
72.	657,30	1,91	0,38	0,22
73.	1723,01	1,91	1,01	0,58
74.	4896,61	1,82	2,86	1,73
75.	639,07	1,72	0,37	0,24
76.	799,43	1,49	0,47	0,35
77.	4255,61	1,91	2,48	1,44
78.	2150,06	1,93	1,25	0,72
79.	215,96	1,43	0,13	0,10
80.	1894,96	1,96	1,11	0,62
81.	247,46	1,59	0,14	0,10
82.	83,08	1,53	0,05	0,03
83.	280,48	1,63	0,16	0,11
84.	92,57	1,83	2,70	1,67
85.	820,18	1,72	0,48	0,31
86.	544,07	1,71	0,32	0,20
87.	550,37	1,63	0,32	0,22
88.	449,32	1,69	0,26	0,17
89.	1695,04	1,90	0,99	0,58
90.	534,07	1,53	0,31	0,22
91.	456,62	1,17	0,27	0,25
92.	755,24	1,52	0,44	0,32
93.	622,44	1,59	0,36	0,25
94.	1347,19	1,65	0,79	0,53
95.	732,31	1,56	0,43	0,30
96.	1068,65	1,69	0,62	0,41
97.	626,39	1,58	0,37	0,26
98.	821,02	1,59	0,48	0,33
99.	738,19	1,61	0,43	0,30
100.	1255,38	1,71	0,73	0,47

Tabela 14. Charakterystyka DNA wyizolowanego z preparatów grupy kontrolnej.

L.p.	C [µg/ml]	A260/280	A260	A280
1.	122,95	1,8204	0,05992	0,03774
2.	1936,28	2,1201	0,95016	0,51504
3.	279,04	1,9314	0,13696	0,08214
4.	1790,54	2,0646	0,87847	0,49062

5.	3397,53	2,0868	1,66813	0,92019
6.	2673,66	2,1423	1,31182	0,70596
7.	1240,20	2,0091	0,60883	0,34854
8.	1980,20	1,9647	0,97156	0,56943
9.	2199,14	2,0646	0,79394	0,53613
10.	6083,94	2,0757	2,98637	1,65612
11.	1697,89	2,0091	0,83353	0,4773
12.	4231,93	2,0868	2,07687	1,14552
13.	664,03	1,7205	0,32635	0,21867
14.	153,91	1,6539	0,07597	0,05217
15.	1474,88	2,0202	0,72439	0,41181
16.	4596,75	2,0979	2,25663	1,23543
17.	2356,47	2,0424	1,15667	0,65379
18.	2235,59	2,0646	1,09675	0,6105
19.	1626,72	2,0646	0,79822	0,444
20.	3891,19	2,0646	1,90995	2,17671
21.	852,93	2,0535	0,41837	0,23421
22.	2235,81	2,0535	1,09782	0,61605
23.	6353,94	1,9647	3,11905	1,83261
24.	829,27	1,8537	0,4066	0,25308
25.	1037,35	1,6095	0,50932	0,36519
26.	5522,16	2,0535	2,71031	1,5207
27.	2789,96	2,0757	1,3696	0,76146
28.	280,24	1,5429	0,13803	0,10323
29.	2458,93	2,109	1,20696	0,66045
30.	321,11	1,7094	0,15729	0,10434
31.	107,80	1,6539	0,05243	0,03663
32.	363,95	1,7538	0,17655	0,11655
33.	120,12	1,9758	2,94785	1,76268
34.	1064,28	1,8537	0,52216	0,32412
35.	705,99	1,8426	0,34668	0,21645
36.	714,17	1,7538	0,35096	0,23088
37.	583,04	1,8204	0,28569	0,18093
38.	2199,51	2,0424	1,07963	0,60939
39.	693,02	1,6539	0,34026	0,23643
40.	592,52	1,2654	0,29104	0,26529
41.	980,02	1,6428	0,4815	0,33633
42.	807,69	1,7094	0,39697	0,26751
43.	1748,14	1,776	0,85814	0,55611
44.	950,26	1,6761	0,46652	0,31968
45.	1386,70	1,8204	0,68052	0,43068
46.	812,81	1,6983	0,39911	0,26973

47.	1065,37	1,7094	0,52323	0,35187
48.	957,89	1,7316	0,46973	0,31302
49.	1629,01	1,8426	0,79929	0,4995
50.	1111,15	1,776	0,5457	0,35409
51.	1928,97	1,3653	0,94695	0,7992
52.	117,312	1,8532	0,05712	0,03672
53.	1847,456	2,1583	0,90576	0,50112
54.	266,24	1,9662	0,13056	0,07992
55.	1708,408	2,1018	0,83742	0,47736
56.	3241,68	2,1244	1,59018	0,89532
57.	2551,016	2,1809	1,25052	0,68688
58.	1183,312	2,0453	0,58038	0,33912
59.	1889,368	2,0001	0,92616	0,55404
60.	2098,262	2,1018	0,75684	0,52164
61.	5804,864	2,1131	2,84682	1,61136
62.	1620,008	2,0453	0,79458	0,4644
63.	4037,8	2,1244	1,97982	1,11456
64.	633,568	1,7515	0,3111	0,21276
65.	146,848	1,6837	0,07242	0,05076
66.	1407,224	2,0566	0,69054	0,40068
67.	4385,888	2,1357	2,15118	1,20204
68.	2248,376	2,0792	1,10262	0,63612
69.	2133,04	2,1018	1,0455	0,594
70.	1552,096	2,1018	0,76092	0,432
71.	3712,696	2,1018	1,8207	2,11788
72.	813,8	2,0905	0,39882	0,22788
73.	2133,248	2,0905	1,04652	0,5994
74.	6062,472	2,0001	2,9733	1,78308
75.	791,232	1,8871	0,3876	0,24624
76.	989,768	1,6385	0,48552	0,35532
77.	5268,848	2,0905	2,58366	1,4796
78.	2661,984	2,1131	1,3056	0,74088
79.	267,384	1,5707	0,13158	0,10044
80.	2346,136	2,147	1,15056	0,6426
81.	306,384	1,7402	0,14994	0,10152
82.	102,856	1,6837	0,04998	0,03564
83.	347,256	1,7854	0,1683	0,1134
84.	114,608	2,0114	2,8101	1,71504
85.	1015,456	1,8871	0,49776	0,31536
86.	673,608	1,8758	0,33048	0,2106
87.	681,408	1,7854	0,33456	0,22464
88.	556,296	1,8532	0,27234	0,17604

89.	2098,616	2,0792	1,02918	0,59292
90.	661,232	1,6837	0,32436	0,23004
91.	565,344	1,2882	0,27744	0,25812
92.	935,064	1,6724	0,459	0,32724
93.	770,64	1,7402	0,37842	0,26028
94.	1667,952	1,808	0,81804	0,54108
95.	906,672	1,7063	0,44472	0,31104
96.	1323,088	1,8532	0,64872	0,41904
97.	775,528	1,7289	0,38046	0,26244
98.	1016,496	1,7402	0,49878	0,34236
99.	913,952	1,7628	0,44778	0,30456
100.	1554,28	1,8758	0,76194	0,486

3.4. Analiza wybranych polimorfizmów genu *ESR1*

Na podstawie danych dostępnych w bazie SNP NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) wybrano dwa polimorfizmy pojedynczych nukleotydów zlokalizowane w genie *ESR1*. Wybrane SNP to NC_000006.11:g.152163335T>C (rs2234693) oraz NC_000006.11:g.152163381A>G (rs9340799). Analizę częstości występowania wyżej wymienionych polimorfizmów w grupie pacjentek z nowotworami jajnika jak i w grupie kontrolnej przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji PCR połączonej z analizą restrykcyjną, PCR-RFLP (ang. Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism). Wybrane fragmenty genu *ESR1* poddano amplifikacji, a następnie trawieniu przy użyciu enzymów restrykcyjnych - rs2234693 (*PvuII*); rs9340799 (*XbaI*). Sekwencje nukleotydowe użytych starterów były następujące:

starter przedni . 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3'

starter wsteczny 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'

Poniżej przedstawiono sekwencję nukleotydową amplifikowanego obszaru o długości 1387 par zasad z zaznaczeniem miejsc cięcia przez zastosowane enzymy restrykcyjne.

ctgccaccctatctgtatcttttctattctcctccaagttctcaaaggaatgccttcctcattttcatctccttacattccatctg
ctgaatttggcttgtgcctgtacctgtctaaggaaactccttgctaagagtctgcttgtcaggtctgaattcacttaaccag
tcttggcttgttgacttctctgccccatttgccattcttgatcatcctctccataaacctttctacttaaagcattttacttccttatt
ttcttggtttcctagaatctccttactgttcattttcagcttccttctgtgttccttctcttctacatttttttagctttctactttctt
aaagcattttacttccttattttcttggtttcctagaattttcttactgttcattttcagtttccttctgtgttcctctgattgtctcttctt
tacatttttttctgtgttcctctgattttcacgcagctctggagttgtcatgatcaatcatagcctactgcagcctcgacatcct
aggctcaagtgattctccacctcagccttacaagtagctaggactacagtcacacatcaccattctcagctaatttttta
agaagcatttttatagagatggagcttctgtatattgtgcaggctgggctcaaactacagggctaaacaattctcctgctt
tggcctcccaaagtgtggtggttccaggcatgaaccaccatgctcagctctctacatgttcctaaagaggagtttgaata
ttgaagaacagtattttcaaattacattattcaagttataaaaaactgatatccaggggtatgtggcaatgacgtaaaaaattt
gaattgttatttttgacacatgttctgtgtgtccatcagttcatctgagttccaaatgtcccag(*PvuII*)ctgttttatgcttgt
ctctgtttccagagaccctgagtggtgt(*XbaI*)ctagagttgggatgagcattgggtcttaatggttctgaaataattgta
tattcctgcaaaaacattaagtctattagaaaccagctaatttcattttgtcatttttataggtaacatattctggtgcaggtag
tatgtttttaaacaagtttgcaataaacaatttcccctcaaggtaataataataggcaacacctttgctgcaacagacgg
caagaggtaatgaaagattagcttacattatgattcattatttcaaaatgtcaggataaagtggatctgctgcatctcca
gagagtgcattgtttgcttttctaattgtaatggattactgttttttccccccaggccaaattcagataatcgacgccagggt
ggcagagaaaaga

Reakcję PCR prowadzono w końcowej objętości 10 μ l. Mieszanina reakcyjna zawierała około 50 ng genomowego DNA, 1 μ l 5 μ M roztworu każdego ze starterów, 1 μ l GeneAmp 10x PCR Buffer z MgCl₂ (Applied Biosystems, USA), 0,2 μ l polimerazy AmpliTaq Gold® (5U/ μ l) (Applied Biosystems, USA), 1 μ l dNTP o stężeniu 10 μ M dla każdego z deoksyrybonukleotydów oraz wodę. Denaturacja wstępna prowadzona była przez 5 minut w temperaturze 95°C, następnie wybrany fragment badanego genu amplifikowano podczas trwania 40 cykli o następujących parametrach: 30 s w temperaturze 95°C, 1 minuta w temperaturze 62 °C oraz 1 minuta w 72°C. Kończącą elongację prowadzono w temperaturze 72°C przez 10 minut.

Uzyskane w wyniku amplifikacji DNA produkty poddawano trawieniu trwającemu 16 godzin w 37°C, przy użyciu enzymów restrykcyjnych dostępnych komercyjnie - PvuII i XbaI (New England Biolabs, USA). Następnie produkty reakcji poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym, barwiono bromkiem etydyny i wizualizowano w świetle ultrafioletowym.

Wielkość produktów uzyskanych w analizie polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) oraz w analizie polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G) zestawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Wielkość produktów uzyskanych w analizie polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) oraz w analizie polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G).

polimorfizm PvuII (rs2234693); pary zasad	TT – 1374 TC - 1374, 934, 440 CC - 934, 440
polimorfizm XbaI (rs9340799); pary zasad	AA – 1374 AG – 1374, 981, 393 GG - 981, 393

3.5. Analiza statystyczna

Opracowanie statystyczne uzyskanych wyników wykonane zostało przy pomocy programu STATISTICA 11 (StatSoft, Polska), Chaplin 1.2 (genetics.emory.edu) oraz THESIAS (www.genecanvas.org). Wpływ polimorfizmów genu *ESR1* na ryzyko zachorowania na raka jajnika oceniano na podstawie ilorazu szans (OR, ang. odds ratio) wraz z 95% przedziałem ufności (PU), który wyznaczano przy użyciu modelu regresji logistycznej. W tym przypadku OR pozwala ocenić ile razy wzrasta/zmniejsza się ryzyko wystąpienia choroby przy wzroście/spadku o jednostkę zmiennej traktowanej jako czynnik ryzyka.

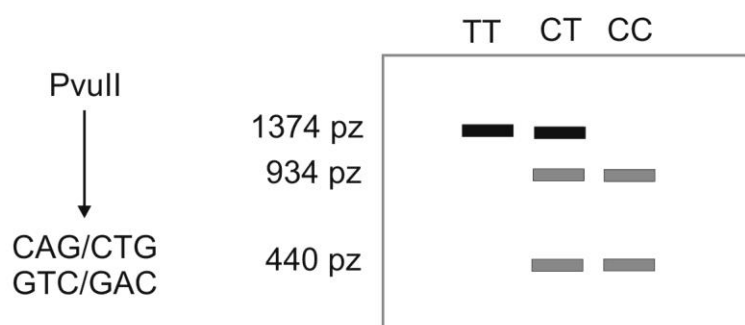
W celu sprawdzenia czy w badanych populacjach zachowane jest prawo równowagi Hardy-Weinberga, skorzystano z programu do obliczeń na stronie www.ihg.gfs.de (Institute of Human Genetics, Technical University Munich and Helmholtz Center Munich). Dla zbadania wpływu haplotypów genu *ERS1* na ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej zastosowano programy Chaplin 1.2 oraz THESIAS.

Wszystkie testy statystyczne przeprowadzane były przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Oceny zgodności rozkładu wartości badanych zmiennych z rozkładem normalnym dokonywano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. W celu weryfikacji hipotezy o istotności wieku w grupie badanej i kontrolnej zastosowano analizę χ^2 . Wynik uznawano za istotny statystycznie przy poziomie istotności p mniejszym niż 0,05.

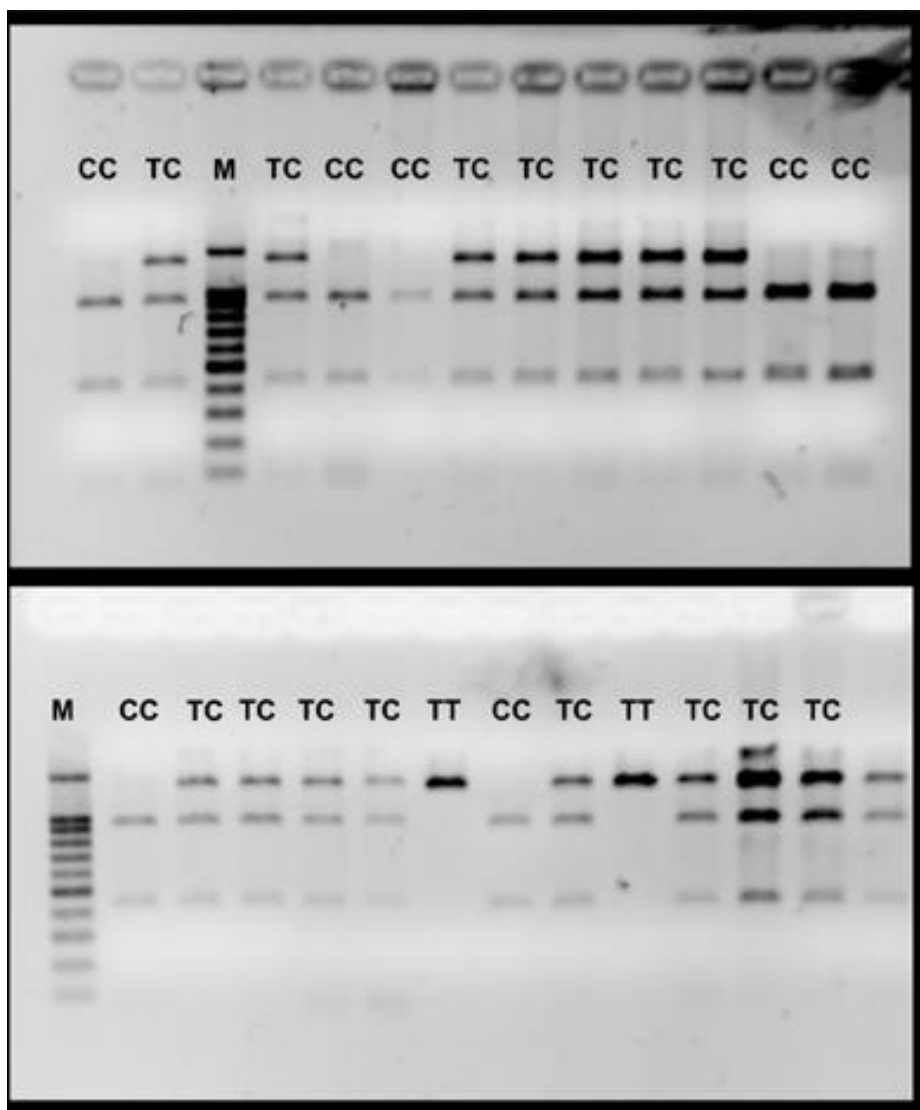
3.6. Analiza polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) w genie *ESR1*

Analiza występowania polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) w genie *ESR1* została przeprowadzona przy użyciu techniki RFLP-PCR w grupie 100 kobiet ze zdiagnozowanym nowotworem jajnika oraz w grupie 100 kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej.

Schemat przewidywanych wielkości fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym PvuII przedstawiono na rycinie 8. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP-PCR dla polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) przedstawiono na rycinie 9.



Rycina 8. Schemat przewidywanych wielkości fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym PvuII w genie *ESR1*, (T) allel prawidłowy, (C) allel zmutowany.

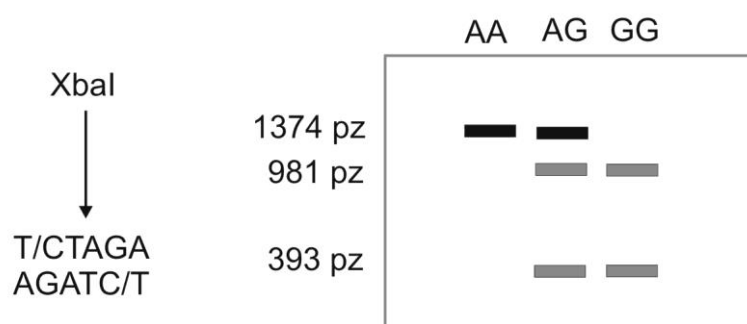


Rycina 9. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktu reakcji RFLP-PCR dla polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) w genie *ESR1*, M – wzorzec wielkości fragmentów DNA, (T) allel prawidłowy, (C) allel zmutowany.

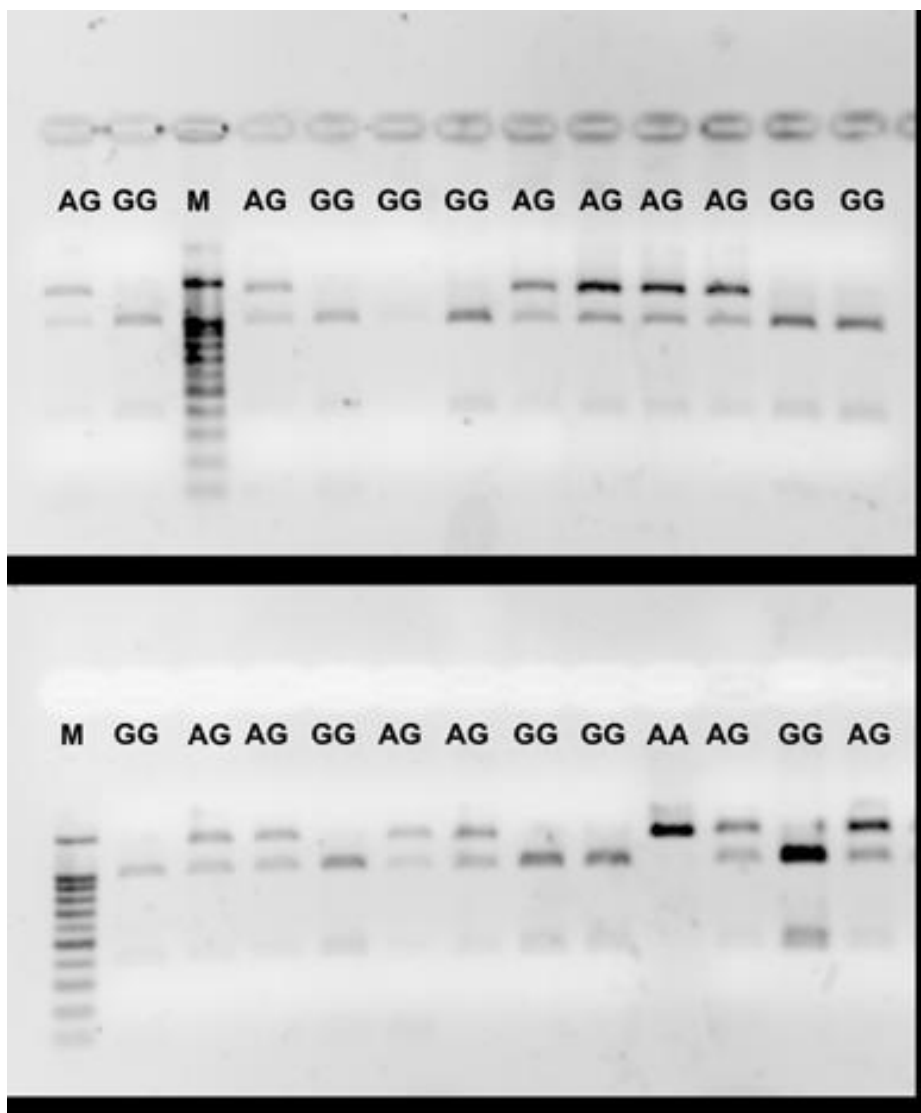
3.7. Analiza polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G) w genie *ESR1*

Analiza występowania polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G) w genie *ESR1* została przeprowadzona przy użyciu techniki RFLP-PCR w grupie 100 kobiet ze zdiagnozowanym nowotworem jajnika oraz w grupie 100 kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej.

Schemat przewidywanych wielkości fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym XbaI przedstawiono na rycinie 10. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji RFLP-PCR dla polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G) przedstawiono na rycinie 11.



Rycina 10. Schemat przewidywanych wielkości fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym XbaI w genie *ESR1*, (A) allel prawidłowy, (G) allel zmutowany.



Rycina 11. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktu reakcji RFLP-PCR dla polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G) w genie *ESRI*, M – wzorzec wielkości fragmentów DNA, (A) allel prawidłowy, (G) allel zmutowany

4. Wyniki

Występowanie poszczególnych genotypów i częstość alleli polimorfizmu rs2234693 genu *ESR1* w grupie z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej

Wśród badanych kobiet (100) z rakiem jajnika u 24 (24%) osób stwierdzono genotyp TT, u 51 osób (51 %) genotyp TC, a u 25 (25 %) osób genotyp CC (tabela 16).

W tej grupie częstość alleli wynosiła odpowiednio: allel T – 99 (49,5%), allel C – 101 (50,5%).

W grupie kontrolnej stwierdzono genotyp TT w 36 przypadkach (36%), TC w 47 przypadkach (47%) i CC w 17 przypadkach (17%)

Rozkład alleli przedstawiał się następująco – allel T 49,5%, allel C- 50,5%

Genotyp CC występował ze statystycznie istotnie większą częstością w grupie badanej w porównaniu z kontrolą ($p < 0.05$).

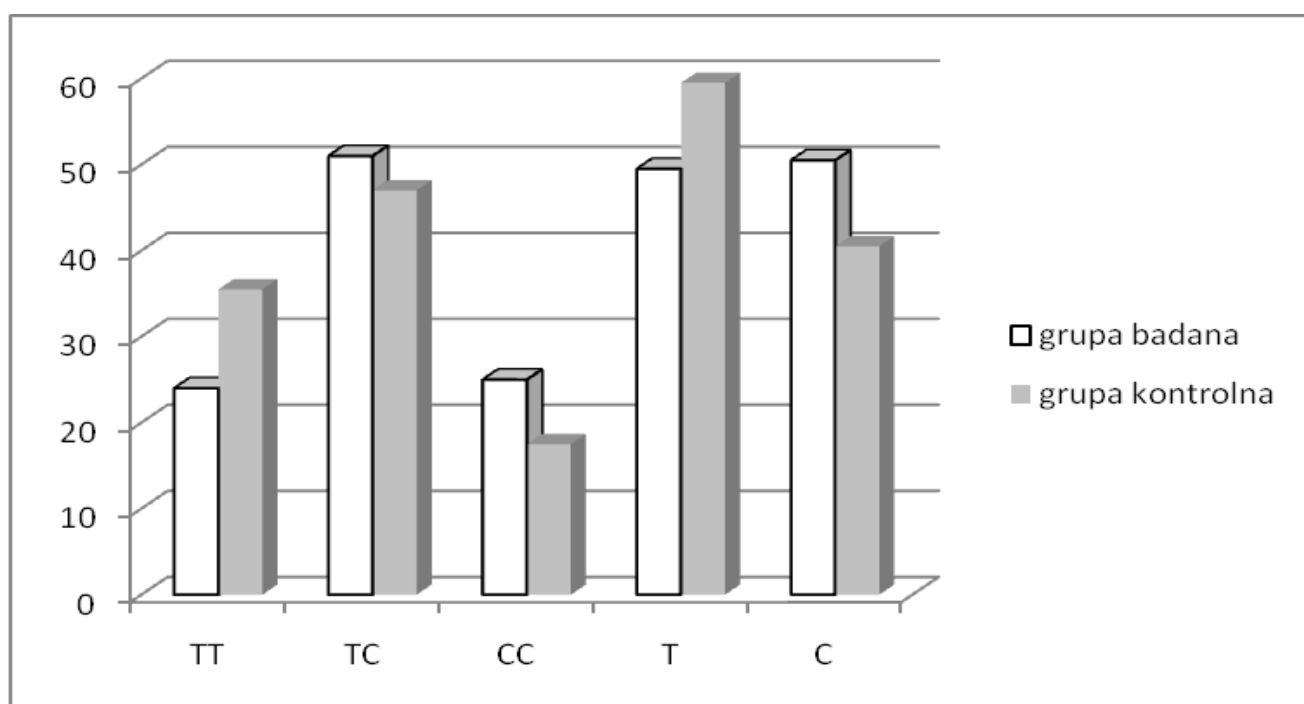
Tabela 16. Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu rs2234693 genu *ESR1* w grupie osób z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej.

	Pacjentki (n= 100)		Kontrola (n=100)		OR (95% PU) ^a	p ^b
	liczebność	(%)	liczebność	(%)		
TT	24	24,0	36	36,0	1.00 Ref.	
TC	51	51,0	47	47,0	1,62 (0,84-3,12)	0.095
CC	25	25,0	17	17,0	2.21 (0,98-4,92)	0.041
T	99	49,5	119	59,5	1.00 Ref.	
C	101	50,5	81	40,5	1,49 (1,01-2,22)	0.028

^a Analiza ilorazu szans (OR - iloraz szans, PU - przedział ufności 95%)

^b dla testu χ^2 zgodności z rozkładem przewidywanym przez prawo Hardy’ego-Weinberga

Rycina 12. Rozkład genotypów TT, TC i CC polimorfizmu rs2234693 genu *ESR1* w grupie badanej (kolor biały) i w grupie kontrolnej (kolor szary).



Występowanie poszczególnych genotypów i częstość alleli polimorfizmu rs9340799 genu *ESR1* w grupie z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej

Wśród badanych kobiet (100) z rakiem jajnika u 42 (42%) osób stwierdzono genotyp AA, u 40 osób (40 %) genotyp AG, a u 18 (18 %) osób genotyp GG (tabela 17).

W tej grupie częstość alleli wynosiła odpowiednio: allel A – 62 (62%), allel G – 38 (38%).

W grupie kontrolnej stwierdzono genotyp AA w 49 przypadkach (49%), AG w 43 przypadkach (43%) i GG w 8 przypadkach (8%)

Rozkład alleli przedstawiał się następująco – allel A 70,25%, allel G- 29,75%

Genotyp GG występował ze statystycznie istotnie większą częstością w grupie badanej w porównaniu z kontrolą ($p < 0.05$).

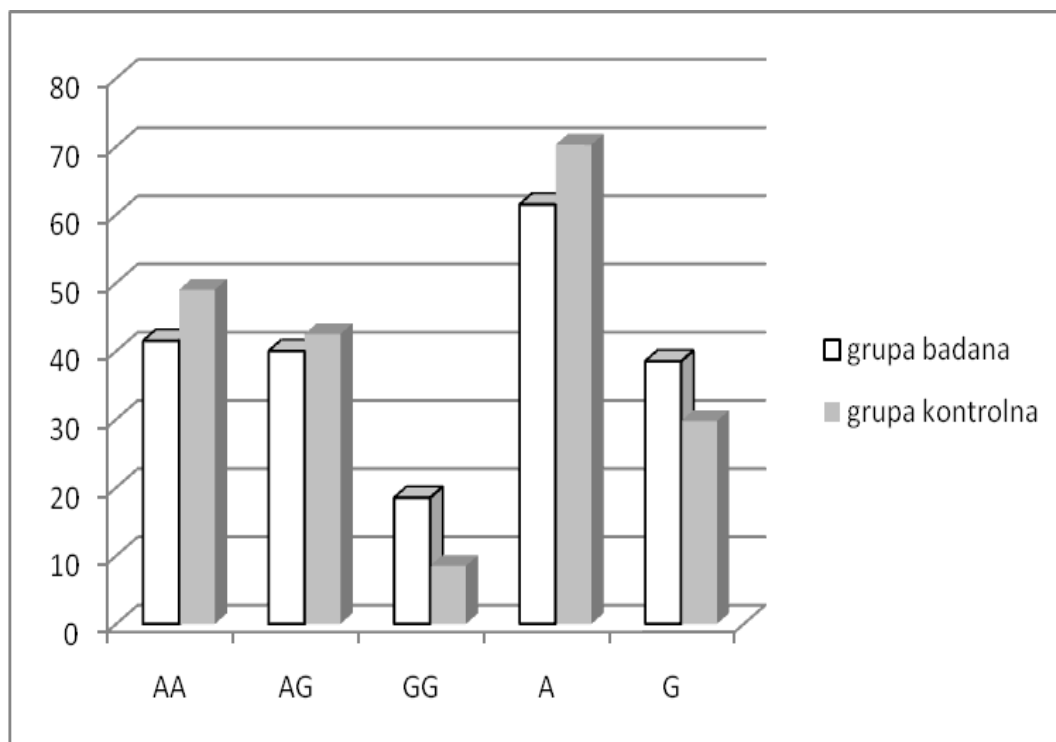
Tabela 17. Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu rs9340799 genu *ESR1* w grupie osób z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej.

	Pacjentki (n= 100)		Kontrola (n=100)		OR (95% PU) ^a	p ^b
	liczebność	(%)	liczebność	(%)		
AA	42	42,0	49	49,0	1.00 Ref.	
AG	40	40,0	43	43,0	1,08 (0,60-1,96)	0.453
GG	18	18,0	8	8,0	2,62 (1,04-6,64)	0.031
A	62	62,0	141	70,5	1.00 Ref.	
G	38	38,0	59	29,5	1,69 (1,01-2,83)	0.030

^a Analiza ilorazu szans (OR - iloraz szans, PU - przedział ufności 95%)

^b dla testu χ^2 zgodności z rozkładem przewidywanym przez prawo Hardy’ego-Weinberga

Rycina 13. Rozkład genotypów AA, AG i GG polimorfizmu rs9340799 genu *ESR1* w grupie badanej (kolor biały) i w grupie kontrolnej (kolor szary).



Częstość występowania polimorfizmów rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej oraz wyliczoną analizę ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej jajnika przedstawiono w tabelach 18, 19, 20, 21 oraz na rycinach 14, 15, 16 oraz 17.

Tabela 18. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej oraz analiza ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej jajnika.

SNP/genotyp rs2234693 (PvuII)	grupa badana (%)/grupa kontrolna (%)	OR (95% PU) ^a	p	OR (95% PU) ^b	p
TT	24 (24,0)/36 (36,0)	1.00 Ref.		1.00 Ref.	
TC	51 (51,0)/47 (47,0)	1,62 (0,84-3,12)	0,095	1,61 (0,81-3,02)	0,096
CC	25 (25,0)/17 (17,0)	2,21 (0,99-4,92)	0,013	2,20 (0,98-4,82)	0,010
p-trend ^c	0,04				

^a surowy

^b skorygowany na wiek

^c addytywny model genetyczny (test Cochran-Armitage)

Rycina 14. Schemat rozkładu genotypów polimorfizmu rs2234693 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej.

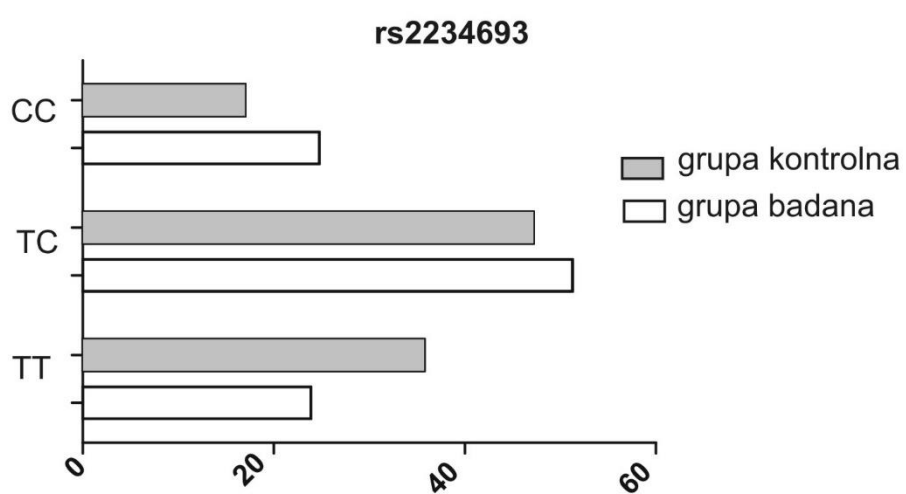


Tabela 19. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej – model dominujący i recesywny.

SNP/genotyp rs2234693 (PvuII)	grupa badana (%)/grupa kontrolna (%)	OR (95% PU) ^a	p	OR (95% PU) ^b	p
TC lub CC vs TT ^c	76 (76,0)/64 (64,0)	0,57 (0,31-1,03)	0,044	0,55 (0,30-1,01)	0,044
TC lub TT vs CC ^d	75(75,0)/83 (83,0)	1,62 (0,82-3,24)	0,112	1,61 (0,81-3,14)	0,102

^a surowy

^b skorygowany na wiek

^c dominujący model genetyczny

^d recesywny model genetyczny

Rycina 15. Schemat rozkładu genotypów polimorfizmu rs2234693 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej – model dominujący i recesywny

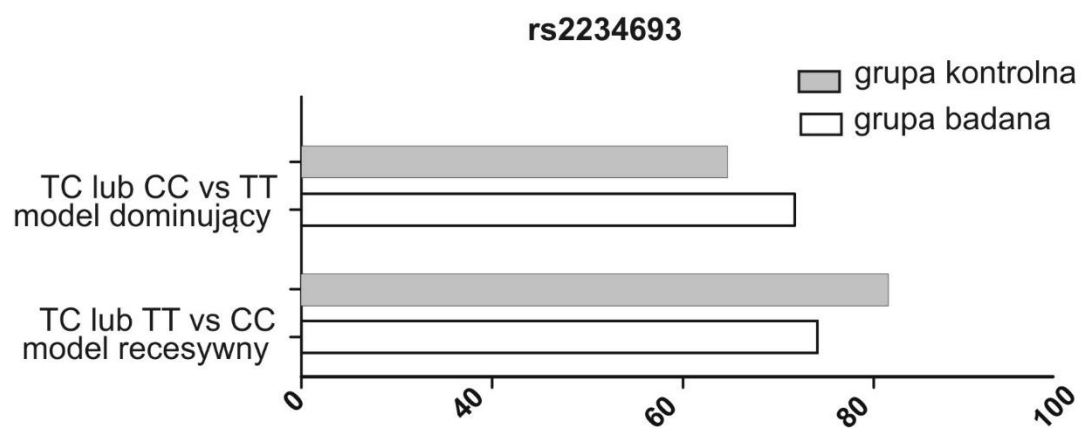


Tabela 20. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej oraz analiza ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej jajnika.

SNP/genotyp rs9340799 (XbaI)	grupa badana (%)/kontrolna (%)	OR (95% PU) ^a	p	OR (95% PU) ^b	p
AA	42 (42,0)/ 49 (49,0)	1.00 Ref.		1.00 Ref.	
AG	40 (40,0)/ 43 (43,0)	1,08 (0,59-1,97)	0,453	1,07 (0,57-1,95)	0,450
GG	18 (18,0)/ 8 (8,0)	2,62 (1,03-6,64)	0,031	2,60 (1,01-6,04)	0,030
p-trend ^c	0,002				

^a surowy

^b skorygowany na wiek

^c addytywny model genetyczny (test Cochran-Armitage)

Rycina 16. Schemat rozkładu genotypów polimorfizmu rs9340799 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej.

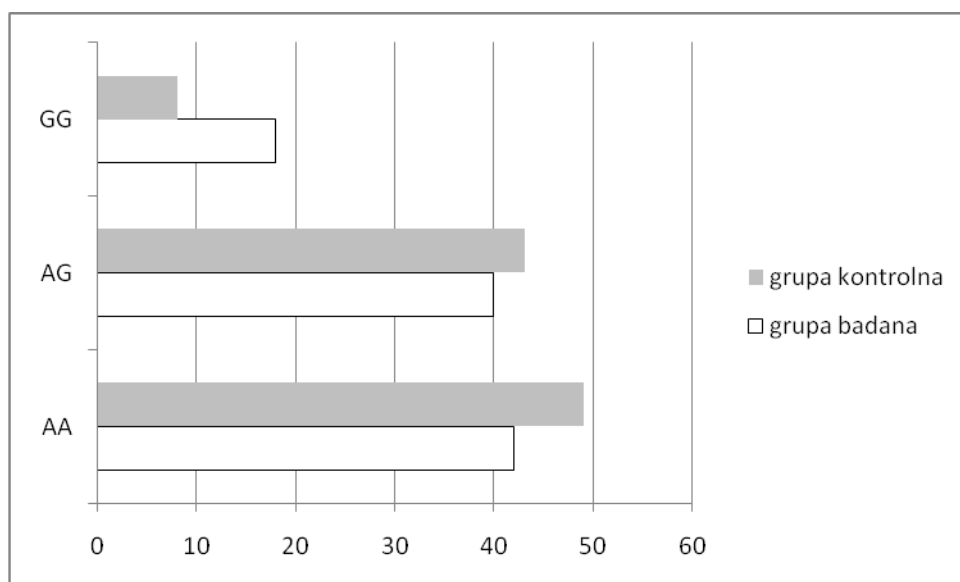


Tabela 21. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej – model dominujący i recesywny.

SNP/genotyp rs9340799 (XbaI)	badana (%) / kontrolna (%)	OR (95% PU) ^a	p	OR (95% PU) ^b	p
AG lub GG vs AA ^c	58 (58,0)/51 (51,0)	0,75 (0,43-1,31)	0,197	0,75 (0,42-1,31)	0,195
AG lub AA vs GG ^d	82 (82,0)/92 (92,0)	2,52 (1,04-6,11)	0,028	2,52 (1,04-6,10)	0,028

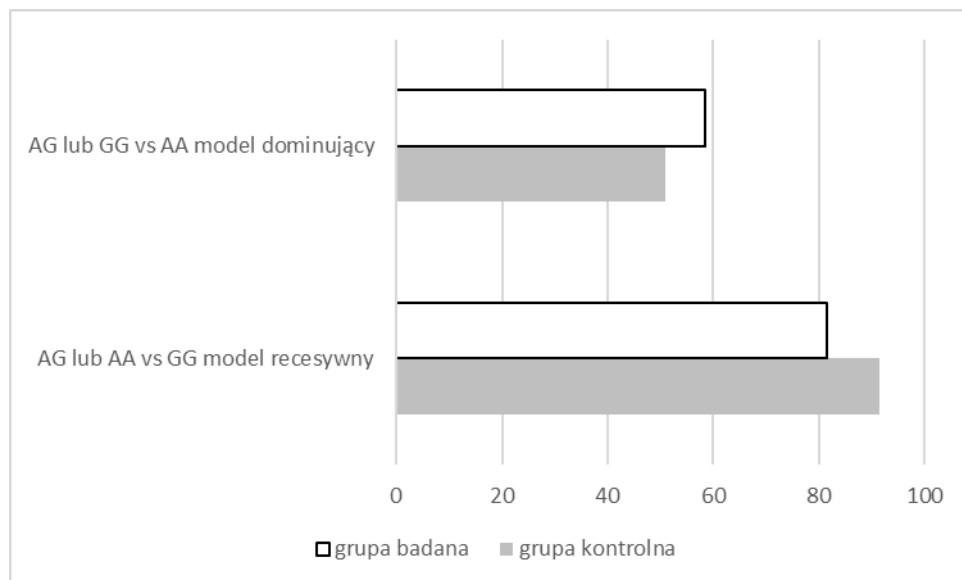
^a surowy

^b skorygowany na wiek

^c dominujący model genetyczny

^d recesywny model genetyczny

Rycina 17. Schemat rozkładu genotypów polimorfizmu rs9340799 genu *ESR1* w grupie badanej i kontrolnej – model dominujący i recesywny.



Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że obecność genotypu CC (rs2234693) ponad dwukrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jajnika OR (95% PU) - 2,21 (0,99-4,92), $p=0,013$, natomiast obecność genotypu TT (rs2234693) znacząco obniża ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu OR (95% PU) - 0,57 (0,31-1,03), $p=0,044$. Wiek kobiet nie miał wpływu na częstość występowania poszczególnych genotypów, ani na związane z nim ryzyko wystąpienia choroby. Wyniki analizy przedstawiono także w postaci skorygowanych ilorazów szans.

W przypadku drugiego z badanych polimorfizmów - rs9340799, stwierdzono analogicznie do poprzednich badań, że obecność genotypu GG ponad dwukrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jajnika OR (95% PU) - 2,62 (1,03-6,64), $p=0,031$, co potwierdziła analiza modelu recesywnego OR (95% PU) - 2,52 (1,04-6,11), $p=0,028$.

Analiza haplotypów

Przeprowadzono analizę haplotypów (zestawu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP), położonych na jednej chromatydzie, który dziedziczy się jako zestaw sprzężonych ze sobą alleli) *ESR1* – rs2234693- rs9340799.

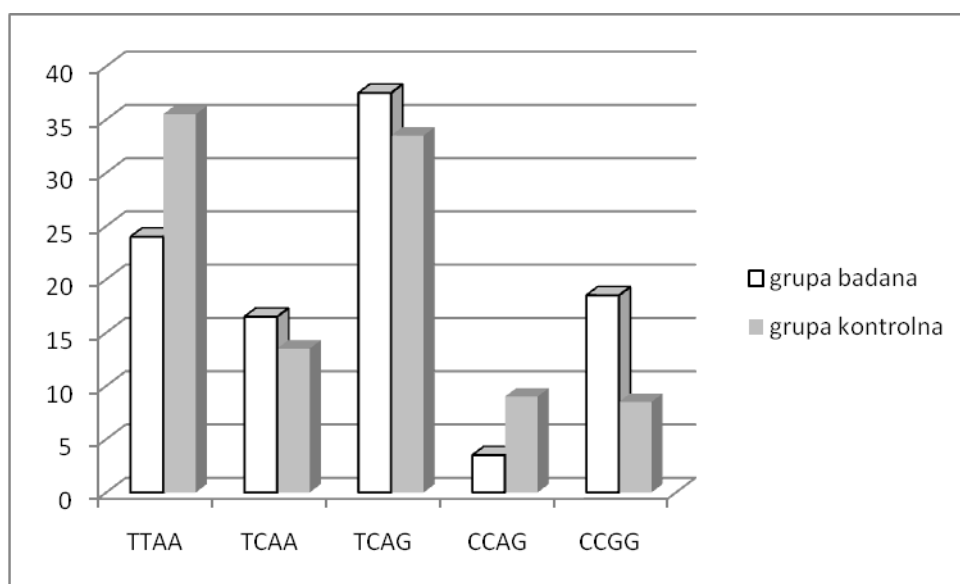
Analiza haplotypów genu *ESR1* w odniesieniu do polimorfizmów rs2234693 i rs9340799 wykazała, że spośród badanych, w stopniu znamionym statystycznie wystąpienie układu TCAG a zwłaszcza CCGG związane może być ze znacznym podwyższeniem ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej u kobiet OR (95% CI) – 2,45 (0,98-6,10), p=0,041. Szczegółowe wyniki analiz zestawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Haplotypy genu *ESR1* a ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jajnika.

Haplotypy (rs2234693; rs9340799)	grupa badana (%)/grupa kontrolna (%)	OR (95% PU) ^a	p
TT-AA	24 (24,0)/36 (36,0)	1,00 (referencyjny)	
TC-AA	17 (17,0)/14 (14,0)	1,82 (0,76-4,37)	0,130
TC-AG	37 (37,0)/28 (28,0)	1,98 (0,97-4,04)	0,043
CC-AG	4 (4,0)/9 (9,0)	0,54 (0,15-1,91)	0,259
CC-GG	18 (18,0)/11 (11,0)	2,45 (0,98-6,10)	0,041

^a surowy

Rycina 18. Rozkład haplotypów badanych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu *ESR1* w grupie badanej (kolor biały) i w grupie kontrolnej (kolor szary).



Analiza ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej jajnika w odniesieniu do polimorfizmów rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* i cech kliniczno-patologicznych.

Rozkład częstości genotypów i alleli polimorfizmów rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* w zależności od klasyfikacji FIGO (staging) i stopnia zróżnicowania nowotworu G (grading) prezentują tabele 23-26.

Tabela 23. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO (staging).

rs2234693	FIGO I (n=39)	FIGO II (n=13)	FIGO III (n=48)
	Liczebność (%)	Liczebność (%)	Liczebność (%)
TT	9 (23)	5 (38)	10 (21)
TC	13 (33)	4 (31)	34 (71)
CC	17 (44)	4 (31)	4 (8)
T	31 (40)	14 (54)	54 (56)
C	47 (60)	12 (46)	42 (44)

Rycina 19. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 w zależności od klasyfikacji FIGO (staging).

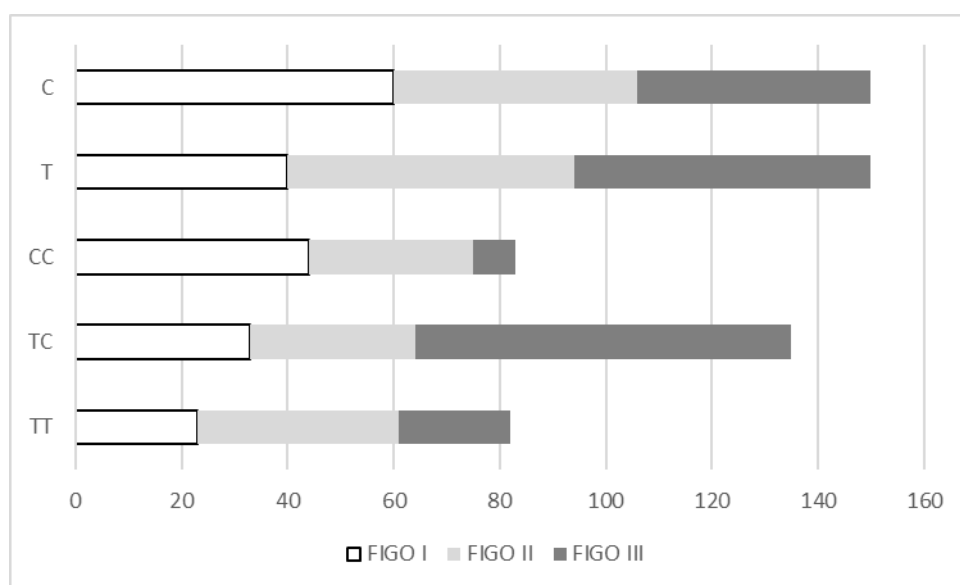


Tabela 24. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 w zależności od stopnia zróżnicowania histopatologicznego nowotworu (grading).

rs2234693	G1 (n=40)	G2 (n=18)	G3 (n=42)
	Liczebność (%)	Liczebność (%)	Liczebność (%)
TT	8 (20)	6 (33)	10 (24)
TC	15 (38)	5 (28)	31 (74)
CC	17 (42)	7 (39)	1 (2)
T	31 (39)	17 (47)	51 (61)
C	49 (61)	19 (53)	33 (39)

Rycina 20. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 w zależności od stopnia G (grading).

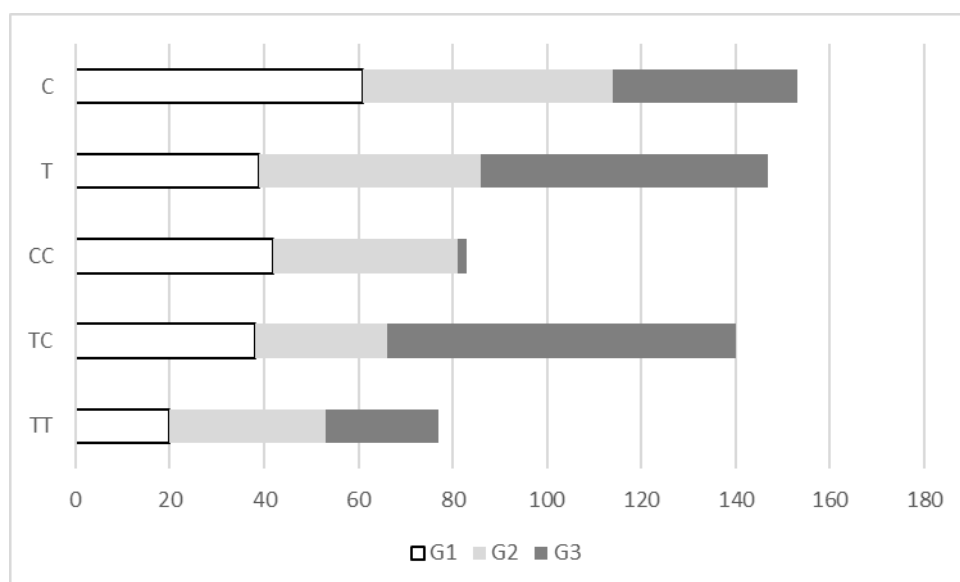


Tabela 25. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO (staging).

rs9340799	FIGO I (n=39)	FIGO II (n=13)	FIGO III (n=48)
	Liczebność (%)	Liczebność (%)	Liczebność (%)
AA	19 (49)	3 (23)	20 (42)
AG	11 (28)	8 (62)	21 (44)
GG	9 (23)	2 (15)	7 (14)
A	49 (63)	14 (54)	61 (64)
G	29 (37)	12 (46)	35 (36)

Rycina 21. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 w zależności od klasyfikacji FIGO (staging).

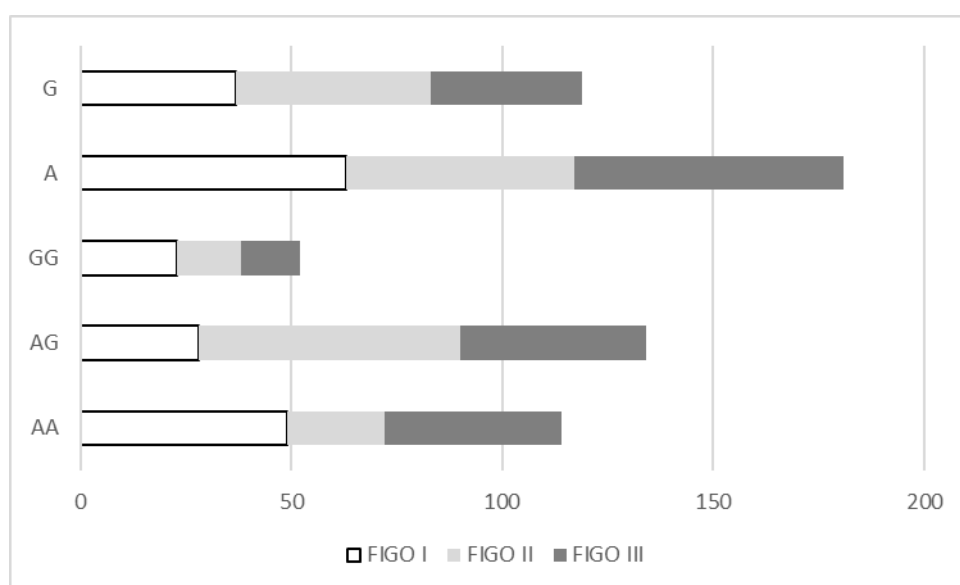
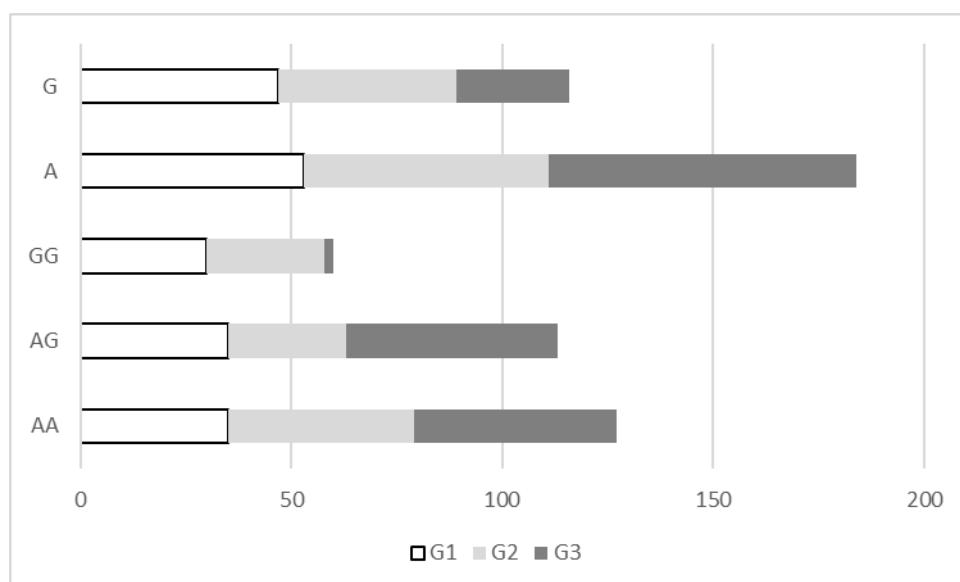


Tabela 26. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 w zależności od stopnia zróżnicowania histopatologicznego nowotworu (grading).

rs9340799	G1 (n=40)	G2 (n=18)	G3 (n=42)
	Liczebność (%)	Liczebność (%)	Liczebność (%)
AA	14 (35)	8 (44)	20 (48)
AG	14 (35)	5 (28)	21 (50)
GG	12 (30)	5 (28)	1 (2)
A	42 (53)	21 (58)	61 (73)
G	38 (47)	15 (42)	23 (27)

Rycina 22. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 w zależności od stopnia G (grading).



Genotyp CC u pacjentów z G1 występował ze statystycznie istotnie wyższym wskaźnikiem częstości występowania (42%), podczas gdy homozygota TT wykazywała statystycznie istotnie niższy wskaźnik częstości występowania (20%) w porównaniu z grupą kobiet z G2 + G3 (C/C-13%, TT-27%). Allel C u pacjentów z G1 występował ze statystycznie istotnie wyższym wskaźnikiem częstości występowania (61%), podczas gdy allel T wykazywał statystycznie istotnie niższy wskaźnik częstości występowania (39%) w porównaniu z grupą kobiet z G2 + G3 (T-57%, C-43%). Zaobserwowano statystycznie istotny wzrost częstości występowania homozygoty CC (OR 3,54; 95% CI 1,08–11,55, $p = 0,031$) u pacjentów w stopniu I, zgodnie z klasyfikacją FIGO.

Z kolei w przypadku polimorfizmu rs9340799 zaobserwowano statystycznie istotny wzrost częstości występowania homozygoty GG (OR 3,5; 95% CI 1,10–11,08, $p = 0,029$) u pacjentów z rozmiarem guza <5cm.

Genotyp GG u pacjentów z G1 występował ze statystycznie istotnie wyższym wskaźnikiem częstości występowania (30%), w porównaniu z grupą kobiet z G2 + G3 (GG-10%). Allel G u pacjentów z G1 występował ze statystycznie istotnie wyższym wskaźnikiem częstości występowania (47%), podczas gdy allel A wykazywał statystycznie istotnie niższy wskaźnik częstości występowania (53%) w porównaniu z grupą kobiet z G2 + G3 (G-32%, A-68%).

Wyniki powyższych analiz zestawiono w tabelach 27 i 28.

Tabela 27. Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu rs2234693 w grupie osób z rakiem jajnika w zależności od cech kliniczno-patologicznych.

	rozmiar guza <5 cm (n= 41)	Rozmiar guza>5cm (n=59)	OR (95% CI) ^a	p ^b
rs2234693	Liczebność (%)	Liczebność (%)		
TT	11 (26)	13 (22)	1.00 Ref	
TC	15 (37)	36 (61)	0,49 (0,18-1,34)	0,128
CC	15 (37)	10 (17)	1,77 (0,57-5,50)	0,240
T	37 (45)	62 (53)		
C	45 (55)	56 (47)	1,34 (0,77-2,37)	0,187
	FIGO I (n= 39)	FIGO II+III (n=61)		
TT	9 (23)	15 (25)	1.00 Ref	
TC	13 (33)	38 (62)	0.57 (0.29-2,35)	0.465
CC	17 (44)	8 (13)	3.54 (1.08-11.5)	0.031
T	31 (40)	68 (56)	1.00 Ref	
C	47 (60)	54 (44)	1,91 (1,07-3,40)	0,019
	G1 (n= 40)	G2+G3 (n=60)		
TT	8 (20)	16 (27)	1.00 Ref	
TC	15 (38)	36 (60)	0,83 (0,16-1,45)	0,156
CC	17 (42)	8 (13)	4,25 (1,28-14,03)	0,015
T	31 (39)	68 (57)	1.00 Ref	
C	49 (61)	52 (43)	2,07 (1,17-3,68)	0,001

^a Analiza ilorazu szans (OR - iloraz szans, PU - przedział ufności 95%)

^b dla testu χ^2 zgodności z rozkładem przewidywanym przez prawo Hardy'ego-Weinberga

Tabela 28. Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu rs9340799 w grupie osób z rakiem jajnika w zależności od cech kliniczno-patologicznych.

	rozmiar guza <5 cm (n= 41)	Rozmiar guza>5cm (n=59)	OR (95% CI) ^a	p ^b
rs9340799	Liczebność	Liczebność		
AA	13 (32)	29 (49)	1.00 Ref	
AG	17 (41)	23 (39)	1,64 (0,67-4,08)	0,196
GG	11 (27)	7 (12)	3,5 (1,10-11,08)	0,029
A	43 (52)	81 (68)		
G	39 (48)	37 (32)	1,98 (1,11-3,56)	0,015
	FIGO I (n= 39)	FIGO II+III (n=61)		
AA	19 (49)	23 (38)	1.00 Ref	
AG	11 (28)	29 (48)	0,45 (0,18-1,15)	0,075
GG	9 (23)	9 (14)	1,21(0,40-3,66)	0,476
A	49 (63)	75 (61)	1.00 Ref	
G	29 (37)	47 (39)	0,94 (0,53-1,69)	0,484
	G1 (n= 40)	G2+G3 (n=60)		
AA	14 (35)	28 (47)	1.00 Ref	
AG	14 (35)	26 (43)	1,07 (0,43-2,68)	0,529
GG	12 (30)	6 (10)	4,0 (1,23-12,9)	0,017
A	42 (53)	82 (68)	1.00 Ref	
G	38 (47)	38 (32)	1,95 (1,09-3,50)	0,018

^a Analiza ilorazu szans (OR - iloraz szans, PU - przedział ufności 95%)

^b dla testu χ^2 zgodności z rozkładem przewidywanym przez prawo Hardy'ego-Weinberga

5. Wnioski

1. Następujące genotypy genu *ESR1* występują znamienne statystycznie częściej u chorych na raka jajnika i mogą powodować wzrost ryzyka zachorowania na powyższy nowotwór u kobiet:
 - genotyp CC polimorfizmu rs2234693
 - genotyp GG polimorfizmu rs9340799
2. Genotypem genu *ESR1* powodującym obniżenie ryzyka zachorowania na raka jajnika jest genotyp TT polimorfizmu rs2234693
3. Występowanie haplotypów TCAG a zwłaszcza CCGG genu *ESR1* w odniesieniu do polimorfizmów rs2234693 i rs9340799 może być związane z podwyższeniem ryzyka zachorowania na raka jajnika.
4. W grupie pacjentek z rakiem jajnika wykazano korelację pomiędzy polimorfizmami rs2234693 i rs9340799 w tkankach raków jajnika o najniższym stopniu zaawansowania w porównaniu do raków jajnika bardziej zaawansowanych, co może świadczyć o związku tych czynników ze stopniem zaawansowania nowotworu.
5. Wykazana zależność między polimorfizmami rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* a występowaniem raka jajnika może wskazywać na możliwy potencjał prognostyczny badanych wariantów genetycznych.

6. Dyskusja

Światowe raporty epidemiologiczne wskazują na stały wzrost tendencji do zachorowania na raka jajnika. Rak jajnika pomimo podejmowania dużych wysiłków zmierzających do jego wczesnego wykrycia, stanowi trudny problem w ginekologii onkologicznej. Objawy raka jajnika mają charakter nieswoisty i są bardzo słabo wyrażane natomiast jego symptomy są często mylnie utożsamiane z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego.

W chwili obecnej brak jest wiarygodnych metod diagnostycznych umożliwiających wczesne rozpoznawanie raka jajnika [99-101]. Rak jajnika rozpoznawany jest późno, w zaawansowanych stadiach choroby ponieważ pierwsze niecharakterystyczne objawy są często ignorowane przez pacjentki. Mimo rosnącej wiedzy na temat raka jajnika nie udało się dotąd opracować skutecznego testu przesiewowego dla tego nowotworu [102]. Niezwykle istotne jest więc wyodrębnienie pacjentek z grup „wysokiego ryzyka” oraz ich ścisła kontrola.

Konieczna wydaje się zatem identyfikacja nowych czynników ryzyka. Mogą stać się nimi na przykład panele biomarkerów molekularnych. Zatem uzasadnione staje się poszukiwanie nowych markerów molekularnych, aby w większym stopniu móc wykrywać mało zaawansowane guzy i stosować względem nich leczenie, dające najlepsze rokowanie. Prace skupiające się na poszukiwaniu markerów molekularnych stały się inspiracją do zaplanowania pracy badawczej stanowiącej podstawę prezentowanej dysertacji. Jako markery genetyczne znajdują zastosowanie polimorfizmy pojedynczego nukleotydu ze względu na ich dużą częstotliwość i stosunkowo równomierne rozmieszczenie w genomie człowieka.

Celem prezentowanej pracy jest wykazanie jakie warianty polimorficzne genu receptora estrogenowego α mogą brać udział w powstawaniu raka jajnika oraz które warianty genetyczne nie mają wpływu na ten proces nowotworzenia. Te „pozytywne” jak i „negatywne” markery nowotworzenia mogą odgrywać rolę w definiowaniu czynników ryzyka raka jajnika u kobiet. Łączna ocena polimorfizmów daje szansę na wyłonienie grupy chorych o wysokim ryzyku zachorowania, co może być niezwykle użyteczne w praktyce medycznej, w ocenie indywidualnego ryzyka zachorowania u bezobjawowych nosicieli. Wyniki przeprowadzonych badań mogą mieć istotne implikacje kliniczne przyczyniając się nie tylko do poznania podłoża molekularnego raka jajnika ale i poprawy wcześniejszego rozpoznawania chorób nowotworowych a w efekcie wydłużenie czasu przeżycia chorych na powyższy nowotwór.

Rak jajnika jest nowotworem hormonozależnym [103-105]. Badania naukowe dotyczące wpływu poszczególnych hormonów na raka jajnika cały czas trwają. Hormonami steroidowymi jajnika są estrogeny [106, 107].

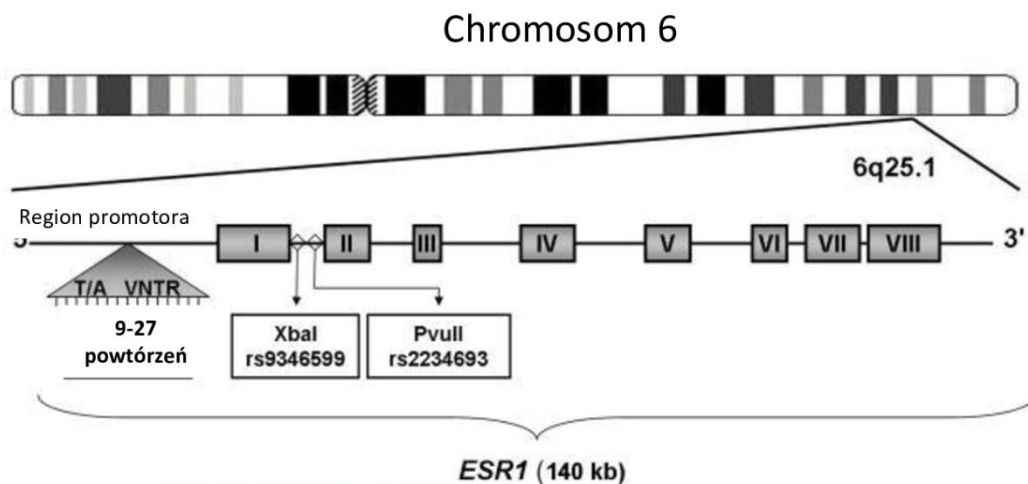
Estrogeny w fazie folikularnej stymulują podziały komórek nabłonka oraz fibroblastów. Długotrwała i nadmierna ekspozycja na estrogeny, nieprzeciwstawiona antyproliferacyjnym działaniem progesteronu, może prowadzić w konsekwencji do rozwoju raka [108-110]. Estrogeny oddziałują na komórki poprzez receptory estrogenowe ER α i ER β [62, 110].

Zaburzenie równowagi między ekspresją receptora ER α i ER β może więc stanowić kluczowy, krytyczny etap w estrogenozależnej kancerogenezie. W prawidłowych komórkach zarówno nabłonka jajnikowego, jak i w komórkach nabłonkowego raka jajnika stwierdzono obecność receptorów dla estrogenów. W 60% przypadków raka wykrywa się znacznie podwyższony poziom receptorów ER α [111-115].

Receptor ER α kodowany jest przez gen *ESR1*. Gen *ESR1* jest genem polimorficznym [116-119]. Gen *ESR1* znajduje się na chromosomie 6q25.1 i składa się z 8 eksonów. Pierwszy intron i promotor genu zawierają sekwencje regulacyjne dla innych intronów. W *ESR1* zidentyfikowano kilka polimorfizmów pojedynczego nukleotydu i polimorfizmów zmiennej liczby powtórzeń tandemowych tzw. sekwencji minisatelitarnych (VNTR, ang. variable number of tandem repeats) (Rycina 23). Dwa polimorfizmy, które wpływają na aktywność ER, najczęściej badane w genie *ESR1* to SNP, rs2234693(PvuII) i rs9340799 (XbaI), które pozostają w nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem VNTR w regionie promotora [120].

Polimorficzny wariant genu *ESR1* rs2234693 (PvuII) znajduje się powyżej eksonu 2, w pierwszej parze zasad intronu długości 397 pz, w którym cytozyna jest zastąpiona tyminą, a zmiana ta jest identyfikowana przez endonukleazę PvuII [121, 122]. Polimorfizm rs9340799 (XbaI), jest zlokalizowany 50 pz od miejsca polimorficznego PvuII [123], jest wariantem w którym guanina jest zastąpiona adeniną.

Rycina 23. Organizacja genu receptora estrogenowego α (*ESR1*) z zaznaczeniem pozycji wariantów XbaI, PvuII i powtórzeń TA [124].



W przypadku polimorfizmu genu *ESR1* PvuII wykazano, że allel C tworzy część funkcjonalnego miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego B-myb, który wzmacnia transkrypcję receptora estrogenowego [125]. Nadekspresja receptora estrogenowego prawdopodobnie wyjaśnia związek allelu C z gorszym przeżyciem. Obecność miejsca PvuII odpowiadającego allelowi T może prowadzić do zmniejszonej ekspresji *ESR1*, a zatem efekty działania estrogenu poprzez pośrednie działanie *ESR1* mogą być zmniejszone, co skutkuje względnym niedoborem estrogenu.

Polimorfizm PvuII wpływa na splicing mRNA *ESR1*, co powoduje zmianę w syntezie białka ESR1 [126].

Możliwe mechanizmy funkcjonalne przypisywane polimorfizmowi XbaI obejmują zmianę ekspresji genu *ERα* poprzez zmianę wiązania czynników transkrypcyjnych i wpływ na alternatywny splicing tego genu. Przypuszcza się, że czynnik transkrypcyjny B-myb może wpływać na funkcję XbaI [127]. Jednak jego znaczenie funkcjonalne pozostaje niejasne.

Opisano różnice w częstości występowania polimorfizmów rs2234693 i rs9340799. W zależności od badanej populacji, allel T lub C został określony jako czynnik protekcyjny lub czynnik ryzyka w przypadku raka piersi [128-130].

Różnice w częstości występowania polimorfizmów w zależności od badanej populacji zaobserwowano też u pacjentek z pierwotną niewydolnością jajników (ang. Primary ovary insufficiency, POI). POI definiuje się jako hipogonadyzm hipergonadotropowy przed

ukończeniu 40. roku życia. Badano związek polimorfizmu w genie receptora estrogenowego z rozwojem POI; jednak wyniki są kontrowersyjne w różnych populacjach [131].

Polimorfizm rs2234693 i rs9340799 w *ESR1* są najlepiej zbadanymi wariantami u kobiet cierpiących na POI. Polimorfizm rs2234693 jest związany z normalnym przebiegiem menopauzy u kobiet koreańskich i holenderskich [132]. Ten polimorfizm badano również u kobiet chińskich, brazylijskich i europejskich, a wyniki ujawniły istotny związek z początkiem POI [133-135]. Inny polimorfizm w tym genie, rs9340799, zmniejsza ryzyko wystąpienia POI w populacji koreańskiej. Jednakże nie stwierdzono związku tego polimorfizmu z POI w populacji kobiet chińskich i brazylijskich [133, 134, 136]. Ciekawe wyniki uzyskali badacze irańscy. Haplotyp rs2234693T/rs9340799A był związany z narażaniem na ryzyko POI [137].

Badania będące metaanalizą wskazują na związek polimorfizmu genu *ESR1* PvuII ze zwiększonym ryzykiem przedwczesnego wygasania czynności jajników (ang. Premature ovary failure, POF). Przedwczesne wygasanie czynności jajników to ustanie funkcji jajnika przed 40. rokiem życia. Przedwczesne wygasanie funkcji jajników u kobiet rozpoznaje się u około 1 na 100 pacjentek przed 40. rokiem życia. Prace badawcze wykazały, że polimorfizm genu *ESR1* XbaI nie jest związany z ryzykiem POF w żaden sposób [138].

Polimorfizmy rs9340799 i rs2234693 znajdują się w silnej nierównowadze sprzężeń między sobą. W tej chwili nie ma biologicznych dowodów na funkcjonalność tych SNP, chociaż ostatnie odkrycia potwierdzają hipotezę, że powyższe polimorfizmy wpływają na aktywność estrogenu, w wyniku regulacji transkrypcji genu *ESR1* modulując wiązanie czynnika transkrypcyjnego. Badania asocjacyjne pozostają kontrowersyjne z różnych powodów: jednym z nich jest trudność w określeniu allelu związanego z chorobą, a drugim zmienność genetyczna występująca w każdej populacji etnicznej i specyfika każdego badania. Istnieją badania asocjacyjne, które wykazały zwiększone ryzyko raka piersi [139-141], osteoporozy [142, 143], a także zmniejszone ryzyko endometriozy [144] w kontekście polimorfizmów rs9340799 i rs2234693. Niektóre badania w endometriozie wykazały powiązane ryzyko z allelami T (rs2234693) i A (rs9340799), podczas gdy inne wykazały ryzyko związane z allelami C (rs2234693) i G (rs9340799) [144].

Receptor estrogenowy α jest receptorem estrogenowym znajdującym się w komórkach nabłonka powierzchni jajnika. Dane literaturowe wskazują na wpływ polimorfizmów genu receptora α rs2234693 oraz rs9340799 na występowanie nabłonkowego raka jajnika. Polimorfizm genu receptora α indukuje powstawanie nabłonkowego raka jajnika poprzez indukcję proliferacji komórek i antyapoptozę [96]. Wariant polimorficzny może

wpływać na podatność danej osoby na wystąpienie raka jajnika. Wykazano, że allel T polimorfizmu rs2295190 może być związany ze zwiększonym ryzykiem inwazyjnego raka jajnika [98].

Wśród inwazyjnych raków jajnika związek z rs2295190 obserwowano dla podtypu surowiczego oraz silną korelację dla podtypu śluzowego, przy czym nie obserwowano związku dla guzów endometrioidalnych. Chociaż niektóre dowody sugerują, że śluzowe inwazyjne i graniczne guzy jajnika mogą mieć wspólne pochodzenie [145], nie odnotowano wyraźnego związku rs2295190 z ryzykiem śluzowych guzów granicznych.

Trwają badania mające na celu zrozumienie roli SNPs w raku jajnika.

W prezentowanej pracy celem było wykazanie czy polimorfizmy rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* mogą brać udział w powstawaniu raka jajnika. Łączna ocena polimorfizmów może umożliwić wyłonienie grupy chorych o wysokim ryzyku zachorowania na nowotwór. Może to mieć praktyczne medyczne zastosowanie w ocenie indywidualnego ryzyka zachorowania u bezobjawowych nosicieli. W prezentowanej pracy badania zostały oparte o analizę polimorfizmów konstytucyjnych o znaczeniu funkcjonalnym w większości dotychczas niezbadanych u chorych na nowotwory jajnika. W pracy zastosowano badania asocjacyjne. Są to badania włączające pacjentów z chorobą nowotworową i osoby nie chorujące na nowotwory w celu określenia czy wybrane zmiany SNP predysponują do raka. W prezentowanej pracy przedstawiono związek poszczególnych SNP z charakterystyką kliniczno-patologiczną raka jajnika. Polimorfizmy receptora estrogenowego α mogą zostać wykorzystane jako czynnik predykcyjny, który umożliwia podjęcie decyzji terapeutycznych. Na tym może polegać ich podstawowe znaczenie kliniczne. W chwili obecnej prace badawcze koncentrują się na analizach kilku zasadniczych polimorfizmów: PvuII, XbaI, i innych znacznie rzadziej oznaczanych (rs746432, rs2077647 i rs532010). Obejmują one ocenę znaczenia tych polimorfizmów w przypadku nowotworów hormono zależnych jak: rak endometrium [62], sutka [146-148] czy jajnika [78]. Opisano również, że polimorfizmy *ESR1* biorą udział w odpowiedzi na hiperstymulację jajników w badaniach wspomaganego rozrodu [149].

W prezentowanej pracy analizowano znaczenie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów u chorych na raka jajnika. Warto zaznaczyć, że SNP z jednej strony determinuje występowanie zjawiska zmienności DNA, jednak często przyczynia się do utworzenia zmian sekwencyjnych DNA, które w konsekwencji prowadzą do występowania wielu chorób w tym nowotworów złośliwych. W niniejszej pracy poddano analizie częstość

występowania wariantów polimorficznych genu *ESR1* u chorych na raka jajnika i w grupie kontrolnej. Otrzymane wyniki skorelowano z cechami klinicznymi i patomorfologicznymi, które mogłyby mieć wpływ na zachorowalność na raka jajnika.

Uzyskane w pracy wyniki wykazały, że obecność genotypu CC (rs2234693) ponad dwukrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jajnika, natomiast obecność genotypu TT (rs2234693) znacząco obniża ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu. W przypadku drugiego z badanych polimorfizmów rs9340799, obecność genotypu GG ponad dwukrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jajnika.

W przedstawionej dysertacji przeprowadzono analizę haplotypów (zestawu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, położonych na jednej chromatydzie), który dziedziczy się jako zestaw sprzężonych ze sobą alleli. Analiza haplotypów genu *ESR1* w odniesieniu do polimorfizmów rs2234693 i rs9340799 wykazała, że wystąpienie układu TCAG a zwłaszcza CCGG związane może być ze znacznym podwyższeniem ryzyka wystąpienia raka jajnika.

W przypadku polimorfizmu rs2234693, obecność genotypu CC (obecność allele C) jest związana ze stopniem zaawansowania nowotworu oraz wiąże się z stopniem jego zróżnicowania. W przypadku polimorfizmu rs9340799, obecność genotypu GG (obecność allele G) związana jest z rozmiarem guza nowotworowego oraz stopniem anaplazji. Wiek kobiet nie miał wpływu na częstość występowania poszczególnych genotypów, ani na związane z nim ryzyko wystąpienia choroby. Uzyskane wyniki są zgodne z badaniami prowadzonymi przez naukowców na odmiennych etnicznie populacjach.

Obecność polimorfizmu rs2234693 genu *ESR1* może być jednym z czynników ryzyka rozwoju raka jajnika w populacji hinduskiej [78]. Wykazano, że pacjentki z rakiem jajnika w 50% były nosicielkami genotypu TT, w 33,75% heterozygotami TC i w 16,25% nosicielkami homozygot CC. W przypadku grupy kontrolnej homozygoty TT stanowiły 79%, genotyp TC 12%, homozygoty CC 9%. U chorych na raka jajnika występował znaczący wzrost częstości allele C w porównaniu z grupą kontrolną. Podobnie jak w prezentowanych badaniach pacjentki będące nosicielkami tego allele mogą być w grupie zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworu.

Wyniki podobne z prezentowanymi w tej dysertacji uzyskali też badacze zespołu Rahayuning i wsp. [95]. W przypadku polimorfizmu rs9340799 wykazali przewagę obecności genotypu AG (70%) u chorych z rakiem jajnika. W przeciwieństwie do prezentowanej pracy rozkład haplotypów rs9340799 i rs2234693 nie wykazał żadnych istotnych różnic.

Większość badanych pacjentek z rakiem jajnika było nosicielkami allelu G, podczas gdy pacjentki grupy kontrolnej były nosicielkami allelu A. Wykazano istotny wpływ polimorfizmu rs9340799 na częstość występowania raka jajnika. Badacze sugerują, że genotypy AG i GG mogą być czynnikiem ryzyka raka jajnika.

Badania genetyczne polimorfizmów *ESR1* w chorobach nowotworowych są cały czas w toku. Przeprowadzono badania epidemiologiczne w celu oceny związku polimorfizmu *ESR1* PvuII (rs2234693 T>C) z ryzykiem zachorowania na nowotwory. Wyniki nie wykazały istotnego związku między ogólnym ryzykiem zachorowania na raka a polimorfizmem PvuII w modelach homozygotycznych (TT vs. CC) i heterozygotycznych (TT vs. CT). Istotną statystycznie zależność zaobserwowano tylko dla polimorfizmu PvuII w modelu allelu T vs. C. Analiza stratyfikacji według typu nowotworu sugerowała, że genotyp T istotnie zmniejszał ryzyko raka prostaty, ryzyko mięśniaków gładkokomórkowych i ryzyko raka wątrobowo komórkowego. Wyniki sugerują, że polimorfizm *ESR1* PvuII (rs2234693 T>C) może mieć jedynie niewielki wpływ na podatność na raka [150]. W przyszłości uzasadnione są badania epidemiologiczne na dużą skalę w celu weryfikacji tych wyników.

W pracy zespołu Kutilin i wsp. analizowano geny regulujące apoptozę, naprawę DNA, proliferację komórek, metabolizm i regulację estrogenu w komórkach nowotworowych i prawidłowych surowiczego gruczolaka jajników wysokiego i niskiego stopnia [151]. Stosując metodę qPCR w czasie rzeczywistym, określono względną liczbę kopii 34 genów (w tym *BAX*, *BCL2*, *TP53*, *MDM2*, *CASP9*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *PRKCI*, *SOX2*, *OCT4*, *PIK3*, *PTEN*, *C-MYC*, *SOX18*, *AKT1*, *NOTCH1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *EXO1*, *SCNN1A*, *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *CYP11A1*, *CYP11A2*, *CYP11B1*, *CYP19A*, *ESR1*, *ESR2*, *GPER*, *STS*, *SULT1A* i *SULT1E1*) w prawidłowych i nowotworowych komórkach jajników pobranych za pomocą bezkontaktowego mikroskopu laserowego z blozków parafinowych FFPE od 200 pacjentek. Zidentyfikowano najbardziej typowe markery molekularne komórek surowiczego gruczolaka jajnika: liczbę kopii genów *PIK3CA*, *BCL2*, *BAX*, *CASP3* i *CASP8*. Na podstawie różnic w zmienności liczby kopii genu zidentyfikowano dwa podtypy molekularne surowiczego gruczolaka, odpowiadające dwóm podtypom histologicznym: wysokiego stopnia (*MDM2*, *SOX2*, *ESR1*, *CYP11B1*, *SULT1E1*, *TP53*, *BRCA2*) i niskiego stopnia (*PIK3CA*, *PTEN*, *BCL2*, *BAX* i *CASP3*). Każdy z tych podtypów charakteryzował się również heterogenicznością molekularną i można go podzielić na kilka podgrup: 3 podgrupy dla wysokiego stopnia i 4 podgrupy dla surowiczego gruczolaka niskiego stopnia. Wyniki te poszerzają naszą wiedzę na temat mechanizmów molekularnych nowotworzenia w tkance jajnika i potwierdzają różnice molekularne między dwoma podtypami histologicznymi

gruczolakoraka surowiczego, które prawdopodobnie leżą u podstaw ich odmiennego przebiegu klinicznego.

Istnieją doniesienia wskazujące, że mutacje w genie *ESR1* mogą wpływać na terapię endokrynologiczną, często przekładają się na jej oporność [152]. Wiadomo, że nowotwory ginekologiczne jak rak jajnika jak i rak trzonu macicy o niskim stopniu złośliwości często charakteryzuje ekspresja receptora estrogenowego ER α , kodowanego przez *ESR1*. Są to nowotwory wrażliwe na hormony. W przypadku tych nowotworów stosowanie terapii endokrynologicznej w zaawansowanym i nawracającym stadium choroby jest powszechne.

Badania wskazują, że mutacje w genie *ESR1* mogą stanowić mechanizm oporności na leczenie inhibitorami aromatazy w nowotworach ginekologicznych. Wykazano, że najczęściej są to mutacje L536, Y537 i D538, które korelowały z wyższą ekspresją mRNA *ESR1* [151].

U chorych na endometriozę istnieje ryzyko rozwoju niektórych typów histologicznych raków jajnika na jej podłożu. Ryzyko zachorowania na raka jajnika jest czterokrotnie wyższe u kobiet z endometriozą w porównaniu z kobietami, u których nie zdiagnozowano tej choroby. W przypadku jej ciężkich podtypów zagrożenie rośnie nawet blisko 10-krotnie [153].

W najnowszym badaniu naukowców ze Stanów Zjednoczonych przeanalizowano dane dotyczące prawie 500 tys. kobiet w stanie Utah w wieku od 18 do 55 lat. Po raz pierwszy przyjrzano się wskaźnikom zapadalności na różne typy endometriozy i podtypy raka jajnika. Ryzyko wystąpienia raka jajnika typu I było „szczególnie wysokie” (ok. 7,5-krotnie wyższe u kobiet z endometriozą), a ryzyko wystąpienia raka jajnika typu II – który może być bardziej agresywny – było około 2,7 razy bardziej prawdopodobne. Sugeruje się, że taka populacja powinna skorzystać z poradnictwa dotyczącego ryzyka raka jajnika i profilaktyki i może być ważną grupą dla ukierunkowanych badań przesiewowych i profilaktycznych [154]. W chwili obecnej badania wariantów w loci PvuII i XbaI w endometriozie są przedmiotem naukowej debaty.

Dane literaturowe wskazują, że w endometriozie rolę odgrywają wzrost poziomu estradiolu i ekspresji ER β , genotypy polimorficzne i allele genu ER β rs4986938 G/A oraz częstość alleli genu ER α rs9340799 A/G [155].

W badaniu będącym metaanalizą z udziałem 4975 pacjentów (2222 chorych na raka jajnika, 2753 grupa kontrolna), przeanalizowano polimorfizmy *ESR1* PvuII/XbaI. Całkowite połączone wyniki nie wykazały istotnych korelacji między polimorfizmami *ESR1* PvuII/XbaI a rozwojem endometriozy. W analizie podgrup PvuII był związany z endometriozą tylko w

stadium I-III i tylko w modelu recesywnym. XbaI był związany z endometriozą tylko w przypadku metody genotypowania PCR-RFLP i również tylko w modelu recesywnym. Metaanaliza wykazała, że polimorfizmy PvuII lub XbaI nie były związane z podatnością na endometriozę z wyjątkiem niewielkiego związku endometriozy w stadium I-III w modelu recesywnym. Wyniki skłaniają do refleksji, że konieczne są dalsze, dobrze zaprojektowane badania na dużą skalę, które mogą rzucić światło na problem powstawania raka jajnika na podłożu endometriozy w korelacji z polimorfizmami *ESR1* [156].

Rak jajnika, ze względu na brak specyficznych objawów we wczesnym etapie choroby, bardzo często zostaje rozpoznany w bardzo zaawansowanym stadium, z niekorzystnymi rokowaniami. Od dawna prowadzone są zatem badania w celu uzyskania idealnego markera tego nowotworu. Mimo znaczących osiągnięć i stosowania testów takich jak wcześniej opisany ROMA czy Ova1 (oparty na różnych biomarkerach włącznie z CA-125 został opracowany do oszacowania charakteru guza – określenia prawdopodobieństwa złośliwości jeszcze przed leczeniem operacyjnym i badaniem histopatologicznym) nadal poszukuje się efektywnych metod wczesnej diagnozy raka jajnika.

Pomimo względnie silnej predyspozycji genetycznej do raka jajnika do tej pory odkryto zaledwie kilka wariantów związanych z tym nowotworem. Wydaje się, że może to mieć związek z niską penetracją genów odpowiedzialnych za rozwój nowotworu. Wyniki przedstawionych badań wnoszą nowe wartości dodane do zrozumienia podłoża molekularnego raka jajnika. Przeprowadzone w pracy badania wykazały, że polimorfizmy rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* mogą uczestniczyć w powstawaniu raka jajnika. Przebadane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów mogą stanowić grupę nowych czynników ryzyka rozwoju raka a ich analiza może posłużyć w kwalifikacji pacjentek do grupy chorych o wysokim ryzyku zachorowania. Ponadto mogą być niezwykle użyteczne w ocenie indywidualnego ryzyka zachorowania u osób bez objawów choroby nowotworowej. Wyniki badań w przyszłości mogą zostać wykorzystane do poprawy wcześniejszego rozpoznawania raka a w efekcie wydłużenia czasu przeżycia chorych na te nowotwory. Konieczne są dalsze badania w temacie polimorfizmów i ich roli w raku jajnika.

7. Piśmiennictwo

1. Didkowska J, Wojciechowska U, Michalek IM, Caetano Dos Santos FL. Cancer incidence and mortality in Poland in 2019. *Sci Rep*. 2022 Jun 27;12(1):10875.
2. Wojciechowska U, Barańska K, Michałek I, Olasek P, Miklewska M, Didkowska JA. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2020 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów. Warszawa 2022.
3. OECD (2023), Krajowe profile dotyczące nowotworów: Polska 2023, EU Country Cancer Profiles, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/aab579a7-pl>.
4. OECD/Europejskie Obserwatorium Polityki i Systemów Opieki Zdrowotnej (2021), Polska: profil systemu ochrony zdrowia 2021, Paryż, OECD Publishing, <https://doi.org/10.1787/e836525a-en>
5. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jul;68(4):284-296.
6. Gatta G, Trama A, Bielska-Lasota M. Rzadkie nowotwory złośliwe – narastający problem w Europie i w Polsce, *Medycyna Praktyczna – Onkologia*, 2013, t. 1/2013, 53–58.
7. Ali AT, Al-Ani O, Al-Ani F. Epidemiology and risk factors for ovarian cancer. *Prz Menopauzalny* 2023 Jun;22(2):93-104.
8. Kehoe S. FIGO staging in ovarian carcinoma and histological subtypes. *J Gynecol Oncol*. 2020 Jul;31(4):e70.
9. Barili V, Ambrosini E, Bortesi B, Minari R, De Sensi E, Cannizzaro IR, Taiani A, Michiara M, Sikokis A, Boggiani D, Tommasi C, Serra O, Bonatti F, Adorni A, Luberto A, Caggiati P, Martorana D, Uliana V, Percesepe A, Musolino A, Pellegrino B. Genetic Basis of Breast and Ovarian Cancer: Approaches and Lessons Learnt from Three Decades of Inherited Predisposition Testing. *Genes (Basel)*. 2024 Feb 8;15(2):219.
10. Gambini D, Ferrero S, Kuhn E. Lynch Syndrome: From Carcinogenesis to Prevention Interventions. *Cancers (Basel)*. 2022 Aug 24;14(17):4102.
11. Daly MB, Drescher CW, Yates MS, Jeter JM, Karlan BY, Alberts DS, Lu KH. Salpingectomy as a means to reduce ovarian cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015 May;8(5):342-8.

12. Dixon-Suen SC, Webb PM, Wilson LF, Tuesley K, Stewart LM, Jordan SJ. The Association Between Hysterectomy and Ovarian Cancer Risk: A Population-Based Record-Linkage Study. *J Natl Cancer Inst.* 2019 Oct 1;111(10):1097-1103.
13. Collaborative Group on Epidemiological Studies on Endometrial Cancer Endometrial cancer and oral contraceptives: an individual participant meta-analysis of 27 276 women with endometrial cancer from 36 epidemiological studies *Lancet Oncol.* 2015 Sep;16(9):1061-1070.
14. Norheim OF, Jha P, Admasu K, Godal T, Hum RJ, Kruk ME, Gómez-Dantés O, Mathers CD, Pan H, Sepúlveda J, Suraweera W, Verguet S, Woldemariam AT, Yamey G, Jamison DT, Peto R. Avoiding 40% of the premature deaths in each country, 2010-30: review of national mortality trends to help quantify the UN sustainable development goal for health. *Lancet.* 2015 Jan 17;385(9964):239-52.
15. Stover J, Winfrey W. The effects of family planning and other factors on fertility, abortion, miscarriage, and stillbirths in the Spectrum model. *BMC Public Health.* 2017 Nov 7;17(Suppl 4):775.
16. Wojciechowska P, Milska Musa KA. Quality of life and mental state of women trying to conceive using the in vitro method. *European journal of Translational and Clinical Medicine* 2024;7(1):106-112
17. Aune D. Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. *Adv Nutr.* 2019 Nov 1;10(Suppl4):S404-S421.
18. Donaldson MS. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J.* 2004 Oct 20;3:19.
19. Sun Y, Liu G. Endometriosis-associated Ovarian Clear Cell Carcinoma: A Special Entity? *J Cancer.* 2021 Sep 23;12(22):6773-6786.
20. Hablase R, Kyrou I, Randevara H, Karteris E, Chatterjee J. The "Road" to Malignant Transformation from Endometriosis to Endometriosis-Associated Ovarian Cancers (EAOCs): An mTOR-Centred Review. *Cancers (Basel).* 2024 Jun 6;16(11):2160.
21. Buck Louis GM, Hediger ML, Peterson CM, Croughan M, Sundaram R, Stanford J, Chen Z, Fujimoto VY, Varner MW, Trumble A, Giudice L.; ENDO Study Working Group. Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. *Fertil Steril.* 2011;96(2):360-365.
22. Kvaskoff M, Mahamat-Saleh Y, Farland LV, Shigesaki N, Terry KL, Harris HR, Roman H, Becker CM, As-Sanie S, Zondervan KT, Horne AW,

- Missmer SA. Endometriosis and cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2021;27(2):393-420.
23. Neff RT, Senter L, Salani R. BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations. *Ther Adv Med Oncol*. 2017 Aug;9(8):519-531.
 24. AlHilli MM, Al-Hilli Z. Perioperative Management of Women Undergoing Risk-reducing Surgery for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *J Minim Invasive Gynecol*. 2019 Feb;26(2):253-265.
 25. Finch AP, Lubinski J, Møller P, Singer CF, Karlan B, Senter L, Rosen B, Maehle L, Ghadirian P, Cybulski C, Huzarski T, Eisen A, Foulkes WD, Kim-Sing C, Ainsworth P, Tung N, Lynch HT, Neuhausen S, Metcalfe KA, Thompson I, Murphy J, Sun P, Narod SA. Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *J Clin Oncol* 2014;32(15):1547-53.
 26. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, Garber JE, Neuhausen SL, Matloff E, Eeles R, Pichert G, Van t'veer L, Tung N, Weitzel JN, Couch FJ, Rubinstein WS, Ganz PA, Daly MB, Olopade OI, Tomlinson G, Schildkraut J, Blum JL, Rebbeck TR. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 26or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA* 2010;304(9):967-75.
 27. Liberto JM, Chen SY, Shih IM, Wang TH, Wang TL, Pisanic TR 2nd. Current and Emerging Methods for Ovarian Cancer Screening and Diagnostics: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 11;14(12):2885.
 28. Bankhead CR, Collins C, Stokes-Lampard H, Rose P, Wilson S, Clements A, Mant D, Kehoe ST, Austoker J. Identifying symptoms of ovarian cancer: a qualitative and quantitative study. *BJOG*. 2008 Jul;115(8):1008-14.
 29. Wei SU, Li H, Zhang B. The diagnostic value of serum HE4 and CA-125 and ROMA index in ovarian cancer. *Biomed Rep*. 2016 Jul;5(1):41-44.
 30. Doubeni CA, Doubeni AR, Myers AE. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician*. 2016 Jun 1;93(11):937-44.
 31. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Aug 25;2:16061.
 32. Kim J, Park EY, Kim O, Schilder JM, Coffey DM, Cho CH, Bast RC Jr. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Nov 12;10(11):433.

33. Wu R, Baker SJ, Hu TC, Norman KM, Fearon ER, Cho KR. Type I to type II ovarian carcinoma progression: mutant Trp53 or Pik3ca confers a more aggressive tumor phenotype in a mouse model of ovarian cancer. *Am J Pathol.* 2013 Apr;182(4):1391-9.
34. Prat J. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. FIGO 's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged publication. *J Gynecol Oncol.* 2015 Apr;26(2):87-9.
35. Zalewski K, Misiek M, Gózdź S, Bidziński M. Nowy system klasyfikacji zaawansowania nowotworów jajnika, jajowodu i otrzewnej— stan na 2014 rok *Onkologia w Praktyce Klinicznej* 2015, tom 11, nr 3, 129–134.
36. Marth C, Reimer D, Zeimet AG. Front-line therapy of advanced epithelial ovarian cancer: standard treatment. *Ann Oncol.* 2017 Nov 1;28(suppl8):viii36-viii39.
37. Macchia G, Titone F, Restaino S, Arcieri M, Pellecchia G, Andreetta C, Driul L, Vizzielli G, Pezzulla D. Is It Time to Reassess the Role of Radiotherapy Treatment in Ovarian Cancer? *Healthcare (Basel).* 2023 Aug 28;11(17):2413.
38. Durno K, Powell ME. The role of radiotherapy in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2022 Mar;32(3):366-371.
39. Satoh T, Hatae M, Watanabe Y, Yaegashi N, Ishiko O, Kodama S, Yamaguchi S, Ochiai K, Takano M, Yokota H, Kawakami Y, Nishimura S, Ogishima D, Nakagawa S, Kobayashi H, Shiozawa T, Nakanishi T, Kamura T, Konishi I, Yoshikawa H. Outcomes of fertility-sparing surgery for stage I epithelial ovarian cancer: a proposal for patient selection. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 1;28(10):1727-32.
40. Li H, Liu Y, Wang Y, Zhao X, Qi X. Hormone therapy for ovarian cancer: Emphasis on mechanisms and applications (Review). *Oncol Rep.* 2021 Oct;46(4):223.
41. Hirschl N, Leveque W, Granitto J, Sammarco V, Fontillas M, Penson RT. PARP Inhibitors: Strategic Use and Optimal Management in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2024 Feb 25;16(5):932.
42. Basta P, Bidziński M, Kluz T, Nowak-Markwitz E, Olejek A, Sawicki W. Zasady postępowania z chorymi z podejrzeniem i rozpoznaniem raka jajnika — rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego *Ginekologia i Perinatologia Praktyczna* 2016, tom 1, nr 3, 127–129.
43. Ali AT, Al-Ani O, Al-Ani F. Epidemiology and risk factors for ovarian cancer. *Prz Menopauzalny.* 2023 Jun;22(2):93-104.
44. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, Senkus E; ESMO Guidelines Committee. Prevention and screening in BRCA mutation carriers

and otherbreast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl 5): v103–v110.

45. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, Roeb W, Agnew KJ, Stray SM, Wickramanayake A, Norquist B, Pennington KP, Garcia RL, King MC, Swisher EM. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(44):18032–18037.
46. Chudecka Głaz A. Bezpieczeństwo leczenia niraparybem pacjentek z rakiem jajnika. *Onkologia w Praktyce Klinicznej.* 2023, Tom 9, Nr 5.
47. Doraczyńska-Kowalik A, Janus-Szymańska G, Matkowski R, Gabalewicz K, Michałowska D, Sąsiadek MM. Genetyka i onkologia (część 2.) Podstawy medycyny personalizowanej w leczeniu raka piersi i raka jajnika. *Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego Nowotwory.* 2020, tom 5, nr 5, 255–272.
48. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019;116:135-170.
49. Kozieł MJ, Piastowska-Ciesielska AW. Estrogens, Estrogen Receptors and Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(19):14673.
50. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987; 51: 941-51.
51. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53.
52. 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.
53. 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.
54. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 1951-9.
55. Leung PC, Choi JH. Endocrine signaling in ovarian surface epithelium and cancer. *Hum Reprod Update* 2007; 2: 143-162.
56. Kozieł MJ, Piastowska-Ciesielska AW. Estrogens, Estrogen Receptors and Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023 Sep 28;24(19):14673.

57. Johansson Å, Schmitz D, Höglund J, Hadizadeh F, Karlsson T, EkWE. Investigating the Effect of Estradiol Levels on the Risk of Breast, Endometrial, and Ovarian Cancer. *J Endocr Soc.* 2022 Jun 29;6(8):bvac100.
58. Skrzypczak M, Wolinska E, Adaszek Ł, Ortmann O, Treeck O. Epigenetic Modulation of Estrogen Receptor Signaling in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2024 Dec 28;26(1):166.
59. Kocanova S, Mazaheri M, Caze-Subra S, Bystricky K. Ligands specify estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation. *BMC Cell Biol.* 2010 Dec 10;11:98.
60. Cano A, Hermenegildo C. Modulation of the oestrogen receptor: a process with distinct susceptible steps. *Hum Reprod* 2000;6: 207-11.
61. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 1997; 277: 1508-10.
62. Fujimura M, Hidaka T, Kataoka K, Ymakawa Y, Akada S, Terenishi A, Saito S. Absence of estrogen receptor- α expression in human ovarian clear cell adenocarcinoma compared with ovarian serous, endometrioid, and mucinous adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 667-72.
63. Rutherford T, Brown WD, Sapi E, Aschkenazi S, Munoz A, MorG. Absence of estrogen receptor – β expression in metastatic ovarian disease. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 417-21.
64. Schüler-Toprak S, Weber F, Skrzypczak M, Ortmann O, Treeck O. Expression of estrogen-related receptors in ovarian cancer and impact on survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021 Sep;147(9):2555-2567.
65. Bardin A, Hoffmann P, Boule N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, Lazenec G. Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 5861-9.
66. Borella F, Fucina S, Mangherini L, Cosma S, Carosso AR, Cusato J, Cassoni P, Bertero L, Katsaros D, Benedetto C. Hormone Receptors and Epithelial Ovarian Cancer: Recent Advances in Biology and Treatment Options. *Biomedicines.* 2023 Aug 1;11(8):2157.
67. Zhang M, Xu, H, Zhang Y, Li Z, Meng W, Xia J, Lei W, Meng K, Guo Y. Research Progress of Estrogen Receptor in Ovarian Cancer *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2023; 50(9): 199.

68. Montalto FI, De Amicis F. Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma. *Cells*. 2020 Dec 9;9(12):2648.
69. Mal R, Magner A, David J, Datta J, Vallabhaneni M, Kassem M, Manouchehri J, Willingham N, Stover D, Vandeusen J, Sardesai S, Williams N, Wesolowski R, Lustberg M, Ganju RK, Ramaswamy B, Cherian MA. Estrogen Receptor Beta (ERbeta): A Ligand Activated Tumor Suppressor. *Front Oncol*. 2020 Oct 23;10:587386.
70. Voutsadakis IA. A systematic review and meta-analysis of hormone receptor expression in low-grade serous ovarian carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021 Jan;256:172-178.
71. Zhou X, Gu Y, Wang DN, Ni S, Yan J. Eight functional polymorphisms in the estrogen receptor 1 gene and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Apr 8;8(4):e60851.
72. Bai XH, Su J, Mu YY, Zhang XQ, Li HZ, He XF, He XF. Association between the ESR1 and ESR2 polymorphisms and osteoporosis risk: An updated meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2023 Oct 13;102(41):e35461
73. Ren H, Liu H, Huang L, Xie W, Lin D, Luo D. Association of ESR1 and ESR2 Polymorphisms with Osteoporosis: A Meta-Analysis from 36 Studies. *J Clin Densitom*. 2022 Oct-Dec;25(4):699-711.
74. Zhao Y, Zheng X, Zhang L, Hu Q, Guo Y, Jiang H, Shi S, Zhang X. Association of estrogen receptor α PvuII and XbaI polymorphisms with prostate cancer susceptibility and risk stratification: a meta-analysis from case-control studies. *Onco Targets Ther*. 2017 Jun 29;10:3203-3210.
75. Aboelroos SA, Eltamany EHM, Mohamed FAM, Suliman MA. Association between estrogen receptor alpha and aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms in the prognosis of breast cancer in Egypt. *Egypt J Immunol*. 2024 Apr;31(2):87-92.
76. Vega-García S, Saucedo-García R, Basurto-Acevedo ML, Vargas-Gutiérrez C, Galván-Duarte RE, Reyes-Maldonado E, Aguilar-Gallegos UI, Avelar-Garnica F, Galván-Plata ME. [Alpha estrogen receptor polymorphisms and their association with breast density]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2020 Apr 27;58(Supl 1):S13-S20.
77. Wang B, Yuan F. Comment on "Estrogen receptor alpha (ERS1) SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) are risk biomarkers for breast cancer development". *Mol Biol Rep*. 2019 Feb;46(1):5.

78. Pemmaraju S, Amidyala L, Vottery R, Nallari P, Akka J, Ananthapur V. Association of ER- α gene PvuII polymorphism with ovarian cancer. *Cancer Treat Res Commun.* 2018;14:13-16.
79. Boyle B, Dallaire N, MacKay J. Evaluation of the impact of single nucleotide polymorphisms and primer mismatches on quantitative PCR. *BMC Biotechnol.* 2009 Aug 28;9:75.
80. Tomita-Mitchell A, Muniappan BP, Herrero-Jimenez P, Zarbl H, Thilly WG. Single nucleotide polymorphism spectra in newborns and centenarians: identification of genes coding for rise of mortal disease. *Gene.* 1998 Nov 26;223(1-2):381-91.
81. Erichsen HC, Chanock SJ. SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer.* 2004 Feb 23;90(4):747-51.
82. Shastry BS. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *J Hum Genet.* 2007;52(11):871-880.
83. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol.* 2009;578:3-22.
84. Antontseva EV, Degtyareva AO, Korbolina EE, Damarov IS, Merkulova TI. Human-genome single nucleotide polymorphisms affecting transcription factor binding and their role in pathogenesis. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii.* 2023 Oct;27(6):662-675.
85. Dakal TC, Dhabhai B, Pant A, Moar K, Chaudhary K, Yadav V, Ranga V, Sharma NK, Kumar A, Maurya PK, Maciaczyk J, Schmidt-Wolf IGH, Sharma A. Oncogenes and tumor suppressor genes: functions and roles in cancers. *Med Comm (2020).* 2024 May 31;5(6):e582.
86. Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget.* 2017 Nov 7;8(66):110635-110649.
87. Turczynowicz A, Niedźwiecka K, Panasiuk D, Pużyńska W, Luchowski K, Kondracka J, Jakubów P. Single nucleotide polymorphisms as predictors of treatment efficacy and adverse effects of morphine in palliative medicine: a literature review. *Palliative Medicine in Practice* 2023, vol. 17, no. 1.
88. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019;116:135-170.
89. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2016 Dec 5;16(1):4-20.
90. Hua H, Zhang H, Kong Q, Jiang Y. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Exp Hematol Oncol.* 2018 Sep 19;7:24.

91. Li Y, Coons LA, Houtman R, Carlson KE, Martin TA, Mayne CG, Melchers D, Jefferson TB, Ramsey JT, Katzenellenbogen JA, Korach KS. A mutant form of ER α associated with estrogen insensitivity affects the coupling between ligand binding and coactivator recruitment. *Sci Signal*. 2020 Sep 22;13(650):eaaw4653.
92. Kommoss F, Pfisterer J, Thome M, Schäfer W, Sauerbrei W, Pfleiderer A. Steroid receptors in ovarian carcinoma: immunohistochemical determination may lead to new aspects. *Gynecol Oncol*. 1992 Dec;47(3):317-22.
93. Lindgren PR, Cajander S, Bäckström T, Gustafsson JA, Mäkelä S, Olofsson JI. Estrogen and progesterone receptors in ovarian epithelial tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Jun 30;221(1-2):97-104.
94. Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R. Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 Feb;84(2-3):279-89.
95. Rahayuning I, Pramesti, Rizal Sanif, Adenin Abadi, Irsan Saleh. Polymorphism Estrogen Receptor α Gene of Epithelial Ovarian Carcinoma. *Indones J Obstet Gynecol* 2011, Vol 35, No 4.
96. Weiderpass E, Persson I. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *J Carcinogenesis*. 2000; 21(4): 623-7.
97. Bardin A, Pascale H, Nathalie B, Dionyssios K, Francoise V, Pascal P. Involvement of estrogen receptor β on ovarian carcinogenesis. *Cancer Research*. 2004; 64: 5861-9.
98. Doherty JA, Rossing MA, Cushing-Haugen KL, Chen C, Van Den Berg DJ, Wu AH, Pike MC, Ness RB, Moysich K, Chenevix-Trench G, Beesley J, Webb PM, Chang-Claude J, Wang-Gohrke S, Goodman MT, Lurie G, Thompson PJ, Carney ME, Hogdall E, Kjaer SK, Hogdall C, Goode EL, Cunningham JM, Fridley BL, Vierkant RA, Berchuck A, Moorman PG, Schildkraut JM, Palmieri RT, Cramer DW, Terry KL, Yang HP, Garcia-Closas M, Chanock S, Lissowska J, Song H, Pharoah PD, Shah M, Perkins B, McGuire V, Whittemore AS, Di Cioccio RA, Gentry-Maharaj A, Menon U, Gayther SA, Ramus SJ, Ziogas A, Brewster W, Anton-Culver H; Australian Ovarian Cancer Study Management Group; Australian Cancer Study (Ovarian Cancer); Pearce CL; Ovarian Cancer Association Consortium (OCAC). ESR1/SYNE1 polymorphism and invasive epithelial ovarian cancer risk: an Ovarian Cancer Association Consortium study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Jan;19(1):245-50.

99. Hong MK, Ding DC. Early Diagnosis of Ovarian Cancer: A Comprehensive Review of the Advances, Challenges, and Future Directions. *Diagnostics (Basel)*. 2025 Feb 7;15(4):406.
100. Liberto JM, Chen SY, Shih IM, Wang TH, Wang TL, Pisanic TR 2nd. Current and Emerging Methods for Ovarian Cancer Screening and Diagnostics: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 11;14(12):2885.
101. Xiao L, Li H, Jin Y. Automated early ovarian cancer detection system based on bioinformatics. *Sci Rep*. 2024 Oct 2;14(1):22887.
102. Huepenbecker SP, Sun CC, Fu S, Zhao H, Primm K, Giordano SH, Meyer LA. Factors impacting the time to ovarian cancer diagnosis based on classic symptom presentation in the United States. *Cancer*. 2021 Nov 15;127(22):4151-4160.
103. Mungenast F, Thalhammer T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Nov 12;5:192.
104. Emons G. Hormone-Dependent Cancers: Molecular Mechanisms and Therapeutical Implications. *Cells*. 2022 Dec 28;12(1):110.
105. McHann MC, Blanton HL, Guindon J. Role of sex hormones in modulating breast and ovarian cancer associated pain. *Mol Cell Endocrinol*. 2021 Aug 1;533:111320.
106. Jeon SY, Hwang KA, Choi KC. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Apr;158:1-8.
107. Vazakidou P, Evangelista S, Li T, Lecante LL, Rosenberg K, Koekkoek J, Salumets A, Velthut-Meikas A, Damdimopoulou P, Mazaud-Guittot S, Fowler PA, Leonards PEG, van Duursen MBM. The profile of steroid hormones in human fetal and adult ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*. 2024 May 22;22(1):60.
108. Trabert B, Sherman ME, Kannan N, Stanczyk FZ. Progesterone and Breast Cancer. *Endocr Rev*. 2020 Apr 1;41(2):320-44.
109. Dias Da Silva I, Wuidar V, Zielonka M, Pequeux C. Unraveling the Dynamics of Estrogen and Progesterone Signaling in the Endometrium: An Overview. *Cells*. 2024 Jul 23;13(15):1236.
110. Chimento A, De Luca A, Avena P, De Amicis F, Casaburi I, Sirianni R, Pezzi V. Estrogen Receptors-Mediated Apoptosis in Hormone-Dependent Cancers. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 22;23(3):1242.

111. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019;116:135-170.
112. Chen P, Li B, Ou-Yang L. Role of estrogen receptors in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Aug 18;13:839005.
113. Scüler-Toprak S, Weber F, Skrzypczak M, Ortmann O, Treeck O. Expression of estrogen-related receptors in ovarian cancer and impact on survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021 Sep;147(9):2555-2567.
114. Gan X, Dai G, Li Y, Xu L, Liu G. Intricate roles of estrogen and estrogen receptors in digestive system cancers: a systematic review. *Cancer Biol Med.* 2024 Oct 30;21(10):898-915.
115. Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F.A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 6;24(7):6834.
116. Miedl H, Oswald D, Haslinger I, Gstoettner M, Wenzl R, Proestling K, Schneeberger C, Yotova I, Schreiber M. Association of the Estrogen Receptor 1 Polymorphisms rs2046210 and rs9383590 with the Risk, Age at Onset and Prognosis of Breast Cancer. *Cells.* 2023 Feb 4;12(4):515.
117. Klinge CM. Estrogenaction: Receptors, transcripts, cellsignaling, and non-coding RNAs in normal physiology and disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Dec 15;418 Pt 3:191-2.
118. Talarowska ME, Szemraj J, Kuan-Pin S.Expression of ESR1 and ESR2oestrogen receptor encoding gene and personality traits - preliminary study. *Prz Menopauzalny.* 2019 Dec;18(3):133-140.
119. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015 Aug;29(4):557-68.
120. Su X, Xu X, Li G, Lin B, Cao J, Teng L. ER- α 36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer. *Onco Targets Ther* 2014;7:1525-33.
121. Sundermann E, Maki P, Bishop J. A Review of Estrogen Receptor α Gene (ESR1) Polymorphisms, Mood, and Cognition. *Menopause* 2010;17:874-86.
122. Su X, Xu X, Li G, Lin B, Cao J, Teng L. ER- α 36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer. *Onco Targets Ther* 2014;7:1525-33.
123. Ding S, Yu J, Chen S Hsu GC, Hsu HM, Ho JY, Lin YH, Chang CC, Fann CS, Cheng CW, Wu PE, Shen CY.Diverse associations betweenESR1 polymorphism and breast cancer development and progression. *Clin Cancer Res* 2010;16:3473-84.

124. Sundermann EE, Maki PM, Bishop JR. A review of estrogen receptor alpha gene (ESR1) polymorphisms, mood, and cognition. *Menopause*. 2010 Jul;17(4):874-86.
125. Anghel A, Raica M, Narita D, Seclaman E, Nicola T, Ursoniu S, Anghel M, Popovici E.. Estrogen receptor alpha polymorphisms: correlation with clinicopathological parameters in breast cancer. *Neoplasma*. 2010;57:306–315.
126. Molvarec A, Vér A, Fekete A, Rosta K, Derzbach L, Derzsy Z, Karádi I, Rigó J Jr.. Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia. *Hypertens Res* 2007;30:205-211.
127. Zavratnik A, Zegura B, Marc J, Prezelj J, Pfeifer M. XbaI polymorphism of the estrogen receptor alpha gene influences the effect of raloxifene on the endothelial function. *Maturitas*. 2010 Sep;67(1):84-90.
128. Zhou X, Gu Y, Wang D, Ni S, Yan J. Eight functional polymorphisms in the estrogen receptor 1 gene and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e6085.
129. Cahua J, Cruz M, Méndez A, Antúnez-Ortiz DL, Vences-Velázquez A, del Carmen Alarcón-Romero L, Parra EJ, Tello-Flores VA, Leyva-Vázquez MA, Valladares-Salgado A, Pérez-Macedonio CP, Flores-Alfaro E. Polymorphisms in the LPL and CETP Genes and Haplotype in the ESR1Gene Are Associated with Metabolic Syndrome inWomen from Southwestern Mexico. *Int J Mol Sci*2015;16:21539-54.
130. Zhang Y, Zhang M, Yuan X, Zhang Z, Zhang P, Chao H, Jiang L, Jiang J. Association BetweenESR1 PvuII, XbaI, and P325P Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 2015;21:2986-96.
131. Li J, Dalgleish R, Vujovic S, Dragojevic-Dikic S, Ivanisevic M, Iovic M, Tancic M, Thompson J, Al-Azzawi F. Microsatellite variation of ESR1, ESR2, and AR in Serbian women with primary ovarian insufficiency. *Climacteric*. 2018;21:472–477
132. Akande RO, Ibrahim Y. Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clin Obstet Gynecol*. 2020;63:687–705.*Orphanet J RareDis*. 2012;7:5.
133. Qin Y, Sun M, You L, Wei D, Sun J, Liang X, Zhang B, Jiang H, Xu J, Chen ZJ. ESR1, HK3 and BRSK1 gene variants are associated with both age atnatural menopause and premature ovarian failure. *Orphanet J RareDis*. 2012;7:5..

134. Cordts EB, Santos AA, Peluso C, Bianco B, Barbosa CP, Christofolini DM. Risk of premature ovarian failure is associated to the PvuII polymorphism at estrogen receptor gene ESR1. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29:1421–1425.
135. M'Rabet N, Moffat R, Helbling S, Kaech A, Zhang H, de Geyter C. The CC-allele of the PvuII polymorphic variant in intron 1 of the α -estrogen receptor gene is significantly more prevalent among infertile women at risk of premature ovarian aging. *Fertil Steril.* 2012;98:965–972.
136. Vichinsartvichai P. Primary ovarian insufficiency associated with autosomal abnormalities: From chromosome to genome-wide and beyond. *Menopause.* 2016;23:806–815.
137. Sadat Eshaghi F, DehghanTezerjani M, Ghasemi N, Dehghani M. Association study of *ESR1* rs9340799, rs2234693, and *MMP2* rs243865 variants in Iranian women with premature ovarian insufficiency: A case-control study. *Int J Reprod Biomed.* 2022 Nov 2;20(10):841-850.
138. He M, Shu J, Huang X, Tang H. J Association between estrogen receptor a gene (*ESR1*) PvuII (T/C) and XbaI (A/G) polymorphisms and premature ovarian failure risk: evidence from a meta-analysis. *Assist Reprod Genet.* 2015 Feb;32(2):297-304.
139. Carrillo-Moreno DI, Eduardo Figuera L, Zuniga González GM, Puebla Perez AM, Jesus Moran Mendoza A, Gallegos Arreola MP. Association of rs2234693 and rs9340799 polymorphisms of *ESR1* gene in breast cancer of Mexican population. *J BUON.* 2019 Sep-Oct;24(5):1927-1933.
140. Sghaier I, Zidi S, El-Ghali RM, Daldoul A, Aimagambetova G, Almawi WY. Unique *ESR1* and *ESR2* estrogen receptor gene variants associated with altered risk of triple-negative breast cancer: A case-control study. *Gene.* 2023 Jan 30;851:146969.
141. Tan SC, Low TY, Mohamad Hanif EA, Sharzehan MAK, Kord-Varkaneh H, Islam MA. The rs9340799 polymorphism of the estrogen receptor alpha (*ESR1*) gene and its association with breast cancer susceptibility. *Sci Rep.* 2021 Sep 20;11(1):18619.
142. Shang DP, Lian HY, Fu DP, Wu J, Hou SS, Lu JM. Relationship between estrogen receptor 1 gene polymorphisms and postmenopausal osteoporosis of the spine in Chinese women. *Genet Mol Res.* 2016 Jun 3;15(2).

143. Shu J, Li J, Fu Y, Hui X, Jin Y, Chen M, Zheng X, Shi Y. Association of ESR1 polymorphism rs2234693 and rs9340799 with postmenopausal osteoporosis in a Chinese population. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020 Jun 3;21(1):346.
144. Eldafira E, Prasasty VD, Abinawanto A, Syahfirdi L, Pujianto DA. Polymorphisms of Estrogen Receptor- α and Estrogen Receptor- β Genes and its Expression in Endometriosis. *Turk J Pharm Sci*. 2021 Feb 25;18(1):91-95.
145. Jordan SJ, Green AC, Whiteman DC, Webb PM; Australian Ovarian Cancer Study Group. Risk factors for benign, borderline and invasive mucinous ovarian tumors: epidemiological evidence of a neoplastic continuum? *Gynecol Oncol*. 2007 Nov;107(2):223-30.
146. Aboelroos SA, Eltamany EHM, Mohamed FAM, Suliman MA. Association between estrogen receptor alpha and aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms in the prognosis of breast cancer in Egypt. *Egypt J Immunol*. 2024 Apr;31(2):87-92.
147. Wang B, Yuan F. Comment on "Estrogen receptor alpha (ERS1) SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) are risk biomarkers for breast cancer development". *Mol Biol Rep*. 2019 Feb;46(1):5.
148. Smolarz B, Nowak AZ, Bryś M, Forma E, Łukasiewicz H, Samulak D, Langner S, Romanowicz H. Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) rs2234693 and rs9340799 of the ESR1 Gene and the Risk of Breast Cancer. *In Vivo*. 2024 Sep-Oct;38(5):2134-2143.
149. de Mattos CS, Trevisan CM, Peluso C, Adami F, Cordts EB, Christofolini DM, Barbosa CP, Bianco B. ESR1 and ESR2 gene polymorphisms are associated with human reproduction outcomes in Brazilian women. *J Ovarian Res*. 2014;7:114.
150. Liu X, Huang J, Lin H, Xiong L, Ma Y, Lao H. ESR1/PvuII (rs2234693 T>C) polymorphism and cancer susceptibility: Evidence from 80 studies. *J Cancer*. 2018 Jul 30;9(16):2963-2972.
151. Kutilin DS, Tsandekova MR, Porkhanova NV. Features of the Copy Number Variation of Certain Genes in Tumor Cells in Patients with Serous Ovarian Adenocarcinoma. *Bull Exp Biol Med*. 2021 Jan;170(3):332-339.
152. Gaillard S, Bayable A, Deshmukh SK, Nayar U, Xiu J, Ingram L, Hubbard G, Sledge GW Jr., Herzog TJ, Thaker PH, Sharon W. Characterization of ESR1 mutations in endometrial and ovarian cancers. *Journal of Clinical Oncology* volume 2024, June, 42, Number 16 suppl.

153. Iyshwarya BK, Mohammed V, Veerabathiran R. Genetics of endometriosis and its association with ovarian cancer. *Gynecology and Obstetrics Clinical Medicine* 2021; 1; 177–185.
154. Barnard ME, Farland LV, Yan B, Wang J, Trabert B, Doherty JA, Meeks HD, Madsen M, Guinto E, Collin LJ, Maurer KA, Page JM, Kiser AC, Varner MW, Allen-Brady K, Pollack AZ, Peterson KR, Peterson CM, Schliep KC. Endometriosis Typology and Ovarian Cancer Risk. *JAMA*. 2024 Aug 13;332(6):482-489.
155. Eldafira E, Prasasty VD, Abinawanto A, Syahfirdi L, Pujianto DA. Polymorphisms of Estrogen Receptor- α and Estrogen Receptor- β Genes and its Expression in Endometriosis. *Turk J Pharm Sci*. 2021 Feb 25;18(1):91-95.
156. Wang J, Hu R, Wang J, He Q. PvuII and XbaI in Estrogen Receptor 1 (ESR1) Polymorphisms and Susceptibility to Endometriosis Risk. *Clin Lab*. 2020 Aug 1;66(8).

8. Streszczenie

Mimo rosnącej wiedzy na temat raka jajnika nie udało się dotąd opracować skutecznego testu przesiewowego dla tego nowotworu. Konieczna wydaje się zatem identyfikacja nowych czynników ryzyka jak na przykład polimorfizmów genetycznych. Rak jajnika jest nowotworem hormonozależnym a jego hormonami steroidowymi są estrogeny. Estrogeny oddziałują na komórki poprzez receptory estrogenowe ER α i ER β . Zaburzenie równowagi między ekspresją receptora ER α i ER β może więc stanowić kluczowy, krytyczny etap w estrogenozależnej kancerogenezie. W 60% przypadków raka wykrywa się znacznie podwyższony poziom receptorów ER α . Receptor ER α kodowany jest przez gen *ESR1*. Gen *ESR1* jest genem polimorficznym.

W prezentowanej pracy celem było wykazanie czy polimorfizmy genu *ESR1* rs2234693 i rs9340799 mogą brać udział w powstawaniu raka jajnika.

Materiał do badań stanowiło 100 bloczków parafinowych, zawierających wycinki z guzów nowotworowych jajnika oraz 100 bloczków parafinowych, zawierających wycinki z łagodnych zmian jajnika, zgromadzonych w archiwum Zakładu Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Z powyższych preparatów izolowano DNA. Polimorfizmy zostały określone techniką PCR-RFLP.

Analiza statystyczna rozkładu genotypów oraz alleli w grupie badanej i kontrolnej przeprowadzona została po wcześniejszym potwierdzeniu, że otrzymane układy pozostają w stanie równowagi według reguły Hardy'ego i Weinberga. Wynik uznawano za istotny statystycznie przy poziomie istotności p mniejszym niż 0,05. Ocenę genotypów i alleli pod względem ich związku z daną cechą, przeprowadzano przez zastosowanie analizy ilorazu szans (OR) oraz 95% przedziału ufności, które obliczano według modelu regresji logistycznej. Typ dziki genotypu oraz allelu stanowił grupę referencyjną.

Wykazano, że obecność genotypu CC (rs2234693) ponad dwukrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jajnika. Obecność genotypu TT (rs2234693) znacząco obniża ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu. W przypadku drugiego z badanych polimorfizmów - rs9340799, nosicielstwo genotypu GG ponad dwukrotnie zwiększa ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jajnika. Analiza haplotypów genu *ESR1* w odniesieniu do polimorfizmów rs2234693 i rs9340799 wykazała, że wystąpienie układów TCAG i CCGG związane może być ze znacznym podwyższeniem ryzyka wystąpienia raka jajnika.

W grupie pacjentek z rakiem jajnika wykazano korelację pomiędzy polimorfizmami rs2234693 i rs9340799 w tkankach raków jajnika o najniższym stopniu zaawansowania w

porównaniu do raków jajnika bardziej zaawansowanych, co może świadczyć o związku tych czynników ze stopniem zaawansowania nowotworu. Wiek kobiet nie miał wpływu na częstość występowania poszczególnych genotypów, ani na związane z nim ryzyko wystąpienia choroby.

W pracy wykazano, że polimorfizmy rs2234693 i rs9340799 genu *ESR1* charakteryzują się istotnym statystycznie związkiem z wystąpieniem choroby nowotworowej jajnika.

Uzyskane wyniki wskazują, że u kobiet chorych na raka jajnika polimorfizmy *ESR1* rs2234693 i rs9340799 mogą być związane z występowaniem tej choroby. Prezentowana praca wskazuje, że na podstawie badań genetycznych wariantów tych polimorfizmów można segregować pacjentki do grupy zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworu. Konieczne są jednak dalsze prace prowadzone na dużo większych grupach badanych.

9. Summary

Despite the growing knowledge about ovarian cancer, it has not yet been possible to develop an effective screening test for this cancer. Therefore, it seems necessary to identify new risk factors, such as genetic polymorphisms. Ovarian cancer is a hormone-dependent cancer and its steroid hormones are estrogens. Estrogens affect cells through the estrogen receptors ER α and ER β . An imbalance between ER α and ER β receptor expression may therefore be a key critical step in estrogen-dependent carcinogenesis. In 60% of cancer cases, significantly elevated levels of ER α receptors are detected. The ER α receptor is encoded by the *ESR1* gene. The *ESR1* gene is a polymorphic gene.

In this study, the aim was to demonstrate whether polymorphisms of the *ESR1* gene rs2234693 and rs9340799 may be involved in the development of ovarian cancer.

The material for the study consisted of 100 paraffin blocks containing specimens from ovarian cancerous tumors and 100 paraffin blocks containing specimens from benign ovarian lesions, collected in the archives of the Department of Clinical Pathomorphology of the Polish Mothers Memorial Hospital Research Institute in Lodz. DNA was isolated from the above preparations. The polymorphisms were determined by the PCR-RFLP technique.

Statistical analysis of the distribution of genotypes and alleles in the study and control groups was carried out after it was previously confirmed that the obtained systems remain in equilibrium according to the Hardy and Weinberg rule. The result was considered statistically significant with a significance level p less than 0.05. The assessment of genotypes and alleles in terms of their relationship to a given trait was carried out by using the analysis of the odds ratio (OR) and the 95% confidence interval, which were calculated according to the logistic regression model. The wild-type genotype and allele was the reference group.

It has been shown that the presence of the CC genotype (rs2234693) more than doubles the risk of ovarian cancer. The presence of the TT genotype (rs2234693) significantly reduces the risk of developing this type of cancer. In the case of the second of the studied polymorphisms - rs9340799, carrier of the GG genotype more than doubles the risk of ovarian cancer. Analysis of the *ESR1* gene haplotypes in relation to the rs2234693 and rs9340799 polymorphisms showed that the occurrence of the TCAG and CCGG systems may be associated with a significant increase in the risk of ovarian cancer.

In the group of patients with ovarian cancer, a correlation was found between rs2234693 and rs9340799 polymorphisms in the tissues of the lowest stage ovarian cancers compared to more advanced ovarian cancers, which may indicate a relationship between these factors and

the stage of the cancer. The age of the women had no effect on the prevalence of individual genotypes, nor on the associated risk of disease.

The study shows that the polymorphisms rs2234693 and rs9340799 of the *ESR1* gene are characterized by a statistically significant relationship with the occurrence of ovarian cancer.

The results indicate that in women with ovarian cancer, *ESR1* rs2234693 and rs9340799 polymorphisms may be associated with the occurrence of this disease. The presented work indicates that on the basis of genetic studies of variants of these polymorphisms, patients can be classified into the group of increased risk of cancer development. However, further work is needed on much larger groups of subjects.

10. Wykaz tabel zamieszczonych w pracy

	strona
Tabela 1. Zachorowalność na nowotwory w Polsce w porównaniu do Unii Europejskiej w 2020 r	1
Tabela 2. Czynniki ryzyka raka jajnika	4
Tabela 3. Interpretacja wyników test ROMA	8
Tabela 4. Nowotwory germinalne jajnika z uwagi na typ histologiczny	10
Tabela 5. Podział raków jajnika	11
Tabela 6. Stopień zaawansowania raka jajnika według FIGO	12
Tabela 7. Leki hormonalne stosowane w leczeniu raka jajnika	15
Tabela 8. Możliwości hormonalnego leczenia raka jajnika	16
Tabela 9. Przeżycia 5-letnie w zależności od stopnia zaawansowania FIGO (www.onkonet.pl)	17
Tabela 10. Liczba i wiek pacjentek z grupy badanej i grupy kontrolnej	34
Tabela 11. Charakterystyka typów histologicznych nowotworów jajnika użytych do badań	34
Tabela 12. Charakterystyka kliniczno-patologiczna grupy badanej	35
Tabela 13. Charakterystyka DNA wyizolowanego z preparatów grupy badanej	38
Tabela 14. Charakterystyka DNA wyizolowanego z preparatów grupy kontrolnej	40
Tabela 15. Wielkość produktów uzyskanych w analizie polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) oraz w analizie polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G)	45
Tabela 16. Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu rs2234693 genu <i>ESR1</i> w grupie osób z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej	51
Tabela 17. Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu rs9340799 genu <i>ESR1</i> w grupie osób z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej	53
Tabela 18. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i kontrolnej oraz analiza ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej jajnika	55
Tabela 19. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i kontrolnej – model dominujący i recesywny	57
Tabela 20. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i kontrolnej oraz analiza ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej jajnika	59
Tabela 21. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i	61

kontrolnej – model dominujący i recesywny	
Tabela 22. Haplotypy genu <i>ESR1</i> a ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej jajnika	63
Tabela 23. Rozkład genotypów polimorfizmurs2234693 w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO (staging)	65
Tabela 24. Rozkład genotypów polimorfizmurs2234693 w zależności od stopnia zróżnicowania histopatologicznego nowotworu (grading)	66
Tabela 25. Rozkład genotypów polimorfizmurs9340799 w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO (staging)	67
Tabela 26. Rozkład genotypów polimorfizmurs9340799 w zależności od stopnia zróżnicowania histopatologicznego nowotworu (grading)	68
Tabela 27. Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu rs2234693w grupie osób z rakiem jajnika w zależności od cech kliniczno-patologicznych	70
Tabela 28. Rozkłady genotypów oraz częstości alleli polimorfizmu rs9340799w grupie osób z rakiem jajnika w zależności od cech kliniczno-patologicznych	71

11. Wykaz rycin zamieszczonych w pracy

	strona
Rycina 1. Zachorowalność na nowotwory w Polsce i w Unii Europejskiej w 2020 r	2
Rycina 2. Postępowanie diagnostyczno-terapeutyczne w przypadku pacjentek z rakiem jajnika	9
Rycina 3. Przykład rodzinnego wzorca dziedziczenia mutacji <i>BRCA1</i>	19
Rycina 4. Schematyczne przedstawienie lokalizacji genów <i>BRCA1/2</i> . (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672 / https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/675)	20
Rycina 5. Schematyczne przedstawienie głównych mechanizmów zmian w biologii komórek raka jajnika indukowanych estrogenami. E2 - estradiol, ERs – receptory estrogenowe, GPER1 - receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G1, ERE - element odpowiedzi estrogenowej, CREB – białko wiążące element odpowiedzi cAMP	23
Rycina 6. Polimorfizm pojedynczych nukleotydów – schematyczne przedstawienie	27
Rycina 7. Struktura genu receptora estrogenowego α z uwzględnieniem położenia wariantów polimorficznych XbaI i PvuII	29
Rycina 8. Schemat przewidywanych wielkości fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym PvuII w genie <i>ESR1</i> , (T) allel prawidłowy, (C) allel zmutowany	47
Rycina 9. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktu reakcji RFLP-PCR dla polimorfizmu PvuII (rs2234693, T/C) w genie <i>ESR1</i> , M – wzorzec wielkości fragmentów DNA, (T) allel prawidłowy, (C) allel zmutowany	48
Rycina 10. Schemat przewidywanych wielkości fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym XbaI w genie <i>ESR1</i> , (A) allel prawidłowy, (G) allel zmutowany	49
Rycina 11. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktu reakcji RFLP-PCR dla polimorfizmu XbaI (rs9340799, A/G) w genie <i>ESR1</i> , M – wzorzec wielkości fragmentów DNA, (A) allel prawidłowy, (G) allel zmutowany	50
Rycina 12. Rozkład genotypów TT, TC i CC polimorfizmu rs2234693 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej (kolor biały) i w grupie kontrolnej (kolor szary)	52
Rycina 13. Rozkład genotypów AA, AG i GG polimorfizmu rs9340799 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej (kolor biały) i w grupie kontrolnej (kolor szary)	54
Rycina 14. Schemat rozkładu genotypów polimorfizmu rs2234693 genu <i>ESR1</i> w grupie	56

badanej i kontrolnej	
Rycina 15. Schemat rozkładu genotypów polimorfizmu rs2234693 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i kontrolnej – model dominujący i recesywny	58
Rycina 16. Schemat rozkładu genotypów polimorfizmu rs9340799 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i kontrolnej	60
Rycina 17. Schemat rozkładu genotypów polimorfizmu rs9340799 genu <i>ESR1</i> w grupie badanej i kontrolnej – model dominujący i recesywny	62
Rycina 18. Rozkład haplotypów badanych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu <i>ESR1</i> w grupie badanej (kolor biały) i w grupie kontrolnej (kolor szary)	64
Rycina 19. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 w zależności od klasyfikacji FIGO (staging)	65
Rycina 20. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2234693 w zależności od stopnia G (grading)	66
Rycina 21. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 w zależności od klasyfikacji FIGO (staging)	67
Rycina 22. Rozkład genotypów polimorfizmu rs9340799 w zależności od stopnia G (grading)	68
Rycina 23. Organizacja genu receptora estrogenowego α (<i>ESR1</i>) z zaznaczeniem pozycji wariantów XbaI, PvuII i powtórzeń TA	75

12. Wykaz załączników zamieszczonych w pracy:

Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej przy Instytucie centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi (opinia nr 34/2025) na przeprowadzenie eksperymentu medycznego.



**Uchwała Komisji Bioetycznej
przy Instytucie „Centrum Zdrowia Matki Polki”
Nr 34/2025
z dnia 15 kwietnia 2025 r.**

w sprawie wydania opinii o eksperymencie badawczym pt.:

**“Badanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego alfa ($E\alpha$, ESR1)
u kobiet chorych na raka jajnika”**

Opinia wydana na podstawie art. 29 ust. 2 ustawy z dnia 05 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2022 poz. 1731, z późn. zm), rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 26.01.2023 r. w sprawie komisji bioetycznej oraz Odwoławczej Komisji Bioetycznej (Dz. U. 2023 poz. 218) oraz Zarządzeniem nr 11/2023 Dyrektora Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi z dnia 13 marca 2023r. w sprawie: powołania Komisji Bioetycznej przy Instytucie „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi wraz z Regulaminem Pracy Komisji Bioetycznej.

Komisja Bioetyczna przy Instytucie „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi na posiedzeniu w dniu 15 kwietnia 2025 r. zapoznała się z dokumentacją badania pt.: **“Badanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego alfa ($E\alpha$, ESR1) u kobiet chorych na raka jajnika”**

Kierownikiem naukowym oraz głównym wykonawcą badania jest:

Mgr Honorata Łukasiewicz z Uniwersytetu Kaliskiego im. Prezydenta Stanisława Wojciechowskiego w Kaliszu, Wydział Medyczny i Nauk o Zdrowiu, Katedra Pielęgniarstwa, ul. Nowy Świat 4, 62-800 Kalisz.

Zespół badaczy:

1. mgr Honorata Łukasiewicz posiadająca specjalizację z pielęgniarstwa internistycznego,
2. Prof. dr hab. n. med. Beata Smolarz posiadająca specjalizację z biochemii,
3. Prof. dr hab. n. med. Hanna Romanowicz posiadająca specjalizację z patomorfologii.

Badanie będzie prowadzone w:

1. Zakładzie Patomorfologii Klinicznej - kierownik: prof. dr hab. n. med. Hanna Romanowicz Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, 93-338 Łódź ul. Rzgowska 281/289

Do wniosku dołączono następujące dokumenty:

1. Życiorys naukowy kierownika oraz głównego wykonawcy badania – mgr Honoraty Łukasiewicz,
2. Życiorys naukowy promotora pracy – prof. dr hab. n. med. Beaty Smolarz,
3. Protokół badania,
4. Piśmiennictwo,
5. Formularz Oświadczenia przy przyjęciu do ICZMP,
6. Dyplom uzyskania specjalisty w dziedzinie pielęgniarstwa internistycznego nr 102492/23 z dnia 24 marca 2023 r.,
7. Oświadczenie o pokryciu kosztów związanych z wydaniem opinii Komisji Bioetycznej,
8. Ubezpieczenie obowiązkowe OC podmiotu przeprowadzającego Eksperyment Medyczny - Polisa PL_T numer 363026044. Okres ubezpieczenia: 02.05.2025 r. do 01.05.2026 r.



Komisja Bioetyczna

przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki
93-338 Łódź, Rzgowska 281/289 tel. (42) 271 11 23
e-mail: komisja.bioetyczna@iczmp.edu.pl

9. Zgodę Kierownika Kliniki, w którym jest planowane przeprowadzenie badania:
 - Prof. dr hab. n. med. Hanny Romanowicz – kierownika Zakładu Patomorfologii Klinicznej ICZMP,
10. Zgodę Promotora pracy – prof. dr hab. n. med. Beaty Smolarz,
11. Zgodę dr hab. n. med. Iwony Maroszyńskiej Dyrektora ICZMP w Łodzi na przeprowadzenie badania.

W wyniku tajnego głosowania, po rozważeniu kryteriów etycznych oraz celowości i wykonalności projektu Komisja Bioetyczna wyraża zgodę na przeprowadzenie eksperymentu medycznego na materiale biologicznym znajdującym się w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej ICZMP pt. **“Badanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego alfa ($E\alpha$, ESR1) u kobiet chorych na raka jajnika”**

i podejmuje uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku.

Komisja zastrzega sobie prawo do uzyskiwania informacji o wszelkich naruszeniach warunków prowadzonego badania, w tym o: powikłaniach i efektach niepożądanych powstałych w związku z prowadzonym badaniem oraz uzyskania raportu końcowego.

Komisja Bioetyczna przy Instytucie „Centrum Zdrowia Matki Polki” działa zgodnie z zasadami Good Clinical Practice (ICH-GCP), Dyrektywą 2001/20/WE parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 4 kwietnia 2001 roku w sprawie zbliżania przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych Państw Członkowskich, odnoszących się do wdrożenia zasady dobrej praktyki klinicznej w prowadzeniu badań klinicznych produktów leczniczych, przeznaczonych do stosowania przez człowieka (Dz. U. UE.L.2005.91.13) oraz Dyrektywą Komisji 2005/28/WE z 8 kwietnia 2005 roku ustalającą zasady oraz szczegółowe wytyczne dobrej praktyki klinicznej w odniesieniu do badanych produktów leczniczych przeznaczonych do stosowania u ludzi, a także wymogi zatwierdzania produkcji oraz przywozu takich produktów (Dz. U. UE.L.2005.91.13), przepisami Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie dobrej praktyki klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489) oraz przestrzega Deklaracji Helsińskiej i Tokijskiej.

Komisja Bioetyczna rekomenduje zachowanie szczególnych zasad ostrożności oraz prowadzenia badania zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa oraz zasadami bioetyki.



**"Badanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego alfa (E α , ESR1)
u kobiet chorych na raka jajnika"**

Uchwałę podjęto jednogłośnie.

Uchwałę podjęto przy sprzeciwie

Przewodniczący Komisji Bioetycznej:

Dr hab. n. med. Michał Krekora, prof. instytutu
(specjalizacja: położnictwo i ginekologia, perinatologia)

Zastępca Przewodniczącego:

Prof. dr hab. n. farm. Daria Orszulak-Michalak
(specjalizacja: farmacja szpitalna)

Członkowie:

Mec. Michał Araszkiewicz
(radca prawny)

Dr hab. n. med. Ewa Gulczyńska, prof. instytutu
(specjalizacja: pediatria, neonatologia)

Ks. dr Jacek Kacprzak
(duchowny, teolog)

Dr hab. Andrzej Kaniowski, prof. UŁ
(filozof, etyk)

Mgr Grażyna Korybut
(magister pielęgniarstwa)

Dr n. med. Marek Maciejewski
(specjalizacja: kardiologia)

Dr hab. n. med. Krzysztof Małecki, prof. instytutu
(specjalizacja: ortopedia i traumatologia)

Lek. Filip Pawliczak
(specjalizacja: choroby wewnętrzne, w trakcie specjalizacji z kardiologii)

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Stasiak
(specjalizacja: choroby wewnętrzne, endokrynologia)

Dr hab. n. med. Miłosz Wilczyński, prof. instytutu
(specjalizacja: położnictwo i ginekologia, ginekologia onkologiczna)

Dr hab. n. med. Marek Zadrożny, prof. instytutu
(specjalizacja: chirurgia ogólna, chirurgia onkologiczna)

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Zeman
(specjalizacja: pediatria, choroby płuc dzieci, alergologia, immunologia)