

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE**



Mgr Donata Simińska

**EKSPRESJA RECEPTORÓW ZALEŻNYCH OD HORMONÓW PŁCIOWYCH
W GLEJAKU WIELOPOSTACIOWYM**

**EXPRESSION OF SEX HORMONE DEPENDENT RECEPTORS
IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Irena Baranowska-Bosiacka

Promotor pomocniczy: dr n. med. Patrycja Kupnicka

Szczecin 2023 r.

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania dla Promotora mojej pracy,
Pani prof. dr hab. n.med. Irenie Baranowskiej-Bosiackiej
za cierpliwość, wyrozumiałość, okazane wsparcie, poświęcony czas oraz za inspirację
do badań i wiarę w moje możliwości podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej.*

***Pani dr. n. med. Patrycji Kupnickiej,**
za przekazaną wiedzę i cenne wskazówki merytoryczne.*

*Pracownikom Katedry Biochemii i Chemii Medycznej,
za życzliwość oraz pomoc w realizacji niniejszej pracy*

Serdecznie dziękuję także mojej rodzinie i narzeczonemu.

*Zawsze we mnie wierzyliście i wspieraliście
w realizacji moich pasji i celów.
Bez Waszego poświęcenia nie byłoby to możliwe.*

WYKAZ SKRÓTÓW

3 α -THP	allopregnanolon (ang. allopregnanolone)
5 α -DHP	5-alfa-dihydroprogesteron (ang. 5 α -dihydroprogesterone)
AF	funkcja aktywacji transkrypcji (ang. activation function)
AIB1	koaktywator receptora jądrowego 3 (ang. amplified in breast 1)
AKT	kinaza białkowa B (ang. protein kinase B)
AP-1	czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. activator protein 1)
AR	receptor androgenowy (ang. androgen receptor)
ARNT	arylowe węglowodorowe translokatory jądrowe (ang. aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator)
ARTX	zależna od ATP, sprzężona z chromosomem helikaza II (ang. ATP-dependent helicase ATRX, X-linked helicase II)
ATP	adenozynotrójfosforan (ang. adenosine triphosphate)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)
BMP	białko morfogenetyczne kości (ang. bone morphogenetic protein)
BPH	łagodny rozrost gruczołu krokowego (ang. benign prostatic hyperplasia)
CDK2	kinaza zależna od cyklin 2 (ang. cyclin-dependent kinase 2)
CDKN2A/B	inhibitor kinazy zależnej od cyklin 2A/B (ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B)
C-jun	czynnik transkrypcyjny Jun (ang. transcription factor Jun)
CK2	kinaza kazeinowa 2 (ang. casein kinase 2)
c-Met	kinaza tyrozynowo-białkowa Met (ang. tyrosine-protein kinase Met)
c-Myc	protoonkogen MYC (ang. MYC proto-oncogene)
CSC	rakowe komórki macierzyste (ang. cancer stem cells)
CSF1	czynnik stymulujący kolonie 1 (ang. colony stimulating factor 1)

CTGF	czynnik wzrostu tkanki łącznej (ang. connective tissue growth factor)
DAMP	wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (ang. damage-associated molecular patterns)
DBD	domena wiążąca DNA (ang. DNA binding domain)
DHT	5 α -dihydrotestosteron (ang. 5 α -dihydrotestosterone)
EC	domena zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular domain)
EDTA	wersenian disodowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor)
EGFR	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. epidermal growth factor receptor)
EGR-1	białko wczesnej odpowiedzi wzrostu 1 (ang. early growth response protein 1)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
ELK	czynnik transkrypcyjny ETS (ang. ETS transcription factor)
ERE	elementy odpowiedzi na estrogeny (ang. estrogen response elements)
ERK	kinazy zewnątrzkomórkowe regulowane sygnałem (ang. extracellular signal-regulated kinases)
ER α	receptor estrogenowy alfa (ang. estrogen receptor alpha)
FBS	płodowa surowica cielęca (ang. fetal bovine serum)
FGF	fibroblastyczny czynnik wzrostu (ang. fibroblast growth factor)
FIH	czynnik hamujący HIF (ang. factor inhibiting HIF)
FSHR	receptor hormonu folikulotropowego (ang. follicle-stimulating hormone receptor)
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynianu (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GAS	elementy odpowiedzi na aktywację interferonu γ (ang. interferon- γ activation sequence)

GBM	glejak wielopostaciowy (łac. glioblastoma multiforme)
GH	hormon wzrostu (ang. growth hormone)
GLI	białko palca cynkowego GLI1 (ang. zinc finger protein GLI1)
GPCR	receptory sprzężone z białkiem G (ang. G protein-coupled receptors)
GPHR	rodzina receptorów hormonu glikoproteinowego (ang. glycoprotein hormone receptors)
HER2	receptor 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. epidermal growth factor receptor)
HER-2	ang. receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
HH	ang. hedgehog signaling pathway
HIF	czynnik indukowany hipoksją (ang. hypoxia-inducible factors)
HMGB1	białko grupy o wysokiej mobilności 1 (ang. high mobility group box 1)
HNF4A	czynnik jądrowy hepatocytów 4 alfa (ang. hepatocyte nuclear factor 4 alpha)
HR	współczynnik ryzyka (ang. hazard ratio)
HRE	elementy odpowiedzi na niedotlenienie (ang. hypoxia-responsive elements)
HSP	białka szoku cieplnego (ang. heat shock proteins)
IARC	Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. International Agency for Research on Cancer)
IC	domena wewnątrzkomórkowa (ang. intracellular domain)
IDH	dehydrogenaza izocytrynianowa (ang. isocitrate dehydrogenase)
IGF	insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. insulin-like growth factor)
IL-10	interleukina 10 (ang. interleukin 10)
IL-1 β	interleukina 1 β (ang. interleukin 1 β)
IL-8	interleukina 8 (ang. interleukin 8)

JAK	kinazy janusowe (ang. janus kinase)
kDa	kilo Dalton
KGF	insulinopodobny czynnik wzrostu keratynocytów(ang. keratinocyte growth factor)
LBD	domena wiążąca ligand (ang. ligand binding domain)
LHCGR	receptor lutropiny/choriogonadotropiny (ang. luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor)
LPA	kwas lizofosfatydowy (ang. lysophosphatidic acid)
MAPK	kinaza aktywowana mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase)
MGMT	alkiltransferaza DNA 6-alkiloguaniny (ang. O6-alkylguanine DNA alkyltransferase)
MMP	metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (ang. matrix metalloproteinases)
mTOR	kinaza mTOR (ang. mammalian target of rapamycin)
NAD ⁺	forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, (ang. oxidized form nicoti-namide adenine dinucleotide)
Nanog	czynnik transkrypcyjny Nanog (ang. protein homeobox NANOG)
NF-κB	czynnik jądrowy κB (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NK	komórki NK (ang. natural killer cells)
NLPZ	niesteroidowe leki przeciwzapalne (ang. non-steroidal anti-inflammatory drugs)
Notch	neurogenne białko homologowe locus notch 1 (ang. neurogenic locus notch homolog protein 1)
NOX	oksydaza NADPH (ang. NADPH oxidase)
NR3A1	rodzina receptorów jądrowych, trzecia podrodzina, grupa A, członek 1 (ang. nuclear receptor subfamily 3, group A, member 1)
NR3A2	rodzina receptorów jądrowych, trzecia podrodzina, grupa A, członek 2 (ang. nuclear receptor subfamily 3, group A, member 2)

NR3C3	rodzina receptorów jądrowych, trzecia podrodzina, grupa C, członek 3 (ang. nuclear receptor subfamily 3, group C, member 3)
NR3C4	rodzina receptorów jądrowych, trzecia podrodzina, grupa C, członek 4 (ang. nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4)
NTD	domena regulacyjna N-terminalna (ang. N-terminal domain)
OTC4	czwarty czynnik transkrypcji wiążący oktamer (ang. octamer-binding transcription factor 4)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy (ang. central nervous system)
P53	białko P53 (ang. tumor protein P53)
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. phosphate buffered saline)
PCa	rak prostaty (ang. prostate cancer)
PELP1	modulator niegenomowych działań receptora estrogenowego (ang. modulator of non-genomic activity of estrogen receptor)
PEM-FM	pola elektromagnetyczne o częstotliwości radiowej
PGE2	prostaglandyna E2 (ang. prostaglandin E2)
PGR	receptor progesteronowy (ang. progesteron receptor)
PHD	hydroksylazy prolinowe (ang. proline hydroxylase)
PI3K	kinaza fosfoinozytydu 3 (ang. phosphoinositide 3-kinases)
PIBF	czynnik blokujący indukowany progesteronem (ang. progesterone induced blocking factor)
PKC	kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)
PTCH	ang. protein patched homolog
PRE	elementy odpowiedzi na progesteron (ang. progesterone response elements)
PRL	prolaktyna (ang. prolactin)
PRLR	receptor prolaktynowy (ang. prolactin receptor)

PRLRA	antagoniści receptora prolaktynowego (ang. prolactin receptor antagonist)
pVHL	białko von Hippel-Lindau (ang. Von Hippel–Lindau tumor suppressor)
qRT-PCR	reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction)
RAF	kinazy Raf (ang. Raf kinases)
RANBP10	białko wiążące RAN 10 (ang. RAN binding protein 10)
RANKL	ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (ang. receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)
Ras	nadrodzina białek Ras (ang. Ras superfamily)
RORC-Treg	regulatorowe limfocyty T z pokrewnym receptorem sierocym C
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
SCF	czynnik komórek macierzystych (ang. stem cell factor)
SHH	ang. sonic hedgehog
SMAD	przetwornik sygnału dla TGF- β (ang. signal transducers for TGF- β)
SMO	ang. smoothed
SOCS2	drugi supresor sygnalizacji cytokin (ang. suppressor of cytokine signaling 2)
Sox2	ang. SRY-Box Transcription Factor 1
Sp1	czynnik transkrypcyjny Sp1 (ang. specificity protein 1)
SRC	kinazy rodziny SRC (ang. SRC kinase family)
STAT3	aktywator przetwornika sygnału transkrypcji 3 (ang. signal transducer and activator of transcription 3)
TAM	makrofagi związane z nowotworem (ang. tumor-associated macrophages)
TCGA	atlas genomu raka (ang. The Cancer Genome Atlas)

TERT	odwrotna transkryptaza telomerazy (ang. telomerase reverse transcriptase)
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β)
TIF2	pośredni czynnik transkrypcyjny 2 (ang. nuclear receptor coactivator 2)
TM	domena transmembranowa (ang. transmembrane domain)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor α)
Treg	limfocyty T regulatorowe (ang. regulatory T cells)
TRIM25	ang. tripartite motif containing 25
TSHR	receptor tyreotropiny (ang. thyrotropin receptor)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	3
WSTĘP TEORETYCZNY	13
1. Glejak	13
1.1 <i>Etiologia guzów glejowych</i>	13
1.2 <i>Klasyfikacja guzów ośrodkowego układu nerwowego z wyszczególnieniem klasyfikacji guzów glejowych</i>	13
1.3 <i>Epidemiologia guzów glejowych</i>	15
1.4 <i>Wpływ czynników antropometrycznych na częstość zachorowania na glejaka</i>	16
1.5 <i>Wpływ czynników środowiskowych na ryzyko zachorowania na glejaka</i>	19
1.6 <i>Obraz kliniczny pacjenta z glejakiem</i>	21
1.7 <i>Budowa niszy nowotworowej glejaka wielopostaciowego</i>	22
2. Receptory zależne od hormonów płciowych	31
2.1 <i>Receptor androgenowy</i>	32
2.2 <i>Receptory estrogenowy α i estrogenowy β</i>	33
2.3 <i>Receptor progesteronowy</i>	36
2.4 <i>Receptor prolaktynowy</i>	37
2.5 <i>Receptor folikulotropowy</i>	39
3. Przesłanki do podjęcia pracy	41
CEL PRACY	42
Cele szczegółowe	42
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	43
1. Model badawczy i materiał badany	43
1.1 <i>Model badawczy</i>	43
1.2 <i>Materiał pochodzący od pacjentów</i>	43
1.3 <i>Hodowla komórkowa</i>	44
2. Metody badawcze	46
2.1 <i>Analiza ekspresji genów receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach glejaka wielopostaciowego i komórkach linii U87 poddanych działaniu badanych czynników metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym</i>	46

2.2	<i>Analiza ekspresji białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach glejaka wielopostaciowego i komórkach linii U87 poddanych działaniu badanych czynników przy użyciu testów immunoenzymatycznych.....</i>	47
2.3	<i>Analiza ekspresji białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach glejaka wielopostaciowego metodą immunohistochemii.....</i>	48
2.4	<i>Wizualizacja receptorów płciowych w komórkach linii U87 wykonana za pomocą mikroskopii konfokalnej</i>	50
2.5	<i>Analiza statystyczna.....</i>	51
	WYNIKI.....	52
1.	Receptor androgenowy	52
1.1	<i>Ekspresja receptora androgenowego w modelu in vitro, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy</i>	52
1.2	<i>Ekspresja receptora androgenowego w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego.....</i>	54
2.	Receptory estrogenowe: receptor estrogenowy α i receptor estrogenowy β.....	56
2.1	<i>Ekspresja receptora estrogenowego α w modelu in vitro, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy</i>	56
2.2	<i>Ekspresja receptora estrogenowego α w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego.....</i>	58
2.3	<i>Ekspresja receptora estrogenowego β w modelu in vitro, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy</i>	60
2.4	<i>Ekspresja receptora estrogenowego β w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego.....</i>	62
3.	Receptor progesteronowy	64
3.1	<i>Ekspresja receptora progesteronowego w modelu in vitro, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy</i>	64
3.2	<i>Ekspresja receptora progesteronowego w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego.....</i>	66
4.	Receptor prolaktynowy.....	68
4.1.	<i>Ekspresja receptora prolaktynowego w modelu in vitro, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy</i>	68
4.2.	<i>Ekspresja receptora prolaktynowego w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego.....</i>	70
5.	Receptor folikulotropowy	72

5.1. Ekspresja receptora folikulotropowego w modelu <i>in vitro</i> , w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy	72
5.2. Ekspresja receptora folikulotropowego w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego.....	74
PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	76
DYSKUSJA.....	78
<i>Receptor androgenowy w modelu in vitro</i>	78
<i>Receptor androgenowy w guzach pobranych od pacjentów</i>	79
<i>Receptor estrogenowy α w modelu in vitro</i>	81
<i>Receptor estrogenowy α w guzach pobranych od pacjentów</i>	83
<i>Receptor estrogenowy β w modelu i in vitro</i>	84
<i>Receptor estrogenowy β w guzach pobranych od pacjentów</i>	86
<i>Receptor progesteronowy w modelu in vitro</i>	89
<i>Receptor progesteronowy w guzach pobranych od pacjentów</i>	91
<i>Receptor prolaktynowy w modelu i in vitro</i>	92
<i>Receptor prolaktynowy w guzach pobranych od pacjentów</i>	94
<i>Występowanie receptora folikulotropowego w glejaku wielopostaciowym</i>	95
WNIOSKI	97
PIŚMIENNICTWO.....	98
SPIS TABEL	139
SPIS RYCIN.....	140
STRESZCZENIE.....	144
SUMMARY	147
SPIS ZAŁĄCZNIKÓW	150
ZAŁĄCZNIKI	151

WSTĘP TEORETYCZNY

1. Glejak

1.1 Etiologia guzów glejowych

Glejaki to zróżnicowana grupa nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN ang. central nervous system). Pochodzą od komórek glejowych i charakteryzują się zróżnicowanym obrazem klinicznym i profilem molekularnym, a także zachorowalnością i przeżywalnością pacjentów.

Mechanizmy odpowiedzialne za transformacje prawidłowych komórek gleju w złośliwe komórki glejaka są słabo poznane. Przyczyn rozwoju tego typu nowotworu poszukuje się wśród czynników środowiskowych, takich jak: narażenie na promieniowanie jonizujące, alkohol, kofeina, różne grupy leków, telefony komórkowe i uraz głowy. Analizowane są również czynniki antropometryczne stanowiące fenotypową manifestację różnic w genotypie, czy też ekspresji poszczególnych genów. Należą do nich: wzrost, masa ciała, płeć, wiek oraz rasa/pochodzenie.

Wiedza o szlakach molekularnych prowadzących do rozwoju glejaka, choć bardzo w ostatnich latach rozwinięta, wciąż jest nie wystarczająca do jasnego opisu patogenetyki poszczególnych typów glejaka [1].

1.2 Klasyfikacja guzów ośrodkowego układu nerwowego z wyszczególnieniem klasyfikacji guzów glejowych

Stara klasyfikacja- podziały WHO (Światowa Organizacja Zdrowia ang. World Health Organization) z 1979, 1993, 2000, 2007 i 2016 roku

Po raz pierwszy sklasyfikowano guzy OUN w 1979 roku opierając się na histologicznym typowaniu guzów [2]. Wydanie drugiej klasyfikacji z 1993 roku zawierało bardziej szczegółowe informacje podparte odkryciami z dziedziny immunohistochemii [3]. Trzecie wydanie z 2000 roku poszerzono o genetyczne cechy poszczególnych nowotworów [4]. W 2007 roku w czwartym wydaniu wprowadzono natomiast (dalej stosowane) stopnie złośliwości nowotworu (I-IV) [5]. Klasyfikacja z 2016 roku, do niedawna obowiązująca, była rzeczywiście aktualizacją 4 wydania. Wprowadziła pojęcie diagnozy zintegrowanej, która polegała na równoczesnym diagnozowaniu typu histologicznego guza, stopnia złośliwości i zmian genetycznych [6].

Aktualnie obowiązująca klasyfikacja z 2021 roku

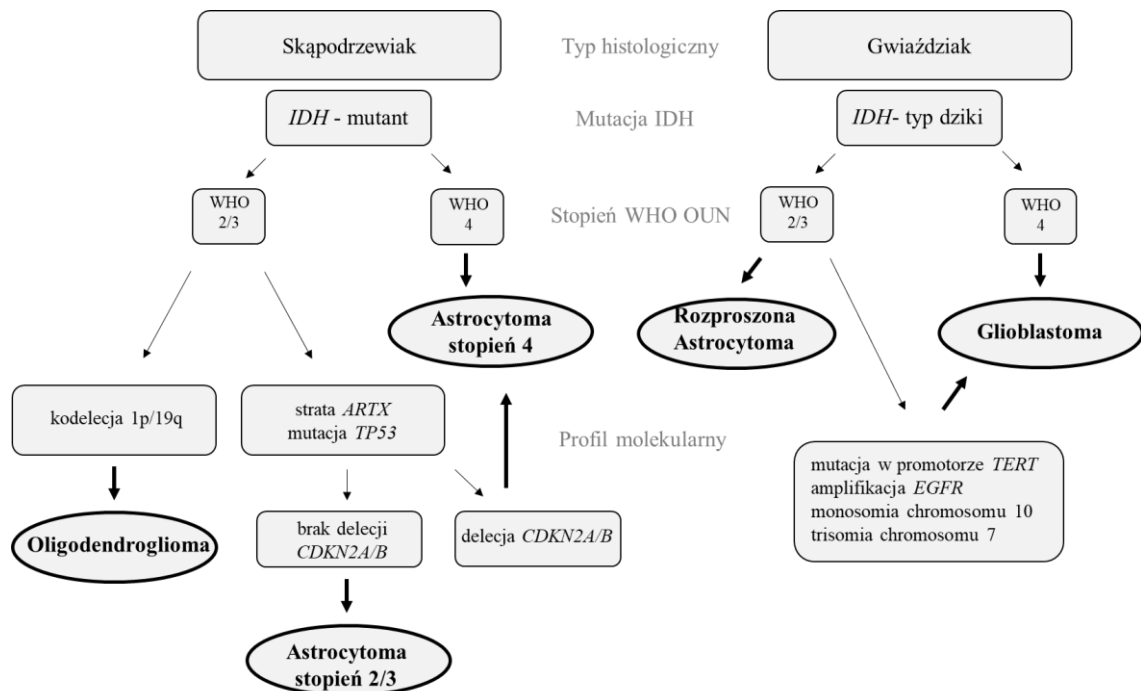
Wprowadzenie klasyfikacji guzów OUN z 2016 roku znacząco uporządkowało diagnostykę tej grupy nowotworów [7]. Pozwoliło to uzyskać bardziej homogenne grupy chorych, których odpowiedź na leczenie i rokowania kliniczne były podobne [7]. W dalszym ciągu pozostawały jednak rzadkie i słabo scharakteryzowane jednostki chorobowe, których podział i charakteryzacja nie były wystarczające [7]. Od 2016 roku poczyniono postępy w lepszym rozumieniu biologii poszczególnych typów guzów OUN, które wywołały potrzebę ponownej zmiany klasyfikacji. Duży udział miały tu prace badacze należące zespołu Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonom (Konsorcjum na rzecz Molekularnych i Praktycznych Podejść do Taksonomii Nowotworów OUN) [8–14]. Omawiana klasyfikacja wyznaczyła nowe typy i podtypy nowotworów, a także zmieniła i uprościła część dotychczas funkcjonujących nazw [15]. Wprowadzono również zmiany w klasyfikacji stopnia złośliwości WHO guzów OUN. Dotychczas jak w innych grupach nowotworów stosowano liczby rzymskie (I-IV) do określenia stopnia złośliwości. Obecnie zaleca się stosowanie dla guzów OUN liczb arabskich (1-4) [15]. Rekomenduje się również stosowanie nazwy „stopień OUN WHO” [15]. Wprowadzone zmiany są wywołane stosowaniem w guzach OUN jednego stopnia złośliwości dla jednego typu nowotworu [16]. Dodatkowo obecna klasyfikacja opiera diagnostykę głównie o cechy molekularne guza, definiując dany typ na podstawie obecności danych zmian genetycznych [15]. W nowej klasyfikacji wyróżniono 6 rodzin glejaków, guzów glioneuronalnych i guzów neuronalnych. Należą do nich:

- (1) glejaki rozlane typu dorosłego (większość pierwotnych guzów mózgu dorosłych),
- (2) pediatryczne rozlane glejaki niskiego stopnia,
- (3) rozlane glejaki typu pediatrycznego o wysokim stopniu złośliwości,
- (4) ograniczone glejaki astrocytarne,
- (5) guzy glioneuronalne i neuronalne (zróżnicowana grupa nowotworów, charakteryzująca się różnicowaniem neuronalnym),
- (6) wyściółczaki.

Rodzina 1 składa się obecnie z 3 typów zamiast 15 jak w poprzedniej klasyfikacji:

- (1) astrocytoma (gwiazdziak), mutant IDH (dehydrogenaza izocytrynianowa. ang. isocitrate dehydrogenase),
- (2) oligodendroglioma (skąpodrzewiak), mutant IDH i 1p/19q-kodacja
- (3) glioblastoma, IDH-dzikiego typu.

Przyporządkowanie nowotworu do danego typu w rodzinie glejaków rozlanych typu dorosłego odbywa się według poniższego schematu (Rycina 1).



Rycina 1. Schemat nowej klasyfikacji glejaków rozlanych typu dorosłego bazujący na cechach histologicznych i molekularnych. W owalnych polach przedstawiono typy nowotworów, a w kwadratowych kolejne etapy rozróżniania. Powyżej użyte skróty oznaczają geny kodujące: IDH, ARTX- zależna od ATP, sprzężona z chromosomem helikaza II (ang. ATP-dependent helicase ATRX, X-linked helicase II), P53- białko nowotworowe P53 (ang. tumor protein P53), CDKN2A/B- inhibitor kinazy zależnej od cyklin 2A/B (ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B), TERT- odwrotna transkryptaza telomerazy (ang. telomerase reverse transcriptase), EGFR- receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. epidermal growth factor receptor).

1.3 Epidemiologia guzów glejowych

Obecnie funkcjonująca klasyfikacja wprowadziła podziały, według których nie ma jeszcze sporządzonych raportów epidemiologicznych, dlatego w tej sekcji zastosowano się do poprzedniej klasyfikacji.

Jednym z najczęstszych [17–20] i najgorzej rokujących [19] typów glejaka jest glejak wielopostaciowy (GBM, łac. glioblastoma multiforme). Stanowi on około 47% wszystkich glejaków [17], zapadalność różni się w zależności od badanej populacji.

W Stanach Zjednoczonych wynosi 3,23 na 100 000 osób [21], w Kanadzie 4,06 na 100 000 osób [22], a we Francji 4,17 na 100 000 osób [23]. Mediana przeżywalności pacjentów przy tym nowotworze to 15 miesięcy [24, 25], a zaledwie 5,5 % pacjentów przeżywa 5 lat od rozpoznania [19]. Inne typy histologiczne charakteryzują się mniejszą zapadalnością. Gwiaździatek anaplastyczny występuje u 4,15 na 100 000 mieszkańców, a skąpodrzewiatek u 2,04 na 100 000 mieszkańców [19]. Przeżywalność również jest inna w tych typach glejaka w przypadku gwiaździateka to 5,2 roku, a w przypadku skąpodrzewiateka 7,2 roku [26].

1.4 Wpływ czynników antropometrycznych na częstość zachorowania na glejaka

Płeć

Raporty statystyczne są zgodne co do częstszego występowania większości typów histologicznych glejaka u mężczyzn [17–20, 27, 28]. Wyjątkiem jest tu typowy dla okresu dziecięcego gwiaździatek pilocytarny, którego częstość występowania nie różni się pomiędzy płciami [18, 20, 27, 28]. Niezależnie od kraju z jakiego pochodzą raporty, a przez to różnic w ogólnej częstości zachorowań, powtarza się ich częstsze występowanie u mężczyzn (USA: mężczyźni 7,35 a u kobiet na 5,25 przeliczone na 100 000 mieszkańców [19]; Finlandia: 4,90 w porównaniu z 4,47 dla kobiet na 100 000 osobo-lat [17]). Najczęstszym i najgorzej rokującym typem glejaka jest GBM. GBM również występuje zgodnie z powyżej opisaną zależnością częstszego występowania u mężczyzn (USA: 3,99 dla mężczyzn i 2,52 dla kobiet [19], Szwajcaria: 3,32 dla mężczyzn i 2,24 dla kobiet [29]). Powyższe dane prezentują wpływ płci na rozkład zachorowalności na glejaki pierwotne (w tym GBM). W przypadku glejaków wtórnych zależność jest odwrotna [29].

Wiek

Wiek jest czynnikiem różnicującym występowanie większości nowotworów. Częstość występowania określonego typu histologicznego glejaka jest zmienna w zależności od wieku, przy czym największa częstość występowania jest w przedziale 75-84 lat [20]. Glejaki o niższym stopniu złośliwości są częstsze u dzieci niż u dorosłych [19]. W wieku dziecięcym częstszymi typami histologicznymi są gwiaździatek pilocytowy, unikalne warianty gwiaździateka, czy neuronalne i mieszane guzy neuronalno-glejowe [19].

W przypadku gwiazdkiaka pilocytowego szczególnie zauważalny jest spadek występowania wraz z wiekiem [19]. Zaledwie 3% pacjentów z nowotworem OUN stanowią dzieci w wieku 0-19 lat [20].

Większość raportów epidemiologicznych opisujących GMB informuje o wzroście ryzyka rozwoju GMB wraz z wiekiem. W badaniu Hansen i wsp. [30] większość pacjentów z GBM (83 %) miała powyżej 50 lat. W pracy Cheo i wsp. oraz Gosh i wsp. [31, 32] najczęściej GBM występował w 6 dekadzie życia. W badaniu Li i wsp. [33] odnotowano 47,9 % pacjentów w wieku 65 i więcej lat, natomiast szczyt zachorowań opisano na przedział 75-79 lat, po którym nastąpił spadek częstości przypadków.

Wyższy wiek zachorowań na GBM odnotowano wśród pacjentów rasy kaukaskiej [34]. Na populacji pediatrycznej dowiedziono, iż wraz z wiekiem zmniejsza się lokalizacja guza w położeniu centralnym [35].

Wyższy wiek pacjenta w momencie diagnozy jest skorelowany ze spadkiem przeżywalności [30], w związku z czym został uznany za istotny czynnik ryzyka [36, 37] z współczynnikiem ryzyka (HR, ang. hazard ratio) wynoszącym 1,54 [37]. HR 3 letniego przeżycia z GBM jest około 2,18 razy większy dla pacjentów po 50 roku życia [34]. Wiek jako istotny czynnik ryzyka śmiertelności przy zdiagnozowanym GBM został również potwierdzony w badaniu opisującym populację dziecięcą. Pacjenci w wieku 6-10 lat wykazali HR równy 1,408, a w wieku 11-19 lat wynosił on 1,406 [35]. Według Ghosh i wsp. mediana przeżycia jest najwyższa w wieku 31-40 lat [32]. Dla pacjentów poniżej 50 roku życia wynosi 8,8 miesiąca, gdy dla pacjentów w wieku powyżej 50 lat wynosi 4,55 miesiąca [32]. Mediana przeżycia pacjentów z GBM zmniejsza się wraz z wiekiem [31, 32] i według Cheo i wsp. jest najgorsza w grupie wiekowej >70 lat. Ogólnie starszy wiek wiązał się z gorszym rokowaniem w GMB [34].

Wzrost

Ponad 100 genów i szlaki sygnałowe takie jak HH/PTCH (ang. hedgehog signaling pathway/protein patched homolog), BMP/TGF- β (białko morfogenetyczne kości ang. bone morphogenetic protein, transformujący czynnik wzrostu beta, ang. transforming growth factor beta), P53, c-Myc (protoonkogen MYC, ang. MYC proto-oncogene), ER α (receptor estrogenowy alfa, ang. estrogen receptor alpha), HNF4A (czynnik jądrowy hepatocytów 4 alfa, ang. hepatocyte nuclear factor 4 alpha) i SMAD (przetwornik sygnału

dla TGF- β , ang. signal transducers for TGF- β) wykazują wzmożoną aktywność u wysokich ludzi [38]. W procesie nowotworzenia uczestniczą te same geny i szlaki sygnałowe [38]. U ludzi wysokich obserwuje się również wyższe poziomy hormonu wzrostu (GH, ang. growth hormone) i insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF, ang. insulin-like growth factor) [39–41]. Wysoki wzrost może być więc jednym z czynników wpływających na rozwój glejaka, czy też innych nowotworów [42–44]. Wykazano, że wraz z wyższym wzrostem częstość występowania GBM jest większa [45–48]. Niektóre z analiz potwierdzają powyższą zależność tylko w przypadku mężczyzn [49], a w wielu z nich zależność dla mężczyzn jest silniejsza. Odnotowuje się również raporty, które nie potwierdzają tej zależności [50].

Masa ciała

Otyłość lub nadwaga są istotnym czynnikiem ryzyka dla wielu nowotworów [51], natomiast w innych rodzajach zmniejsza ryzyko powstania [52, 53]. Tkanka tłuszczowa jest istotnym źródłem estrogenów (szczególnie u kobiet po menopauzie) [54], czy substancji prozapalnych [55]. W związku z tym jej ilość może mieć szczególne znaczenie w rozwoju nowotworów. Należy zauważyć również, że GBM u kobiet w wieku po menopauzalnym wiąże się z gorszym rokowaniem [56]. Z opublikowanych analiz wynika, że za wysokie BMI (wskaźnik masy ciała ang. body mass index) w momencie diagnozy nie wpływa na częstsze występowanie glejaka [45, 49]. Wykazano natomiast, że otyłość lub nadwaga w wieku młodzieńczym może przekładać się na większe ryzyko wystąpienia GBM w przyszłości [48, 50]. Wpływ zbyt dużego BMI w czasie diagnozy na czas przeżycia w GBM jest dyskusyjny, istnieją dowody na wydłużenie go [57], jak i te mówiące o braku wpływu [58]. Dodatkowo odnotowano, że wysokie spożycie tłuszczu i cholesterolu [59] jest czynnikiem ochronnym, podobnie jest w przypadku hiperlipidemii [54], czy cukrzycy [60].

Rasa/pochodzenie etniczne

Rasę definiujemy jako grupę osób posiadających podobne warianty genowe wpływające na silniejszą lub słabszą manifestację danej cechy biologicznej. Przez lata specjaliści z antropologii fizycznej próbowali opracować kwalifikację rasową bazującą na tych cechach fenotypowych. Większość kwalifikacji wyróżnia tak zwane rasy główne, do któ-

rych zaliczamy: rasę kaukaską, negroidalną i mongoidalną. W raportach epidemiologicznych glejaka często spotyka się też grupę, którą zbiorczo można traktować jako pochodzenie hiszpańskie, portugalskie czy południowo amerykańskie, określane jako latynosi. Najwyższą częstość glejaka obserwuje się kolejno u pacjentów pochodzenia kaukaskiego, następnie negroidalnego i mongoloidalnego [61]. Donosi się również, że rasa kaukaska ma wyższy współczynnik zapadalności niż latynosi [62]. Podobne obserwacje poczyniono na populacji pediatrycznej, gdzie również wykazano iż zapadalność jest większa w przypadku osób wywodzących się z rasy kaukaskiej [35, 63].

Latynosi mają wyższe wskaźniki przeżycia niż pozostała grupa określana jako nie latynosi [61, 64]. Dowiedziono również, iż rasa mongoidalna ma lepsze przeżycie niż kaukaska [34, 62]. Wykazano, że lepsze przeżycie jest skojarzone z pochodzeniem z rasy negroidalnej lub innej niż z rasy kaukaskiej [64, 65]. Prace prowadzone na populacji dziecięcej wykazały brak związku pomiędzy rasą i śmiertelnością [66]. Nie wykazano różnic w występowaniu mutacji IDH czy metylacji MGMT (alkilotransferaza DNA 6-alkiloguaniny, ang. O6-alkylguanine DNA alkyltransferase) pomiędzy rasami [62].

Według analizowanej literatury raporty, które opisują epidemiologię glejaka względem ras człowieka, pochodzą w znacznej większości z USA. Raporty publikowane w krajach europejskich na ogół nie przedstawiają epidemiologii pod tym kątem.

1.5 Wpływ czynników środowiskowych na ryzyko zachorowania na glejaka

Promieniowanie jonizujące

Podobnie jak dla wielu innych nowotworów ekspozycja na promieniowanie jonizujące zwiększa ryzyko wystąpienia glejaka. Prowadzone przez lata badania o wpływie promieniowania jonizującego na rozwój glejaka dostarczyły wystarczających dowodów na uznanie go za czynnik ryzyka [67].

Alkohol

Właściwości kancerogenne alkoholu [68, 69] wykazano na zwierzętach i zaobserwowano przy innych nowotworach [70]. Pomimo powyższych przesłanek nie wykazano wpływu alkoholu na wzrost częstości występowania glejaka [71], a nawet zasugerowano jego protekcyjny wpływ w przypadku niskich dawek [72].

Palenie papierosów

Zawartość związków N-nitrowych w dymie papierosowym i ich wpływ na rozwój glejaka u zwierząt wydają się istotną przesłanką dla sprawdzenia wpływu palenia papierosów na powstawanie i rozwój glejaka [73]. W literaturze istnieją sprzeczne informacje o wpływie palenia na powstawanie glejaka [74–76]. Należy również zwrócić uwagę na możliwość zakłócania wyników przez dodatkowe zmienne, a sam wpływ palenia może nie być bezpośredni. W jednym z badań odnotowano bowiem wpływ palenia na powstawanie glejaka, ale tylko u kobiet [77]. Dowiedziono, że palenie wpływa na wzrost stężenia hormonów płciowych, które z kolei mogą wpływać na rozwój glejaka [78].

Uraz głowy

Istnieje szereg powiązań biologicznych mogących tłumaczyć wpływ urazu na powstanie glejaka [79]. Wyniki badań epidemiologicznych nie potwierdzają jednak zauważonych powiązań [80–82].

Picie kawy i herbaty

Wpływ spożywania kawy i herbaty na stan zdrowia człowieka jest tematem wieloletnich dyskusji i badań naukowców. Obecność w tych produktach spożywczych związków takich jak polifenole, kwas kawowy, kahweol, kafestol czy związków heterocyklicznych może mieć protekcyjny charakter dla rozwoju glejaka [83–86]. Badania dotyczące wpływu kawy i herbaty na powstawanie glejaka są niezgodne. Niektóre z prac opisują ochronny wpływ kawy i herbaty [87–89], natomiast inne wskazują je jako czynnik ryzyka glejaka [90].

Telefony komórkowe

Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC, ang. International Agency for Research on Cancer) uznała pola elektromagnetyczne o częstotliwości radiowej (PEM-FM) za czynniki rakotwórcze [91]. Ilość urządzeń, które emitują PEM-FM w otoczeniu człowieka ciągle wzrasta. Prowadzone przez lata badania o wpływie telefonii komórkowej na powstawanie glejaka przynosiły sprzeczne rezultaty. Wyniki metaanaliz z 2017 [91] i 2018 [92] roku stwierdzają wzrost ryzyka zachorowania przy długotrwałym użytkowaniu (>10 lat). Należy zaznaczyć, że wyniki są rozbieżne w zależności od stopnia złośliwości guza [91]. Obecnie opublikowane prace nie potwierdzają przedstawianych

założeń, sugerując, że ogólny wzrost ilości odnotowywanych zachorowań może być związany z lepszą diagnostyką [92-94].

Sen

Dowodzono, że ilość snu nie jest związana z ryzykiem wystąpienia glejaka [93], ale zaburzenia z nim związane mogą przyczynić się do gorszego rokowania dla pacjenta [94]. Wykazano również, że podawanie melatoniny może zwiększyć czas przeżycia pacjenta z glejakiem [95, 96]. Melatonina zmniejsza również częstość występowania nowotworów złośliwych [96].

Wybrane leki

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) czy paracetamol są obecnie szeroko dostępne, a pacjenci mogą je nabywać bez jakiegokolwiek konsultacji z lekarzem czy też farmaceutą. Wpływ NLPZ na rozwój glejaka może być skojarzony z hamowaniem syntezy prostaglandyny E₂ (PGE₂ ang. prostaglandin E₂) [97, 98] czy też blokowaniem przyłączania fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF ang. fibroblast growth factor) [99]. Dokładny mechanizm molekularny tłumaczący wpływ NLPZ na rozwój glejaka jest w dalszym ciągu niejasny [100]. Wyniki badań analizujących wpływ NLPZ na rozwój glejaka są sprzeczne. Przedstawiają brak wpływu [101–104], wpływ dodatni [105, 106] i wpływ negatywny [107–109].

Leki przeciwhistamowe stosowane są przez pewne grupy pacjentów w sposób ciągły, a ich działanie przeciwzapalne i immunomodulujące wydaje się interesujące w kontekście rozwoju glejaka. W większości przeprowadzone analizy wykazały ochronny wpływ leków przeciwhistaminowych na rozwój glejaka [110–112].

Opublikowana niedawno metaanaliza opisująca wpływ stosowania statyn na ryzyka powstania glejaka stwierdza, że pomimo silnego przeciwnowotworowego działania statyn w badaniach *in vitro* nie odnotowuje się ich wpływu na częstość występowania glejaka [113].

1.6 Obraz kliniczny pacjenta z glejakiem

Obraz kliniczny pacjenta z wczesnym stadium rozwoju glejaka składa się z wielu niespecyficznych objawów, do których zaliczamy: bóle głowy, ortostatyczne bóle głowy, zaciemnienie pola widzenia, ogniskowe objawy neurologiczne, problemy z chodzeniem

lub siłą, problemy z pamięcią lub zdolnością koncentracji, trudności z mową i zmiany osobowości, pojawianie się lub pogorszenie się napadów drgawkowych w wyniku, których może wystąpić letarg, nudności, wymioty i podwójne widzenie [114–116]. Szeroki przekrój objawów i mnogość przyczyn je wywołujących stanowi problem przy rozpoznawaniu glejaka. Dodatkowo nie istnieją metody diagnostyczne, które można by stosować jako metody przesiewowe w celu wykrycia nowotworu we wczesnym stadium. Zapadalność i przeżywalność w przypadku glejaka różni się w zależności od typu histologicznego [19] i profilu genetycznego nowotworu [117]. Leczeniem w przypadku guzów glejowych jest połączenie resekcji chirurgicznej guza, radioterapii i chemioterapii (protokół Stupp: frakcjonowane napromienianie ogniskowe w dziennych frakcjach 2 Gy podawane 5 dni w tygodniu przez 6 tygodni, w sumie 60 Gy, temozolomidu 75 mg na m² powierzchni ciała na dzień, 7 dni w tygodniu od pierwszego do ostatniego dnia radioterapii, a następnie sześć cykli adiuwantowego temozolomidu od 150 do 200 mg na m² przez 5 dni podczas każdego 28-dniowego cyklu) [118]. Pomimo stosowania wielokierunkowej terapii w leczeniu guzów glejowych, przy tak różnorodnych możliwościach progresji nowotworu schemat ten jest niewystarczający [119]. W przeciwieństwie do innych typów nowotworów, poczyniono bardzo niewielkie postępy w leczeniu glejaków o wysokim stopniu złośliwości. Kluczowymi czynnikami odpowiadającymi za to niepowodzenie to wysoki stopień proliferacji, naciekający charakter i znaczna heterogeniczność komórkowa guza [120]. W przypadku glejaków rozlanych (do których należy GBM) bardzo ciężko jest przeprowadzić kompletną resekcję chirurgiczną, ze względu na ich rozległą infiltrację w mięszu OUN [118]. Dodatkowo wysoka heterogeniczność między- i wewnątrznowotworowa bardzo utrudnia prawidłową identyfikację celów terapeutycznych [120].

1.7 Budowa niszy nowotworowej glejaka wielopostaciowego

GBM jest klasycznym przykładem heterogeniczności komórkowej guza [121]. Sekwencjonowanie jednokomórkowego RNA ujawniło, że w obrębie jednego guza może istnieć wiele podtypów, podkreślając znaczną heterogeniczność między- i wewnątrznowotworową GBM [122]. W skład komórkowy guza wchodzi nie tylko różniące się od siebie w ekspresji i selekcji izoform linie komórek nowotworowych [122], ale także szeroka gama nienowotworowych komórek zrębu, w tym naczyń krwionośnych, różnych in-

filtrujących i rezydentnych komórek odpornościowych oraz innych typów komórek glejowych [123]. Istotną składową puli komórkowej guza są również rakowe komórki macierzyste (CSC ang. cancer stem cells) umożliwiające jeszcze większą heterogeniczność guza i zwiększone możliwości proliferacyjne [124].

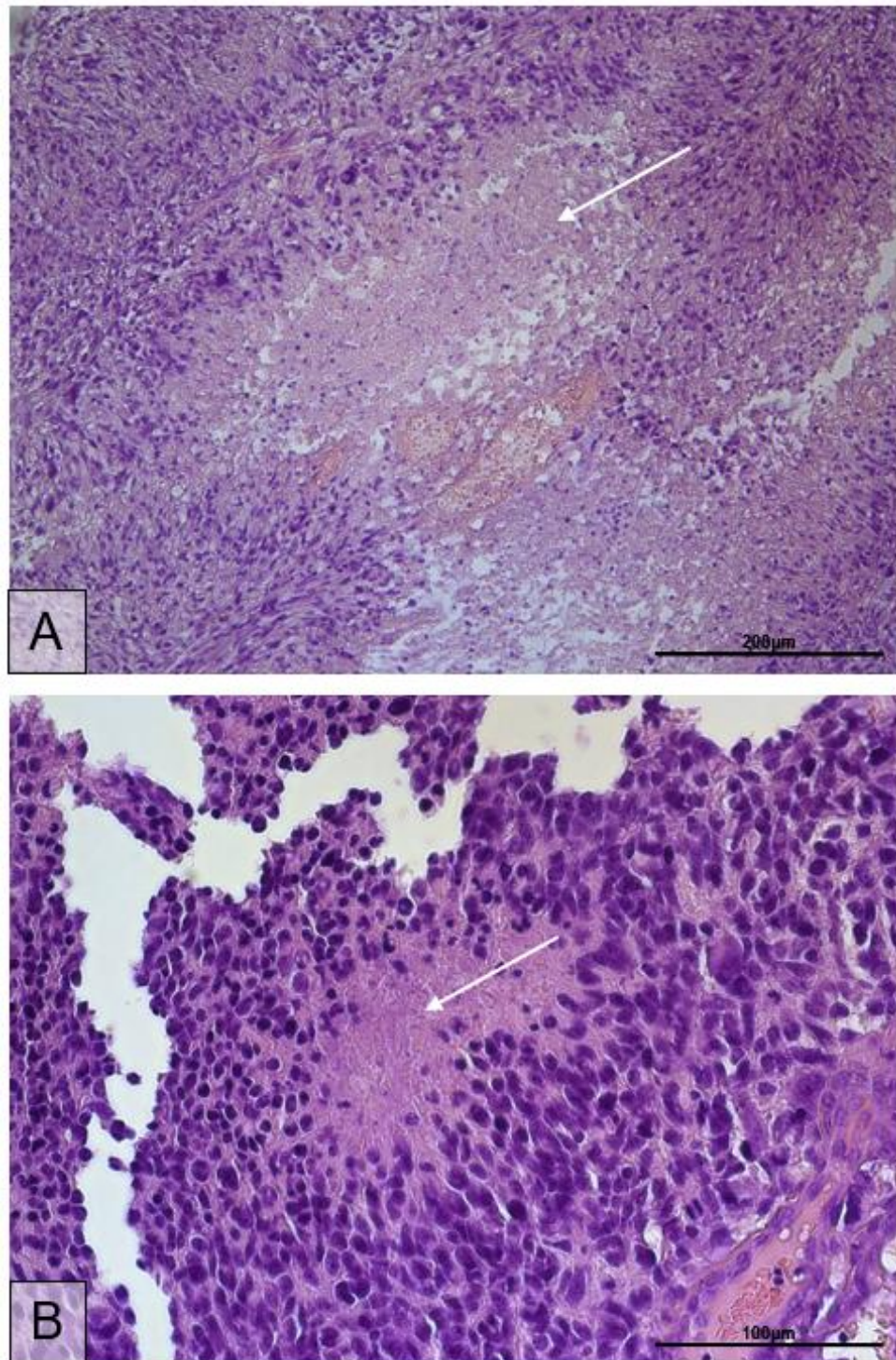
Obok zmienności komórkowej dla glejaka charakterystyczna jest również zmienność mikrośrodowiska guza, wywołana dostępem do substancji odżywczych i tlenu. Zmienny poziom tych substancji wywołany jest masywnym wzrostem nowotworu i nieprawidłową angiogenezą narastającego guza [123]. W zależności od dostępu powyższych czynników zmienia się profil molekularny komórek guza.

W literaturze można znaleźć wyróżnianie trzech regionów guza GBM, są to: hipoksyjny niewzrostowy rdzeń guza, region intensywnego wzrostu guza- występujący około naczyń i region stanowiący obrzeże guza, silnie infiltrujące, otaczające guz obszary OUN [123]. W dalszych podrozdziałach zdefiniowano te obszary jako: niewzrastający rdzeń guza, korę guza, obrzeże guza.

Niewzrastający rdzeń guza

Rdzeń guza GBM charakteryzuje się niedotlenieniem i martwicą pseudopalisadową, powstałą wskutek niewystarczającego dokrwienia tych regionów guza, a przez to małym dostępem tlenu i składników odżywczych. Do powyższych konsekwencji może dojść w wyniku niedrożności naczyń krwionośnych, zapaści i zakrzepicy wewnątrznaczyniowej [125]. Przyczynić się do tego może również okluzja naczyń krwionośnych wywołana apoptozą komórek śródbłonna naczyń indukowaną angiopoetyną 2 [125]. W wyniku tworzenia się regionów niedotlenienia i niedożywienia, a przez to regionów martwicy, komórki guza migrują, tworząc wokół regionu martwicy palisady składające się z cienkich i wydłużonych komórek, których jądro również jest wydłużone (Rycina 2). Komórki stanowiące palisadę charakteryzują się niską proliferacją i wyższym wskaźnikiem apoptozy niż komórki dalej położone od regionu martwicy [125].

Występowanie martwicy pseudopalisadowej i niedotlenienia tylko pozornie zdaje się negatywnie wpływać na rozwój guza. Mechanizmy indukowane niedotlenieniem wspomagające rozwój GBM takie jak: migracja komórek GBM, angiogeneza, czy tworzenie środowiska immunosupresyjnego, zostały szerzej opisane w kolejnych podrozdziałach.



Rycina 2. Przykład struktury martwicy pseudopalisadowej. Fotografia oryginalna w powiększeniu x20 (A) i x40 (B), oraz skali 200µm (A) i 100µm. (B). Białymi strzałkami zaznaczono obszar martwicy.

Niewzrastający rdzeń guza - komórki migrujące z rdzenia guza

Obecnie uważa się, że niedotlenienie jest jednym z kluczowych czynników przeżycia komórek nowotworowych i rozwoju guza GBM. W wyniku niedotlenienia w komórce wzrasta poziom czynników białkowych: HIF-1, HIF-2, HIF-3 (czynnik indukowany hipoksją ang. hypoxia-inducible factors) [126, 127]. Wzrost ich aktywności w komórce zmienia profil ekspresji genów poprzez interakcję z elementami odpowiedzi na niedotlenienie (HRE ang. hypoxia-responsive elements) [128].

Aktywna postać tych czynników transkrypcyjnych to forma heterodimeru składającego się z podjednostki α i podjednostki β [129]. Podjednostka α pełni funkcje regulacyjne dla tego białka, jej ekspresja i stałość wpływa na poziom aktywności gotowego dimeru [129]. Podjednostka β nazywana również aryłowym węglowodorowym translokatozem jądrowym (ARNT, ang. aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator) nie jest poddawana regulacji, ale jej połączenie z podjednostką α jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania czynników transkrypcyjnych HIF [130]. Podjednostki α białek HIF-1, HIF-2, HIF-3 regulowane są przez poziom tlenu w komórce, regulacje transkrypcji i degradację proteolityczną. W warunkach normoksji degradacja proteolityczna następuje w proteosomie na skutek znakowania ubikwityną przez białko von Hippel-Lindau (pVHL, ang. Von Hippel-Lindau tumor suppressor) [131–133]. Do ubikwitynacji dochodzi w skutek hydroksylacji dwóch reszt prolinowych (Pro402 HIF-1 α , Pro564 HIF-1 α , Pro405 HIF-2 α i Pro531 HIF-2 α) przez hydroksylazy prolinowe (PHD, ang. proline hydroxylase) [134]. Hydroksylacja reszt asparaginianu (Asn803 HIF-1 α i Asn847 HIF-2 α) przez czynnik hamujący HIF (FIH, ang. factor inhibiting HIF) blokuje natomiast poprawną aktywację transkrypcji genów zależnych od HIF [135, 136]. Na aktywność HIF wpływa również poziom reaktywnych form tlenu (ROS ang. reactive oxygen species) i tlenku azotu (NO). Niedotlenianie zwiększa poziom ROS [137], które zmniejszają inhibicję podjednostek α HIF przez PHD [138] i FIH [135]. ROS zwiększają również ekspresję mRNA HIF α poprzez wpływ na czynnik jądrowy κ B (NF- κ B, ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [139, 140]. Zwiększona ilość ROS i jonów wapnia wpływa na aktywację szlaku kinaz MAPK (kinazy aktywowane mitogenami, ang. mitogen-activated protein kinase), które poprzez fosforylację zwiększają stabilność i aktywność transkrypcyjną HIF-1 α [141, 142]. NO przyczynia się do zwiększenia stabilności białka HIF-1 α poprzez S-nitrozylowanie cysteiny w pozycji 533 w warunkach normoksji [143, 144]. Należy jednak zaznaczyć, że ROS i NO mogą wspólnie aktywować

PHD i przez to przyczyniać się do degradacji HIF, mogą również zwiększać stężenie jonów wapnia i aktywować kalpainę, doprowadzając do niezależnej od proteosomu degradacji czynnika HIF [145, 146].

W komórkach pseudopalisady glejaka zwiększona ilość białek HIF indukuje ekspresję czynników takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF ang. vascular endothelial growth factor) i interleukinę 8 (IL-8 ang. interleukin 8), które są zaangażowane w różne aspekty homeostazy komórkowej, w tym przeżycie, metabolizm, inwazję i angiogenezę [127, 147–149].

W warunkach hipoksji komórki CSC różnicują się do komórek podobnych do komórek śródbłonna i uczestniczą w nowotworowej angiogenezie [150]. Powstałe naczynia krwionośne cechuje szereg dysfunkcji takich jak: dezorganizacja, wysoka przepuszczalność, nieprawidłowości w ścianie śródbłonna przyczyniających się do utraty bariery krew-mózg [151]. Powstawanie nowotworowych naczyń krwionośnych w obszarach martwicy pseudopalisadowej pozwala komórkom nowotworowym wzrastać ku zewnątrz [123].

Rdzeń guza w wyniku nieprawidłowego dokrwienia pozbawiony jest również substancji odżywczych niezbędnych do wytworzenia energii. Warunki niedotlenienia zmuszają komórki do korzystania z glikolizy beztlenowej jako źródła energii. HIF-1 α zwiększa ekspresję wielu enzymów, które uczestniczą w glikolizie w celu utrzymania wystarczającego poziomu ATP (adenozynotrójfosforan ang. adenosine triphosphate) w niedotlenionych komórkach [152].

Niewzrastający rdzeń guza - komórki tworzące martwicę i środowisko immunosupresyjne

Masywny wzrost guza w wyniku niedotlenienia wywołuje migrację komórek i tworzenie pseudopalisady, ale przyczynia się również do martwiczej śmierci komórek pozostających w strefie długotrwałego niedotlenienia. Proces ten przyczynia się do wydzielenia do mikrośrodowiska guza substancji prozapalnych [153]. W wyniku ich działania napływające nienowotworowe komórki układu odpornościowego zmieniają się w komórki immunosupresyjne.

Makrofagi wnikają do guza w odpowiedzi na chemokiny za pośrednictwem stanu zapalnego [154]. W regionie rdzenia guza komórki TAM (makrofagi związane z nowotworem, ang. tumor-associated macrophages) są rekrutowane w wyniku działania VEGF

zależnego od HIF [155]. TAM ulegają polaryzacji w kierunku fenotypu immunosupresyjnego poprzez metabolity, takie jak kinurenina [156]. Uwalniane przy powstawaniu martwicy wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP, ang. damage-associated molecular patterns) mają działanie chemoatraktywne na najobficiej występujące komórki układu odpornościowego - neutrofile [157]. Wysunięto teorię, że początkowo powstała martwica w glejaku rekrutuje neutrofile, które następnie aktywują mechanizmy ferroptozy powiększające obszar martwicy, tworząc w ten sposób dodatnie sprzężenie zwrotne dla rozwoju martwicy [158]. HIF-1 α pochodzący z komórek GBM może również tłumić odpowiedź immunologiczną komórek T poprzez aktywację supresorowych limfocytów T regulatorowych (Treg ang. regulatory T cells) [159].

Klasyczne cytokiny immunosupresyjne związane z glejakiem to TGF- β i IL-10 (interleukina 10 ang. interleukin 10). TGF- β hamuje prezentację antygenów przez limfocyty i komórki NK (ang. natural killer cells) obecne w guzie, oraz wraz z IL-10 kierkuje TAM w stronę fenotypu immunosupresyjnego [160]. Innymi cytokinami wyrażanymi w glejaku są IL-1 β (interleukina 1 β , ang. interleukin 1 β), IL-6, TNF- α (czynnik martwicy nowotworów, ang. tumor necrosis factor α) i IL-8 [161].

Kora guza

Kora guza jest strefą intensywnego wzrostu nowotworu. Intensywna proliferacja i zwiększanie masy guza przyczynia się do dużego zapotrzebowania na składniki odżywcze w tej części guza. Dodatkowo tak zwiększona ilość komórek w stosunku do obecnego unaczynienia wywołuje przejściową, choć cyklicznie występującą hipoksję [162]. W tej części guza prowadzona jest również intensywna angiogeneza w celu zapewniania komórkom dostępu do składników odżywczych i tlenu. Błędy w tworzeniu nowych naczyń mogą również przyczyniać się do powstawania obszarów hipoksji różniących się od tej występującej w rdzeniu guza [163–165].

Kora guza - metabolizm energetyczny komórek glejaka wielopostaciowego

Komórki agresywnych nowotworów charakteryzują się dużymi zdolnościami adaptacyjnymi metabolizmu energetycznego dzięki czemu zachowują swój potencjał inwazyjny [166].

W komórkach guza GBM HIF2- α reguluje ekspresję transporterów glukozy (GLUT1 i GLUT3) [167]. Glukoza dostarczona do komórki jest fosforylowana, w celu

wykorzystania jej do produkcji energii. W normalnych komórkach mózgowych proces ten katalizuje heksokinaza pierwsza. W komórkach GBM w stanie hipoksji natomiast ekspresję heksokinazy drugiej promuje HIF1- α zwiększając ilość ufosforylowanej glukozy [168]. Ułatwienie przepływu glukozy przez szlak glikolizy zapewnia również nadekspresja izoformy płytkowej fosfofruktokinazy i nadmierna aktywacja tego enzymu w komórkach GBM [169]. Fruktozo-1,6-bisfosforan zintensyfikowanie powstały w reakcji katalizowanej przez fosfofruktokinazę allosterycznie aktywuje embrionalną formę kinazy pirogronianowej, która jest obecna w komórkach GBM, ale nie w normalnej tkance mózgowej [169, 170]. Embrionalna forma kinazy pirogronianowej jest również nadwyrażana w komórkach GBM, dodatkowo intensyfikując wydajność reakcji przeniesienia grupy fosforanowej z fosfoenolpirogronianu na ADP z wytworzeniem pirogronianu i ATP. Powstały w wyniku tych reakcji pirogronian może być przekształcany dalej w cyklu Krebsa lub pod wpływem dehydrogenazy mleczanowej, może być przekształcony w mleczan. W komórkach GBM dehydrogenaza mleczanowa jest nadekspresjonowana, w wyniku czego powstaje nie tylko mleczan, ale również NAD⁺ (forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, ang. oxidized form nicotinamide adenine dinucleotide) [171]. NAD⁺ zwiększa aktywację dehydrogenazy aldehydu glicerynowego-3-fosforanu (GAPDH, ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), a tym samym intensyfikuje proces glikolizy. Powstały w komórkach mleczan odprowadzany jest do środowiska guza za pośrednictwem transporterów monokarboksylowych, których blokada sprzyja hamowaniu inwazyjności guza GBM [172]. Pirogronian niepoddany przekształceniu w mleczan trafia do mitochondrium, jednak intensywność tego procesu jest zmniejszona w części guzów GBM, ze względu na delecję w genie kodującym mitochondrialny nośnik pirogronianowy. Występowanie wspomnianej delecji jest paradoksalnie związane z mniejszą przeżywalnością pacjentów [173]. Przekształcenie pirogronianu w acetylo-CoA jest również procesem zaburzonym w komórkach GBM [174].

Według obecnej klasyfikacji warunkiem zakwalifikowania guza glejowego do grupy GBM jest występowanie IDH typu dzikiego. W związku z powyższym reakcja wytwarzania α -ketoglutaranu w cyklu Krebsa zachodzi klasycznie. Ilość α -ketoglutaranu w cyklu jest podyktowana również dopływem tego α -ketokwasu z reakcji oksydacyjnej deaminacji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminową, której ekspresja w GBM jest zwiększona [175]. Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę glutaminową jest kluczowa dla dostarczenia szkieletów węglowych niezbędnych do pozyskiwania energii

z cyklu Krebsa, szczególnie zważywszy na zaburzenie procesu przekształcania pirogronianu w acetylo-CoA. Guz GBM wykorzystuje dostatek glutaminy w mózgu, będącej masywnie produkowanym neurotransmiterem, w celu pozyskania glutaminianu. Duży dostatek substratu dla dehydrogenazy glutaminowej, jest warunkowany nie tylko obecnością glutaminy w środowisku guza, ale także wysoką aktywnością glutaminazy katalizującej rozpad glutaminy do glutaminianu [176].

Powyższe zmiany metaboliczne umożliwiają komórkom GBM funkcjonować w środowisku zmiennej podaży tlenu. Przesławienie metabolizmu energetycznego na profil beztlenowy jest szybkie ze względu na już wcześniej prowadzoną intensywną glikolizę beztlenową. Powrót do metabolizmu tlenowego umożliwia natomiast szybki dostęp do szkieletów węglowych za sprawą dwóch reakcji. Przedstawione implikacje skłoniły do stworzenia modelu badawczego niedoboru składników odżywczych, w którym komórki mają zmniejszony dostęp do glutaminy, a pirogronian nie jest dostępny w środowisku.

Kora guza - hipoksja cykliczna

Niedotlenienie cykliczne pojawia się w guzie w sposób powtarzalny i przejściowy, wywołując narastającą amplitudę zmian w metabolizmie komórek guza. Częstotliwość i stopień wahań poziomu tlenu zależy między innymi od wielkości guza, jego lokalizacji i intensywności wzrostowej [177–179].

W niedotlenieniu cyklicznym HIF-1 jest aktywowany mocniej i dłużej [180–182], a wraz z kolejnymi falami hipoksji dochodzi do jego akumulacji [183]. Stabilność HIF-1 jest warunkowana zwiększonym poziomem ROS, w wyniku zmniejszenia aktywności PHD [181, 184] oraz dezaktywacji FIH [135]. Reaktywne formy tlenu w komórkach GBM mogą powstawać w wyniku niedotlenienia cyklicznego poprzez regulacje w górę NOX1 (oksydaza fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), ang. NADPH oxidase) [183] i NOX4 [182, 185]. W niedotlenieniu cyklicznym dochodzi również do degradacji HIF-2 α przez aktywację kalpain wywołaną reaktywnymi formami tlenu [186].

W niedotlenieniu cyklicznym dochodzi także do silniejszej aktywacji EGF, niż w hipoksji ciągłej [187]. Wzrasta również aktywacja kinazy białkowej A [188], której fosforylacyjna funkcja zwiększa stabilność podjednostki HIF-1 [188, 189].

Obrzeże guza

Obszar określany jako obrzeże guza często definiowany jest jako nisza inwazyjna GBM, ze względu na występowanie w tym obszarze komórek nowotworowych, które poprzez swoją migrację w zdrową tkankę przesuwają granice guza.

GBM, podobnie jak inne rozlane glejaki, ma tendencję do tworzenia wypustek infiltrujących zdrowe tkanki, powstających przeważnie wzdłuż dróg nerwowych, opon mózgowych, błon podstawnych, w tym naczyń krwionośnych (migracja wzdłuż struktur Scherera [190]) [191]. Inwazyjność guza GBM prowadzona wzdłuż naczyń krwionośnych wydaje się być głównym mechanizmem inwazji tego typu nowotworu [123]. Komórki GBM nasilają stopień inwazji wraz z wrastającym w guzie niedotlenieniem. HIF indukuje ekspresję kinazy tyrozynowo-białkowej Met (c-Met, ang. tyrosine-protein kinase Met), co przyczynia się do wzrostu inwazyjności komórek nowotworowych [192].

Obszar obrzeża guza, w odróżnieniu od jego pozostałych rejonów, jest lepiej unaczyniony, jednak wraz z postępem inwazji komórki nowotworowe wypierają astrocyty z kontaktu z komórkami naczyń krwionośnych, prowadząc tym samym do zmiany napięcia naczyniowego i zniszczenia bariery krew-mózg [193]. Dochodzi tym samym do rozwoju niedotlenienia cyklicznego, rozwinięcia środowiska immunosupresyjnego i przekształcenia się danego obszaru w strefę intensywnego wzrostu guza, czyli korę guza. W wyniku tego procesu astrocyty występujące w strefie obrzeża guza mogą być również włączone w obszar guza [123].

Astrocyty obrzeża guza mogą również ulegać procesowi reaktywnej astroglejozy w wyniku interakcji z guzem [123]. Reaktywne astrocyty wydzielają bowiem do środowiska guza czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF, ang. connective tissue growth factor), który wiąże się z receptorami na CSC (receptor kinazy tyrozynowej typu A i integryna β 1) i wywołuje za pośrednictwem NF-K β (czynnik jądrowy κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)) zmniejszoną ekspresję E-kadheryny. Zmniejszona ekspresja E-kadheryny przyczynia się z kolei do zwiększenia inwazyjności i migracji komórek guza [194]. Dodatkowo astrocyty w obrzeżu guza wydzielają białko SHH (ang. sonic hedgehog), które wiąże się z białkiem PTCH1 (ang. protein patched homolog 1), indukując tym samym białko SMO (ang. smoothened), które wywołując aktywację czynników transkrypcyjnych GLI (białko palca cynkowego GLI1, ang. zinc finger protein GLI1), przyczynia się do dalszego rozwoju komórek guza GBM [195, 196].

Komórkami obrzeża również wspomagającymi rozwój guza GBM są komórki mikrogleju. Komórki odpornościowe OUN gromadzą się na granicy guza nie rozpoczynając reakcji odpornościowej, jak dzieje się to w przypadku jakichkolwiek zaburzeń homeostazy OUN [197]. Mikroglej dodatkowo rekrutowany i aktywowany jest w obszarze guza poprzez czynnik stymulujący kolonie 1 (CSF1, ang. colony stimulating factor 1), interleukinę 34 (IL34) i czynnik komórek macierzystych (SCF, ang. stem cell factor) wydzielane przez komórki guza. W wyniku tej aktywacji dochodzi do wzrostu wytwarzania przez mikroglej naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. epidermal growth factor), który wspomaga komórki GBM w migracji [198].

2. Receptory zależne od hormonów płciowych

Termin hormon został po raz pierwszy użyty w 1905 roku przez fizjologa Ernesta Henry'ego Starlinga na Croonian Lecture dla Royal College of Physicians of London [199]. Ówczesna definicja hormonu mówiła, że jest to: „substancja wytwarzana przez gruczoły z wewnętrzną wydzieliną, która służy do przenoszenia sygnałów przez krew do narządów docelowych" [199]. Obecnie definicja hormonu została zmieniona pod wpływem rozwoju wiedzy z dziedziny endokrynologii. Hormony są rozpuszczalnymi przekąźnikami układu hormonalnego. Nazywamy tak szereg różnych substancji pełniących funkcje sygnałowe i regulatorowe w organizmie wielokomórkowym [199].

Ze względu na miejsce działania hormony dzielimy na endokryne (działanie odległe poprzez krążenie ustrojowe) i parakryne (działanie na sąsiadujące komórki bez udziału krążenia ustrojowego). Ze względu na strukturę chemiczną hormony dzielimy na białkowe i steroidowe. Hormony pełnią funkcję sygnałowo-regulatorową poprzez łącznie się z receptorami i dalszą transdukcję sygnału. Receptory odbierające sygnał mogą znajdować się na zewnątrz błony komórkowej, na wewnętrznej stronie błony komórkowej lub wewnątrz komórki w cytoplazmie.

Hormony steroidowe to pochodne cholesterolu, wśród nich można wyróżnić grupę hormonów płciowych, do których należą: androgeny, estrogeny i progestageny. Hormony te działają głównie przez receptory jądrowe, które znajdują się w cytoplazmie komórki. Hormony białkowe działają natomiast poprzez połączenie z receptorem na powierzchni komórki. Należą do nich między innymi hormon folikulotropowy czy prolaktyna.

2.1 Receptor androgenowy

Gen kodujący *AR* (receptor androgenowy, ang. androgen receptor) znajduje się na długim ramieniu chromosomu X (Loci X:67,544,021-67,730,619) [200]. *AR* zawiera ponad 90 Kb (Kb - kilo par zasad, ang. kilo base pair) [200] z czego 2,757 kb stanowi 8 eksonowy region kodujący białko [201]. Wielkość intronów obecnych w *AR* waha się 0,7 do 2,6 kb [201]. Odnotowano 8 transkryptów tego genu [200].

AR jest czwartym członkiem grupy C, trzeciej podrodziny receptorów jądrowych (NR3C4 ang. nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4) [202]. Białko *AR* występuje w dwóch głównych izoformach o długości 110 kDa (kilo Daltony) i 87 kDa [201]. Zbudowane jest z 3 domen: najbardziej zmiennej domeny regulacyjnej N-terminalnej (NTD, ang. N-terminal domain), wysoce konserwatywnej składającej się z dwóch palców cynkowych domeny wiążącej DNA (DBD, ang. DNA binding domain) i domeny wiążącej ligand (LBD, ang. ligand binding domain) [203]. NTD jest domeną kodowaną w całości przez ekson 1 i stanowi ponad połowę wielkości białka *AR* [204]. Charakteryzuje się powtórzeniami glutaminy i glicyny, ale ich ilość jest bardzo zmienna w populacji [205]. Ilość powtórzeń wpływa na składanie i strukturę NTD w *AR* [206], przy czym zmniejszona ich ilość wpływa na zwiększoną aktywność transaktywacji *AR* [207]. DBD jest regionem wysoce konserwatywnym wśród receptorów hormonów steroidowych [208]. Pojedynczy monomer DBD ma rdzeń złożony z dwóch palców cynkowych, każdy z nich składa się z czterech reszt cysteiny [208]. W skład LBD *AR* wchodzi cztery krótkie pasma β (tworzące razem dwa antyrównoległe arkusze β) i jednaście α -helis, które stanowią trójwarstwowy, antyrównoległy, α -spiralny fałd, o strukturze 3 warstwowej kaptki [208].

AR w nieaktywnej formie związany jest cytozoloowo z białkami szoku cieplnego (HSP90, HSP70, ang. heat shock proteins) [209], po przyłączeniu liganda receptor dysocjuje od kompleksu i translokuje się do jądra, gdzie uczestniczy we wzroście ekspresji określonych genów [210]. Niewiele dotychczas wiadomo o regulacji ekspresji genów przez *AR* w GBM, w przeciwieństwie do komórek raka prostaty, gdzie wpływ *AR* na biologię tego guza jest bardzo dobrze poznany [211].

Istnieje wiele ligandów *AR*. Są to substancje naturalne lub zsyntetyzowane [212]. Dwoma najważniejszymi endogennymi ligandami *AR* są, będące androgenami, testosteron i DHT (5 α -dihydrotestosteron ang. 5 α -dihydrotestosterone) [213]. DHT powstaje

z testosteronu w skutek działania enzymu 5α -reduktazy [214, 215]. DHT różni się od testosteronu brakiem pojedynczego podwójnego wiązania na pierścieniu A [213]. Ta pozornie niewielka różnica w budowie wywołuje dwukrotnie większe powinowactwo DHT do AR i pięciokrotnie mniejsze tempo dysocjacji tego liganda w porównaniu do testosteronu [216]. Androgeny są hormonami występującymi w znacznie wyższych stężeniach u mężczyzn niż u kobiet [217], co mogłoby tłumaczyć częstsze występowanie GBM u mężczyzn. AR pełni rolę czynnika transkrypcyjnego i odpowiada za wzrost ekspresji genów kontrolujących tworzenie męskiego fenotypu.

AR jest dodatkowo receptorem, którego wariant AR-V7/AR3 może być aktywowany niezależnie od liganda co opisywano w komórkach raka prostaty [218]. Powyższy mechanizm jest możliwy dzięki krzyżowej aktywacji molekularnych ścieżek sygnałowych takich jak insulinopodobny czynnik wzrostu keratynocytowy (KGF, ang. keratinocyte growth factor), EGFR i receptor drugiego ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2, ang. epidermal growth factor receptor) [211]. Występowanie tego wariantu potwierdzono również w GBM [211].

2.2 Receptory estrogenowy α i estrogenowy β

ER α jest pierwszym odkrytym receptorem estrogenowym [219]. ER α jest pierwszym członkiem grupy A trzeciej podrodziny rodziny receptorów jądrowych, dlatego nazywany jest również NR3A1 (ang. nuclear receptor subfamily 3, group A, member 1) [220]. ER α kodowany jest przez gen *ESR1* leżący na 6 chromosomie w pozycji 6q25.1-q25.2 [221], zawiera 140 Kb [222] z czego 1785 pz stanowi [223] 8 eksonów obecnych w genie [222]. Białko ER α składa się z 595 aminokwasów i ma łączny ciężar cząsteczkowy 66,2 kDa [223]. ER β znany również jako drugi członek grupy A trzeciej podrodziny rodziny receptorów jądrowych (NR3A2 ang. nuclear receptor subfamily 3, group A, member 2), odkryty został 38 lat po ER α . Gen kodujący ER β (*ESR2*) znajduje się na 14 chromosomie w pozycji 14q22-q24 [219]. Podobnie jak w przypadku ER α składa się z 8 eksonów o całkowitej długości 40 Kb [219]. Białko ER β składa się z 530 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 59,2 kDa [224].

Podobnie jak inne jądrowe receptory, receptory estrogenowe zbudowane są z czterech domen: domeny amino-końcowej (domena A / B), domeny wiążącej DNA (DBD; domena C), regionu zawiasu (domena D) i domeny wiążącej ligand (LBD; E-domena).

Dodatkowo w ER występuje domena karboksylowo-końcowa (domena F) [225]. W domenie amino-końcowej i domenie wiążącej ligand występują funkcje aktywacji transkrypcji (AF1, AF2, ang. activation function). AF 1 jest ważne dla transaktywacji niezależnej od ligandu, natomiast AF2 dla zależnej od ligandu regulacji transkrypcji [226].

Domena DBD jest wysoce homologiczna pomiędzy ER α i ER β (97% homologii). Wysokim stopniem podobieństwa charakteryzuje się również domena LBD (60% homologii). W przypadku pozostałych domen procent powtarzalności struktury jest niższy i wynosi: 18% dla domeny N-końcowej, 30% dla regionu zawiasowego i 18% dla domeny C-końcowej [227].

ER w stanie nieaktywnym związane są z białkami Hsp90, dzięki czemu nie wiążą się z elementami odpowiedzi na estrogeny w DNA (ERE ang. estrogen response elements) [228]. Nie powiązane z ligandem białko ER α ma krótki czas półtrwania (4-5h) i jest stale degradowane poprzez proces ubikwitynacji i proteosom [229]. Połączenie ligandu z receptorem wywołuje zmiany w konformacji 12 helisy domeny LBD i aktywacji receptora [230]. Po połączeniu receptora z ligandem dochodzi do jego dimeryzacji, translokacji do jądra komórkowego i wiązania z ERE [231]. Do aktywacji receptora może dochodzić na drodze klasycznej poprzez jego interakcje bezpośrednio z DNA lub nieklasycznie poprzez interakcje białko - białko. Klasycznie homodimer ER wiąże się z ERE, który stanowi fragment o długości 15 pz z dwoma miejscami o sekwencji PuGGTCA, oddzielnymi od siebie trzema pz [232]. ER może również wpływać na transkrypcje genów poprzez interakcję z innymi czynnikami transkrypcyjnymi takimi jak: czynnik transkrypcyjny Sp1, (Sp1, ang. specificity protein 1), czynnik transkrypcyjny AP-1 (AP-1, ang. activator protein 1) lub NF- κ B. Poprzez interakcje z powyższymi czynnikami ER α może przyczyniać się do zwiększenia proliferacji, różnicowania, przeżycia i wzrostu komórki [220]. ER może być również aktywowany w sposób niezależny od ligandu, w skutek fosforylacji reszt serynowych receptora przez czynniki wzrostu lub inne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe prowadząc do jego aktywacji [233].

Dotychczas opisano trzy izoformy ER α : ER α Δ 3 (brak 3 eksonu, kodującego częściowo domenę DBD) [234], ER α 36 (nie wykazuje aktywności transkrypcyjnych 1 i 2, a ostatecznie 138 aa zastąpione jest inną sekwencją 22 aa) [235], ER α 46 (pozbawiona pierwszych 173 aa i aktywność transkrypcyjnej 1) [236]. W przypadku ER β występują cztery izoformy: ER β cx/2, ER β 3, ER β 4 i ER β 5, które różnią się między sobą domeną C końcową i nie wiążą estrogenów [237].

Ligandami ER są małe lipofilowe cząsteczki zwane estrogenami, wyróżnić wśród nich można 17 β -estradiol, estron i estriol [238].

Receptory estrogenowe α i β różnią się pod względem profilu ekspresji w poszczególnych tkankach ludzkiego organizmu. Często pomimo występowania obu typów receptora jeden z nich wyrażany jest na wyższych poziomach ekspresji. ER α ulega ekspresji głównie w tkankach rozrodczych kobiety (macica, jajnik), piersiach, nerkach, kościach, białej tkance tłuszczowej i wątrobie, podczas gdy ekspresja ER β znajduje się w jajniku, ośrodkowym układzie nerwowym, układzie sercowo-naczyniowym, płucach, męskich narządach rozrodczych, prostatie, okrężnicy, nerkach i układzie odpornościowym [239]. Receptory regulują różne procesy fizjologiczne takie jak rozwój i prawidłowe funkcjonowanie tkanek związanych z układem płciowym kobiety. Uczestniczą także w zachowaniu homeostazy szkieletu czy regulacji metabolizmu [240].

ER α promuje również wzrost i proliferację komórek. Przyczynia się tym samym do rozwoju wielu jednostek chorobowych, w tym nowotworów [240]. Udział sygnalizacji receptora estrogenowego w progresji raka piersi jest powszechnie znany [241], ER α wykazuje ekspresję w 70% przypadków guza piersi [242], a wiele leków takich jak tamoksifen [243] czy fulwestrant [244] jest skierowane przeciwko temu receptorowi. Należy również zauważyć, że ER α zaangażowany jest w rozwój takich nowotworów jak: rak prostaty, płaskonabłonkowy rak jamy ustnej czy rak endometrium. W raku prostaty rozwój guza stymulowany jest przez estrogen działający przez ER α , którego zablokowanie wiąże się ze zmniejszeniem przerzutów do kości czy płuc [245]. W raku płaskonabłonkowym jamy ustnej ekspresję ER α stwierdza się częściej u starszych pacjentów płci męskiej, a występowanie tego receptora wiąże się często ze złośliwością tego nowotworu [246]. W komórkach raka endometrium również wykrywa się ekspresję ER α , a także odnotowuje się jej istotne statystycznie zwiększenie w przypadku raków endometrium dających przerzuty do węzłów chłonnych [247]. W przypadku raka wątroby, estrogeny i sam receptor ER α zdają się pełnić rolę protekcyjną i ograniczającą postęp rozwoju nowotworu [248].

W przypadku ER β w literaturze znany jest raczej jako supresor nowotworów. W przypadku raka jajnika poziom ekspresji ER β jest niższy niż w zdrowej tkance [249], a utrata ekspresji tego receptora wiąże się z krótszym całkowitym przeżyciem pacjentek z rakiem [250]. Donosi się również, że nie tylko ilość receptora wpływa na efekt obserwowany, ale także jego lokalizacji w komórce. W przypadku komórek raka jajnika, ER β

obserwowany jest głównie w cytoplazmie, natomiast w prawidłowych komórkach w jądrze [251]. W przypadku raka piersi obserwuje się spadek ekspresji ER β wraz z postępem choroby [252]. Ponowny wzrost ekspresji tego receptora wiąże się z spadkiem proliferacji komórek w wyniku tłumienia szlaków sygnałowych MAPK i PI3K (kinaza fosfoinozytydu 3 ang. phosphoinositide 3-kinases) [253], promowaniem apoptozy i lepszą odpowiedzią na chemioterapię [254]. W przypadku raka prostaty ER β również wykazuje coraz niższą ekspresję wraz z progresją nowotworu w wyniku metylacji jego promotora [255]. Ochronna rola ER β została również wykazana w raku okrężnicy, ER β przyczynia się bowiem do hamowania procesów zapalnych biorących udział w kancerogenezie raka jelita grubego [256].

2.3 Receptor progesteronowy

Receptor progesteronowy (PGR ang. progesterone receptor) należy do rodziny receptorów jądrowych podrodziny 3, grupy C, członek 3 (NR3C3, ang. nuclear receptor subfamily 3, group C, member 3) [257]. Loci genu kodującego PGR to 11q22.1 [258]. PGR składa się z trzech domen: N-końcowej domeny (NTD), centralnej domeny wiążącej DNA (DBD) i domeny wiążącej ligand (LBD). Domena NTD zawiera dwa regiony o funkcji aktywacyjnej w procesie transkrypcji: AF1 i AF3. W skład domeny DBD wchodzi dwa wysoce konserwatywne palce cynkowe i region zawiasowy (H). Domena LBD zawiera kolejny region o funkcji aktywacyjnej AF2 [259, 260].

Wyróżniamy dwie pierwotne izoformy PGR: PGR-A (~94 kDa) i PGR-B (~116 kDa). Izofорма PGR-B wyposażona jest w dodatkowy 164 aminokwasowy fragment nazywany segmentem B (BUS ang. B upstream). Fragment ten wchodzi w skład domeny NTD i zawiera w sobie region AF3 [261]. Izofорма PGR-A działa jako represor funkcji PGR-B [262]. Występowanie w komórce obu izoform i ich aktywacja tym samym ligandem powoduje, że o wywołanym efekcie nie decyduje obecność danej izoformy, a wzajemny stosunek tych izoform w komórce [263].

PGR znajdujący się w cytoplazmie łączy się za pośrednictwem LBD z ligandem (progesteronem) [264, 265], a następnie dimeryzuje i translokuje się do jądra komórkowego, gdzie łączy się z elementami odpowiedzi progesteronu (PRE, ang. progesterone response elements) w promotorze lub odległym wzmacniaczu docelowego genu [259, 260]. PGR poddawany jest różnym modyfikacjom potranskrypcyjnym takim jak fosforylacja, ubikwitynacja, acetylacja i 36etylacja. Procesy te wpływają na poziom ekspresji

PGR, aktywność transkrypcyjną i docelowy dobór genów, których transkrypcja jest pobudzana przez PGR [266]. PGR może również wpływać na transkrypcję genów w sposób niebezpośredni, wiążąc się z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak: AP-1, SP1, NF- κ B i aktywator przetwornika sygnału transkrypcji 3 (STAT3, ang. signal transducer and activator of transcription 3) [259]. PGR wykazuje również działania nie-genomowe poprzez aktywację kaskady kinaz rodziny SRC (ang. SRC kinase family) [267]. Pod nieobecność ligandu PGR może być fosforylowany przez mitogenne kinazy białkowe, takie jak: CDK2 (kinaza zależna od cyklin 2, ang. cyclin-dependent kinase 2), CK2 (kinaza kazeinowa 2, ang. casein kinase 2) i MAPK [268, 269]. Fosforylacja PGR zachodzi w odpowiedzi na lokalne czynniki wzrostu lub w sposób zależny od cyklu komórkowego. W środowisku silnie mitogennym jakim są nowotwory PGR może być aktywowany bez obecności ligandu jakim jest progesteron. PGR może również wpływać na transkrypcję genów poprzez zaangażowanie w lokalną i globalną trójwymiarową organizację chromatyny [270]. Progesteron pobudza proliferację w nabłonku piersi i jest uznawany za czynnik ryzyka nowotworu piersi. Rola progesteronu i jego receptora rozpatrywana jest również w nowotworach: endometrium [271], prostaty [272] i tarczycy [273].

2.4 Receptor prolaktynowy

Receptor prolaktynowy (PRLR ang. prolactin receptor) jest receptorem typu cytokinowego, należącym do podrodziny typu I, która obejmuje również receptory hormonu wzrostu, leptyny, erytropoetyny czy czynnika hamującego białaczkę [274, 275].

Prolaktyna (PRL, ang. prolactin) będąca ligandem PRLR wytwarzana jest w przednim płacie przysadki mózgowej oraz pozaprzysadkowo w gruczole sutkowym, prostatce, skórze, komórkach układu odpornościowego i wielu częściach mózgu [276, 277]. Poziom PRL może być jednak wyższy w mózgu niż ogólnoustrojowo ze względu na występowanie wstecznego przepływu krwi od przedniego płata przysadki do podwzgórza [278].

PRLR kodowany jest przez gen *PRLR* mapowany na 5p13.2 [279]. Gen *PRLR* składa się z ponad 100 Kb [280]. W skład genu *PRLR* wchodzi 11 eksonów, z których białko kodowane jest od części eksonu 3. Eksony poprzedzające tworzą 5'UTR [280]. Receptor PRL jest złożony z trzech głównych domen: domeny zewnątrzkomórkowej (EC, ang. extracellular domain), domeny transmembranowej (TM, ang. transmembrane domain) i domeny wewnątrzkomórkowej (IC, ang. intracellular domain) [275]. Domena EC PRLR składa się z dwóch subdomen (S1 i S2) zawierających siedmiopasmowy antyrównoległy

motyw fibronektyny III β arkusz [281]. Subdomena S1 zawiera dwa wysoce zachowane wiązania dwusiarczkowe (cysteiny 12 i 22 oraz cysteiny 51 i 62) [282]. Usunięcie którekolwiek z wiązań dwusiarczkowych w PRLR eliminuje zarówno aktywację za pośrednictwem ligandu [282], jak i działania biologiczne [283]. Domena TM jest wysoce konserwatywna i nie różni się pomiędzy izoformami PRLR. Domena IC PRLR zawiera bogate w prolinę motywy hydrofobowe takie jak: Box 1, Variable Box (V-Box), Box 2 i Extended Box 2 (X-Box) [284]. Zmiany w domenie IC wpływają na efekty biologiczne powstające po aktywacji receptora.

Receptor PRL istnieje w kilku izoformach wytwarzanych przez alternatywny splicing lub rozszczepienie po translacyjne. Wyróżniamy długą izoformę PRLR [285], pośrednią izoformę PRLR [285] i dwie krótkie izoformy PRLR [286]. Długa izoforma PRLR zawiera 598 reszt aminokwasowych, w tym domena EC 210 reszt aminokwasowych, domena TM 24 reszty aminokwasowe, a domena IC 364 reszty aminokwasowe [287]. Izoforma pośrednia ma masę 50 kDa, jej skrócony forma wynika z przesunięcia ramki odczytu po 312 reszcie aminokwasowej [280]. Izoforma pośrednia PRLR nie może indukować proliferacji komórek w odpowiedzi na PRL, ale może pośredniczyć w przeżyciu komórki [280]. W mleku i surowicy ludzkiej opisano również występowanie izoformy rozpuszczalnej, posiadającej tylko jedną domenę pozakomórkową o masie 33 kDa [280].

Do prawidłowej aktywacji PRLR niezbędne jest związanie dwóch cząsteczek receptora z jedną cząsteczką hormonu. Wiązanie przebiega oddzielnie dla dwóch miejsc wiązania na hormonie. Badacze nie są zgodni, czy drugie wiązanie jest możliwe dzięki zmianie konformacji miejsca przyłączenia wywołanej pierwszym połączeniem, czy jest to spowodowane interakcją pomiędzy receptorami. Przyłączenie PRL do jego receptorów wywołuje aktywację poniższych szlaków sygnałowych: JAK-STAT (kinazy janusowe, ang. janus kinase), MAPK i PI3K. Box 1 domeny IC PRLR jest konstytutywnie związany z białkiem Jak2. Po dimeryzacji PRLR białko Jak2 ulega aktywacji i fosforyluje reszty tyrozynowe na PRLR [288]. Białka Stat 5a i Stat 5b również są fosforylowane przez Jak2 i odłączają się od PRLR, by związać się z elementami GAS (elementy odpowiedzi na aktywację interferonu γ , ang. interferon- γ activation sequence) w DNA w jądrze komórkowym [289]. Powoduje to aktywację transkrypcji określonych genów, których działanie może indukować proliferację komórek, jak wykazano na liniach komórkowych raka piersi (T47D, BT-20 i MCF-7) [290, 291]. PRLR aktywuje również szlak Ras-Raf-

MAPK (Ras, nadrodzina białek Ras, ang. Ras superfamily, Raf, kinazy Raf, ang. Raf kinases), gdzie spośród kinaz MAPK PRLR aktywuje głównie MAPK1/2 i C-jun (czynnik transkrypcyjny Jun, ang. transcription factor Jun) [292, 293]. Aktywacja PRLR może hamować działanie kaspazy 3 poprzez kinazę białkową B (AKT, ang. protein kinase B) [294] hamując proces apoptozy. PRLR wpływa również na modulację cytoszkieletu i interakcję z kinazami adhezyjnymi wpływając przez to na migrację komórek [295].

Miejscowa ekspresja PRLR skorelowana jest z wyższym ryzykiem rozwoju raka piersi i prostaty [296]. Guzy piersi charakteryzują się wyższą ekspresją PRLR niż tkanka je otaczająca [297]. Ekspresja PRLR jest wyższa w guzach prostaty niż w zdrowych tkankach. Odnotowano także wyższe poziomy ekspresji w płynie pochodzącym z prostaty mężczyzn z rakiem, niż u zdrowych mężczyzn [298]. Działanie PRLR indukujące proliferację, angiogeneza i oporność na leki chemioterapeutyczne zostało potwierdzone w badaniach nad rakiem piersi [299–301].

2.5 Receptor folikulotropowy

Receptor hormonu folikulotropowego (FSHR, ang. follicle-stimulating hormone receptor) kodowany jest przez gen znajdujący się na chromosomie 2 w pozycji 2p21–p16 i ma około 190 Kb [302]. Składa się z 10 eksonów i 9 intronów o zróżnicowanej wielkości wahającej się od 69 do 1234 pb dla eksonów i od 108 do 15 kb dla intronów [302]. Pierwsze 9 eksonów koduje domenę zewnątrzkomórkową białka, a ekson 10 pozostałe domeny [302, 303]. Pierwotnie białko FSHR zbudowane jest z 695 aminokwasów, jednak po zakotwiczeniu w błonie komórkowej sekwencja sygnałowa składająca się z 17 aminokwasów jest odcinana, a funkcjonalne białko składa się z 678 aminokwasów [304]. Masa cząsteczkowo funkcjonalnego białka FSHR to około 75 kDa [304].

FSHR występuje u ludzi w 4 izoformach, których funkcję biologiczną znamy tylko w przypadku 1 i 3 izoformy [305]. FSHR-1 jest formą sprzężoną z białkiem G, FSHR-2 jest formą dominującą negatywną, FSHR-3 to czynnik wzrostu typu 1 i FSHR-4 będąca rozpuszczalną izoformą FSHR [306]. Istnieje również wariant składający się tylko z eksonów 1–8 [307].

FSHR należy do rodziny receptorów hormonu glikoproteinowego (GPHR, ang. glycoprotein hormone receptors) podgrupy 10 klasy A nadrodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR, ang. G protein-coupled receptors) [308]. FSHR podobnie jak inne

GPCR, składa się z domeny zewnątrzkomórkowej wiążącej ligand wraz z regionem związowym, domeny transbłonowej składającej się z transbłonowych 7 α -helis, 3 pętli wewnątrzkomórkowych i 3 zewnątrzkomórkowych, domeny wewnątrzkomórkowej z C-końcem białka [308]. Cechą charakterystyczną GPCR, do których obok FSHR należą receptor tyreotropiny (TSHR ang. thyrotropin receptor) i receptor lutropiny/choriogonadotropiny (LHCGR ang. luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor), jest występowanie dużej domeny zewnątrzkomórkowej składającej się z ponad 320 aminokwasów [308].

FSHR wyrażany jest głównie w tkankach i komórkach związanych z układem rozrodczym. U kobiet ulega ekspresji w komórkach ziarninowych, rozwijających się pęcherzyków w jajniku [309]. U mężczyzn jego ekspresja występuje głównie w komórkach Sertolego w kanalikach nasiennych [310, 311]. Istnieją jednak doniesienia o występowaniu FSHR także w kościach [312], monocytach [313], wątrobie [314], rozwijającym się łożysku [315], komórkach śródbłonna z żyły pępkowej [316], naczyniach krwionośnych: złośliwych guzów [317, 318] i przerzutów [319]. Należy oczywiście zaznaczyć, że w przypadku kości i monocytów opisywane są inne izoformy FSHR, niż te działające w komórkach jajnika, a ich aktywacja nie powoduje wzrostu ilości cAMP w komórkach, a wzrost transkrypcji białek sygnałowych RANKL (ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B, ang. receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) [313]. Podobnie w przypadku komórek śródbłonna z żyły pępkowej, aktywacja FSHR nie wywołuje wzrostu cAMP, a autorzy sugerują tu stymulację szlaku sygnałowego PI3K/AKT [316]. W naczyniaku dziecięcym odnotowano ekspresję FSHR oraz zauważono związek pomiędzy wzrostem tego nowotworu, a wydzielaniem FSH u pacjenta [320]. Ekspresję FSHR wykryto w naczyniach krwionośnych guzów prostaty, piersi, okrężnicy, trzustki, pęcherza moczowego, nerek, płuc, wątroby, żołądka, jąder i jajników [318], a także w mięsaku tkanek miękkich [321]. W komórkach linii raka gruczołu krokowego niezależnego od androgenów (PC-3), również odnotowano ekspresję FSHR. Autorzy wskazują na rolę FSH w stymulowaniu wzrostu. Ekspresja ta, była również wcześniej odnotowywana w komórkach niektórych normalnych ludzkich tkanek prostaty i łagodnym rozroście gruczołu krokowego (BPH, ang. benign prostatic hyperplasia), a bardziej intensywnie w większości tkanek raka prostaty (PCa, ang. prostate cancer) [322]. Wzrost ekspresji FSHR został również odnotowany w naczyniach krwionośnych zmian endometrialnych,

przy porównaniu z naczyniami krwionośnymi zdrowego endometrium [323]. Odnotowano również, że polimorfizmy w genie kodującym FSHR mogą mieć wpływ na stopień zawansowania tej choroby [324]. FSHR-3 przyczynia się do napływu jonów wapnia do komórki i aktywuje szlak MAPK w komórkach warstwy ziarnistej jajnika [325]. Linie komórkowe raka z komórek nabłonka jajnika wyrażają FSHR-3, ale nie FSHR-1. FSH wywołuje aktywację MAPK i proliferację komórek [326]. W związku z powyższym FSHR-3 może przyczyniać się do aktywności mitotycznej i proliferacji komórek.

3. Przesłanki do podjęcia pracy

Za udziałem jądrowych receptorów hormonalnych w zmianie biologii komórek glejaka przemawia fakt, iż występowanie tych nowotworów różni się istotnie u kobiet i mężczyzn [20, 27, 28]. Znacznie częściej chorują mężczyźni, a kobiety w wieku przedmenopauzalnym charakteryzują się wyższą przeżywalnością, w stosunku do kobiet w wieku pomenopauzalnym, czy mężczyzn [327–330]. Glejak jest nowotworem, którego charakterystyczny sposób wzrostu, może wywierać wpływ na tworzenie się w jednym guzie różnych linii komórkowych. Tworzy on bowiem podczas naciekania zdrowych tkanek swego rodzaju długie wypustki [331]. Ograniczony dostęp do składników odżywczych i tlenu, w niektórych częściach guza, wpływa na powstanie w guzie obszarów martwicy [332]. W wyniku czego, w samym guzie powstają różniące się od siebie struktury. Dotychczas prowadzone badania nad receptorami hormonalnymi w glejaku dotyczyły linii komórkowych, tkanek pochodzących od pacjentów lub zwierząt laboratoryjnych. Badania na tkankach traktują guz nowotworowy jako całość, natomiast hodowle komórkowe nie oddają różnorodności i przestrzennej zmienności linii komórkowych w guzie. W związku z tym potrzebne są badania, które pozwolą określić różnice pomiędzy ekspresją jądrowych receptorów hormonów płciowych w poszczególnych obszarach guza.

CEL PRACY

Celem przeprowadzonych badań było określenie ekspresji receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach guza GBM, a także sprawdzenie wpływu warunków panujących w guzie na ekspresję receptorów zależnych od hormonów płciowych *in vitro*.

Cele szczegółowe

1. Sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) w poszczególnych strukturach guza (rdzeń, kora, obrzeże guza).
2. Sprawdzenie różnic w ekspresji genów i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) w poszczególnych strukturach guza (rdzeń, kora, obrzeże guza) u kobiet i mężczyzn.
3. Sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) w różnych warunkach występujących w guzie (warunki nekrozy, hipoksji, niedoboru składników odżywczych) w modelu *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek glioblastoma astrocytoma (U87).

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Model badawczy i materiał badany

1.1 Model badawczy

W badaniu zastosowano dwa modele badawcze. Pierwszy wykorzystywał materiał pochodzący z różnych struktur guza GBM od pacjentów. Miał on za zadanie wykazać różnice w ekspresji receptorów płciowych pomiędzy różnymi strukturami guza zarówno na poziomie genu jak i białka. Drugi model badawczy, model *in vitro*, został stworzony w celu sprawdzenia czy analizowane czynniki wpływają na ekspresję badanych receptorów. Sztucznie wywołano w nim warunki imitujące czynniki, które mogą wpływać na ekspresję badanych receptorów i są czynnikami występującymi przy wzroście guza. Założono, że zastosowanie tych dwóch modeli badawczych umożliwi wnioskowanie, o przyczynie zmiany ekspresji danych receptorów płciowych w poszczególnych strukturach GBM.

1.2 Materiał pochodzący od pacjentów

Materiał biologiczny pochodzący od pacjentów pozyskano od osób ze zdiagnozowanym guzem mózgu, potwierdzonym przez badanie neuroobrazowe (rezonans magnetyczny lub tomografię komputerową) oraz wynikiem badania histopatologicznego wskazującym GBM. Projekt uzyskał wszystkie niezbędne zgody wymagane prawem krajowym i międzynarodowym dla tego typu badań (Załącznik numer 1). Do projektu włączonych zostało 28 pacjentów w tym 16 mężczyzn i 12 kobiet. Pacjenci byli w wieku od 36 do 81 lat. Wszyscy pacjenci przed operacją otrzymali „Informację dla pacjenta” na temat prowadzonego projektu, formularz pisemnej zgody, a następnie ankietę dotyczącą stanu zdrowia pacjenta (Załącznik numer 2). Dodatkowo, każdy pacjent został pouczony o dobrowolności udziału w projekcie i jego nieodpłatności. Pacjenci byli kwalifikowani do operacji według procedur obowiązujących w klinice (kwalifikacja chirurgiczna i anestezyjologiczna) bez względu na udział w projekcie. Pacjenci poddani zostali standardowej procedurze anestezyjologicznej obejmującej znieczulenie ogólne z zastosowaniem intubacji dotchawicznej.

Materiał został pozyskany przy przeprowadzaniu resekcji chirurgicznej guza zalecanej dla pacjentów na podstawie standardów leczenia dla postawionej diagnozy GBM. Podczas operacji kraniektomii, resekcja guza wykonana została w sposób klasyczny obejmujący: zdjęcie kości i opon mózgowych, następnie uwidocznienie i resekcję guza,

w dalszej kolejności zaszcycie opon mózgowych, a następnie zaszcycie tkanek podskórnych i skóry. Materiał pobrany do badań naukowych stanowiły próby pobrane z trzech obszarów guza: niewzrastającego rdzenia guza obejmującego głównie obszary martwicy, kory guza, czyli strefy guza rosnącego i obrzeża guza. Wyszczególnione obszary guza stosowane są zarówno w praktyce klinicznej, jaki i w badaniach naukowych. Pewność właściwej identyfikacji poszczególnych części guza, zapewniło zastosowanie metody neuronawigacji podczas operacji. Neuronawigacja polegała na wykonaniu, jeszcze przed operacją, mapowania chorego mózgowia poprzez wykonanie serii cienkich warstw axialnych 1.5 mm, przy użyciu rezonansu magnetycznego (1.5 i 3 Tesli). Uzyskane wyniki wprowadzono do urządzenia neuronawigacyjnego, by podczas operacji możliwe było określenie pozycji znakowanych narzędzi chirurgicznych w odniesieniu do tkanki nowotworowej. Dokładność tej techniki, oceniana jako 1-2 mm, pozwoliła wykonać w sposób bezpieczny i wiarygodny resekcję guza. Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej.

Płeć	Kobiety		Mężczyźni		Brak danych
	10		14		-
Rodzaj pracy	Fizyczna		Umysłowa		Brak danych
	13		7		4
Palenie tytoniu	Tak		Nie		Brak danych
	17		4		3
Miejsce zamieszkania	Wieś	Miasto <10 tysięcy	Miasto 10-100 tysięcy	Miasto >100 tysięcy	Brak danych
	3	4	4	9	4
	Średnia		Minimum	Maksimum	Odch. std
Wiek	61.78		41	81	11.65
Wzrost	171.87		147	196	11.50
BMI	28.99		21.48	38.87	4.66

1.3 Hodowla komórkowa

Materiał biologiczny do modelu in vitro pozyskano z hodowli komórkowych, ludzkich komórek nowotworowych mózgu (glioblastoma astrocytoma, linia U87), poddanych

określonym warunkom hodowli w celu sprawdzenia wpływu wybranych czynników na biologię tej linii glejaka. Linię komórkową zakupiono z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Porton Down, Salisbury, Wielka Brytania). Komórki hodowano w pożywce standardowej, której skład przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 2). Hodowla prowadzona była w temperaturze 37°C, 95% wilgotności powietrza i 5% stężeniu CO₂.

Tabela 2. Skład pożywek hodowlanych stosowanych w doświadczeniu.

Pożywka standardowa	Pożywki testowe		
	Warunki nekrozy	Warunki hipoksji	Warunki niedoboru składników odżywczych
EMEM (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)			
10% FBS (cielęca surowica płodowa, ang. fetal bovine serum) (Gibco Limited Brigg, Wielka Brytania)			
100 U/ml penicylina and 100 µg/ml streptomycyna (Gibco Limited, Brigg, Wielka Brytania)			
1% non-essential amino acid (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)			
2 mM l-glutamina (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)			0,2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)
1 mM pirogronianu sodu (Sigma-Aldrich)			Bez pirogronianu sodu
-	200 µM nadtlenku wodoru (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	100 µM chlorku kobaltu (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska)	-

W celu sprawdzenia jak badane warunki wpływają na ekspresje analizowanych receptorów w tej linii, wykonano doświadczenie polegające na sztucznym zaindukowaniu warunków w hodowli glejaka. Komórki linii U87 wysiano na płytkę 6-dołkową (Nest, Scientific Biotechnology, Wuxi, Jiangsu, China) gęstością 20 tysięcy/cm², a następnie hodowano przez 72 h w standardowej pożywce, uzyskując odpowiednią konfluencję w każdym dołku hodowlanym (70-80%). Następnie podano komórkom pożywki testowe.

W tym celu najpierw odciążnięto stare pożywki hodowlane i delikatnie, trzykrotnie przemyto komórki ciepłym (37°C) roztworem PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanami ang. phosphate buffered saline, SigmaAldrich, Poznań, Polska). W kolejnym etapie, do prób badanych podano wcześniej przygotowane media testowe, a do próby kontrolnej standardową pożywkę i hodowano przez 24 h. Skład pożywek testowych podano w tabeli powyżej (Tabela 2).

Kolejne etapy różniły się w zależności od przeznaczenia prowadzonej hodowli. Materiał wykorzystany do badań ekspresji genów i białek (metody Real time PCR i ELISA (test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)) pozyskany został poprzez odklejenie komórek od podłoża z zastosowaniem trypsyny (0,25% roztwór trypsyna-EDTA (wersenian disodowy, ang. ethylenediaminetetraacetic acid), Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Następnie komórki odwirowano (25 °C, 300 G, 5 min), supernatant odrzucono, komórki przepłukano ciepłym roztworem PBS i ponownie odwirowano (25 °C, 300 G, 5 min). Uzyskane w ten sposób pelety komórkowe zostały zamrożone w -80 °C i wykorzystane do dalszych analiz. Hodowle w celu przeprowadzenia analiz z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej, prowadzono na płytkach 6-dołkowych, w których wcześniej umieszczono szkiełka pokryte polilizyną (Poly-L-lysine solution, 0.01%, sterile-filtered, BioReagen, SigmaAldric, Poznań, Polska). Po inkubacji z mediami testowymi, komórki przemyto ciepłym roztworem PBS, a następnie zalano 4% buforowanym roztworem formaldehydu o pH 6.9 (SigmaAldrich, Poznań, Polska) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 min, w celu utrwalenia preparatów. Dalej kolejno odciążnięto formalinę i trzykrotnie przemyto komórki ciepłym roztworem PBS. Tak uzyskane preparaty wysuszone pod komorą laminarną i zabezpieczono do analiz.

2. Metody badawcze

2.1 Analiza ekspresji genów receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach glejaka wielopostaciowego i komórkach linii U87 poddanych działaniu badanych czynników metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

W celu oznaczenia relatywnej ekspresji genów kodujących (*AR*, *PGR*, *ESR1*, *ESR2*, *PRLR*, *FSHR*) badane receptory przeprowadzono analizę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). W tym celu wyizolowano mRNA z badanego materiału z zastosowaniem zestawów RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen,

Hilden, Niemcy) dla 50–100 mg próbek tkanek i zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) dla 2×10^6 komórek linii komórkowej U87. Procedura została wykonana zgodnie z instrukcją producenta, a czystość i stężenie wyizolowanego mRNA została określona przy pomocy spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA). W dalszym etapie wykonano odwrotną transkrypcję w celu przepisania materiału genetycznego z mRNA na cDNA. W tym celu zastosowano zestaw FirstStrand i starterów oligo-dT (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). W celu sprawdzenia ekspresji badanych genów wykorzystano zestaw odczynników Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA). Analizę przeprowadzono na aparacie ABI 7500.

Zastosowane sekwencje primerów podano poniżej:

AR: CCAGGGACCATGTTTTGCC |CGAAGACGACAAGATGGACAA

PGR: ACCCGCCCTATCTCAACTACC |AGGACACCATAATGACAGCCT

PRLR: TCTCCACCTACCCTGATTGAC|CGAACCTGGACAAGGTATTT

ER α : CCCACTCAACAGCGTGTCTC |CGTCGATTATCTGAATTTGGCCT

ER β : AGATTCCCGGCTTTGTGGAG |GAGCAAAGATGAGCTTGCCG

FSHR: TCTGTCACTGCTCTAACAGGG |TGCACCTTTTTGGATGACTCG

Profil termiczny reakcji zastosowany w analizie: 95 °C (15 sekund), 40 cykli w 95 °C (15 sekund) i 60 °C (60 sekund). Pomiar powtórzono dwukrotnie (powtórzenia techniczne) dla każdej analizowanej próbki. Do dalszej analizy wykorzystano średnie wartości Ct. Poziom ekspresji genu w próbce został znormalizowany do poziomów endogennej kontroli genu GAPDH. Gen referencyjny został wybrany na podstawie danych literaturowych [335–337].

Analizę przeprowadzono na materiale pochodzącym od pacjentów w trzech strukturach guza i na materiale z linii komórkowej hodowanej w czterech rodzajach warunków hodowlanych.

2.2 Analiza ekspresji białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach glejaka wielopostaciowego i komórkach linii U87 poddanych działaniu badanych czynników przy użyciu testów immunoenzymatycznych

W celu przeprowadzenia analiz białkowych badany materiał poddano homogenizacji, której przebieg był różny w zależności od przetwarzanego materiału. Procedura dla tkanek pochodzących od pacjentów polegała na nożowej homogenizacji około 1 cm³

tkanki w 1 ml zimnego PBS (0.01M, pH=7.4) (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) zawierającego inhibitory proteinaz (PhosSTOP i cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Cały proces prowadzony był temperaturze około 4 °C. Uzyskany w ten sposób materiał poddano procesowi sonifikacji. W przypadku materiału pochodzącego z hodowli linii komórkowej U87, homogenizacji nożowej poddano pelety zawierające 2×10^6 komórek zawieszonych w 0,5 ml komercyjnego buforu RIPA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zawierającego inhibitory proteinaz (PhosSTOP i cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie przetworzony w ten sposób materiał, poddano procesowi zamrażania i rozmrażania. W kolejnym etapie próbki pochodzące od pacjentów i te uzyskane z hodowli poddano wirowaniu (5 minut, 5000×g), w celu uzyskania supernatantu. W dalszym etapie wykonano oznaczenie stężenia białka całkowitego w supernatancie przy użyciu MicroBCAPierce™ (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Na podstawie oznaczonych wartości dokonano rozcieńczenia pozyskanego supernatantu, w celu otrzymania mieszaniny o stężeniu końcowym nie większym niż 0,3 mg/ml. Po rozcieńczeniu ponownie dokonano oznaczenia stężenia białka całkowitego w rozcieńczonym materiale. Oznaczenia stężeń poszczególnych receptorów dokonano z użyciem komercyjnych zestawów testów ELISA (FineTest, Wuhan, Chiny):

- Human AR ELISA Kit 9 (EH0033),
- Human PGR ELISA Kit (EH1449),
- Human PRLR ELISA Kit (EH15147),
- Human ER α ELISA Kit (EH0033),
- Human ER β ELISA Kit (EH3015),
- Human FSHR ELISA Kit (EH3088).

Wyniki odczytano przy użyciu czytnika do płytek (BiochromAsys UVM 340). Uzyskane wartości przeliczono na ilość białka całkowitego. Analizę przeprowadzono na materiale pochodzącym od pacjentów w trzech strukturach guza i na materiale z linii komórkowej hodowanej w czterech rodzajach warunków hodowlanych.

2.3 Analiza ekspresji białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach glejaka wielopostaciowego metodą immunohistochemii

Fragmenty guzów po pobraniu były przetrzymywane w 4% roztworze formaldehydu, w celu ich utrwalenia przez 24 godziny. Następnie tkanki guza zostały poddane

odwodnieniu w szeregu odwadniającym składającym się z: absolutnego etanolu, absolutnego etanolu z ksylenem zmieszanych w stosunku 1:1 i ksylenu. Po odwodnieniu materiał zatopiono w bloczkach parafinowych. Materiał zabezpieczony w postaci bloczków parafinowych został uzyskany z Katedry i Kliniki Neurologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie oraz Katedry i Zakładu Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie.

W celu przeprowadzenia dalszych badań bloczki zostały pocięte przy użyciu mikrotomu (340E Electronic Rotary Microtome, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a skrawki w ten sposób uzyskane zostały umieszczone na szkiełkach podstawowych pokrytych polilizyną (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Następnie preparaty zostały odparafinowane w ksylenie i uwodnione w szeregu malejących stężeń etanolu. W dalszej kolejności poddane zostały dwukrotnemu gotowaniu w 10 mM buforze cytrynianowym o pH 9,0 (Dako Inc., Carpinteria, CA, USA) przez 4 i 3 minuty w kuchence mikrofalowej (700 W). Po gotowaniu preparaty ochłodzono i przemyto PBS (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Endogenną peroksydazę zablokowano przy użyciu odczynnika do blokowania peroksydazy z zestawu Dako LSAB + System-HRP (Dako Inc., Carpinteria, CA, USA) w temperaturze pokojowej przez 10 min. W dalszym etapie skrawki inkubowano przez całą noc z przeciwciałami: PGR Antibody (sc-810, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), ER α Antibody (sc-8005, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), ER β Antibody (sc-390243, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), AR Antibody (sc-7305, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), PRL-R Antibody (sc-377098, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), FSH-R Antibody (ab150557-50, Abcam, Cambridge, UK) w celu ich uwidocznienia w preparacie. Stężenie dla przeciwciał przeciwko: PR, ER α , ER β , AR, PRL-R wynosiło 4 μ g/ml, natomiast przeciwciała przeciwko FSHR 10 μ g/ml i zostały dobrane zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie preparaty podano barwieniu systemem awidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa z diaminobenzydyną jako chromogenem przy zastosowaniu zestawu Dako LSAB + System-HRP (Dako Inc., Dako Inc., Carpinteria, CA, USA). Preparaty podbarwiono również hematoksyliną (Chempur, Piekary Śląskie Polska) w celu uwidocznienia cytoplazmy i jader komórkowych. Zdjęcia preparatów wykonano przy zastosowaniu mikroskopu świetlnego (Leica DM5000 B, Wetzlar, Niemcy) zintegrowanego z kamerą.

Analizy przeprowadzono dla receptorów: AR (NR3C4), PGR (NR3C3), ER α (NR3A1), ER β (NR3A2), PRLR, FSHR w przykładowych preparatach wykonanych ze skrawków guza pochodzącego od pacjenta zakwalifikowanego do badania.

2.4 Wizualizacja receptorów płciowych w komórkach linii U87 wykonana za pomocą mikroskopii konfokalnej

Utrwalone preparaty z hodowli komórkowej przepłukano roztworem PBS (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska) i permeabilizowano komórki przez 20 minut w 0,5% roztworze TRITON X100 (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska). Następnie przy użyciu PBS odpłukano detergent i inkubowano szkiełka z surowicą blokującą (2,5% surowica końska w PBS (Thermo-Fischer, Waltham, MA, USA) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi: PGR Antibody (sc-810, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), ER α Antibody (sc-8005, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), ER β Antibody (sc-390243, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), AR Antibody (sc-7305, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), PRL-R Antibody (sc-377098, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), FSH-R Antibody (ab150557-50, Abcam, Cambridge, UK) w odpowiednim rozcieńczeniu przez godzinę w temperaturze pokojowej, w komorze wilgotnej. W dalszym etapie przeciwciało I-rzędowe zostało wypłukane przy użyciu roztworu PBS. Następnie inkubowano komórki z przeciwciałem II-rzędowym połączonym z fluorochromem (FITC, MerckMillipore, Poznań, Polska), przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w komorze wilgotnej, w ciemności, w celu uwidocznienia ich w komórkach. Ponownie opłukano szkiełka w PBS i inkubowano z DAPI (MerckMillipore, Poznań, Polska) przez 20 minut w temperaturze pokojowej w celu wizualizacji jąder komórkowych. Tak przygotowane preparaty, po ostatecznym płukaniu w PBS, zamknięto w medium do fluorescencji (Dako, Glostrup, Hovedstaden, Denmark) w celu wydłużenia ich trwałości. Preparaty poddano ocenie mikroskopowej w systemie mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Hamburg, Germany) połączonej z mikroskopem odwróconym IX81 (Olympus, Hamburg, Germany). Obrazy zarejestrowano wielokanałowo: laser 488nm dla FITC oraz dioda laserowa 405nm dla DAPI.

Analizy przeprowadzono dla receptorów: AR (NR3C4), PGR (NR3C3), ER α (NR3A1), ER β (NR3A2), PRLR, FSHR w 4 warunkach badanych.

2.5 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu Statistica 13 software. Analizie statystycznej poddano wyniki relatywnej ekspresji genów kodujących badane receptory, uzyskane z analizy ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*qRT-PCR*) oraz ilość białka badanych receptorów, przeliczone na mg białka całkowitego w próbce oznaczone przy użyciu testów ELISA. W pracy wykorzystano dwa modele badawcze, które analizowano oddzielnie.

Model komórkowy: w pierwszej kolejności wykonano test Shapiro–Wilka, którego wyniki wskazywały na rozkłady normalne we wszystkich analizowanych grupach, zarówno dla ekspresji genu jak i białka. W dalszej kolejności wykonano T test, w celu porównania badanych warunków z wynikami pozyskanym z kontroli.

Model na tkankach pacjentów: zastosowano Shapiro–Wilk test. Wyniki wykazały, w przewarżającej części rozkłady niezgodne z rozkładem normalnym, w związku z powyższym zastosowano test U Manna-Whitneya do porównania tożsamyh struktur pomiędzy płciami oraz test rangowanych znaków Wilcoxona, do porównania pomiędzy strukturami w obrębie płci i bez jej uwzględnienia. Wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

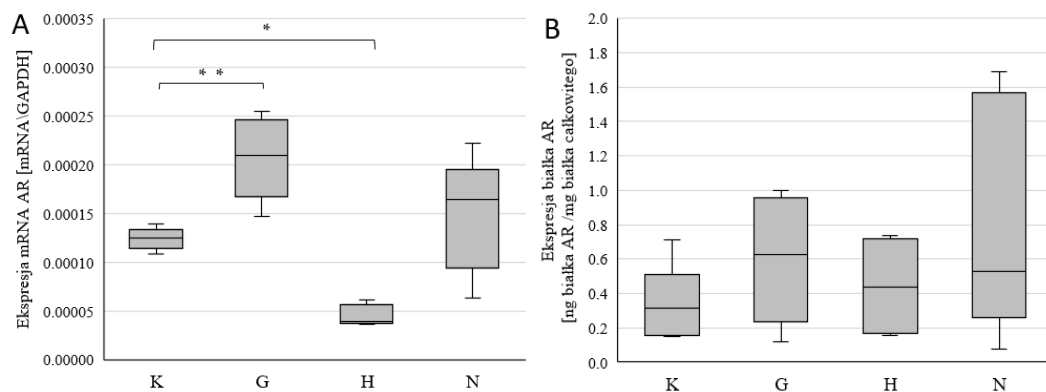
WYNIKI

1. Receptor androgenowy

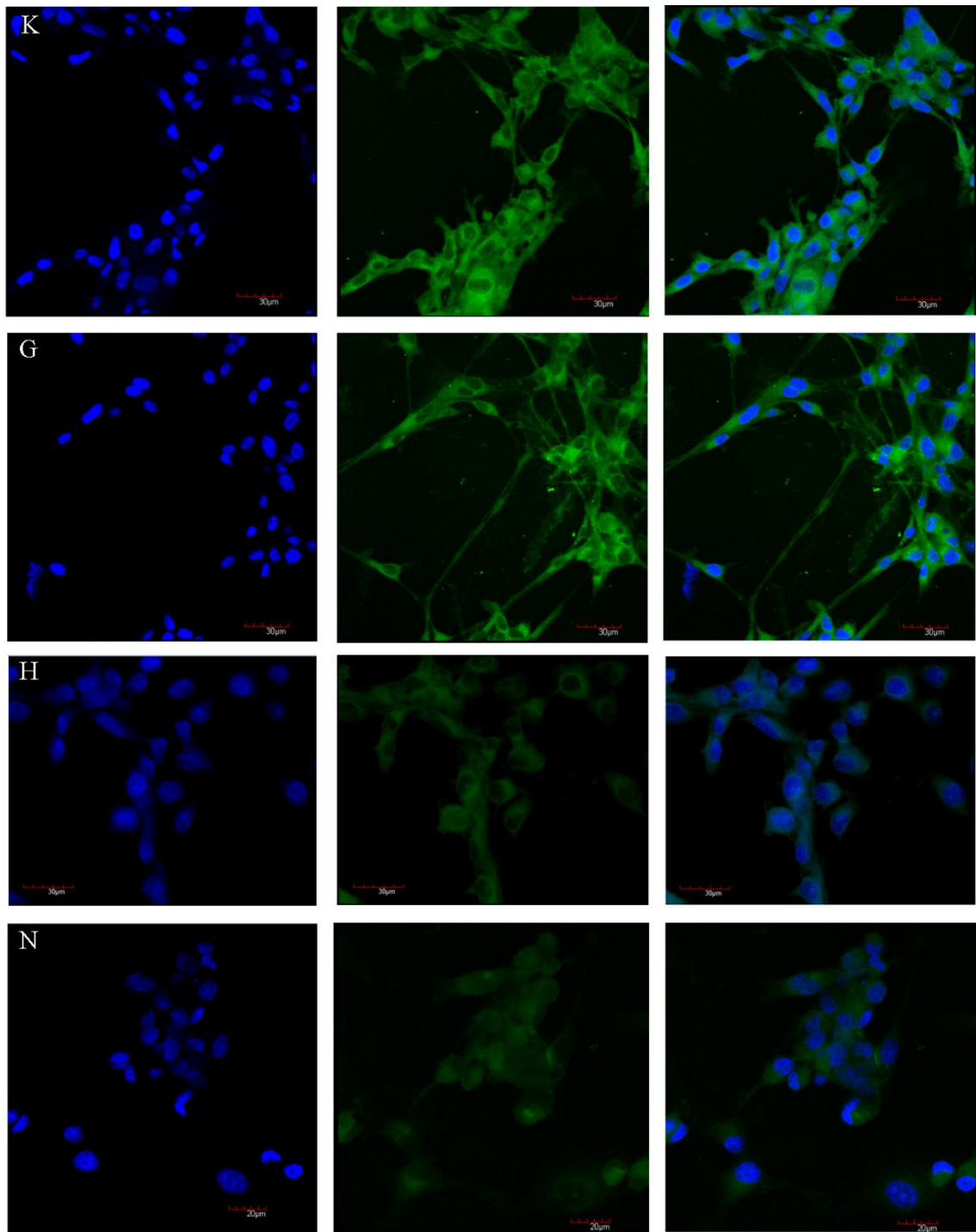
1.1 Ekspresja receptora androgenowego w modelu *in vitro*, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy

Ekspresja mRNA AR w komórkach hodowanych w warunkach niedoboru składników odżywczych była istotnie statystycznie wyższa ($p < 0,005$) niż ekspresja mRNA AR w komórkach hodowanych w warunkach kontrolnych, o średnio 150% (Rycina 3A). W warunkach niedotlenienia ekspresja mRNA AR była istotnie statystycznie niższa ($p < 0,0000005$) i stanowiła około 34% ekspresji oznaczonej w warunkach kontrolnych (Rycina 3A). Nie zaobserwowano natomiast istotnej statystycznie zmiany ekspresji mRNA AR w komórkach hodowanych w warunkach nekrozy (Rycina 3A).

Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie zmian w ekspresji białka AR pomiędzy warunkami badanymi (Rycina 3B). Średnia ekspresja białka AR dla wszystkich warunków badanych wynosiła 0,62 ng/mg białka całkowitego. Wyniki potwierdzono metodą mikroskopii konfokalnej, również nie wykazując różnic w ekspresji białka AR (Rycina 4). Świecenie obserwowane było w całej objętości komórki z jego nasileniem w okolicach jądra komórkowego.



Rycina 3. Ekspresja mRNA genu AR (A) i białka AR (B) w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu T, * $p < 0,0000005$, ** $p < 0,005$.

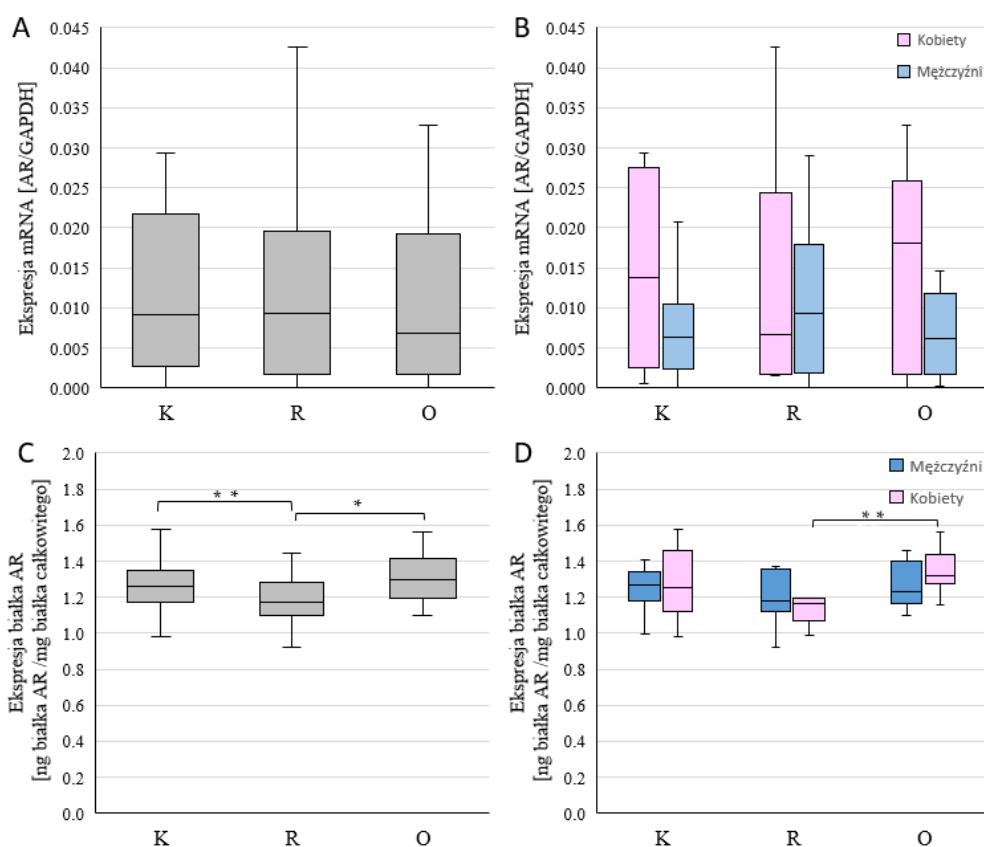


Rycina 4. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka AR w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x20 (K, G, N) x40 (H) i skali 20µm (K, G, N) oraz 30µm (H).

1.2 Ekspresja receptora androgenowego w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego

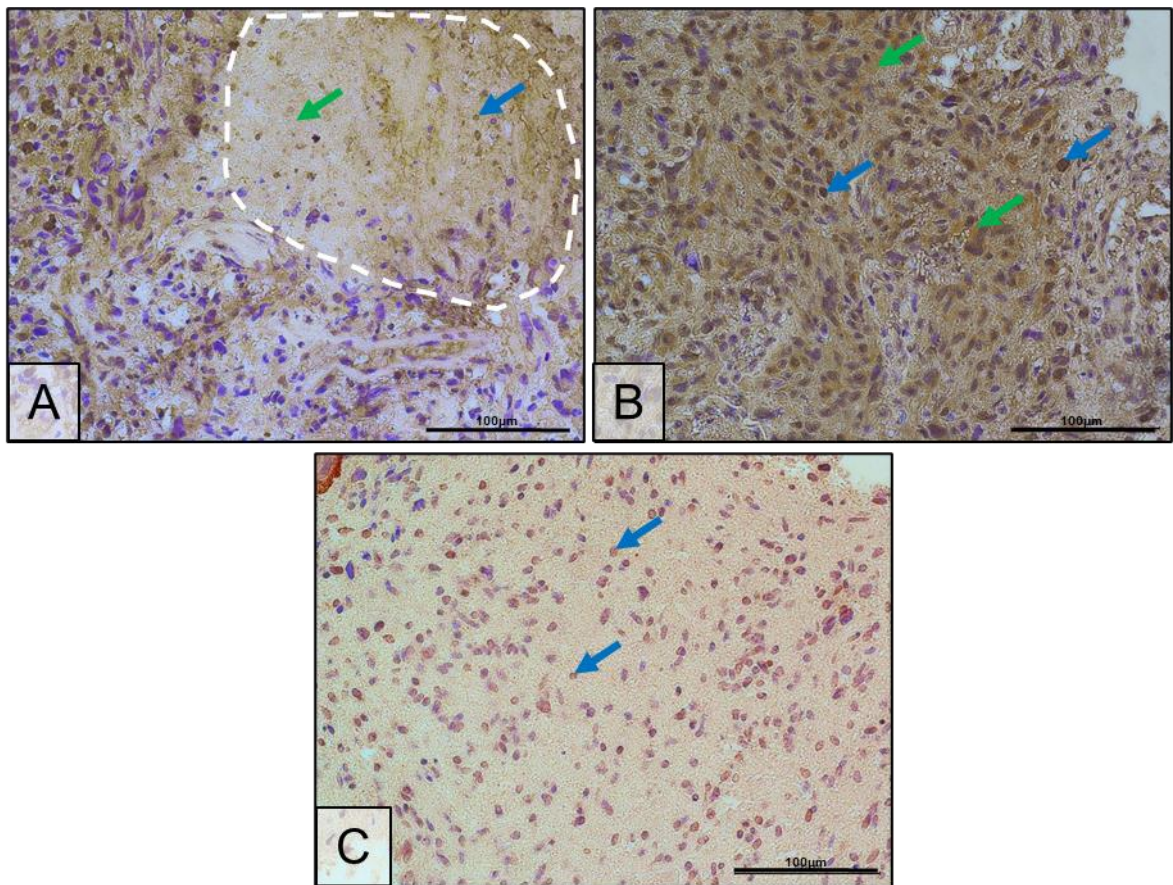
Ekspresja mRNA AR nie różniła się pomiędzy badanymi strukturami guza GBM (Rycina 5A), jak i pomiędzy płciami w obrębie jednej struktury (Rycina 5B). Średni poziom ekspresji mRNA AR wynosił 0,01417 [AR/GAPDH].

Ekspresja białka AR różniła się istotnie statystycznie pomiędzy rdzeniem guza, a korą guza przed uwzględnieniem płci ($p < 0,05$) z wyższą ekspresją białka AR w korze o średnio 109% (Rycina 5C). Przed uwzględnieniem płci, ekspresja białka AR w obrzeżu guza również była wyższa niż w rdzeniu guza, średnio o 113%. Różnica była istotna statystycznie ($p < 0,01$) (Rycina 5C). Po uwzględnieniu płci ekspresja białka AR u kobiet była istotnie statystycznie wyższa w obrzeżu niż w rdzeniu guza, o średnio 120% ($p < 0,05$) (Rycina 5D).



Rycina 5. Ekspresja mRNA genu AR (A, B) i białka AR (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnianiem płci (B, D). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu rangowanych znaków Wilcoxon, * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

Wyniki badań immunohistochemicznych potwierdziły rezultaty badań ekspresji białka metodą ELISA. Rycina 6. przedstawia lokalizację i ekspresję białka AR w poszczególnych rejonach guza. Ekspresję receptora zlokalizowano zarówno w jądrze komórkowym jak i w cytoplazmie komórek (Rycina 6, strzałki niebieskie i zielone). Najwyższą ekspresję receptora zaobserwowano w aktywnie dzielącej się części guza, czyli w korze guza (Rycina 6B). W obrzeżu guza ekspresja receptora była niższa i była zlokalizowana głównie w jądrach (Rycina 6C).



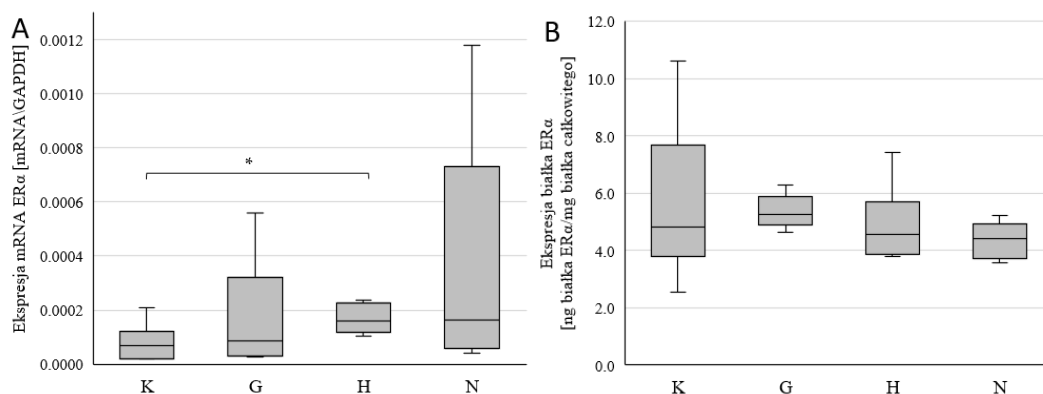
Rycina 6. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka AR w nie-wzrastającym rdzeniu guza (A, białą przerywaną linią zaznaczono obszar martwicy), korze guza (B) i obrzeżu guza (C) zdiagnozowanego jako GBM. Pozytywny wynik reakcji IHC – brązowy odczyn zaznaczony strzałkami: niebieskimi – jądro z dodatnią reakcją barwną, zielonymi – cytoplazmatyczną dodatnią reakcją barwną. Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x40 i skali 100 μm .

2. Receptory estrogenowe: receptor estrogenowy α i receptor estrogenowy β

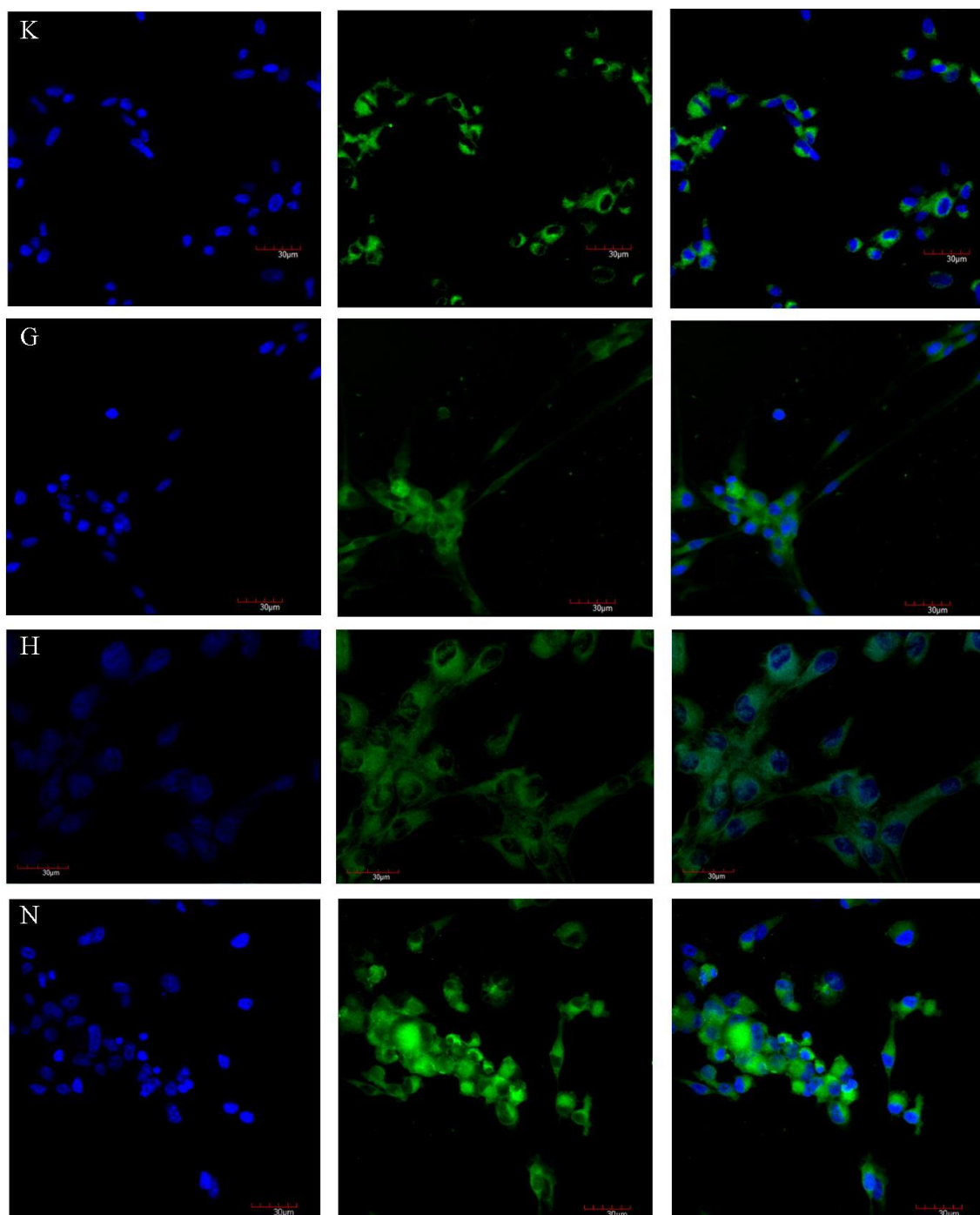
2.1 Ekspresja receptora estrogenowego α w modelu *in vitro*, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy

W komórkach hodowanych w warunkach hipoksji zauważono średnio 300%, istotny statystycznie wzrost ($p < 0,005$) ekspresji mRNA $ER\alpha$ w stosunku do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych (Rycina 7A). W pozostałych warunkach nie odnotowano znaczących różnic.

Białko $ER\alpha$ było wyrażane na podobnym poziomie we wszystkich badanych warunkach hodowlanych i nie odnotowano istotnych statystycznie zmian (Rycina 7B). Średnia ekspresja białka $ER\alpha$ dla wszystkich warunków badanych wynosiła 5,07 ng/mg białka całkowitego. Analiza zdjęć hodowli komórkowych wykonanych w systemie mikroskopii konfokalnej pozwoliła wyciągnąć podobne wnioski. Świecenie w przypadku $ER\alpha$, również obserwowane było w całej objętości komórki z nasileniem w okolicach jądra komórkowego (Rycina 8).



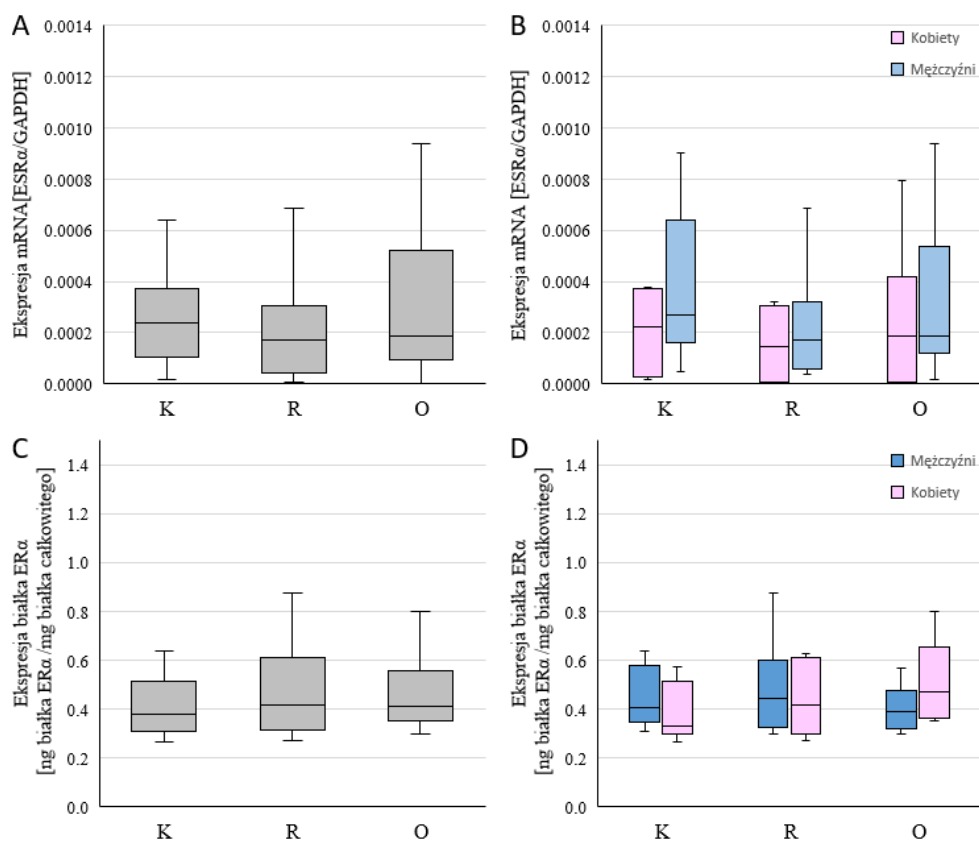
Rycina 7. Ekspresja mRNA genu $ER\alpha$ (A) i białka $ER\alpha$ (B) w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu T, $*p < 0,005$.



Rycina 8. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka ER α w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x20 (K, G, N) x40 (H) i skali 30 μ m.

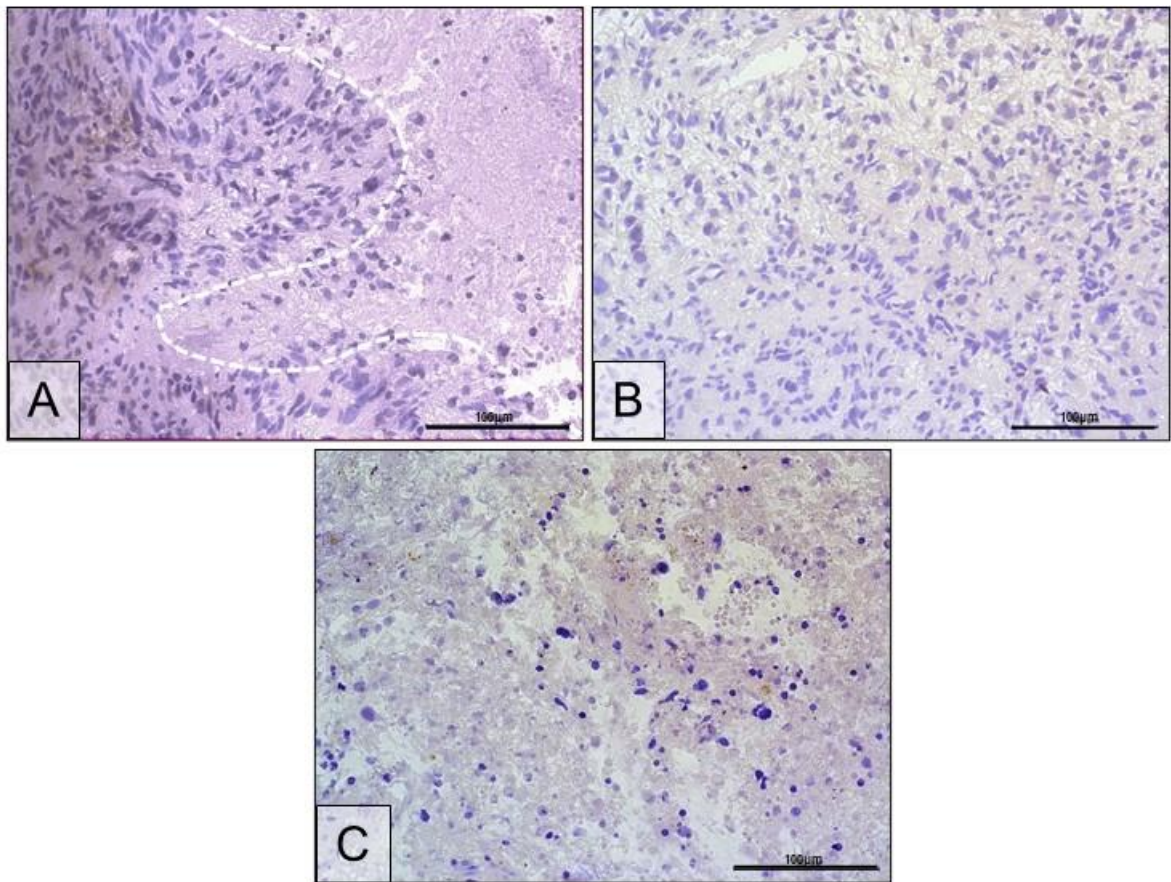
2.2 Ekspresja receptora estrogenowego α w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego

Ekspresja mRNA $ER\alpha$ (Rycina 9A i 9B) i białka $ER\alpha$ (Rycina 9C i 9D) nie różniła się pomiędzy strukturami wśród kobiet i mężczyzn, jak i pomiędzy płciami w obrębie jednej struktury. Średni poziom ekspresji mRNA $ER\alpha$ wynosił 0,00025 [$ER\alpha$ /GAPDH], natomiast białka $ER\alpha$ 0,45 ng/mg białka całkowitego.



Rycina 9. Ekspresja mRNA genu $ER\alpha$ (A, B) i białka $ER\alpha$ (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnieniem płci (B, D). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot.

W badaniu immunohistochemicznym, nie odnotowano ekspresji białka receptora ER α w rdzeniu, korze i obrzeżu guza (Rycina 10).

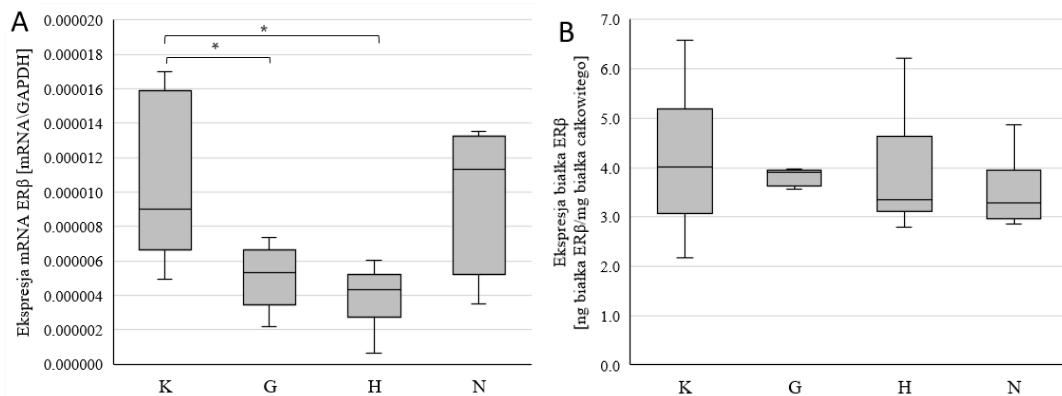


Rycina 10. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka ER α w niewzrastającym rdzeniu guza (A, białą przerywaną linią oddzielono obszar martwicy (prawa strona) i obszar kory guza (lewa strona)), korze guza (B) i obrzeżu guza (C) zdiagnozowanego jako GBM. Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x40 i skali 100 μ m.

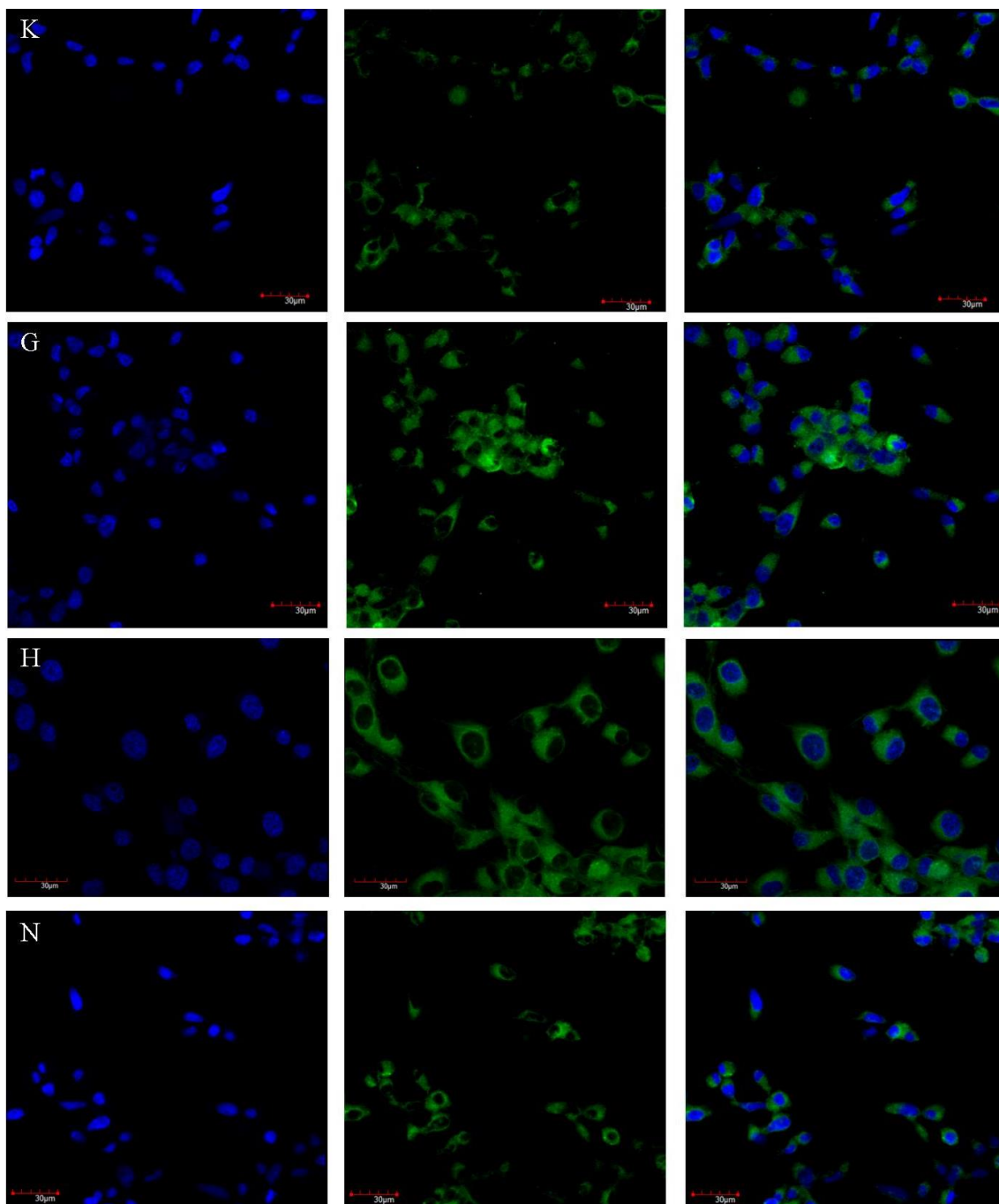
2.3 Ekspresja receptora estrogenowego β w modelu *in vitro*, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy

Odnotowano istotny statystycznie spadek ekspresji mRNA *ER β* zarówno w warunkach hipoksji ($p < 0,05$), jak i w warunkach niedoboru składników odżywczych ($p < 0,05$) (Rycina 11A). W obu przypadkach ekspresja mRNA *ER β* stanowiła średnio około 50% ekspresji kontroli. Nie zauważono zmian w ekspresji mRNA tego receptora w warunkach nekrozy.

Nie zaobserwowano również zmian w ekspresji białka *ER β* pomiędzy poszczególnymi warunkami badanymi (Rycina 11B). Średnia ekspresja białka *ER β* dla wszystkich warunków badanych wynosiła 3,82 ng/mg białka całkowitego. Mikroskopia konfokalna potwierdziła wyniki uzyskane metodą ELISA. Stopień świecenia nie różnił się pomiędzy poszczególnymi warunkami badanymi (Rycina 12). Największe natężenie świecenia zlokalizowane było wokół jądra komórkowego, ale występowało również w cytoplazmie komórek.



Rycina 11. Ekspresja mRNA genu *ER β* (A) i białka *ER β* (B) w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu T, $*p < 0,05$.

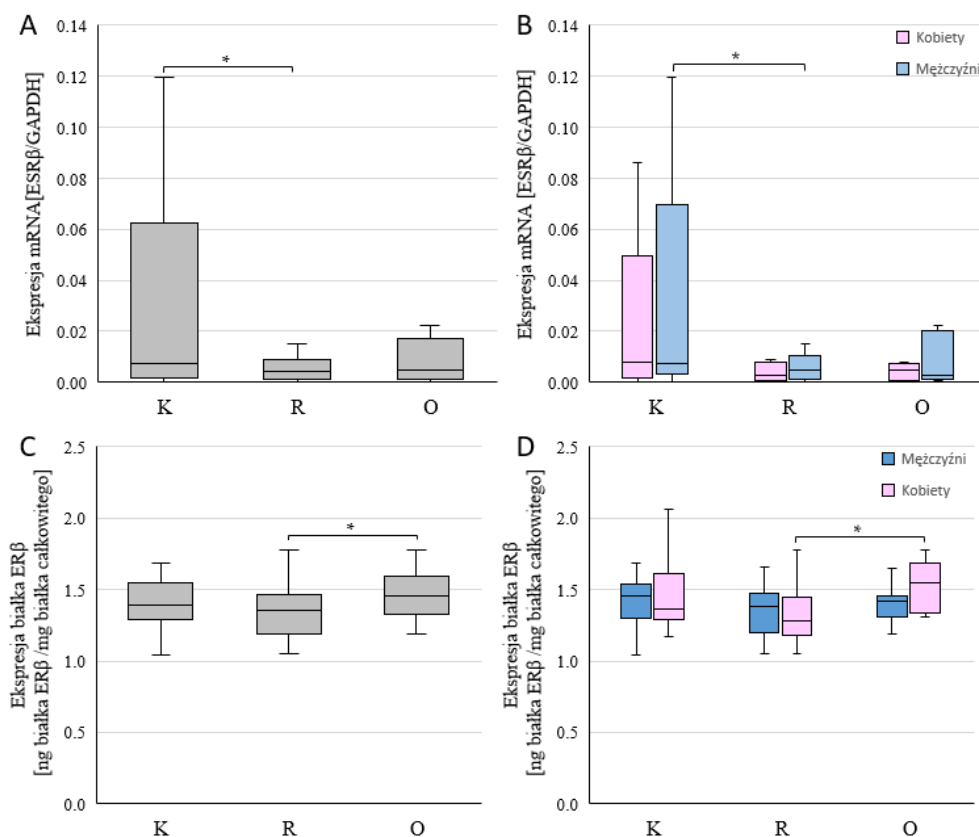


Rycina 12. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka ER β w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x20 (K, G, N) x40 (H) i skali 30 μ m.

2.4 Ekspresja receptora estrogenowego β w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego

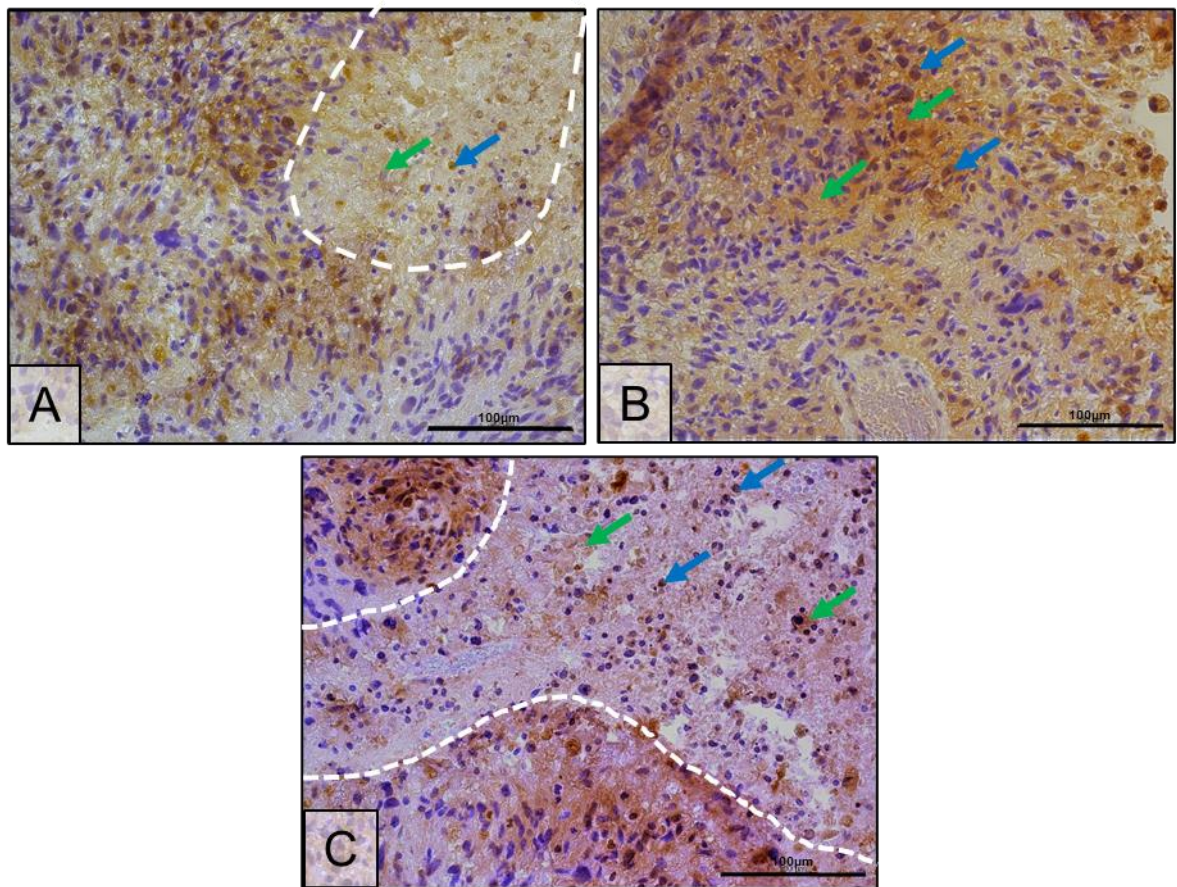
Istotną statystycznie różnicę odnotowano również w przypadku ekspresji genu kodującego $ER\beta$. Przed uwzględnieniem płci ekspresja mRNA $ER\beta$ w korze guza była wyższa o około 564% niż w rdzeniu guza ($p < 0,05$) (Rycina 13A). Po uwzględnieniu płci w analizie, ekspresja mRNA $ER\beta$ u mężczyzn była wyższa w korze guza niż w rdzeniu guza, średnio o 429% ($p < 0,05$) (Rycina 13B).

Ekspresja białka $ER\beta$ różniła się istotnie statystycznie pomiędzy rdzeniem guza i obrzeżem guza w analizie bez uwzględnienia płci z wyższą, o około 109% ekspresją odnotowaną w obrzeżu guza ($p < 0,05$) (Rycina 13C). Po uwzględnieniu płci, różnicę tę odnotowano ponownie, ale tylko u kobiet, z ekspresją wyższą o około 115% ($p < 0,05$) (Rycina 13D).



Rycina 13. Ekspresja mRNA genu $ER\beta$ (A, B) i białka $ER\beta$ (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnianiem płci (B, D). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu rangowanych znaków Wilcozona, $*p < 0,05$.

W analizie immunohistochemicznej odnotowano wyższą ekspresję białka receptora ER β w korze guza niż w rdzeniu guza (Rycina 14). Ekspresja w korze widoczna była głównie w cytoplazmie komórek, choć występowała również w jądrze komórkowym (Rycina 14B, zielone i niebieskie strzałki). W obrzeżu guza ekspresja była na niższym poziomie niż w korze guza, czego nie wykazały wyniki z innych badań (Rycina 14C). Podobnie jak w przypadku wyników z testu ELISA, ekspresja białka receptora ER β była niższa w rdzeniu guza niż w obrzeżu guza (Rycina 14A i 14C).



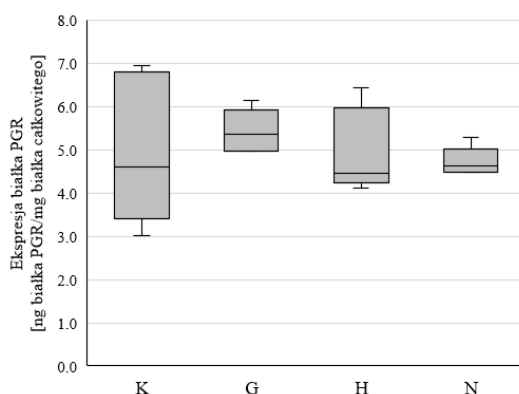
Rycina 14. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka ER β w niewzrastającym rdzeniu guza (A, białą przerywana linią zaznaczono obszar martwicy), korze guza (B) i obrzeżu guza (C, białą przerywana linią oddzielono fragmenty stanowiące korę guza) zdiagnozowanego jako GBM. Pozytywny wynik reakcji IHC – brązowy odczyn zaznaczony strzałkami: niebieskimi – jądrową dodatnią reakcją barwną, zielonymi – cytoplazmatyczną dodatnią reakcją barwną. Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x40 i skali 100 μ m.

3. Receptor progesteronowy

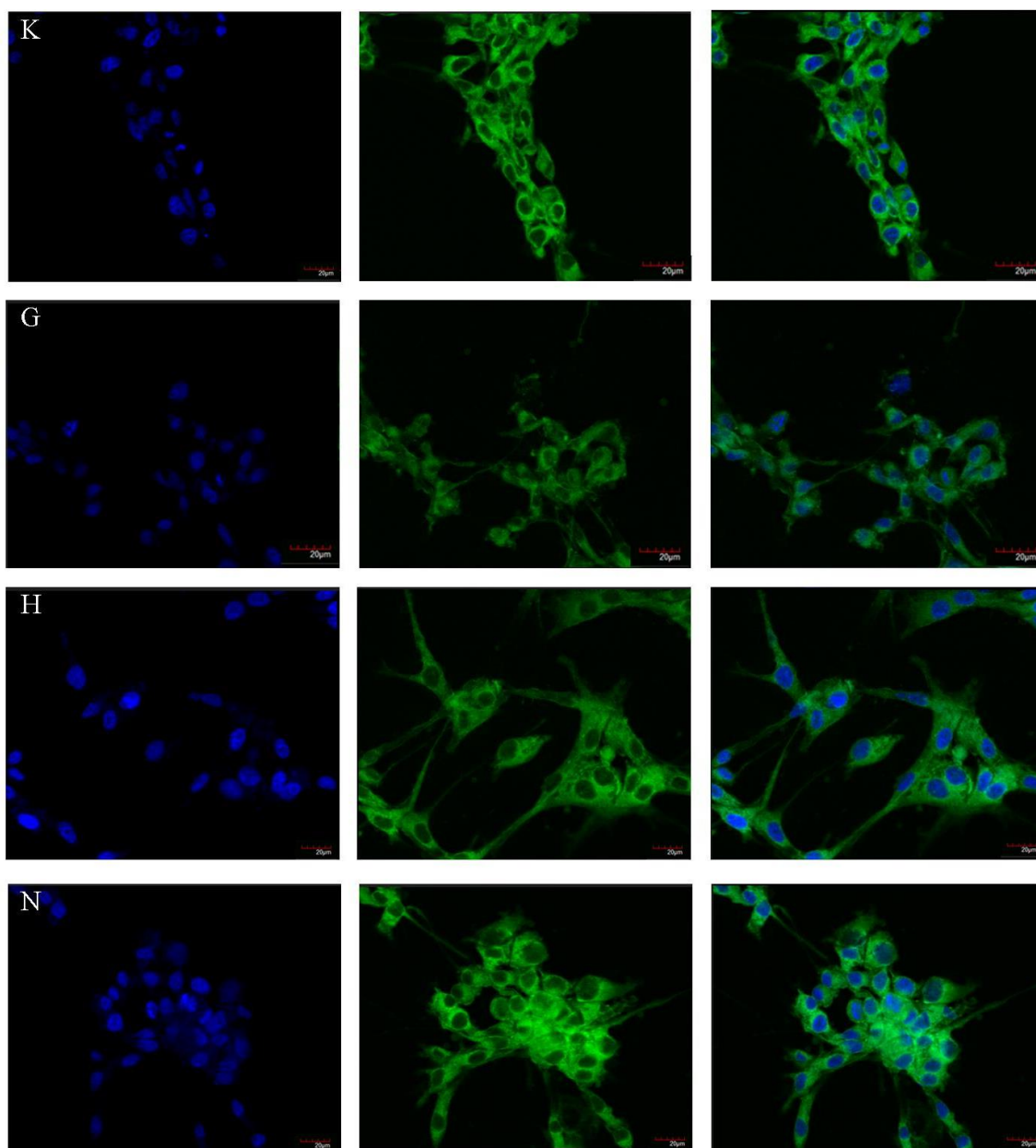
3.1 Ekspresja receptora progesteronowego w modelu *in vitro*, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy

Przeprowadzona analiza ekspresji mRNA *PGR* wykazała poziom mRNA poniżej poziomu oznaczalności metody, w związku z powyższym danych nie przedstawiono.

Ekspresja białka PGR była podobna pomiędzy warunkami badanymi (Rycina 15). Średnia ekspresja białka PGR dla wszystkich warunków badanych wynosiła 5 ng/mg białka całkowitego. Podobne obserwacje poczyniono podczas analizy wyników z mikroskopii konfokalnej. Ekspresja białka receptora PGR była na podobnym poziomie we wszystkich warunkach hodowlanych, występowała w całej objętości komórki z nasileniem w kierunku jądra komórkowego (Rycina 16).



Rycina 15. Ekspresja białka PGR w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot.



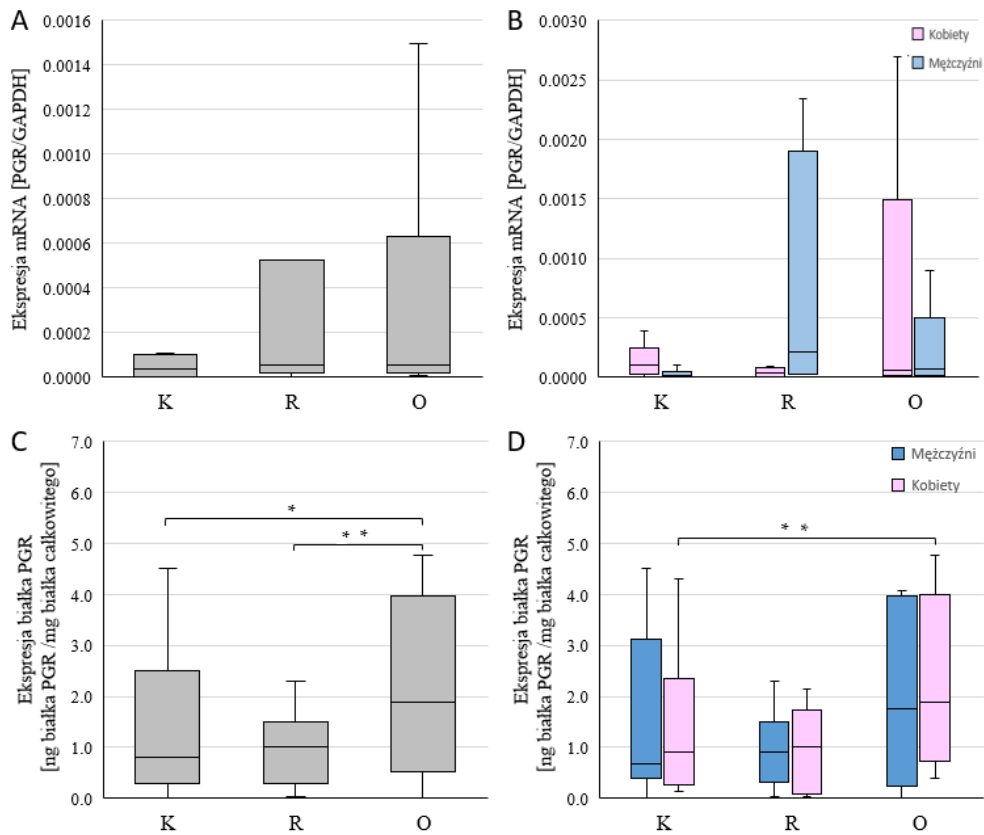
Rycina 16. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka PGR w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x20 i skali 20µm.

3.2 Ekspresja receptora progesteronowego w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego

Ekspresja mRNA genu *PGR* nie różniła się pomiędzy strukturami wśród kobiet i mężczyzn, jak i pomiędzy płciami w obrębie jednej struktury (Rycina 17A i 17B). Średni poziom ekspresji mRNA *PGR* wynosił 0,00031 [PGR/GAPDH].

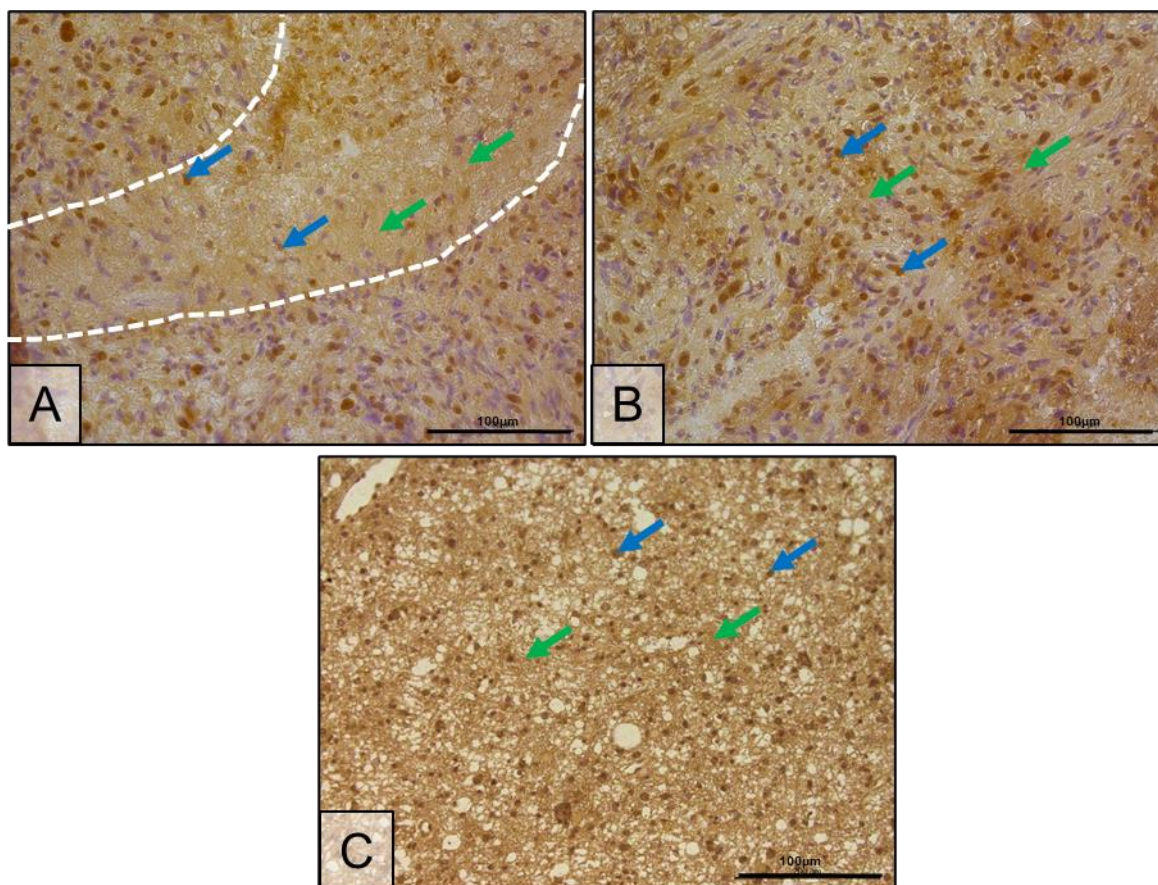
Ekspresja białka PGR przed uwzględnieniem płci była istotnie statystycznie wyższa w obrzeżu guza niż w rdzeniu guza ($p < 0,05$), czy korze guza ($p < 0,01$). Ekspresja białka PGR była wyższa adekwatnie o 210% i 144% (Rycina 17C).

Po uwzględnieniu w analizie płci, istotną statystycznie różnicę wykazano tylko pomiędzy korą i obrzeżem guza z ponowną 161% przewagą ekspresji w obrzeżu u kobiet ($p < 0,05$) (Rycina 17D).



Rycina 17. Ekspresja mRNA genu *PGR* (A, B) i białka PGR (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnianiem płci (B, D). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu rangowanych znaków Wilcoxon, * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$.

W analizie immunohistochemicznej odnotowano ekspresję białka PGR we wszystkich trzech badanych strukturach (Rycina 18). Zgodnie z wynikami uzyskanymi z testu ELISA, ekspresja białka PGR była najwyższa w obrzeżu guza, które charakteryzowało się dużym stopniem zabarwienia cytoplazmatycznego, jak i jądrowego (Rycina 18C, strzałki zielone i niebieskie). Ekspresja odnotowana w korze guza miała porównywalny stopień wybarwienia cytoplazmatycznego jak otoczenie guza. Charakteryzowała się jednak niższym stopniem wybarwienia jądrowego (Rycina 18B, strzałki niebieskie). W rdzeniu guza odnotowana ekspresja białka PGR była głównie cytoplazmatyczna, a poziom jej wybarwienia był podobny do wybarwienia cytoplazmatycznego kory. Zabarczenie jądrowe było natomiast na niższym poziomie (Rycina 18A, strzałki zielone i niebieskie).



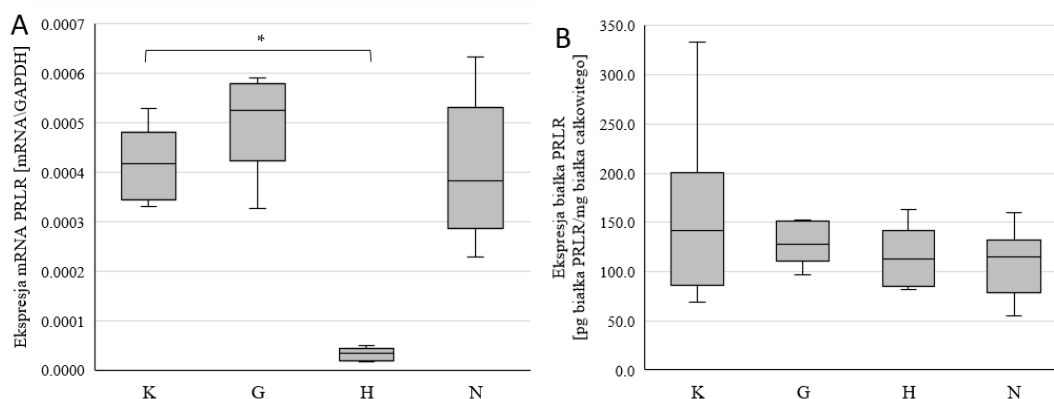
Rycina 18. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka PGR w niewzrastającym rdzeniu guza (A, białą przerywana linią zaznaczono obszar martwicy), korze guza (B) i obrzeżu guza (C) zdiagnozowanego jako GBM. Pozytywny wynik reakcji IHC – brązowy odczyn zaznaczony strzałkami: niebieskimi – jądrową dodatnią reakcją barwną, zielonymi – cytoplazmatyczną dodatnią reakcją barwną. Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x40 i skali 100 µm.

4. Receptor prolaktynowy

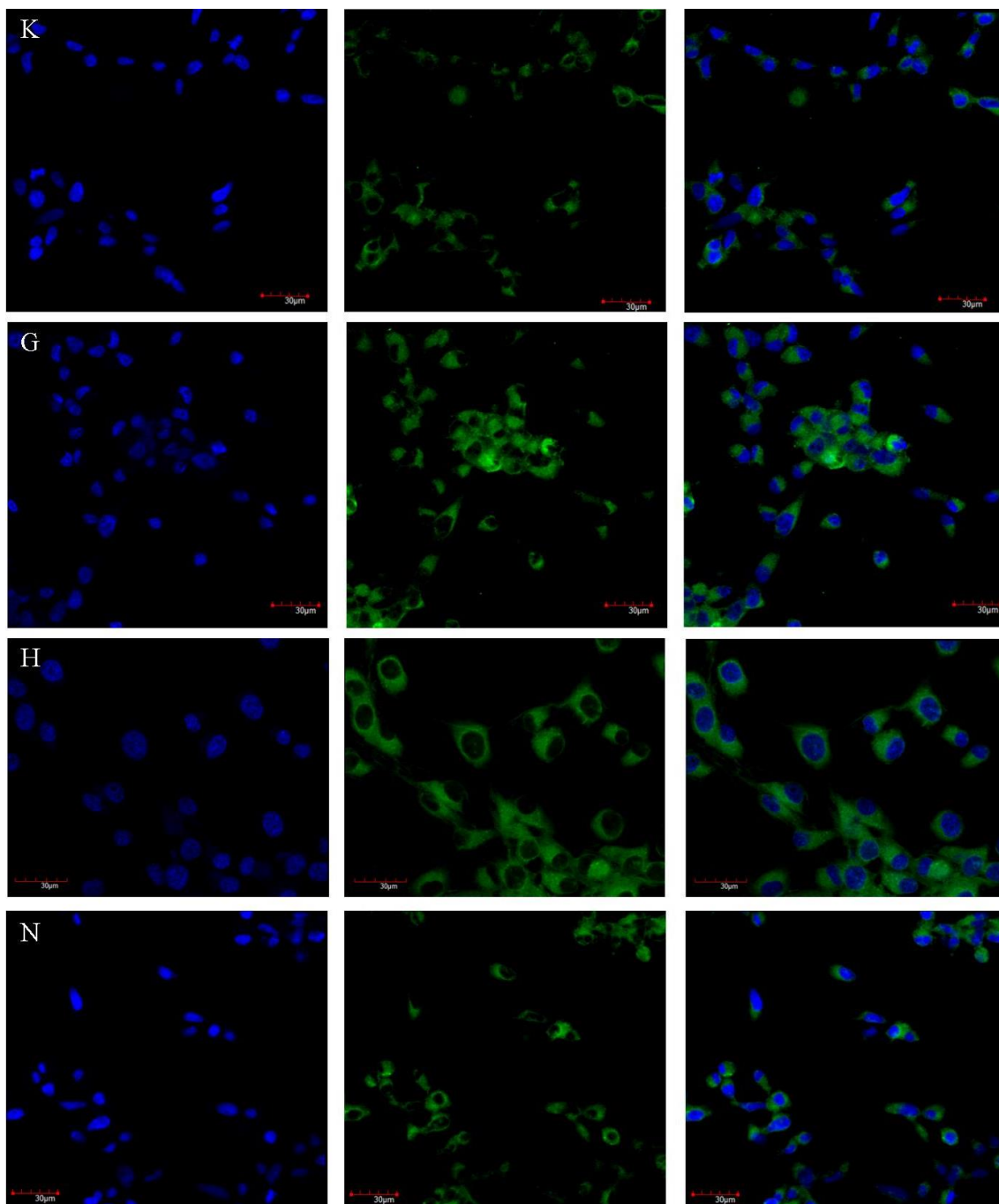
4.1. Ekspresja receptora prolaktynowego w modelu *in vitro*, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy

Ekspresja mRNA *PRLR* w komórkach hodowanych w warunkach hipoksji była w sposób istotny statystycznie ($p < 0,0000005$) niższa, niż ekspresja odnotowana w komórkach hodowanych w warunkach kontrolnych (Rycina 19A). Ekspresja odnotowana w hipoksji stanowiła średnio 8% ekspresji kontroli. W pozostałych warunkach badanych nie zaobserwowano zmian w ekspresji mRNA *PRLR*.

Ekspresja białka PRLR nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy poszczególnymi warunkami badanymi (Rycina 19B). Średnia ekspresja białka PRLR dla wszystkich warunków badanых wynosiła 127,18 pg/mg białka całkowitego. Nie wykazano również różnic w świeceniu komórek pomiędzy poszczególnymi warunkami badanymi (Rycina 20).



Rycina 19. Ekspresja mRNA genu *PRLR* (A) i białka PRLR (B) w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu T, $*p < 0,0000005$.

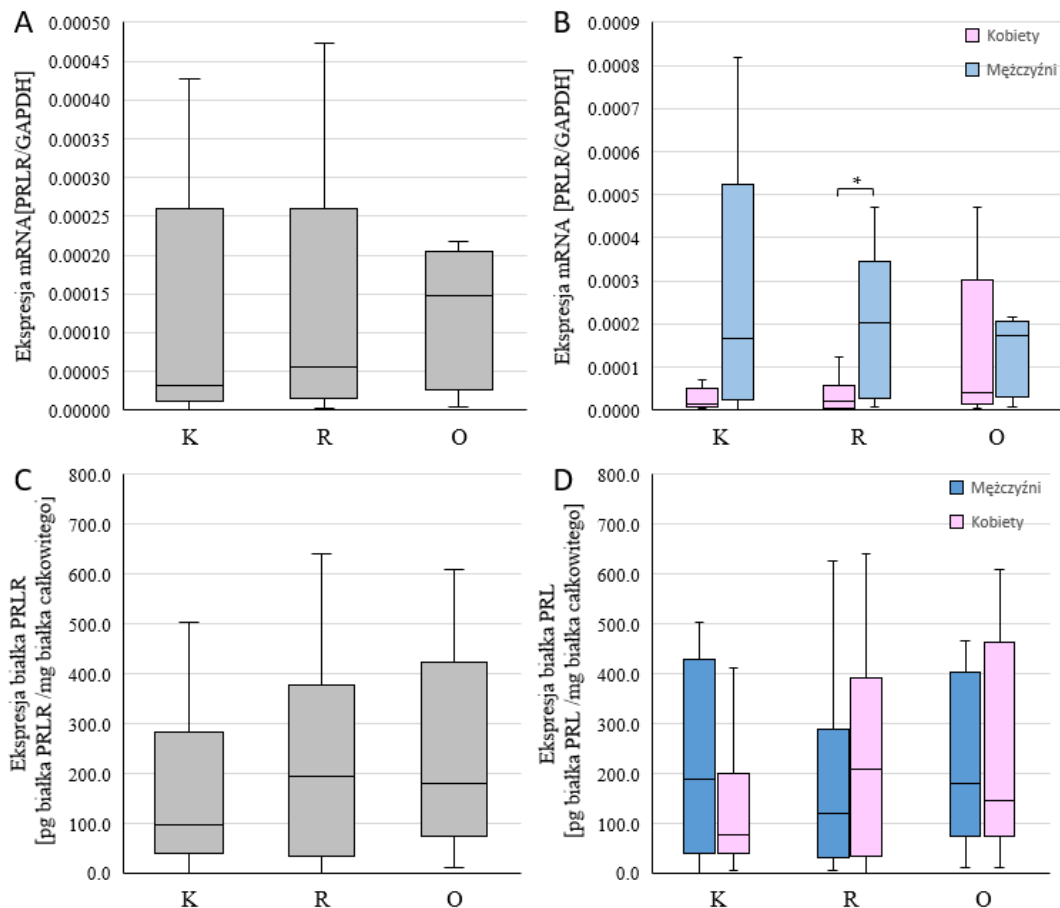


Rycina 20. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka PRLR w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x20 (K, G, N) x40 (H) i skali 30µm.

4.2. Ekspresja receptora prolaktynowego w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego

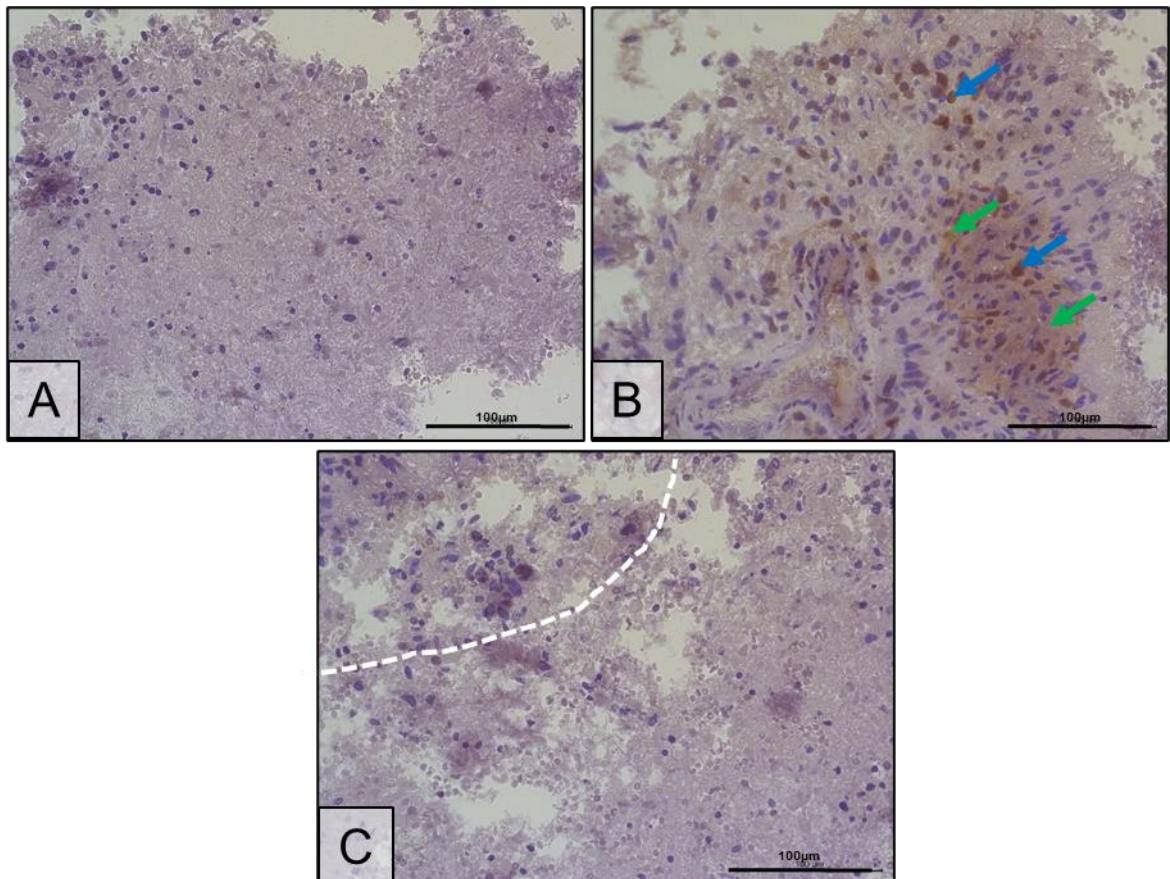
Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę ($p < 0,05$) ekspresji mRNA *PRLR* pomiędzy rdzeniem guza u mężczyzn, a rdzeniem guza u kobiet (Rycina 21B), z wyższą ekspresją u mężczyzn średnio o 723%. Nie zaobserwowano różnic między ekspresją w poszczególnych strukturach guza zarówno ogólnie jak i z uwzględnieniem płci (Rycina 21A i 21B). Średni poziom ekspresji mRNA *PRLR* wynosił 0,00014 [PRLR/GAPDH].

Białko PRLR wyrażane było na podobnym poziomie we wszystkich strukturach guza (Rycina 21C) i pomiędzy płciami (Rycina 21D). Średni poziom ekspresji białka PRLR wynosił 205,24 pg/mg białka całkowitego.



Rycina 21. Ekspresja mRNA genu *PRLR* (A, B) i białka PRLR (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnieniem płci (B, D). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą test U Manna-Whitneya, * $p < 0,05$.

W badaniu immunohistochemicznym, nie odnotowano ekspresji białka receptora PRLR w rdzeniu guza (Rycina 22A). W korze guza odnotowano występowanie ekspresji białka receptora ER α w cytoplazmie i jądrze komórek, można również rozróżnić ją na miejsca o wysokiej ekspresji i miejsca charakteryzujące się jej brakiem (Rycina 22B, zielone i niebieskie strzałki). W przypadku obrzeża guza nie odnotowano ekspresji białka receptora ER α (Rycina 22C).



Rycina 22. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka PRLR w niewzrastający rdzeniu guza (A), korze guza (B) i obrzeżu guza (C, białą przerywana linią odznaczono obszar kory guza w lewym górnym rogu) zdiagnozowanego jako GBM. Pozytywny wynik reakcji IHC – brązowy odczyn zaznaczony strzałkami: niebieskimi – jądrową dodatnią reakcją barwną, zielonymi – cytoplazmatyczną dodatnią reakcją barwną. Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x40 i skali 100 µm.

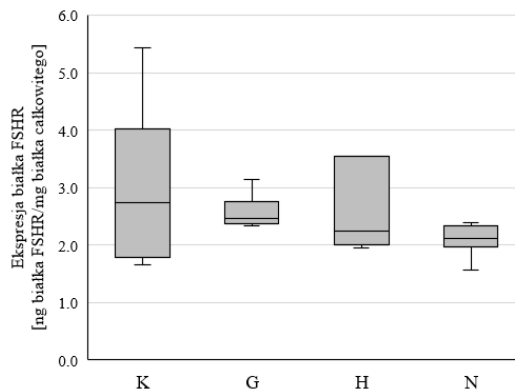
5. Receptor folikulotropowy

5.1. Ekspresja receptora folikulotropowego w modelu *in vitro*, w warunkach niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy

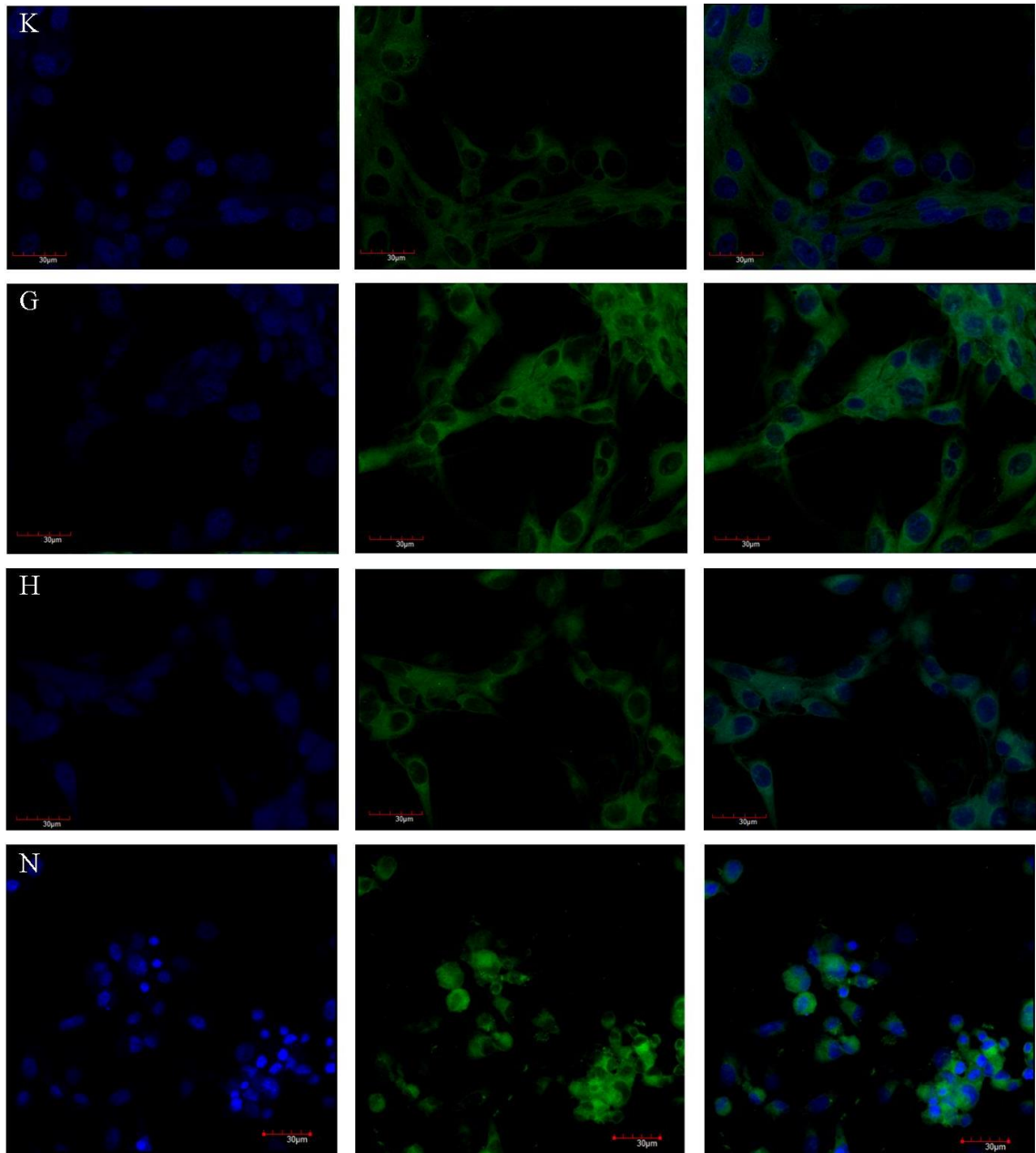
Wyniki analizy ekspresji mRNA *FSHR* były poniżej poziomu oznaczalności metody, w związku z tym danych nie przedstawiono.

Ekspresja białka *FSHR* nie była istotnie statystycznie różna (Rycina 23). Średni poziom ekspresji we wszystkich warunkach badanych wynosił 2,64 ng/mg białka całkowitego.

Zdjęcia wykonane z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej wykazały obecność receptora w komórkach, a świecenie w nich obecne zlokalizowane jest zarówno wokół, jak i w samej cytoplazmie (Rycina 24).



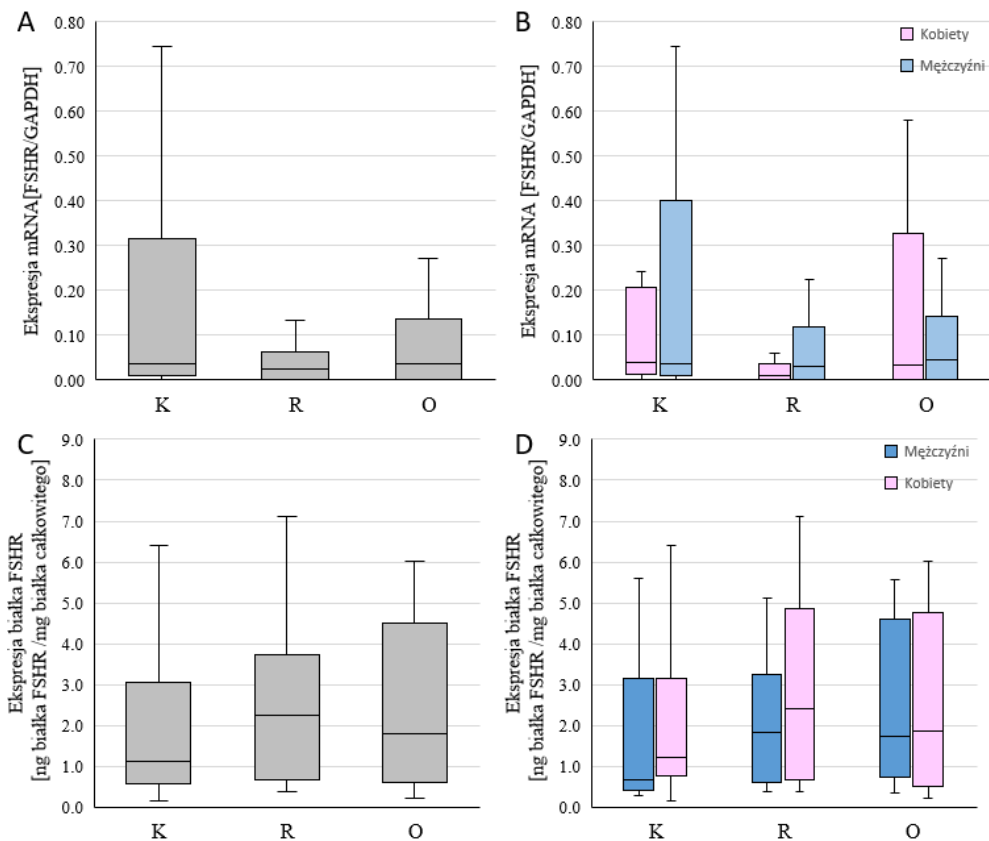
Rycina 23. Ekspresja białka *FSHR* w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot.



Rycina 24. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka FSHR w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). Mikrofotografie wykonano przy powiększeniu x20 (N) x40 (K, G, H) i skali 30µm.

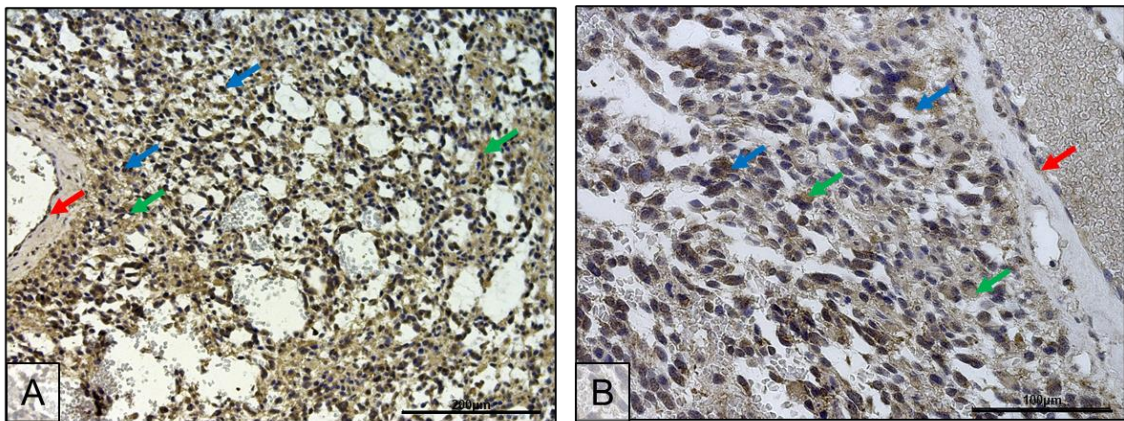
5.2. Ekspresja receptora folikulotropowego w niewzrastającym rdzeniu, korze i obrzeżu glejaka wielopostaciowego

Ekspresja mRNA *FSHR* (Rycina 25A) i białka FSHR (Rycina 25C) nie różniła się w poszczególnych strukturach guza. Po uwzględnieniu płci w analizie, również nie odnotowano różnic w ekspresji mRNA *FSHR* (Rycina 25B), jak i białka FSHR (Rycina 25D). Średni poziom ekspresji mRNA *FSHR* wyniósł 0,14 [FSHR/GAPDH], natomiast białka FSHR 2,29 ng/mg białka całkowitego.



Rycina 25. Ekspresja mRNA genu *FSHR* (A, B) i białka FSHR (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnianiem płci (B, D). Dane przedstawione są z zastosowaniem wykresu typu box plot.

W analizie immunohistochemicznej odnotowano obecność białka FSHR w komórkach nabłonka naczyń krwionośnych (Rycina 26, czerwone strzałki). Zaobserwowano również dodatnią ekspresję tego receptora w cytoplazmie i jądrach komórkowych komórek GBM (Rycina 26 zielone i niebieskie strzałki). Ekspresja nie różniła się pomiędzy poszczególnymi strukturami. W związku z powyższym postanowiono przedstawić najbardziej reprezentatywne mikrografie wizualizujące rozmieszczenie białka FSHR zarówno w guzie GBM, jak i w nabłonku naczyń krwionośnych guza.



Rycina 26. Reprezentatywne mikrografie pokazujące ekspresję białka FSHR w guzie GBM. Pozytywny wynik reakcji IHC – brązowy odczyn zaznaczony strzałkami: niebieskimi – jądrową dodatnią reakcją barwną, zielonymi – cytoplazmatyczną dodatnią reakcją barwną. Czerwonymi strzałkami zaznaczono nabłonek naczyń krwionośnych. Mikrografie wykonano przy powiększeniu x20 i skali 200 μm (A) oraz x40 i skali 100 μm (B).

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Porównanie ekspresji mRNA i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych uzyskanych z komórek linii U87, hodowanych w warunkach kontrolnych, niedoboru składników odżywczych, hipoksji i nekrozy przedstawiono w Tabeli 3. Warunki niedoboru składników odżywczych wywołały wzrost ekspresji mRNA *AR* i spadek ekspresji mRNA *ERβ*. Warunki hipoksji spowodowały spadek ekspresji mRNA *AR*, *ERβ*, *PRLR* i wzrost ekspresji mRNA *ERα*. Warunki nekrotyczne nie wywołały natomiast zmian w ekspresji badanych receptorów.

Tabela 3. Podsumowanie ekspresji mRNA i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w modelu in vitro.

		Warunki badane przyrównane do kontroli		
		Niedoboru składników odżywczych	Hipoksja	Nekroza
Receptor androgenowy	<i>AR</i> mRNA	↑	↓	=
	<i>AR</i> białko	=	=	=
Receptor estrogenowy α	<i>ERα</i> mRNA	=	↑	=
	<i>ERα</i> białko	=	=	=
Receptor estrogenowy β	<i>ERβ</i> mRNA	↓	↓	=
	<i>ERβ</i> białko	=	=	=
Receptor progesteronowy	<i>PGR</i> mRNA	=	=	=
	<i>PGR</i> białko	=	=	=
Receptor prolaktynowy	<i>PRLR</i> mRNA	=	↓	=
	<i>PRLR</i> białko	=	=	=
Receptor folikulotropowy	<i>FSHR</i> mRNA	=	=	=
	<i>FSHR</i> białko	=	=	=

Podsumowanie porównania ekspresji mRNA i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych uzyskanych z niewzrastającego rdzenia (R), kory (K) i obrzeża (O) guzów GBM przedstawiono w Tabeli 4. W obrzeżu guza GBM zaobserwowano wzrost ekspresji białek AR, ER β , PGR w stosunku do rdzenia guza, a także wzrost białka PGR w stosunku do kory guza. W korze guza zauważono natomiast wzrost białka AR i mRNA ER β w stosunku do rdzenia guza. Po uwzględnieniu podziału na kobiety i mężczyzn w analizach zaobserwowano, że guzy pochodzące od kobiet charakteryzowały się wzrostem białek AR, ER β w obrzeżu guza w stosunku do rdzenia guza. Guzy pozyskane od mężczyzn cechowały się natomiast wzrostem mRNA ER β w korze guza w stosunku do rdzenia guza. Zauważono również, że guzy mężczyzn charakteryzowały się wzrostem białka PRLR w rdzeniu w stosunku do guzów kobiet. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji PRLR, ER α , FSHR pomiędzy strukturami guza, a także różnic w ekspresji ER α , FSHR pomiędzy płciami.

Tabela 4. Podsumowanie porównania ekspresji mRNA i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych pomiędzy niewzrastającym rdzeniem (R), korą (K) i obrzeżem (O) guzów GBM pozyskanych od pacjentów. W nawiasach zaznaczono płeć pacjentów, wśród których różnice się powtórzyły po uwzględnieniu płci w analizach.

		Porównanie ekspresji struktur guza GBM		
		R : K	K : O	R : O
Receptor androgenowy	AR mRNA	=	=	=
	AR białko	↑K	=	↑O (↑O)
Receptor estrogenowy α	ER α mRNA	=	=	=
	ER α białko	=	=	=
Receptor estrogenowy β	ER β mRNA	↑K (↑K)	=	=
	ER β białko	=	=	↑O (↑O)
Receptor progesteronowy	PGR mRNA	=	=	=
	PGR białko	=	↑O	↑O
Receptor prolaktynowy	PRLR mRNA	=	=	=
	PRLR białko	=	=	=
Receptor folikulotropowy	FSHR mRNA	=	=	=
	FSHR białko	=	=	=

DYSKUSJA

Receptor androgenowy w modelu in vitro

Ekspresja AR w GBM i innych nowotworach (takich jak: rak prostaty [333], rak wątrobowokomórkowy [334], czy rak piersi [335]) jest w centrum zainteresowania szerokiego grona badaczy, a sam receptor uczestniczy w licznych mechanizmach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych.

Ekspresję białka AR odnotowano w wielu liniach komórkowych GBM (A172, LN-18, LN-229, M059, T-98G, U87, U118-MG i U138-MG) [56]. W badaniu Wernera i wsp. [336] połowa testowanych linii komórkowych wykazała ekspresję AR zarówno na poziomie białka, jak i mRNA. Badania Yu i wsp. [56] przedstawiły pośrednią rolę sygnalizacji AR w indukcji proliferacji komórek linii U87. Aktywacja szlaku AR znosiła bowiem częściowo działanie antyproliferacyjne wywołane aktywacją TGF- β . Badania Rodríguez-Lozano i wsp. [346] dowiodły również, że aktywacja AR może powodować zwiększenie możliwości proliferacyjnych, migracyjnych i inwazyjnych komórek GBM.

Przedstawione w przekładanej pracy badania potwierdziły, ekspresję AR w linii U87. Głównym celem badań było jednak sprawdzenie, jak na ekspresję omawianego receptora mają wpływ wybrane czynniki, takie jak niedobór składników odżywczych, hipoksja i warunki nekrotyczne. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że warunki hipoksji sprzyjają zmniejszeniu ekspresji AR na poziomie mRNA. Na poziomie białka nie wykazano takiej zależności.

Zestawienie powyższych obserwacji z doniesieniami literaturowymi o roli AR w komórce GBM, umożliwia powiązanie niedotlenienia ze spadkiem proliferacji komórek w obszarze wykazującym niedotlenienie. Hamujący wpływ hipoksji na transkrypcję AR może przyczynić się do ograniczenia proliferacji komórek nowotworu w niesprzyjającym środowisku i wzrostu guza w obszarach normooksji. Przedstawiany mechanizm wzrostu tłumaczy powstawanie obszarów martwicy wewnątrz GBM i intensywny jego rozrost na obrzeżach obserwowany w GBM [337]. Badania Huang i wsp. [338] dowiodły, że niewielkie guzy o znacznym stopniu niedotlenienia charakteryzują się szybkim wzrostem i krótkim czasem przeżycia pacjenta. Powyższy mechanizm można nazwać skokowym wzrostem guza indukowanym niedotlenieniem [339].

Należy zaznaczyć, że niedotlenienie zastosowane w niniejszym modelu, wywołane chlorkiem kobaltu, ma cechy niedotlenienia przewlekłego, charakterystycznego dla centrum guza, którego mechanizmy różnią się od niedotlenienia cyklicznego, obecnego

w obszarach wzrostowych guza GBM [340]. Chlorek kobaltu jest inhibitorem PHD i odpowiada za wzrost HIF, którego poziom jest zwiększony w niedotlenieniu. W niedotlenieniu przewlekłym pierwotnie (pierwsze 4 godziny) wzrasta ekspresja HIF1- α , a następnie HIF2- α i HIF3- α [340]. Dowiedziono, że w raku wątrobowokomórkowym ekspresja AR na poziomie mRNA jest hamowana przez HIF2- α [341], który wykazuje ekspresję w komórkach GBM narażonych na hipoksję przewlekłą [341].

W niniejszej pracy przedstawiono również wyniki uzyskane z modelu hodowli komórek U87 prowadzonej w warunkach niedoboru składników odżywczych. Odnotowano wzrost ekspresji mRNA AR w warunkach niedoboru składników odżywczych. Uzyskane rezultaty były przeciwne do odnotowanych w warunkach hipoksji, co tłumaczyć można szerokim udziałem AR w metabolizmie energetycznym komórki.

Dowiedziono, że AR w komórkach raka prostaty: promuje glikolizę i utlenianie pirogronianu, uczestniczy w syntezie i utlenianiu kwasów tłuszczowych (FA), reguluje katabolizm aminokwasów zwiększając ekspresję ich transporterów [342]. Należy również zauważyć, że w warunkach niedoboru składników odżywczych wzrasta ekspresja białka grupy o wysokiej mobilności 1 (HMGB1, ang. high mobility group box 1) [343], które zwiększa wiązanie AR do DNA. Tym samym ułatwia transkrypcję genów regulowaną przez AR [344]. Guz w ten sposób niejako omija problem niewystarczającej podaży składników odżywczych dla zwiększonej masy komórkowej, w stosunku do unaczynienia. Proces ten jest prawdopodobnie prowadzony do momentu pojawienia się niedotlenienia i spadku ekspresji AR, a przez to zahamowania rozwoju guza w danym obszarze.

Należy zaznaczyć, że zależności zaobserwowane w modelu in vitro, pokryły się z rezultatami analizy struktur guzów GBM przedstawionymi poniżej. Region guza charakteryzujący się znacznym niedotlenieniem (rdzeń guza) również wykazał obniżoną ekspresję AR w stosunku do pozostałych struktur.

Receptor androgenowy w guzach pobranych od pacjentów

Dane literaturowe sugerują istotną rolę AR w rozwoju GBM, dowiedziono bowiem, że pierwotne guzy GBM wykazują ekspresję AR [336]. Odnotowano również zwiększoną ekspresję mRNA tego receptora w tkance guza GBM w stosunku do zdrowej tkanki mózgu [211]. Ponadto zauważono, że ekspresja białka AR również jest wyższa w GBM, niż w zdrowej tkance mózgowej [56]. Stwierdzono także, że ekspresja białka tego

receptora wzrasta wraz ze stopniem złośliwości glejaka [345], a jej poziom pokrywa się z tym obserwowanym w raku prostaty [336].

W badaniach opisanych w przekładanej pracy sprawdzono poziom ekspresji AR w poszczególnych strukturach guza GBM. Założono, że wybrany model badawczy może pomóc w zrozumieniu roli tego receptora w progresji GBM.

W niniejszej pracy zauważono wzrost ekspresji białka AR w korze guza (w stosunku do rdzenia guza) pozwalający przypuszczać, że ekspresja AR może mieć znaczenie dla progresji guza. W literaturze odnotowano bowiem wpływ szlaku sygnałowego AR na zwiększenie możliwości proliferacyjnych, migracyjnych i inwazyjnych komórek GBM [346]. Badania Hou i wsp. [347] dowiodły, że białko RANBP10 (białko wiążące RAN10 ang. RAN binding protein 10) przyczynia się do wzrostu ekspresji genu AR i wywołuje w glejaku wzrost proliferacji, migracji i inwazyjności. AR może być jednym z wykładników działania tego białka i przyczyniać się do powyższych efektów. Wykazano również, że AR może promować nowotworzenie poprzez hamowanie sygnalizacji receptora TGF- β [56].

Wzrost ekspresji białka, został również zaobserwowany w obrzeżu guza (w stosunku do rdzenia guza). Wzrost w tym regionie nie świadczy jednak o wzroście ekspresji AR w zdrowych tkankach pacjenta. Tkanki obrzeża pobierano z pogranicza guza, stąd część komórek nowotworowych może znajdować się również w tym obszarze, przyczyniając się do obserwowanego wzrostu ekspresji AR (w stosunku do rdzenia guza). Przedstawianą interpretację wyników popierają doniesienia o wyższej ekspresji AR w guzie, niż w zdrowej tkance, zgłaszane przez Yu i wsp. [56].

Przedstawiane w przekładanej pracy obserwacje o różnym poziomie ekspresji białka AR w poszczególnych strukturach guza GBM potwierdzono wynikami badania immunohistochemicznego. W zamieszczonej analizie w korze guza zaobserwowano najwyższy poziom dodatniej reakcji barwnej, zarówno cytoplazmatycznej jak i jądrowej. Obrzeże guza prezentowało natomiast głównie jądrową dodatnią reakcję barwną. Przedstawione w pracy rezultaty pośrednio potwierdziły badania Orevi i wsp. Badacze w swojej publikacji przedstawili bowiem metodę obrazowej identyfikacji glejaków AR dodatnich. Na przedstawionych w pracy Orevi i wsp. [348] zdjęciach mikroskopowych widoczna jest zmienność ekspresji tego białka w różnych regionach guza.

Przeciwstawnie do zróżnicowanej ekspresji białka AR w niniejszej pracy nie odnotowano różnic w ekspresji mRNA AR w poszczególnych strukturach guza GBM. Brak

różnicy w ekspresji tego receptora pomiędzy strukturami na poziomie mRNA, może być jednak spowodowane różnicami w procesach interferencji mRNA AR w tych strukturach, takich jak wyciszenie ekspresji genu przez siRNA [349]. To założenie potwierdzają obserwację Zalcmana i wsp. [211] i Orevi i wsp. [348], ponieważ w ich badaniach również nie odnotowano korelacji pomiędzy zmianami ekspresji na poziomie mRNA AR i białka AR.

W przedstawianej pracy nie odnotowano również różnicy w ekspresji mRNA jak i białka AR pomiędzy kobietami i mężczyznami. Wnioski wyciągnięte z przedstawianych analiz potwierdzają badania Wernera i wsp. [336]. Dowiedziono również, że ekspresja mRNA tego receptora jest zwiększona w GBM zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn [211].

Dodatkowo wykazano, że linia komórkowa glejaka (U87) ma możliwość produkcji ligandów niezbędnych do aktywacji AR [350–353]. Dzięki ekspresji enzymów P450-scc i 17 α -hydroksylazy, komórki linii U87 mają możliwość syntezy androgenów (będących ligandami dla AR) z cholesterolu, znosząc tym samym efekt płci na działanie tego receptora. Sama synteza androgenów przez komórki GBM może wiązać się z migracją komórek RORC-Treg (regulatorowe limfocyty T z pokrewnym receptorem sierocym C) do niszy nowotworowej i tworzeniem przez to mikrośrodowiska immunosupresyjnego, dodatkowo ułatwiającego rozrost guza [354]. Niedotlenienie obecne w guzie GBM wspomaga dodatkowo przemianę limfocytów T (Th17) w RORC-Treg [355].

Warto również wspomnieć o możliwości aktywacji tego receptora przez drogi niezależne od liganda (testosteronu lub dihydrotestosteronu), zaobserwowane w raku prostaty [218]. W 30% guzów GBM pobieranych od pacjentów odnotowano występowanie konstytutywnie aktywnego wariantu AR bez domeny wiążącej ligand (wariant ARV7/AR3) [211]. Aktywacja AR niezależna od liganda może odbywać się przez IGF-1, KGF i EGF, których wpływ pobudza szlak PI3K/AKT/mTOR (ang. mammalian target of rapamycin) [208].

Choć rola AR jako czynnika transkrypcyjnego w raku prostaty jest bardzo dobrze przebadana, w glejaku natomiast jest jeszcze słabo poznana [211] i wymaga dalszych badań, w celu szerszego poznania wpływu aktywacji tego receptora na progresję guza.

Receptor estrogenowy α w modelu *in vitro*

W piśmiennictwie naukowym dostępnych jest wiele sprzecznych doniesień dotyczących ekspresji ER α w glejaku. Początkowo wykazano ekspresję mRNA ER α w liniach komórkowych: C6 (linia szczurzego GBM), U373MG i T98G (linie ludzkich GBM)

[356]. Kolejne doniesienia przeczyły poprzednim wykazując, że linie komórkowe U87, T98G, U251MG, U373MG, U138MG, WS1088 nie wykazują ekspresji mRNA *ERα*, ani *ERβ* [357]. Następne badanie linii komórkowych glejaka wykazało brak ekspresji białka *ERα* w T98G, U87, LN229, U138, M059J, M059K [358].

Najnowsze badania potwierdziły ekspresję *ERα* w liniach komórkowych U87 i U251-MG [359–361]. Doniesiono jednak, że ekspresja mRNA *ERα* w liniach komórkowych ludzkiego GBM jest niższa niż w normalnych ludzkich astrocytach (linie GBM: U251, U87, T98G i LN229)) [362]. Odnotowano również zauważalnie wyższą ekspresję mRNA *ERα* w komórkach linii U251 [362]. Na poziomie białka *ERα* cechował się wyższą ekspresją niż *ERβ* we wszystkich badanych liniach komórkowych [362].

Różnice w oznaczalności ekspresji *ERα* można tłumaczyć rozwojem technologicznym i wzrostem dokładności metod. W przedstawianej pracy potwierdzono występowanie ekspresji mRNA i białka *ERα* w linii komórkowej U87. Obecność białka wykryto dwiema metodami badawczymi pozwalającymi nie tylko ilościowo określić stan ekspresji białka *ERα*, ale także zwizualizować jego rozmieszczenie w komórce. W przedstawianych analizach zauważono również wyższą ekspresję *ERα* niż *ERβ* zarówno pod względem ekspresji mRNA jak i białka.

W literaturze można także znaleźć sprzeczne doniesienia o roli agonistów *ERα* na jego ekspresję oraz proliferację i żywotność komórek. Wykazano wpływ agonistów *ER* na wzrost proliferacji komórek, a także na wzrost ekspresji białek *ERα* i *ERβ* [359]. Inne badanie przedstawiło zmniejszenie ekspresji *ERα* w liniach komórkowych U87 i U251-MG w wyniku podania 17β-estradiol [361]. Doniesiono również, że leczenie wysokimi stężeniami estradiolu powodowało niższą żywotność komórek GBM linii LN229 i LN18 [360]. Udowodniono, że komórki prezentowały istotnie większą wrażliwość na temozolomid (TMZ) po wstępnym leczeniu estradiolem [360]. Wykazano, że agonista *ERα* (triol propylopirazolu) indukował wzrost linii komórkowych gwiazdziaka (U373 i D54) [363].

W badaniach z wykorzystaniem linii komórkowych U87 i U251 wykazano, że obie wyrażają *ERα-36*, z mocniejszą ekspresją odnotowaną w linii U87 [364]. W liniach komórkowych U87 i U251 ekspresja *ERα* była niższa niż ekspresja jego izoformy *ERα-36*. Zaobserwowano, że izoforma *ERα-36* wyrażana jest w obu liniach zarówno na poziomie genu jak i białka, w przypadku *ERα* ekspresja białka jest znikoma, natomiast mRNA wyrażane jest tylko w linii U251 [365].

W świetle powyżej opisanych badań trudno jest jednoznacznie przypisać ER α rolę receptora proonkogenego w GBM. Do przedstawianych wniosków skłaniają jednak doniesienia o udziale ER α w transkrypcji genów związanych z proliferacją komórek (IGF1, gen cykliny D1, c-Myc i TRIM25 (ang. tripartite motif containing 25)) [366]. Istotnymi wydają się również doniesienia o uczestnictwie ER α w aktywacji przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, zaangażowanego w złośliwość GBM [362]. 17 β -estradiol oraz selektywny agonista ER α wywołały bowiem wzrost ekspresji markerów mezenchymalnych, takich jak wimentyna i N-kadheryna, a także zwiększyły migrację i inwazję komórek GBM [362].

W badaniach prezentowanych w przekładanej pracy wykazano, że warunki hipoksji mogą zwiększać ekspresję ER α , a tym samym przypuszczalnie zwiększać proliferację komórek w niedotlenionym regionie guza. Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi [367].

ER α może jednak przyczyniać się do aktywacji szlaku degradacji HIF-1 [368], znośząc tym samym efekt niedotlenienia na komórkę i blokując aktywację mechanizmów obronnych związanych ze statusem niedotlenienia. Należy również zaznaczyć, że obserwowany wzrost ekspresji ER α w prezentowanych analizach występuje tylko w mRNA. Powyższą obserwację można tłumaczyć możliwą autokontrolą ekspresji poprzez mechanizmy kompensacyjne lub też zbyt krótkim okresem inkubacji z czynnikiem wywołującym hipoksję. Przedstawiane analizy należałoby zatem powtórzyć w innych punktach czasowych, w celu potwierdzenia postawionych hipotez.

Receptor estrogenowy α w guzach pobranych od pacjentów

W GBM i glejakach o niskim stopniu złośliwości obserwowano niższe poziomy ekspresji ER α w porównaniu ze zdrową tkanką [362]. Ponadto wykazano wyższą ekspresję ER α w GBM niż w glejakach o niskim stopniu złośliwości [362].

Według Dueñas Jiménez i wsp. gwiazdki charakteryzowały się podobnym poziomem ekspresji ER α u mężczyzn i kobiet. Wykazywały również ujemną korelację ekspresji ER α ze stopniem złośliwości guza oraz dodatnią korelację z czasem przeżycia pacjentów. Ekspresja odnotowywana w guzach GBM była niższa niż ta obserwowana w gwiazdkiach [369].

Wykazano, że guzy GBM różnią się między sobą pod względem wielkości ekspresji ER α [360]. W badaniach Hernández-Vega i wsp. wyższe poziomy ekspresji ER α

i ER β w GBM wiązały się ze złym rokowaniem dla pacjenta, co jest zastanawiające w świetle niższej ekspresji ER α w komórkach guza niż w zdrowej tkance [362]. Wysoka ekspresja ER α i aromatazy w próbkach tkanek GBM wiązała się ze znacznie dłuższym czasem przeżycia pacjentów z GBM, niezależnie od płci i wskaźnika masy ciała [360]. W przedstawianych wynikach nie zauważono również różnic w ekspresji ER α pomiędzy płciami, co stanowi potwierdzenie poprzednich danych literaturowych [370].

W prezentowanych analizach guzów GBM pochodzących od pacjentów, nie przeprowadzono porównania ze zdrową tkanką pacjenta, ze względu na brak możliwości jej pozyskania. Przeprowadzone analizy statystyczne nie wykazały różnic pomiędzy ekspresją ER α w poszczególnych strukturach guza zarówno na poziomie genu, jak i białka. W związku z powyższym, należy zastanowić się czemu, wynik wpływu niedotlenienia na wzrost ekspresji ER α (uzyskany w modelu *in vitro*) nie manifestuje się tak wyraźnie w wynikach uzyskanych z materiału pochodzącego od pacjentów.

Powyższa obserwacja może wynikać z mechanizmu kompensacji i ciągłego wzajemnego równania poziomów ekspresji białek HIF-1 i ER α . Może również wynikać ze zbyt ogólnego podejścia do puli tkanek uzyskanych od pacjentów. Być może poprawnym byłoby rozgraniczenie guzów GBM na różne grupy ze względu na poziom wyrażanej ekspresji ER α w sposób podobny do Hönikl i wsp. [360].

Wykazano, że jedna z izoform ER α : ER α -36 jest szczególnie wyrażana w komórkach guzów GBM i wykazuje ekspresję w 96% próbek glejaka III-IV stopnia, natomiast bardzo słabo wykazuje ekspresję w guzach glejowych I stopnia [364]. Izoforma ER α -36 występuje najczęściej w całej objętości komórki, choć ekspresja lokalizuje się również tylko w samym jądrze, samej błonie komórkowej lub cytoplazmie [364]. Podobne obserwacje dla rozmieszczenia białka w całej objętości komórki poczyniono dla ekspresji ER α w przedkładanych analizach.

Receptor estrogenowy β w modelu i *in vitro*

ER β jest szeroko badany w wielu nowotworach, w tym w glejowych liniach komórkowych (T98G, U87, LN229, U138, M059J, M059K), w których wykryto jego ekspresję, zarówno w przypadku mRNA jak i białka [358].

W niniejszej pracy nie badano wpływu ekspresji ER β na komórki GBM, jednak według literatury agoniści ER β wywoływali spadek proliferacji linii komórkowych gle-

jaka (T98G, U87, LN229, U138, M059J, M059K) [358, 371], a także hamowali cykl komórkowy w fazie G2/M [358]. Wykazano również, że agoniści ER β hamują wzrost guza glejowego w modelu ksenoprzeszczepu [371, 372]. Dowiedziono, że stosowanie agonistów ER β i selektywnych modulatorów receptora estrogenowego hamuje wzrost guza glejowego i promuje śmierć komórek na drodze apoptozy [357, 372]. Rezultaty osiągnęto tylko w przypadku glejowych linii komórkowych wyrażających ER β , a ekspresja samego receptora wzrastała w wyniku podania agonisty ER β do hodowli komórkowych [372].

Przeciwstawnie do powyższych badań wykazano, że tibolon, będący selektywnym tkankowym regulatorem aktywności estrogenowej, indukuje proliferację, ale nie migrację i inwazję komórek linii komórkowych GBM poprzez ER oraz wpływa na wzrost ekspresji ER β [359]. Zauważono również, że wzrost ekspresji ER β i wyciszenie ER α przyczyniło się do wzrostu ekspresji akwaporyny drugiej, a tym samym do zmniejszenia zdolności migracyjnych komórek GBM [373]. Wpływ agonistów ER β przez ER β na procesy takie jak proliferacja czy migracja potwierdzono oznaczając wzrost ekspresji genów docelowych ER β [358]. Zastosowanie siRNA lub shRNA specyficznych dla ER β wywołało wyciszenie ekspresji białka ER β i zniósło zdolność agonistów ER β do zmniejszania proliferacji komórek glejaka [358].

Ponadto połączenie agonisty ER β z TMZ zostało uznane za dobrą metodę hamowania wzrostu guza glejowego. Prawdopodobnie poprzez wpływ agonisty ER β na hamowanie aktywność szlaku PI3K/AKT/MTOR, przyczyniającego się do ochrony komórek guza przed cytotoksycznością wywołaną TMZ [374].

Wykazano, że ER β poprzez mechanizm niegenomowy obejmujący kaskadę sygnalizacyjną RAF/MAP2K1/ERK/ELK-1 (RAF, kinazy Raf, ang. Raf kinases, ERK, kinazy zewnątrzkomórkowe regulowane sygnałem, ang. extracellular signal-regulated kinases, ELK, czynnik transkrypcyjny ETS, ang. ETS transcription factor), zwiększał ekspresję supresorowego czynnika transkrypcyjnego EGR-1 (białko wczesnej odpowiedzi wzrostu 1 (ang. early growth response protein 1)), biorącego udział w regulacji wzrostu, różnicowaniu i apoptozie komórek [375].

W związku z powyższymi doniesieniami, można założyć supresorową rolę ER β w rozwoju GBM. Odnotowany w przekładanej pracy spadek ekspresji mRNA *ER β* w warunkach hipoksji i warunkach niedoboru składników odżywczych jest sprzeczny z danymi literaturowymi. Doniesiono bowiem, że niedotlenienie, a także same czynniki HIF1 α lub HIF2 α , wywoływały zwiększenie ekspresji mRNA *ER β 1*, *ER β 2* i *ER β 5* w komórkach U87

[376]. Przeciwnostawne wyniki mogą być częściowo spowodowane różnicami w protokole wywołania niedotlenienia. W cytowanej pracy zastosowano hodowlę w warunkach obniżonej zawartości tlenu, natomiast w prezentowanej pracy zastosowano inhibicję PDH. Zgodne z literaturą, rezultaty uzyskano natomiast w przypadku ekspresji białka ER β , która nie różniła się pomiędzy warunkami badanymi. Wyniki przedstawiane w przedkładanej pracy, potwierdza publikacja Habib i wsp., w której autorzy również nie zaobserwowali różnic w ekspresji białka ER β w komórkach poddanych niedotlenieniu [367].

Opisane rezultaty wydają się sprzeczne, ponieważ poddanie komórek warunkom stresowym, jakimi są hipoksja i niedobór składników odżywczych, teoretycznie powinno wywoływać wzrost ekspresji czynnika hamującego proliferację. W pracy Attwood i wsp. udowodniono jednak, że wprowadzenie do hodowli komórkowych selektywnego modulatora ER, raloksyfenu, opóźniało rozpuszczanie granulek stresu. Powstające w wyniku warunków stresowych dla komórek GBM, granulki stresowe, są skupiskami mRNA i białek potrzebnych do funkcjonowania w warunkach normoksji. Translacja omawianych mRNA rozpoczyna po ustąpieniu warunków stresowych. Rozpuszczenie granulek stresu jest potrzebne do ponownej adaptacji komórki do warunków normoksji [377]. Przy założeniu, że aktywacja ER przyczyniać się może do wydłużenia czasu powrotu komórki do inwazyjnego fenotypu, spadek ekspresji ER β w warunkach stresowych jest wytłumaczalny.

Receptor estrogenowy β w guzach pobranych od pacjentów

Występowanie ER β opisano w glejakiach astrocytarnych [378] i w oligodendrogliomach [379]. Zauważono, że pacjenci z ER β dodatnim wykazywali dłuższe przeżycie [379]. Dowiedziono, że ER β występuje również w zdrowych astrocytach, a wraz ze wzrostem złośliwości guza ekspresja tego receptora spada [358, 370, 378–380]. Wykazano również, że ekspresja w zdrowych astrocytach jest niższa niż w guzie glejowym [370].

Cytowane doniesienie jest niejako sprzeczne z uzyskanymi przez nas wynikami. Odnotowano bowiem niższą ekspresję białka ER β w rdzeniu guza niż w jego obrzeżu, które częściowo stanowiła zdrowa tkanka. Należy zwrócić oczywiście uwagę, że uzyskany wynik, może być spowodowany występowaniem części guza o wysokiej ekspresji białka ER β w obrzeżu guza, która być może zaburza odczyt dla tkanek prawidłowych. Poparciem dla przedstawianej tezy są niedawno opublikowane badania opisujące wyższy

poziom ekspresji ER β w GBM w porównaniu ze zdrową tkanką i glejakami niskiego stopnia [362]. Powyższy wynik może być również uzyskany przez oznaczenie ekspresji wszystkich izoform łącznie. Dowiedziono bowiem, że główną izoformą ER β w glejaku jest ER β 5, a jej ekspresja jest wyższa w guzie niż w zdrowej tkance [376]. Wykazano również, tendencje wzrostu ekspresji tej izoformy wraz ze stopniem złośliwości guza [376]. Funkcja supresorowa ER β wykazywana w innych typach raka, występuje również w przypadku glejaka. Za supresorową rolę ER β przemawia doniesienie sugerujące, że ER β nie bierze udziału w procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, które jest charakterystyczne dla GBM [362].

Wyniki ekspresji białka ER β przedstawione w niniejszej pracy, wskazują na wzrost ekspresji w obrzeżu guza w stosunku do jego rdzenia. Powyższe wyniki są zgodne z założeniem supresyjnej funkcji ER β , a także z faktem, że w obrzeżu guza komórki mają niższy potencjał proliferacyjny niż w korze guza. Uzyskane wyniki opisują ekspresję ER β , bez podziału na izoformy. W świetle przedstawianej aktualnie literatury, może to utrudniać interpretację, szczególnie zważywszy na niepełną zgodność publikowanych doniesień.

Stwierdzono bowiem dotychczas, że ER β 5 hamuje szlaki onkogenne takie jak PI3K/AKT/mTOR i MAPK/ERK w sposób niezależny od liganda [376]. Odkrycia poczynione przez Liu i wsp. przeczą tym doniesieniom, przedstawiając izoformę ER β 1 jako supresorową w guzie GBM, a izoformę ER β 5 jako proonkogeną w GBM [381]. Wykazano, że zastosowanie epigenetycznego modulatora ekspresji ER β , inhibitora deacetylaz histonowych, wywołało wzrost ekspresji izoformy ER β 1, która działała jako supresor guza, ale nie izoformy ER β 5, która napędzała funkcje onkogenne [382]. Stosowanie inhibitora deacetylaz histonowych w połączeniu z agonistą ER β , wywołało natomiast silne zmniejszenie żywotność komórek, inwazji, tworzenia kolonii, a także zwiększoną apoptozę [382]. Powyższe badania stanowią potwierdzenie, że GBM cechuje się niską ekspresją ER β , prawdopodobnie wywołaną wyciszeniem genu ER β przez hipermetylację [369].

Ekspresja *ER β* przedstawiona w niniejszej pracy, wskazuje natomiast na wzrost ekspresji mRNA w korze guza, w stosunku do jego rdzenia. Przedstawione wyniki potwierdzają dane pozyskane z modelu *vitro*, warunki stresowe takie jak niedotlenienie i niedobór składników odżywczych obecne w rdzeniu guza, mogą przyczyniać do spadku ekspresji mRNA *ER β* .

W badaniach Sareddy i wsp. zaobserwowano, że lokalizacja białka ER β w komórce również różni się w zależności od stopnia złośliwości guza glejowego. W guzach II stopnia zlokalizowana była głównie w jądrze komórkowym, natomiast w guzach o wysokim stopniu złośliwości, białko ER β zlokalizowane było głównie cytoplazmatyczne. Wraz ze stopniem złośliwości spadał odsetek komórek z wybarwieniem jądrowym [358]. W analizach przedstawianych w niniejszej pracy ekspresja ER β zauważalna była zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. Jednak zgodnie z literaturą, zauważalnie więcej komórek wykazywało cytoplazmatyczną dodatnią reakcję barwną charakterystyczną dla guzów glejowych wysokiej złośliwości, do których należy GBM.

Ponadto w badaniach Kefalopoulou i wsp. wykazano, że wraz ze wzrostem złośliwości guza wzrasta ekspresja koaktywatorów ER β , takich jak AIB1 (koaktywator receptora jądrowego 3, ang. amplified in breast 1), TIF2 (pośredni czynnik transkrypcyjny 2 ang. nuclear receptor coactivator 2) i PELP1 (modulator niegenomowych działań receptora estrogenowego, ang. modulator of non-genomic activity of estrogen receptor), zaangażowanych w inicjację, progresję i potencjał przerzutowy w różnych typach nowotworów [383]. Opisana ekspresja koaktywatorów ER β , była jednak odwrotnie skorelowana z ekspresją ER β [383].

W przedstawianych analizach nie zauważono różnic w ekspresji ER β pomiędzy kobietami i mężczyznami, co stanowi potwierdzenie danych literaturowych. W guzach glejowych (24 gwiaździków i 8 glejaków) nie wykryto bowiem różnic w ekspresji białka ER β pomiędzy płciami [370]. W ogólnej analizie guzów glejowych, wykryto według autorów granicznie istotną statystycznie wyższą ekspresję białka ER β u kobiet (nie podano wyniku dla samego GBM) [380]. Wartość *p* dla powyższej analizy to jednak 0,058, które według ogólnie przyjętych standardów, również w przekładanej pracy, stanowi wartość nieistotną statystycznie. Nie można tu oczywiście odmówić przejawiania pewnego trendu, który w pewnym stopniu może potwierdzać, zauważoną w niniejszej pracy różnicę w ekspresjach ER β po uwzględnieniu płci. Zaobserwowana rozbieżność w ekspresji mRNA *ER β* pomiędzy korą, a rdzeniem guza, po uwzględnieniu płci, utrzymała się tylko u mężczyzn. W przypadku kobiet natomiast, utrzymywała się tylko różnica w ekspresji białka ER β pomiędzy centrum, a obrzeżem. Zauważone różnice są trudne do interpretacji z obecnym stanem wiedzy o ekspresji ER β w GBM. Jednak mogą stanowić wyraz jeszcze nieopisanych zależności, co pozwala stwierdzić, że określenie szczegółowej roli ER β w GBM wymaga dalszych badań.

Receptor progesteronowy w modelu in vitro

Ekspresję białka PGR wykryto w liniach gwiazdziaka III i IV stopnia, a także w liniach komórkowych GBM [384–386]. Progesteron (P) indukował proliferację linii komórkowych ludzkiego gwiazdziaka III i IV stopnia poprzez PGR [384]. Po zbadaniu wpływu antagonisty PGR (RU486, mifepriston) na wzrost komórek, dystrybucję cyklu komórkowego i apoptozę, dowiedziono, że P wpływa na wzrost komórek poprzez klasyczny mechanizm genomowy [384].

Wykazano, że P indukuje inwazję i migrację komórek ludzkiego gwiazdziaka (U373) wszczepionych w korę ruchową szczura [385] oraz komórek ludzkiego GBM (D54, U251 i U87) hodowanych i testowanych *in vitro* [386, 387]. W przedstawianych badaniach antagonistą PGR znosił powyższe efekty [385, 386]. Udział sygnalizacji P/PGR w tych mechanizmach, został potwierdzony poprzez oznaczenie ekspresji i wpływu genu docelowego PGR, jakim jest czynnik blokujący indukowany progesteronem (PIBF, ang. progesterone induced blocking factor) [387]. Dowiedziono, że PIBF zaangażowany jest w szlak IL-4R α /JAK1 /STAT6 [388], a także indukuje produkcję EGF, przez co promuje transkrypcję genów metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP, ang. matrix metalloproteinases) a tym samym inwazję i migrację komórek [389, 390]. Wykazano również, że ekspresja PIBF wzrastała po wystawieniu komórek na działanie P, a zastosowanie RU486 blokowało indukcyjne działanie hormonu [387]. Progesteron może również hamować proliferację i migrację komórek ludzkiego glejaka, jednak efekt ten występuje przy niefizjologicznie wysokich stężeniach. Przy niższych stężeniach efekt jest tożsamy do obserwowanego we wcześniej omawianych badaniach [391]. Udowodniono, że połączenie wysokich dawek P z temozolomidem dodatkowo wzmocniło hamowanie proliferacji i migracji komórek GBM [392]. Wpływ na proliferację i migrację wykazał również metabolit P wytwarzany w mózgu: 5-alfa-dihydroprogesteron (5 α -DHP, ang. 5 α -dihydroprogesterone) również działający przez PGR [393]. Kolejny metabolit P, powstający z 5 α -DHP: allopregnanolon (3 α -THP, ang. allopregnanolone) również zwiększał proliferację ludzkich komórek glejaka (U87), oraz przyczyniał się do promocji ekspresji genów istotnych w rozwoju GBM: TGF- β 1, EGFR, VEGF i cykliny D1 [394].

Wykryto również, że kwas lizofosfatydowy (LPA, ang. lysophosphatidic acid), którego aktywność wykazano w wielu nowotworach, indukuje aktywację kinazy białkowej C (PKC, ang. protein kinase C), która katalizuje fosforylacje PGR zwiększając tym samym jego aktywność transkrypcyjną [395]. W wyniku aktywności transkrypcyjnej PGR dochodzi natomiast do zwiększenia ekspresji VEGF [395]. Mechanizm został potwierdzony poprzez oznaczenie zwiększonej ekspresji VEGF, po leczeniu komórek GBM LPA [395].

Rola sygnalizacji P/ PGR w rozwój guzów glejowych stanowi zainteresowanie wielu badaczy, a wpływ P na komórki glejowe jest szeroko sprawdzany. W pracy postanowiono przedstawić wpływ poszczególnych warunków występującym w guzie na ekspresję PGR. Opisano ekspresję PGR na poziomie białka w linii komórkowej U87. Ekspresja białka PGR została sprawdzona i przedstawiona poprzez zastosowanie dwóch metod badawczych. Obie metody wykazały ekspresję PGR nie różniącą się między warunkami badanymi. Dane literaturowe pozwalają zakładać dużą rolę sygnalizacji P/RGP na procesy wzrostu i rozwoju GBM. Według przeprowadzanych analiz sygnalizacja nie jest jednak regulowana, na poziomie ekspresji receptora, badanymi czynnikami takimi jak: niedotlenienie, niedobór składników odżywczych czy warunki nekrozy. Przedstawiane dane są zgodne z odkryciami doniesionymi przez Habib i wsp. Wykryli oni bowiem brak różnic ekspresji białka PGR (izoforny A) w astrocytach korowych szczurów poddanych warunkom normoksji i hipoksji [367].

Zauważyli jednak zwiększenie ekspresji mRNA *PGR* (izoforny A) w warunkach niedotlenienia [367]. W przedstawianej pracy ekspresja mRNA *PGR* nie została opisana ze względu na występowanie poziomu ekspresji poniżej progu oznaczalności metody. Różnica w odnotowaniu wyników ekspresji mRNA *PGR* może być wywołana różnicą między linią nowotworową astrocytów, a zdrową tkanką, różnicą gatunkową lub różnicami w protokole wywołania niedotlenienia. Występowanie niezgodności ekspresji genu z ekspresją białka w GBM jest często odnotowywane [396, 397]. Stwierdzono to również w przypadku samego PGR, którego ekspresja białka wzrastała wraz ze złośliwością guza, chociaż poziom mRNA zmniejszał się wraz ze stopniem guza [395, 398].

Przedstawiane analizy należałoby powtórzyć z zastosowaniem dłuższego czasu inkubacji komórek, co mogłoby wpłynąć na zmiany w ekspresji PGR po dłuższej ekspozycji na czynniki badane.

Receptor progesteronowy w guzach pobranych od pacjentów

Ekspresję PGR wykazano również w guzach glejowych pochodzących od pacjentów. Ekspresja wykrywana była zarówno w guzach niższego stopnia jak i GBM [399–402]. Zauważono, że w GBM jest jednak więcej komórek PGR dodatnich, niż w gwiaździankach o niskim stopniu złośliwości czy gwiaździankach anaplastycznych, a wyższa ekspresja PGR skorelowana jest z wyższym wskaźnikiem proliferacji [399]. Kolejne badania również potwierdziły występowanie PGR w guzach GBM [400] i jego wyższą ekspresję w guzach o większej złośliwości [401].

Według analiz przedstawianych w pracy badani pacjenci również wyrażali ekspresję mRNA i białka PGR. Nie różnili się ekspresją mRNA *PGR* pod względem struktury guza czy płci. Ekspresja mRNA *PGR* odnotowywana w GBM jest na niskim poziomie, w związku z powyższym różnice mogą być nie odnotowywane przy obecnym progu oznaczalności metody i zbadanej liczbie próbek.

Ekspresja białka PGR wykrywana jest na wyższych poziomach, a według wykonanych analiz jest najniższa w rdzeniu guza i wzrasta kolejno w korze i obrzeżu guza. Powyższe obserwacje potwierdziła analiza immunohistochemiczna, wykazując szczególnie wzrost ekspresji jądrowej białka PGR w obrzeżu guza.

Powyższe obserwacje mogą być jedną z przyczyn różnicy w stopniu proliferacji poszczególnych regionów guza. PGR indukuje bowiem szlaki proliferacji i migracji komórek GBM *in vitro*. Ksenotransplantacja ludzkich komórek glejaka U87 w korze mózgowej szczura indukowana P, wykazała wzrost wzrostu i infiltracji guza poprzez interakcję z wewnątrzkomórkowym PGR [403]. Prace prowadzone na ortotopowym mysim modelu GBM (U118MG) nie wykazały wzrostu guza w wyniku podawania niskich dawek P [404]. Autorzy sugerują tu równie nieistotne co prawda statystycznie, hamowanie wzrostu guza przez P w niskich dawkach, a także istotne statystycznie zahamowanie wzrostu guza przy zastosowaniu wysokich dawek P [404].

W przedstawianych analizach, po uwzględnieniu płci, różnica w ekspresji powiele się tylko pomiędzy korą, a otoczeniem guza i to tylko u kobiet. Może to wskazywać na różny sposób regulacji ekspresji PGR w GBM pomiędzy kobietami i mężczyznami. W świetle różnej odpowiedzi komórek GBM na indukcję P w zależności od dawki, istotnym wydaje się badanie różnicy w odpowiedzi komórek guza na stężenia P występujących zarówno u mężczyzn i kobiet w różnych stanach fizjologicznych.

Receptor prolaktynowy w modelu i in vitro

Dotychczas PRLR wykryto w cytoplazmie linii komórkowych glejaka U251-MG, U87 i U373, które różniły się między sobą pod względem ekspresji badanego białka [405]. Białko PRLR wyrażane było również w liniach komórkowych ludzkiego GBM (U251-MG, LN229), mysiego GBM (GL26) i szczurzego GBM (C6). Wśród nich podstawowa, długa izoforma występowała we wszystkich liniach, natomiast pozostałe izoformy występowały tylko w ludzkich GBM [406]. W analizach przedstawianych w pracy również wykryto ekspresję PRLR zarówno na poziomie genu jak i białka w linii komórkowej U87.

Nasilenie ekspresji PRLR było obserwowane w okolicy okołojądrowej komórek [405], co potwierdzają analizy przedłożone w niniejszej pracy. Podobną lokalizację subkomórkową PRLR określono również wcześniej w innych typach komórek, takich jak hepatocyty szczurów [407].

PRL nie wpływał na żywotność komórek linii U87 i U373-MG [406]. Zauważono jednak, że indukował proliferację i wzrost linii komórkowych ludzkiego glejaka G28, G55 i U87 w sposób zależny od dawki [408, 409], a także przy dawce 100 ng/ml w przypadku linii U251-MG i U373-MG GBM [406]. Obserwacji tych nie potwierdzono jednak w innym układzie badanym, gdzie komórki linii U251-MG, U87 i U373 nie wykazały zwiększonej proliferacji po poddaniu ich wpływowi PRL [405]. Mogło być to jednak spowodowane dobraniem warunków doświadczalnych, na co zwracają uwagę sami autorzy. Wykazano również, że antagoniści PRLR (PRLRA, ang. prolactin receptor antagonist) zmniejszali szybkość proliferacji komórek U373-MG i U251-MG, a także żywotność komórek U87, U373-MG i GL26 [406].

W niniejszej pracy przedstawiono wpływ hipoksji na zmniejszenie ekspresji mRNA *PRLR*. W świetle danych literaturowych może to być mechanizm zabezpieczenia komórki przed nadmierną proliferacją w miejscu z niedostateczną podażą tlenu. Należy jednak zwrócić uwagę, że ekspresja PRLR wymagana do pośredniczenia w działaniach proliferacyjnych PRL w liniach komórkowych raka sutka jest bardzo niska [385]. Należałoby, w związku z powyższym sprawdzić wpływ PRL na proliferację komórek wystawionych na warunki hipoksji, by móc w pełni wnioskować o jej wpływie na proliferację poprzez PRLR.

Wykazano również, że PRL zwiększa zdolności inwazyjne komórek U251-MG (ale nie U87 i U373), natomiast PRLRA znoszą ten efekt [405]. Mechanizm ten może

być wywołany wpływem PRL (poprzez PRLR) na zwiększenie ekspresji MMP (MMP-2 i MMP-9), a przez to zintensyfikowaniem zdolności migracyjnych komórek GBM. Potwierdziła to obserwacja hamowania tych zdolności przez PRLRA [406].

W przedstawionym układzie badanym odnotowano spadek ekspresji mRNA *PRLR*, który może się wiązać z hamowaniem zdolności migracyjnych komórek, czyli możliwości ucieczki w inną bardziej sprzyjającą niszę. W badanych warunkach hipoksji (inhibicja PDH przez CoCl_2) obserwujemy zmiany charakterystyczne dla niedotlenienia występującego w rdzenia guza [340]. W przypadku niedotlenienia cyklicznego podczas, którego ekspresja HIF-1 α wzrasta silniej i dłużej niż w przypadku niedotlenienia ciągłego [410] ekspresja PRLR może być wyrażana na wyższym poziomie umożliwiającym migrację komórek. W związku z powyższym, należałoby sprawdzić czy w przypadku niedotlenienia cyklicznego charakterystycznego dla kory guza ekspresja mRNA *PRLR* również prezentowałaby się na podobnym poziomie.

Wykazano, że w komórkach U251-MG i U87 PRL indukuje wewnątrzkomórkową fosforylację STAT5, a PRLRA znosi ten efekt [405]. Ekspresja PRLR może być regulowana przez drugi supresor sygnalizacji cytokin (SOCS2, ang. suppressor of cytokine signaling 2)[411], który reguluje również szlak JAK/STAT, a STAT wykazuje zwiększoną aktywność w GBM [412, 413].

PRL wyrażana jest w komórkach ludzkich linii GBM (U251-MG, U87, U373-MG) na niskim poziomie (graniczącym z poziomem wykrywalności) [406]. Jest to jednak charakterystyczne w przypadku tkanek pozaprzysadkowych wytwarzających PRL, których to linie komórkowe są ciągłością [414]. PRL może być dostarczana do guza nie tylko przez jego produkcję przez guz, ale również przez wsteczny przepływ krwi od przedniego płata przysadki do podwzgórza [278]. PRL stymuluje proliferację, różnicowanie i migrację neuronalnych komórek macierzystych, a także proliferację prekursorów komórek glejowych [415]. PRL osłabia również właściwości cytotoksyczne cisplatyny oraz temozolomidu, a właściwie zwiększa na nie odporność ludzkich komórek GBM U251-MG. Natomiast PRLRA zwiększa cytotoksyczne działanie cisplatyny w komórkach U251-MG [406]. Indukcja nadekspresji PRL w komórkach U251-MG GBM wywołuje wzrost żywotności komórek i spadek chemowrażliwości (na cisplatynę), natomiast indukcja nadekspresji PRLRA zmniejsza żywotność komórek GBM i zwiększyła wrażliwość na cisplatynę [406].

Receptor prolaktynowy w guzach pobranych od pacjentów

Ekspresję białka PRLR wykryto w 66% przypadków guza GBM. Poziom wyrażanej ekspresji różnił się pomiędzy przypadkami, a 50% pacjentów wyrażało ekspresję powyżej progu odcięcia wyznaczonego przez autorów (25% ekspresji w tkance badanej) [405]. Ekspresję PRLR wykryto również w różnym stopniu w tkance sąsiadującej z guzem [405]. Analizy przedstawiane w niniejszej pracy potwierdzają występowanie ekspresji PRLR w guzach GBM. Pośrednio potwierdzają również dane literaturowe o braku różnic pomiędzy guzem, a zdrową tkanką, nie odnotowano bowiem różnic w ekspresji PRLR pomiędzy guzem właściwym (rdzeń i kora guza), a obrzeżem guza, stanowiącym pogranicze między guzem, a tkanką sąsiadującą.

Dane transkryptomiczne z bazy danych TCGA (ang. The Cancer Genome Atlas) wykazały, że mRNA *PRLR* wykrywane jest również w próbkach glejaków od II do III stopnia (również w GBM) [406]. Ekspresja mRNA *PRL* wykrywana jest natomiast w większym stopniu w GBM [406]. Odnotowano również pozytywną korelację pomiędzy ekspresjami PRLR i PRL w GBM, a także pomiędzy PRL, a MMP-2 [406]. Ekspresja MMP jest natomiast skorelowana inwazyjnością guza GBM [416]. Nie stwierdzono różnic w przeżywalności pacjentów pod względem ekspresji mRNA *PRL* i *PRLR* [406]. Zaobserwowano jednak, że wśród pacjentów (zarówno glejak II- III stopnia jak i GBM) z długim czasem przeżycia, większe odsetki charakteryzują się niską ekspresją mRNA *PRLR* lub brakiem ekspresji mRNA *PRL* [406].

Pacjenci po uwzględnieniu płci nie różnili się pod względem ekspresji mRNA *PRLR* i *PRL* [406]. Mężczyźni z GBM i wysokim poziomem ekspresji mRNA *PRLR* mieli gorszy wskaźnik przeżywalności, a mężczyźni z glejakiem II-III stopnia i wysokim PRLR mieli lepszy wskaźnik przeżywalności (w obu przypadkach w porównaniu do pacjentów z niskim PRLR) [406]. U kobiet natomiast wysoki poziom ekspresji PRLR w GBM poprawiał wskaźnik przeżywalności [406].

Dane te częściowo są sprzeczne z obserwacjami przedstawionym w pracy, bowiem według przedstawianych analiz ekspresja mRNA *PRLR* była w znacznym stopniu wyższa w rdzeniu guza u mężczyzn niż u kobiet. Zależność tą zaobserwowano tylko w rdzeniu guza i tylko na poziomie mRNA. Brak potwierdzenia uzyskanych wyników w literaturze może być spowodowany traktowaniem guza w innych badaniach jako homogennej całości, bez uwzględnienia struktur guza. Dodatkowo zaobserwowany wpływ

ekspresji mRNA *PRLR* na przeżywalność w sposób zależny od płci, sugeruje wpływ płci na ekspresję *PRLR* w guzie GBM, który wymaga dalszych badań.

Występowanie receptora folikulotropowego w glejaku wielopostaciowym

Powszechne przekonanie o występowaniu FSHR tylko w tkankach i organach związanych z układem rozrodczym zostało w ostatnim dziesięcioleciu przełamane [417]. Obecnie nie zaprzecza się występowaniu tego receptora również w innych tkankach, tak jak wcześniej wspomniano (kościach [312], monocytach [313], wątrobie [314], rozwijającym się łożysku [315], komórkach śródbłonna z żyły pępkowej [316]). Potwierdzono również występowanie tego receptora w naczyniach krwionośnych złośliwych guzów [317, 318] i przerzutów [319], a także w komórkach linii komórkowej raka gruczołu krokowego [322].

W literaturze brakuje jednak danych o ekspresji receptora folikulotropowego w guzie GBM. W przedstawianych w pracy badaniach zaobserwowano występowanie ekspresji tego receptora zarówno w linii komórkowej U87 glejaka, jak i w guzach pochodzących od pacjentów. Obserwacje potwierdzono dwiema metodami, metodą ELISA i odpowiednio dla komórek mikroskopią konfokalną, a dla tkanek analizą immunohistochemiczną. Wszystkie metody potwierdziły występowanie białka FSHR. W przypadku komórek FSHR zlokalizowany był w cytoplazmie z nasileniem w okolicach jądra komórkowego. W przypadku badań immunohistochemicznych zaobserwowano obecność receptora zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowych w dużym odsetku komórek. Zauważono również ekspresję receptora w komórkach nabłonka naczyń krwionośnych, co jest zgodne z danymi literaturowymi w przypadku innych nowotworów. W literaturze odnotowano bowiem niejednokrotnie ekspresję tego receptora w komórkach śródbłonna naczyń guzów złośliwych [317, 318]. Na podstawie samej analizy ilościowej przeprowadzonej metodą ELISA można by było twierdzić, iż obserwowana ekspresja pochodzi właśnie ze śródbłonna naczyń. Jednak odnotowana ilość (średnio około 2 ng/mg białka całkowitego) białka FSHR i wyniki analiz immunohistochemicznych pozwalają stwierdzić obecność tego receptora również w komórkach guza GBM.

Analizy ekspresji białka FSHR w komórkach mózgu szczurów wykazały, że komórki glejowe [418] (w tym astrocyty [419]) nie wyrażają ekspresji FSHR w przeciwieństwie do neuronów. Podobne informacje przekazuje ogólnodostępna baza danych: The Human Protein Atlas (Atlas białek ludzki), według którego FSHR nie jest wyrażany

w astrocytach, oligodendrocytach czy też komórkach mikrogleju, natomiast jest wyrażany w neuronach [420].

Prezentowane wyniki wykazujące ekspresję FSHR w guzie GBM wydają się więc bardzo istotnym spostrzeżeniem, jednakże należy przeprowadzić dodatkowe, ponowne analizy na większej liczbie guzów pobranych od pacjentów oraz zastosować dodatkowe metody badawcze jak np. metoda Western Blot, w celu potwierdzenia uzyskanych rezultatów.

Rola FSHR i jego liganda FSH jest bardzo istotna w nowotworze raka jajnika, gdzie, jak wykazano przyczynia się do wielu mechanizmów kancerogenezy. Zaobserwowano, że w linii komórkowej raka jajnika FSH stymuluje ekspresję czwartego czynnika transkrypcji wiążącego oktamer (OTC4, ang. octamer-binding transcription factor 4), który prawdopodobnie przyczynia się do hamowania apoptozy w tych komórkach [421]. Wykazano również, że białko OCT4 zwiększa ekspresję genów *Notch* (neurogenne białko homologowe locus notch 1, ang. neurogenic locus notch homolog protein 1), *Sox2* (ang. SRY-Box Transcription Factor 1) i *Nanog* (czynnik transkrypcyjny Nanog, ang. protein homeobox NANOG), a przez to indukuje proliferację i różnicowanie komórki nowotworowej [421]. Dowiedziono, że białko OTC4 jest nadmiernie wyrażane również w guzie GBM [422], a FSHR aktywowany przez FSH indukuje proliferację komórek nabłonka powierzchniowego jajnika poprzez szlak MAPK/ERK (najprawdopodobniej przez FSHR3) [325]. Ponadto wykazano, że nadekspresja FSHR wywołuje wzrost ekspresji HER-2 (receptor kinazy tyrozynowo-białkowej erbB-2, ang. receptor tyrosine-protein kinase erbB-2), C-Myc i EGFR w raku jajnika [423]. Aktywacja FSHR przez FSH zwiększa potencjał migracyjny komórek raka jajnika poprzez szlak PI3K/Akt [424]. FSH poprzez swój receptor i wiele innych szlaków sygnałowych komórki wywołuje ekspresję HIF1 α , co może pozwalać osiągnąć profil ekspresji genów charakterystyczny dla hipoksji w stanie normoksji [425].

Zważywszy na konsekwencje molekularne wynikające z ekspresji FSHR w raku jajnika, przedstawiane wyniki ekspresji FSHR w guzie GBM, a także wzrost występowania guza GBM u kobiet w okresie pomenopauzalnym (wzrost poziom FSH), dalsze badania nad ekspresją i rolą FSHR w GBM powinny stanowić punkt zainteresowania szerszego grona badaczy.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Niewzrastający rdzeń guza GBM, obejmujący obszar martwicy, charakteryzował się obniżonym lub niezmiennym poziomem ekspresji badanych receptorów zależnych od hormonów płciowych w porównaniu do strefy guza rosnącego (kora guza) i obrzeża guza.
2. Strefa silnego wzrostu guza (kora guza) GBM cechowała się obniżonym lub niezmiennym poziomem ekspresji badanych receptorów zależnych od hormonów płciowych w porównaniu do obrzeża guza.
3. Ekspresja badanych receptorów w poszczególnych strukturach guza nie różniła się u kobiet i mężczyzn, z wyjątkiem ekspresji receptora PRLR w rdzeniu guza, która była niższa u kobiet.
4. Mężczyźni charakteryzowali się niższą ekspresją mRNA receptora *ERβ* w rdzeniu guza w porównaniu do kory guza GBM.
5. Kobiety cechowały się niższą ekspresją białka receptorów AR i *ERβ* w rdzeniu guza w porównaniu do obrzeża guza GBM.
6. Warunki panujące w guzie GBM (hipoksja i niedobór składników odżywczych) były czynnikami, które wywarły wpływ na zmiany w ekspresji badanych receptorów w warunkach *in vitro*.
7. Za udziałem receptorów zależnych od hormonów płciowych w zmianie biologii komórek glejaka wielopostaciowego mogą przemawiać stwierdzone zmiany w ekspresji badanych receptorów u kobiet i mężczyzn. Jednakże dostępne dane nie pozwalają jednoznacznie określić roli tych receptorów w progresji glejaka wielopostaciowego.

PIŚMIENNIECTWO

1. Mandal AS, Brem S, Suckling J. Brain network mapping and glioma pathophysiology. *Brain Commun.* **2023**;5(2). doi:10.1093/BRAINCOMMS/FCAD040
2. Zülch K. Histological typing of tumours of the central nervous system. *World Heal Organ Genevae.* **1979**.
3. Kleihues P, Burger PC SB. Histological typing of tumours of the central nervous system. *World Heal Organ Int Histol Classif tumours Springer, Heidelb.* **1993**.
4. Kleihues P CW. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. *IARC Press Lyon.* 2000.
5. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **2007**;114(2):97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
6. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **2016**;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
7. Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer.* **2022**;128(1):47-58. doi:10.1002/CNCR.33918
8. Louis DN, Wesseling P, Paulus W, et al. cIMPACT-NOW update 1: Not Otherwise Specified (NOS) and Not Elsewhere Classified (NEC). *Acta Neuropathol.* **2018**;135(3):481-484. doi:10.1007/S00401-018-1808-0/TABLES/1
9. Louis DN, Giannini C, Capper D, et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant. *Acta Neuropathol.* **2018**;135(4):639-642. doi:10.1007/S00401-018-1826-Y
10. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV.” *Acta Neuropathol.* **2018**;136(5):805-810. doi:10.1007/S00401-018-1913-0/TABLES/1
11. Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse

- gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAFV600E mutation. *Acta Neuropathol.* **2019**;137(4):683-687. doi:10.1007/S00401-019-01987-0
12. Brat DJ, Aldape K, Colman H, et al. cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathol.* **2020**;139(3):603-608. doi:10.1007/S00401-020-02127-9
 13. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol.* **2020**;30(4):844-856. doi:10.1111/BPA.12832
 14. Ellison DW, Aldape KD, Capper D, et al. cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathol.* **2020**;30(5):863-866. doi:10.1111/BPA.12866
 15. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* **2021**;23(8):1231-1251. doi:10.1093/NEUONC/NOAB106
 16. Louis DN, von Deimling A. Grading of diffuse astrocytic gliomas: Broders, Kernohan, Zülch, the WHO... and Shakespeare. *Acta Neuropathol.* **2017**;134(4):517-520. doi:10.1007/S00401-017-1765-Z
 17. Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, et al. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol.* **2007**;9(3):319-325. doi:10.1215/15228517-2007-016
 18. Lee C-H, Jung K-W, Yoo H, Park S, Lee SH. Epidemiology of Primary Brain and Central Nervous System Tumors in Korea. *J Korean Neurosurg Soc.* **2010**;48(2):145. doi:10.3340/jkns.2010.48.2.145
 19. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro Oncol.* **2017**;19(5):1-88. doi:10.1093/neuonc/nox158
 20. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol.* **2013**;15(2):1-56. doi:10.1093/neuonc/not151
 21. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro Oncol.* **2020**;22(1):1-96.

doi:10.1093/NEUONC/NOAA200

22. Walker E V, Davis FG, CBTR founding affiliates. Malignant primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in Canada from 2009 to 2013. *Neuro Oncol.* **2019**;21(3):360-369. doi:10.1093/neuonc/noy195
23. Fabbro-Peray P, Zouaoui S, Darlix A, et al. Association of patterns of care, prognostic factors, and use of radiotherapy–temozolomide therapy with survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a French national population-based study. *J Neurooncol.* **2019**;142(1):91-101. doi:10.1007/s11060-018-03065-z
24. Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, et al. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol.* **2012**;107(1):207-212. doi:10.1007/s11060-011-0738-7
25. Tran B, Rosenthal MA. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *J Clin Neurosci.* **2010**;17(4):417-421. doi:10.1016/j.jocn.2009.09.004
26. Claus EB, Walsh KM, Wiencke JK, et al. Survival and low-grade glioma: the emergence of genetic information. *Neurosurg Focus.* **2015**;38(1):E6. doi:10.3171/2014.10.FOCUS12367
27. Gigineishvili D, Shengelia N, Shalashvili G, Rohrmann S, Tsiskaridze A, Shakarishvili R. Primary brain tumour epidemiology in Georgia: First-year results of a population-based study. *J Neurooncol.* **2013**;112(2):241-246. doi:10.1007/s11060-013-1054-1
28. Dubrow R, Darefsky AS. Demographic variation in incidence of adult glioma by subtype, United States, 1992-2007. *BMC Cancer.* **2011**;11:325. doi:10.1186/1471-2407-11-325
29. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic Pathways to Glioblastoma. *Cancer Res.* **2004**;64(19):6892-6899. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
30. Hansen S, Rasmussen BK, Laursen RJ, et al. Treatment and survival of glioblastoma patients in Denmark: The Danish Neuro-Oncology Registry 2009–2014. *J Neurooncol.* **2018**;139(2):479-489. doi:10.1007/s11060-018-2892-7
31. Cheo STT, Lim GH, Lim KHC. Glioblastoma multiforme outcomes of 107 patients treated in two Singapore institutions. *Singapore Med J.* **2017**;58(1):41-45. doi:10.11622/smedj.2016044
32. Ghosh M, Shubham S, Mandal K, Trivedi V, Chauhan R, Naseera S. Survival and

- prognostic factors for glioblastoma multiforme: Retrospective single-institutional study. *Indian J Cancer*. **2017**;54(1):362-367. doi:10.4103/ijc.IJC_157_17
33. Li K, Lu D, Guo Y, et al. Trends and patterns of incidence of diffuse glioma in adults in the United States, 1973-2014. *Cancer Med*. **2018**;7(10):5281-5290. doi:10.1002/cam4.1757
 34. Bohn A, Braley A, De La Vega PR, Carlos Zevallos J, Barengo NC. The association between race and survival in glioblastoma patients in the US: A retrospective cohort study. *PLoS One*. **2018**;13(6). doi:10.1371/journal.pone.0198581
 35. Liu M, Thakkar JP, Garcia CR, et al. National cancer database analysis of outcomes in pediatric glioblastoma. *Cancer Med*. **2018**;7(4):1151-1159. doi:10.1002/cam4.1404
 36. Bruhn H, Strandéus M, Milos P, Hallbeck M, Vrethem M, Lind J. Improved survival of Swedish glioblastoma patients treated according to Stupp. *Acta Neurol Scand*. **2018**;138(4):332-337. doi:10.1111/ane.12966
 37. De Witt Hamer PC, Ho VKY, Zwinderman AH, et al. Between-hospital variation in mortality and survival after glioblastoma surgery in the Dutch Quality Registry for Neuro Surgery. *J Neurooncol*. **2019**;144(2):313-323. doi:10.1007/s11060-019-03229-5
 38. Tripaldi R, Stuppia L, Alberti S. Human height genes and cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. **2013**;1836(1):27-41. doi:10.1016/j.bbcan.2013.02.002
 39. Perry JK, Liu DX, Wu ZS, Zhu T, Lobie PE. Growth hormone and cancer: An update on progress. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. **2013**;20(4):307-313. doi:10.1097/MED.0b013e328363183a
 40. Watts EL, Perez-Cornago A, Appleby PN, et al. The associations of anthropometric, behavioural and sociodemographic factors with circulating concentrations of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2 and IGFBP-3 in a pooled analysis of 16,024 men from 22 studies. *Int J Cancer*. **2019**;145(12):3244-3256. doi:10.1002/ijc.32276
 41. Boguszewski CL, Boguszewski MC da S. Growth Hormone's Links to Cancer. *Endocr Rev*. **2019**;40(2):558-574. doi:10.1210/er.2018-00166
 42. Song X, Gong X, Zhang T, Jiang W. Height and risk of colorectal cancer: A meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*. **2018**;27(6):521-529.

doi:10.1097/CEJ.0000000000000390

43. Liang S, Lv G, Chen W, Jiang J, Wang J. Height and kidney cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2015**;141(10):1799-1807. doi:10.1007/s00432-014-1870-5
44. Aune D, Vieira AR, Chan DSM, et al. Height and pancreatic cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control*. **2012**;23(8):1213-1222. doi:10.1007/s10552-012-9983-0
45. Wiedmann MKH, Brunborg C, Di Ieva A, et al. The impact of body mass index and height on the risk for glioblastoma and other glioma subgroups: A large prospective cohort study. *Neuro Oncol*. **2017**;19(7):976-985. doi:10.1093/neuonc/now272
46. Cote DJ, Downer MK, Smith TR, Smith-Warner SA, Egan KM, Stampfer MJ. Height, waist circumference, body mass index, and body somatotype across the life course and risk of glioma. *Cancer Causes Control*. **2018**;29(8):707-719. doi:10.1007/s10552-018-1052-x
47. Kitahara CM, Wang SS, Melin BS, et al. Association between adult height, genetic susceptibility and risk of glioma. *Int J Epidemiol*. **2012**;41(4):1075-1085. doi:10.1093/ije/dys114
48. Moore SC, Rajaraman P, Dubrow R, et al. Height, body mass index, and physical activity in relation to glioma risk. *Cancer Res*. **2009**;69(21):8349-8355. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1669
49. Helseth A, Tretli S. Pre-Morbid Height and Weight as Risk Factors for Development of Central Nervous System Neoplasms. *Neuroepidemiology*. **1989**;8(6):277-282. doi:10.1159/000110195
50. Little RB, Madden MH, Thompson RC, et al. Anthropometric factors in relation to risk of glioma. *Cancer Causes Control*. **2013**;24(5):1025-1031. doi:10.1007/s10552-013-0178-0
51. Fang X, Wei J, He X, et al. Quantitative association between body mass index and the risk of cancer: A global Meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cancer*. **2018**;143(7):1595-1603. doi:10.1002/ijc.31553
52. Yang Y, Dong J, Sun K, et al. Obesity and incidence of lung cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer*. **2013**;132(5):1162-1169. doi:10.1002/ijc.27719
53. Porter MP, Stanford JL. Obesity and the risk of prostate cancer. *Prostate*.

- 2005**;62(4):316-321. doi:10.1002/pros.20121
54. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* **2001**;45(3):S116-S124. doi:10.1067/MJD.2001.117432
 55. Jialal I, Devaraj S. Subcutaneous adipose tissue biology in metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Investig.* **2018**;33(1). doi:10.1515/HMBCI-2017-0074/MACHINEREADABLECITATION/RIS
 56. Yu X, Jiang Y, Wei W, et al. Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumor Biol.* **2015**;36(2):967-972. doi:10.1007/s13277-014-2709-z
 57. Potharaju M, Mangaleswaran B, Mathavan A, et al. Body Mass Index as a Prognostic Marker in Glioblastoma Multiforme: A Clinical Outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **2018**;102(1):204-209. doi:10.1016/j.ijrobp.2018.05.024
 58. Jones LW, Ali-Osman F, Lipp E, et al. Association between body mass index and mortality in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Causes Control.* **2010**;21(12):2195-2201. doi:10.1007/s10552-010-9639-x
 59. Kaplan S, Novikov I, Modan B. Nutritional factors in the etiology of brain tumors: potential role of nitrosamines, fat, and cholesterol. *Am J Epidemiol.* **1997**;146(10):832-841. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A009201
 60. Seliger C, Ricci C, Meier CR, et al. Diabetes, use of antidiabetic drugs, and the risk of glioma. *Neuro Oncol.* **2015**;18(3):340-349. doi:10.1093/NEUONC/NOV100
 61. Gittleman H, Boscia A, Ostrom QT, et al. Survivorship in adults with malignant brain and other central nervous system tumor from 2000-2014. *Neuro Oncol.* **2018**;20:6-16. doi:10.1093/neuonc/noy090
 62. Shabihkhani M, Telesca D, Movassaghi M, et al. Incidence, survival, pathology, and genetics of adult Latino Americans with glioblastoma. *J Neurooncol.* **2017**;132(2):351-358. doi:10.1007/s11060-017-2377-0
 63. Maxwell R, Luksik AS, Garzon-Muvdi T, et al. Population-based Study Determining Predictors of Cancer-Specific Mortality and Survival in Pediatric High-grade Brainstem Glioma. *World Neurosurg.* **2018**;119:1006-1015. doi:10.1016/j.wneu.2018.08.044
 64. Bin Abdulrahman AK, Bin Abdulrahman KA, Bukhari YR, Faqihi AM, Ruiz JG. Association between giant cell glioblastoma and glioblastoma multiforme in the

- United States: A retrospective cohort study. *Brain Behav.* **2019**;9(10):01402. doi:10.1002/brb3.1402
65. Xie JC, Yang S, Liu XY, Zhao YX. Effect of marital status on survival in glioblastoma multiforme by demographics, education, economic factors, and insurance status. *Cancer Med.* **2018**;7(8):3722-3742. doi:10.1002/cam4.1688
 66. Lam S, Lin Y, Zinn P, Su J, Pan IW. Patient and treatment factors associated with survival among pediatric glioblastoma patients: A Surveillance, Epidemiology, and End Results study. *J Clin Neurosci.* **2018**;47:285-293. doi:10.1016/j.jocn.2017.10.041
 67. Braganza MZ, Kitahara CM, Berrington de González A, Inskip PD, Johnson KJ, Rajaraman P. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro Oncol.* **2012**;14(11):1316-1324. doi:10.1093/neuonc/nos208
 68. Baglietto L, Giles GG, English DR, Karahalios A, Hopper JL, Severi G. Alcohol consumption and risk of glioblastoma; evidence from the Melbourne collaborative cohort study. *Int J Cancer.* **2011**;128(8):1929-1934. doi:10.1002/ijc.25770
 69. And AM, Mitsumori K. Spontaneous Occurrence and Chemical Induction of Neurogenic Tumors in Rats — Influence of Host Factors and Specificity of Chemical Structure. *Crit Rev Toxicol.* **1990**;20(4):287-310. doi:10.3109/10408449009089866
 70. Galeone C, Malerba S, Rota M, et al. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of brain tumours. *Ann Oncol.* **2013**;24(2):514-523. doi:10.1093/annonc/mds432
 71. Qi Z-Y, Shao C, Yang C, Wang Z, Hui G-Z. Alcohol consumption and risk of glioma: a meta-analysis of 19 observational studies. *Nutrients.* **2014**;6(2):504-516. doi:10.3390/nu6020504
 72. Cote DJ, Samanic CM, Smith TR, et al. Alcohol intake and risk of glioma: results from three prospective cohort studies. *Eur J Epidemiol.* **2021**;36(9):965-974. doi:10.1007/S10654-021-00800-1
 73. Hurley SF, McNeil JJ, Donnan GA, Forbes A, Salzberg M, Giles GG. Tobacco smoking and alcohol consumption as risk factors for glioma: a case-control study in Melbourne, Australia. *J Epidemiol Community Health.* **1996**;50(4):442-446. doi:10.1136/jech.50.4.442

74. Lee M, Wrensch M, Miike R. Dietary and tobacco risk factors for adult onset glioma in the San Francisco Bay Area (California, USA). *Cancer Causes Control*. **1997**;8(1):13-24. doi: 10.1023/a:1018470802969
75. Hu J, Johnson KC, Mao Y, et al. Risk factors for glioma in adults: a case-control study in northeast China. *Cancer Detect Prev*. **1998**;22(2):100-108. doi: 10.1046/j.1525-1500.1998.cdoa22.x
76. Hou L, Jiang J, Liu B, et al. Smoking and adult glioma: a population-based case-control study in China. *Neuro Oncol*. **2016**;18(1):105-113. doi:10.1093/neuonc/nov146
77. Li H-X, Peng X-X, Zong Q, et al. Cigarette smoking and risk of adult glioma: a meta-analysis of 24 observational studies involving more than 2.3 million individuals. *Onco Targets Ther*. **2016**;9:3511-3523. doi:10.2147/OTT.S99713
78. Qi Z-Y, Shao C, Zhang X, Hui G-Z, Wang Z. Exogenous and endogenous hormones in relation to glioma in women: a meta-analysis of 11 case-control studies. *PLoS One*. **2013**;8(7):e68695. doi:10.1371/journal.pone.0068695
79. Simińska D, Kojder K, Jeżewski D, et al. The pathophysiology of post-traumatic glioma. *Int J Mol Sci*. **2018**;19(8). doi:10.3390/ijms19082445
80. Tyagi V, Theobald J, Barger J, et al. Traumatic brain injury and subsequent glioblastoma development: Review of the literature and case reports. *Surg Neurol Int*. **2016**;7:78. doi:10.4103/2152-7806.189296
81. Annegers JF, Laws ER, Kurland LT, Grabow JD. Head trauma and subsequent brain tumors. *Neurosurgery*. **1979**;4(3):203-206. doi: 10.1227/00006123-197903000-00001
82. Inskip PD, Mellekjaer L, Gridley G, Olsen JH. Incidence of intracranial tumors following hospitalization for head injuries (Denmark). *Cancer Causes Control*. **1998**;9(1):109-116. doi: 10.1023/a:1008861722901
83. Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 2009 96. **2009**;9(6):429-439. doi:10.1038/nrc2641
84. Cavin C, Holzhaeuser D, Scharf G, Constable A, Huber WW, Schilter B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem Toxicol*. **2002**;40(8):1155-1163. doi:10.1016/S0278-6915(02)00029-7
85. Kang SS, Han KS, Ku BM, et al. Caffeine-mediated inhibition of calcium release

- channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival. *Cancer Res.* **2010**;70(3):1173-1183. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2886
86. Nkondjock A. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. *Cancer Lett.* **2009**;277(2):121-125. doi:10.1016/J.CANLET.2008.08.022
 87. Dubrow R, Darefsky AS, Freedman ND, Hollenbeck AR, Sinha R. Coffee, tea, soda, and caffeine intake in relation to risk of adult glioma in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Causes Control.* **2012**;23(5):757-768. doi:10.1007/s10552-012-9945-6
 88. Malerba S, Galeone C, Pelucchi C, et al. A meta-analysis of coffee and tea consumption and the risk of glioma in adults. *Cancer Causes Control.* **2013**;24(2):267-276. doi:10.1007/s10552-012-0126-4
 89. Creed JH, Smith-Warner SA, Gerke TA, Egan KM. A prospective study of coffee and tea consumption and the risk of glioma in the UK Biobank. *Eur J Cancer.* **2020**;129:123-131. doi:10.1016/j.ejca.2020.01.012
 90. Efird JT, Friedman GD, Sidney S, et al. The risk for malignant primary adult-onset glioma in a large, multiethnic, managed-care cohort: cigarette smoking and other lifestyle behaviors. *J Neurooncol.* **2004**;68(1):57-69. doi:10.1023/b:neon.0000024746.87666
 91. Yang M, Guo W, Yang C, et al. Mobile phone use and glioma risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* **2017**;12(5):e0175136. doi:10.1371/journal.pone.0175136
 92. Wang P, Hou C, Li Y, Zhou D. Wireless Phone Use and Risk of Adult Glioma: Evidence from a Meta-Analysis. *World Neurosurg.* **2018**;115:629-636. doi:10.1016/J.WNEU.2018.04.122
 93. Samanic CM, Cote DJ, Creed JH, et al. Prospective study of sleep duration and glioma risk. *Cancer Causes Control.* **2021**;32(9):1039-1042. doi: 10.1007/s10552-021-01447-9
 94. Oreškovic D, Kaštelančić A, Raguž M, et al. The vicious interplay between disrupted sleep and malignant brain tumors: a narrative review. *Croat Med J.* **2021**;62(4):376. doi:10.3325/CMJ.2021.62.376
 95. Lissoni P, Meregalli S, Nosetto L, et al. Increased Survival Time in Brain Glioblastomas by a Radioneuroendocrine Strategy with Radiotherapy plus

- Melatonin Compared to Radiotherapy Alone. *Oncology*. **1996**;53(1):43-46. doi:10.1159/000227533
96. Cutando A, López-Valverde A, Arias-Santiago S, DE Vicente J, DE Diego RG. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res*. **2012**;23(7):2747-2753. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22753734/>.
 97. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*. **2010**;10(3):181-193. doi:10.1038/nrc2809
 98. Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut*. **2006**;55(1):115-122. doi:10.1136/GUT.2004.047100
 99. Altinoz MA, Elmaci I, Cengiz S, Emekli-Alturfan E, Ozpinar A. From epidemiology to treatment: Aspirin's prevention of brain and breast-cancer and cardioprotection may associate with its metabolite gentisic acid. *Chem Biol Interact*. **2018**;291:29-39. doi:10.1016/J.CBI.2018.05.016
 100. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers*. **2022**;14(10):2412. doi:10.3390/cancers14102412
 101. Bannon FJ, O'Rourke MA, Murray LJ, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and brain tumour risk: a case–control study within the Clinical Practice Research Datalink. *Cancer Causes Control*. **2013**;24(11):2027-2034. doi:10.1007/s10552-013-0279-9
 102. Liu Y, Lu Y, Wang J, et al. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and brain tumour risk: a meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. **2014**;78(1):58-68. doi:10.1111/bcp.12311
 103. Daugherty SE, Moore SC, Pfeiffer RM, et al. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Glioma in the NIH-AARP Diet and Health Study Cohort. *Cancer Prev Res*. **2011**;4(12):2027-2034. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0274
 104. Gaist D, García-Rodríguez LA, Sørensen HT, Hallas J, Friis S. Use of low-dose aspirin and non-aspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of glioma: a case-control study. *Br J Cancer*. **2013**;108(5):1189-1194. doi:10.1038/bjc.2013.87
 105. Sørensen HT, Friis S, Nørgård B, et al. Risk of cancer in a large cohort of nonaspirin NSAID users: a population-based study. *Br J Cancer*. **2003**;88(11):1687-1692. doi:10.1038/sj.bjc.6600945
 106. Friis S, Sørensen HT, McLaughlin JK, Johnsen SP, Blot WJ, Olsen JH. A

- population-based cohort study of the risk of colorectal and other cancers among users of low-dose aspirin. *Br J Cancer*. **2003**;88(5):684-688. doi:10.1038/sj.bjc.6600760
107. Scheurer ME, El-Zein R, Thompson PA, et al. Long-term Anti-inflammatory and Antihistamine Medication Use and Adult Glioma Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2008**;17(5):1277-1281. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2621
 108. Ferris JS, McCoy L, Neugut AI, Wrensch M, Lai R. HMG CoA reductase inhibitors, NSAIDs and risk of glioma. *Int J cancer*. **2012**;131(6):E1031-7. doi:10.1002/ijc.27536
 109. Sivak-Sears NR, Schwartzbaum JA, Miike R, Moghadassi M, Wrensch M. Case-Control Study of Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Glioblastoma Multiforme. *Am J Epidemiol*. **2004**;159(12):1131-1139. doi:10.1093/aje/kwh153
 110. Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, et al. Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study. *J Cancer*. **1999**;82:155-160. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990719)82:2
 111. Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Hepworth SJ, McKinney PA, Van Tongeren M, Muir KR. History of allergies and risk of glioma in adults. *Int J Cancer*. **2006**;119(9):2165-2172. doi:10.1002/IJC.22091
 112. McCarthy BJ, Rankin K, Il'yasova D, et al. Assessment of Type of Allergy and Antihistamine Use in the Development of Glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2011**;20(2):370-378. doi:10.1158/1055-9965
 113. Rendon LF, Tewarie IA, Cote DJ, et al. Statins and Gliomas: A Systematic Review of the Preclinical Studies and Meta-Analysis of the Clinical Literature. *Drugs*. **2022**;82(3):293-310. doi:10.1007/s40265-021-01668-x
 114. Campen CJ, Porter BE. Subependymal Giant Cell Astrocytoma (SEGA) Treatment Update. *Curr Treat Options Neurol*. **2011**;13(4):380-385. doi:10.1007/s11940-011-0123-z
 115. Ahmed R, Oborski MJ, Hwang M, Lieberman FS, Mountz JM. Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Manag Res*. **2014**;6:149-170. doi:10.2147/CMAR.S54726
 116. Armstrong TS, Bishof AM, Brown PD, Klein M, Taphoorn MJB, Theodore-Oklota C. Determining priority signs and symptoms for use as clinical outcomes

- assessments in trials including patients with malignant gliomas: Panel 1 Report. *Neuro Oncol.* **2016**;18 (2):1-12. doi:10.1093/neuonc/nov267
117. Cohen AL, Colman H. Glioma Biology and Molecular Markers. *Cancer Treatment and Research.* **2015**; 163:15-30. doi: 10.1007/s11060-017-2379-y
 118. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* **2005**;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330
 119. Rajesh Y, Pal I, Banik P, et al. Insights into molecular therapy of glioma: current challenges and next generation blueprint. *Acta Pharmacol Sin.* **2017**;38(5):591-613. doi:10.1038/aps.2016.167
 120. Paolillo M, Comincini S, Schinelli S. In Vitro Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension. *Cancers (Basel).* **2021**;13(10). doi:10.3390/CANCERS13102449
 121. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2013**;110(10):4009-4014. doi:10.1073/pnas.1219747110
 122. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science.* **2014**;344(6190):1396-1401. doi:10.1126/science.1254257
 123. Hambardzumyan D, Bergers G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends in cancer.* **2015**;1(4):252. doi: 10.1016/j.trecan.2015.10.009
 124. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* **2015**;29(12):1203. doi: 10.1101/gad.261982.115
 125. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res.* **2004**;64(3):920-927. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-2073
 126. Bar EE. Glioblastoma, Cancer Stem Cells and Hypoxia. *Brain Pathol.* **2011**;21(2):119. doi:10.1111/J.1750-3639.2010.00460.X
 127. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest.* **2006**;86(12):1221-1232. doi: 10.1038/labinvest.3700482
 128. Dames SA, Martinez-Yamout M, De Guzman RN, Jane Dyson H, Wright PE.

- Structural basis for Hif-1 α /CBP recognition in the cellular hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci.* **2002**;99(8):5271-5276. doi:10.1073/PNAS.082121399
129. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* **1996**;271(30):17771-17778. doi:10.1074/JBC.271.30.17771
130. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* **1995**;270(3):1230-1237. doi:10.1074/jbc.270.3.1230
131. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* **2001**;292(5516):468-472. doi: 10.1126/science.1059796
132. Cockman ME, Masson N, Mole DR, et al. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* **2000**;275(33):25733-25741. doi:10.1074/jbc.M002740200
133. Corn PG, McDonald ER, Herman JG, El-Deiry WS. Tat-binding protein-1, a component of the 26S proteasome, contributes to the E3 ubiquitin ligase function of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Genet.* **2003**;35(3):229-237. doi:10.1038/ng1254
134. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* **2001**;20(18):5197-5206. doi:10.1093/EMBOJ/20.18.5197
135. Masson N, Singleton RS, Sekirnik R, et al. The FIH hydroxylase is a cellular peroxide sensor that modulates HIF transcriptional activity. *EMBO Rep.* **2012**;13(3):251-257. doi:10.1038/EMBOR.2012.9
136. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: A hypoxic switch. *Science.* **2002**;295(5556):858-861. doi:10.1126/science.1068592
137. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem.* **2000**;275(33):25130-25138. doi: 10.1074/jbc.M001914200
138. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.*

- 2005**;1(6):401-408. doi:10.1016/J.CMET.2005.05.001
139. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* **2010**;21(1):103-115. doi:10.1038/cr.2010.178
140. Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, et al. Reactive Oxygen Species Activate the HIF-1 α Promoter Via a Functional NF κ B Site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2007**;27(4):755-761. doi:10.1161/01.ATV.0000258979.92828.BC
141. Salnikow K, Kluz T, Costa M, et al. The Regulation of Hypoxic Genes by Calcium Involves c-Jun/AP-1, Which Cooperates with Hypoxia-Inducible Factor 1 in Response to Hypoxia. *Mol Cell Biol.* **2002**;22(6):1734-1741. doi:10.1128/MCB.22.6.1734-1741.2002
142. Xu L, Pathak PS, Fukumura D. Hypoxia-Induced Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3'-Kinase Signaling Pathways Contributes to Expression of Interleukin 8 in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res.* **2004**;10(2):701-707. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0953-03
143. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, et al. Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. *Mol Cell.* **2007**;26(1):63-74. doi:10.1016/J.MOLCEL.2007.02.024
144. Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brüne B. Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 α by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell.* **2003**;14(8):3470-3481. doi:10.1091/MBC.E02-12-0791
145. Callapina M, Zhou J, Schmid T, Köhl R, Brüne B. NO restores HIF-1 α hydroxylation during hypoxia: Role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* **2005**;39(7):925-936. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.009
146. Köhl R, Zhou J, Brüne B. Reactive oxygen species attenuate nitric-oxide-mediated hypoxia-inducible factor-1 α stabilization. *Free Radic Biol Med.* **2006**;40(8):1430-1442. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.012
147. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* **2010**;29(5):625-634. doi:10.1038/ONC.2009.441
148. Brat DJ. Glioblastoma: biology, genetics, and behavior. *Am Soc Clin Oncol Educ book Am Soc Clin Oncol Annu Meet.* **2012**;32(1):102-107. doi:10.14694/EdBook_AM.2012.32.48
149. Filatova A, Acker T, Garvalov BK. The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta.*

- 2013**;1830(2):2496-2508. doi:10.1016/J.BBAGEN.2012.10.008
150. Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011**;108(11):4274-4280. doi: 10.1073/pnas.1016030108
 151. Jain RK, Di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. **2007**;8(8):610-622. doi:10.1038/NRN2175
 152. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, et al. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. **2001**;21(10):3436-3444. doi:10.1128/MCB.21.10.3436-3444.2001
 153. Rock KL, Kono H. The Inflammatory Response to Cell Death. *J Neurosci*. **2008**;3:99-126. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2017-12.2012
 154. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. **2017**;14(7):399-416. doi:10.1038/nrclinonc.2016.217
 155. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*. **2004**;104(8):2224-2234. doi:10.1182/BLOOD-2004-03-1109
 156. Takenaka MC, Gabriely G, Rothhammer V, et al. Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nat Neurosci*. **2019**;22(5):729-740. doi:10.1038/s41593-019-0370-y
 157. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. **2013**;13(3):159-175. doi:10.1038/NRI3399
 158. Yee PP, Wei Y, Kim SY, et al. Neutrophil-induced ferroptosis promotes tumor necrosis in glioblastoma progression. *Nat Commun*. **2020**;11(1). doi:10.1038/S41467-020-19193-Y
 159. Miska J, Lee-Chang C, Rashidi A, et al. HIF-1 α Is a Metabolic Switch between Glycolytic-Driven Migration and Oxidative Phosphorylation-Driven Immunosuppression of Tregs in Glioblastoma. *Cell Rep*. **2019**;27(1):226-237. doi:10.1016/J.CELREP.2019.03.029
 160. Iwami K, Natsume A, Wakabayashi T. Cytokine networks in glioma. *Neurosurg Rev*. **2011**;34(3):253-264. doi:10.1007/S10143-011-0320-Y
 161. Albuлесcu R, Codrici E, Popescu ID, et al. Cytokine Patterns in Brain Tumour

- Progression. *Mediators Inflamm.* **2013**;2013. doi:10.1155/2013/979748
162. Span PN, Bussink J. Biology of hypoxia. *Semin Nucl Med.* **2015**;45(2):101-109. doi:10.1053/J.SEMNUCLMED.2014.10.002
163. Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M, McDonald DM. Abnormalities of Basement Membrane on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am J Pathol.* **2003**;163(5):1801. doi:10.1016/S0002-9440(10)63540-7
164. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* **2005**;15(1):102-111. doi:10.1016/J.GDE.2004.12.005
165. Lanzen J, Braun RD, Klitzman B, Brizel D, Secomb TW, Dewhirst MW. Direct demonstration of instabilities in oxygen concentrations within the extravascular compartment of an experimental tumor. *Cancer Res.* **2006**;66(4):2219-2223. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2958
166. Kamradt ML, Jung JU, Pflug KM, Lee DW, Fanniel V, Sitcheran R. NIK promotes metabolic adaptation of glioblastoma cells to bioenergetic stress. *Cell Death Dis.* **2021**;12(3). doi:10.1038/S41419-020-03383-Z
167. Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell.* **2009**;15:501-513. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018
168. Wolf A, Agnihotri S, Micallef J, et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J Exp Med.* **2011**;208(2):313-326. doi:10.1084/JEM.20101470
169. Lee JH, Liu R, Li J, et al. Stabilization of phosphofructokinase 1 platelet isoform by AKT promotes tumorigenesis. *Nat Commun.* **2017**;8(1):1-14. doi:10.1038/s41467-017-00906-9
170. Yang W, Lu Z. Pyruvate kinase M2 at a glance. *J Cell Sci.* **2015**;128(9):1655-1660. doi:10.1242/jcs.166629
171. Mair R, Wright AJ, Ros S, et al. Metabolic imaging detects low levels of glycolytic activity that vary with levels of C-MyC expression in patient-derived xenograft models of glioblastoma. *Cancer Res.* **2018**;78(18):5408-5418. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0759
172. Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, et al. Metabolic Targeting of Lactate Efflux by Malignant Glioma Inhibits Invasiveness and Induces Necrosis: An In Vivo Study.

- Neoplasia*. **2011**;13(7):620-632. doi:10.1593/NEO.11134
173. Chai Y, Wang C, Liu W, Fan Y, Zhang Y. MPC1 deletion is associated with poor prognosis and temozolomide resistance in glioblastoma. *J Neurooncol*. **2019**;144(2):293-301. doi:10.1007/S11060-019-03226-8/FIGURES/6
174. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med*. **2010**;2(31). doi:10.1126/scitranslmed.3000677
175. Chendong Y, Sudderth J, Tuyen D, Bachoo RG, McDonald JG, DeBerardinis RJ. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res*. **2009**;69(20):7986-7993. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2266
176. Cheng T, Sudderth J, Yang C, et al. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2011**;108(21):8674-8679. doi:10.1073/pnas.1016627108
177. Cárdenas-Navia LI, Mace D, Richardson RA, Wilson DF, Shan S, Dewhirst MW. The pervasive presence of fluctuating oxygenation in tumors. *Cancer Res*. **2008**;68(14):5812-5819. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6387
178. Ellingsen C, Øvrebø KM, Galappathi K, Mathiesen B, Rofstad EK. pO₂ fluctuation pattern and cycling hypoxia in human cervical carcinoma and melanoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **2012**;83(4):1317-1323. doi:10.1016/J.IJROBP.2011.09.037
179. Yasui H, Matsumoto S, Devasahayam N, et al. Low field magnetic resonance imaging to visualize chronic and cycling hypoxia in tumor-bearing mice. *Cancer Res*. **2010**;70(16):6427. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1350
180. Miao ZF, Zhao TT, Wang ZN, et al. Influence of different hypoxia models on metastatic potential of SGC-7901 gastric cancer cells. *Tumour Biol*. **2014**;35(7):6801-6808. doi:10.1007/S13277-014-1928-7
181. Hsieh CH, Lee CH, Liang JA, Yu CY, Shyu WC. Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity. *Oncol Rep*. **2010**;24(6):1629-1636. doi:10.3892/OR_00001027
182. Hsieh CH, Shyu WC, Chiang CY, Kuo JW, Shen WC, Liu RS. NADPH Oxidase Subunit 4-Mediated Reactive Oxygen Species Contribute to Cycling Hypoxia-

- Promoted Tumor Progression in Glioblastoma Multiforme. *PLoS One*. **2011**;6(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0023945
183. Malec V, Gottschald OR, Li S, Rose F, Seeger W, Hänze J. HIF-1 alpha signaling is augmented during intermittent hypoxia by induction of the Nrf2 pathway in NOX1-expressing adenocarcinoma A549 cells. *Free Radic Biol Med*. **2010**;48(12):1626-1635. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.008
 184. Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1 α Expression by Intermittent Hypoxia: Involvement of NADPH Oxidase, Ca²⁺ Signaling, Prolyl Hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol*. **2008**;217(3):674. doi:10.1002/JCP.21537
 185. Hsieh CH, Chang HT, Shen WC, Shyu WC, Liu RS. Imaging the impact of Nox4 in cycling hypoxia-mediated U87 glioblastoma invasion and infiltration. *Mol imaging Biol*. **2012**;14(4):489-499. doi:10.1007/S11307-011-0516-0
 186. Nanduri J, Vaddi DR, Khan SA, Wang N, Makeenko V, Prabhakar NR. Xanthine Oxidase Mediates Hypoxia-Inducible Factor-2 α Degradation by Intermittent Hypoxia. *PLoS One*. **2013**;8(10):75838. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0075838
 187. Olbryt M, Habryka A, Student S, Jarzab M, Tyszkiewicz T, Lisowska KM. Global Gene Expression Profiling in Three Tumor Cell Lines Subjected to Experimental Cycling and Chronic Hypoxia. *PLoS One*. **2014**;9(8):105104. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0105104
 188. Toffoli S, Feron O, Raes M, Michiels C. Intermittent hypoxia changes HIF-1alpha phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1alpha. *Biochim Biophys Acta*. **2007**;1773(10):1558-1571. doi:10.1016/J.BBAMCR.2007.06.002
 189. Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Sci Signal*. **2016**;9(430):56. doi: 10.1126/scisignal.aaf0583
 190. Scherer HJ. A critical review: The pathology of cerebral gliomas. *J Neurol Psychiatry*. **1940**;3(2):147-177. doi: 10.1136/jnnp.3.2.147
 191. Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*. **2014**;15(7):455. doi:10.1038/NRN3765
 192. Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K. Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell

- migration. *Int J cancer*. **2007**;121(2):276-283. doi:10.1002/IJC.22679
193. Watkins S, Robel S, Kimbrough IF, Robert SM, Ellis-Davies G, Sontheimer H. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun*. **2014**;5:4196. doi:10.1038/NCOMMS5196
 194. Edwards LA, Woolard K, Son MJ, et al. Effect of Brain- and Tumor-Derived Connective Tissue Growth Factor on Glioma Invasion. *JNCI J Natl Cancer Inst*. **2011**;103(15):1162. doi:10.1093/JNCI/DJR224
 195. Becher OJ, Hambarzumyan D, Fomchenko EI, et al. Gli Activity Correlates with Tumor Grade in Platelet-Derived Growth Factor–Induced Gliomas. *Cancer Res*. **2008**;68(7):2241-2249. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6350
 196. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal and tumorigenicity. *Curr Biol*. **2007**;17(2):165. doi:10.1016/J.CUB.2006.11.033
 197. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. **2013**;77(1):10-18. doi:10.1016/J.NEURON.2012.12.023
 198. Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, et al. Microglial Stimulation of Glioblastoma Invasion Involves Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF-1R) Signaling. *Mol Med*. **2012**;18(1):519. doi:10.2119/MOLMED.2011.00217
 199. Starska L, Duskova M. What Is a Hormone? *Physiol Res*. **2020**;69(2):183. doi:10.33549/PHYSIOLRES.934509
 200. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*. **1988**;240(4850):327-330. doi:10.1126/SCIENCE.3353727
 201. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol*. **2002**;20(13):3001-3015. doi:10.1200/JCO.2002.10.018
 202. Auwerx J, Baulieu E, Beato M, et al. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. **1999**;97(2):161-163. doi:10.1016/S0092-8674(00)80726-6
 203. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. **1995**;83(6):835-839. doi:10.1016/0092-8674(95)90199-

204. McEwan IJ. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer*. **2004**;11(2):281-293. doi:10.1677/ERC.0.0110281
205. Sasaki M, Kaneuchi M, Sakuragi N, Fujimoto S, Carroll PR, Dahiya R. The polyglycine and polyglutamine repeats in the androgen receptor gene in Japanese and Caucasian populations. *Biochem Biophys Res Commun*. **2003**;312(4):1244-1247. doi:10.1016/J.BBRC.2003.11.075
206. Davies P, Watt K, Kelly SM, Clark C, Price NC, McEwan IJ. Consequences of poly-glutamine repeat length for the conformation and folding of the androgen receptor amino-terminal domain. *J Mol Endocrinol*. **2008**;41(5):301-314. doi:10.1677/JME-08-0042
207. Werner R, Holterhus PM, Binder G, et al. The A645D mutation in the hinge region of the human androgen receptor (AR) gene modulates AR activity, depending on the context of the polymorphic glutamine and glycine repeats. *J Clin Endocrinol Metab*. **2006**;91(9):3515-3520. doi:10.1210/JC.2006-0372
208. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. **2014**;36(1):3-23. doi:10.1038/aps.2014.18
209. Querol Cano L, Lavery DN, Bevan CL. Mini-review: Foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. **2013**;369(1-2):52-62. doi:10.1016/J.MCE.2013.01.023
210. Srinivas-Shankar U, Wu FCW. Drug insight: testosterone preparations. *Nat Clin Pract Urol*. **2006**;3(12):653-665. doi:10.1038/NCPURO0650
211. Zalcman N, Canello T, Ovadia H, et al. Androgen receptor: a potential therapeutic target for glioblastoma. *Oncotarget*. **2018**;9(28):19980. doi:10.18632/ONCOTARGET.25007
212. Fang H, Tong W, Branham WS, et al. Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem Res Toxicol*. **2003**;16(10):1338-1358. doi:10.1021/TX030011G
213. Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*. **2001**;179(1-2):105-109. doi:10.1016/S0303-7207(01)00466-X
214. Bruchofsky N, Wilson JD. The Conversion of Testosterone to 5 α -Androstan-17 β -ol-3-one by Rat Prostate in Vivo and in Vitro. *J Biol Chem*. **1968**;243(8):2012-

2021. doi:10.1016/S0021-9258(18)93542-8
215. Baulieu EE, Lasnitzki I, Robel P. Metabolism of testosterone and action of metabolites on prostate glands grown in organ culture. *Nature*. **1968**;219(5159):1155-1156. doi:10.1038/2191155A0
216. Grino PB, Griffin JE, Wilson JD. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*. **1990**;126(2):1165-1172. doi:10.1210/ENDO-126-2-1165
217. Carrano A, Juarez JJ, Incontri D, Ibarra A, Cazares HG. Sex-Specific Differences in Glioblastoma. *Cells*. **2021**;10(7). doi:10.3390/CELLS10071783
218. Hu R, Dunn TA, Wei S, et al. Ligand-Independent Androgen Receptor Variants Derived from Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res*. **2009**;69(1):16-22. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2764
219. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, et al. Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern¹. *J Clin Endocrinol Metab*. **1997**;82(12):4258-4265. doi:10.1210/jcem.82.12.4470
220. Welboren WJ, Sweep FCGJ, Span PN, Stunnenberg HG. Genomic actions of estrogen receptor α : what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer*. **2009**;16(4):1073-1089. doi:10.1677/ERC-09-0086
221. Menasce LP, White GRM, Harrison CJ, Boyle JM. Localization of the Estrogen Receptor Locus (ESR) to Chromosome 6q25.1 by FISH and a Simple Post-FISH Banding Technique. *Genomics*. **1993**;17(1):263-265. doi:10.1006/GENO.1993.1320
222. Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J*. **1988**;7(11):3385-3388. doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03211.x.
223. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. **1986**;231(4742):1150-1154. doi: 10.1126/science.3753802.
224. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen Signaling via Estrogen Receptor β . *J Biol Chem*. **2010**;285(51):39575. doi:10.1074/JBC.R110.180109
225. Hamilton KJ, Hewitt SC, Arao Y, Korach KS. Estrogen Hormone Biology. *Curr Top Dev Biol*. **2017**;125:109. doi:10.1016/BS.CTDB.2016.12.005
226. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. Nuclear receptor ligand-binding

- domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci.* **2000**;21(10):381-388. doi:10.1016/S0165-6147(00)01548-0
227. Tang ZR, Zhang R, Lian ZX, Deng SL, Yu K. Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Cells.* **2019**;8(10). doi:10.3390/CELLS8101123
228. Chambraud B, Berry M, Pierre Chambong P, Baulieu Etienne-Emile. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem.* **1990**;265(33):206-20691. doi:10.1016/S0021-9258(17)30558-6
229. Eckert RL, Mullick A, Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Estrogen receptor synthesis and turnover in MCF-7 breast cancer cells measured by a density shift technique. *Endocrinology.* **1984**;114(2):629-637. doi:10.1210/ENDO-114-2-629
230. Green KA, Carroll JS. Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat Rev Cancer.* **2007**;7(9):713-722. doi:10.1038/NRC2211
231. Powell E, Wang Y, Shapiro DJ, Xu W. Differential requirements of Hsp90 and DNA for the formation of estrogen receptor homodimers and heterodimers. *J Biol Chem.* **2010**;285(21):16125-16134. doi:10.1074/JBC.M110.104356
232. Welboren WJ, Van Driel MA, Janssen-Megens EM, et al. ChIP-Seq of ER α and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J.* **2009**;28(10):1418-1428. doi:10.1038/EMBOJ.2009.88
233. Smith CL. Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod.* **1998**;58(3):627-632. doi:10.1095/BIOLREPROD58.3.627
234. Price RH, Butler CA, Webb P, Uht R, Kushner P, Handa RJ. A Splice Variant of Estrogen Receptor β Missing Exon 3 Displays Altered Subnuclear Localization and Capacity for Transcriptional Activation. *Endocrinology.* **2001**;142(5):2039-2049. doi:10.1210/ENDO.142.5.8130
235. Shi L, Dong B, Li Z, et al. Expression of ER- α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol.* **2009**;27(21):3423-3429. doi:10.1200/JCO.2008.17.2254
236. Denger S, Reid G, Koš M, et al. ER α Gene Expression in Human Primary

- Osteoblasts: Evidence for the Expression of Two Receptor Proteins. *Mol Endocrinol.* **2001**;15(12):2064-2077. doi:10.1210/MEND.15.12.0741
237. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, et al. Cloning and Characterization of Human Estrogen Receptor β Isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* **1998**;247(1):75-78. doi:10.1006/bbrc.1998.8738
238. Bao TZ, Han GZ, Shim JY, Wen Y, Jiang XR. Quantitative Structure-Activity Relationship of Various Endogenous Estrogen Metabolites for Human Estrogen Receptor α and β Subtypes: Insights into the Structural Determinants Favoring a Differential Subtype Binding. *Endocrinology.* **2006**;147(9):4132-4150. doi:10.1210/EN.2006-0113
239. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **2015**;29(4):557-568. doi:10.1016/J.BEEM.2015.04.008
240. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.* **2014**;90:13-29. doi:10.1016/j.steroids.2014.06.012
241. Arnone AA, Cline JM, Soto-Pantoja DR, Cook KL. Investigating the role of endogenous estrogens, hormone replacement therapy, and blockade of estrogen receptor- α activity on breast metabolic signaling. *Breast Cancer Res Treat.* **2021**;190(1):53. doi:10.1007/S10549-021-06354-W
242. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol.* **2013**;10(9):494-506. doi:10.1038/NRCLINONC.2013.124
243. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. Wood AJJ, ed. *N Engl J Med.* **1998**;339(22):1609-1618. doi:10.1056/NEJM199811263392207
244. SJ J, KL C. Fulvestrant - a novel endocrine therapy for breast cancer. *Curr Med Chem.* **2010**;17(10):902-914. doi:10.2174/092986710790820633
245. Mishra S, Tai Q, Gu X, et al. Estrogen and estrogen receptor alpha promotes malignancy and osteoblastic tumorigenesis in prostate cancer. *Oncotarget.* **2015**;6(42):44388-44402. doi:10.18632/ONCOTARGET.6317
246. Grimm M, Biegner T, Teriete P, et al. Estrogen and Progesterone hormone receptor expression in oral cavity cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* **2016**;21(5):e554-e558. doi:10.4317/MEDORAL.21182
247. Huang X, Wang X, Shang J, et al. Estrogen related receptor alpha triggers the

- migration and invasion of endometrial cancer cells via up regulation of TGFB1. *Cell Adh Migr.* **2018**;12(6):538-547. doi:10.1080/19336918.2018.1477901
248. Zhao Y, Li Z. Interplay of estrogen receptors and FOXA factors in the liver cancer. *Mol Cell Endocrinol.* **2015**;418 Pt 3(0 3):334-339. doi:10.1016/J.MCE.2015.01.043
249. Chan KKL, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HYS. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol.* **2008**;111(1):144-151. doi:10.1097/01.AOG.0000296715.07705.E9
250. Halon A, Nowak-Markwitz E, Maciejczyk A, et al. Loss of Estrogen Receptor Beta Expression Correlates with Shorter Overall Survival and Lack of Clinical Response to Chemotherapy in Ovarian Cancer Patients. *Anticancer Res.* **2011**;31(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21378361/>
251. De Stefano I, Zannoni GF, Prisco MG, et al. Cytoplasmic expression of estrogen receptor beta (ER β) predicts poor clinical outcome in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* **2011**;122(3):573-579. doi:10.1016/J.YGYNO.2011.05.025
252. Zhao C, Lam EWF, Sunter A, et al. Expression of estrogen receptor β isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene.* **2003**;22(48):7600-7606. doi:10.1038/sj.onc.1207100
253. Cotrim CZ, Fabris V, Doria ML, et al. Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells. *Oncogene.* **2012**;32(19):2390-2402. doi:10.1038/onc.2012.261
254. Treeck O, Juhasz-Boess I, Lattrich C, Horn F, Goerse R, Ortmann O. Effects of exon-deleted estrogen receptor β transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* **2008**;110(3):507-520. doi:10.1007/S10549-007-9749-7/FIGURES/5
255. Nojima D, Li L-C, Dharia A, et al. CpG Hypermethylation of the Promoter Region Inactivates the Estrogen Receptor-Gene in Patients with Prostate Carcinoma. *Cancer.* **2001**;92: 2076-2083 doi:10.1002/1097-0142
256. Edvardsson K, Ström A, Jonsson P, Gustafsson JÅ, Williams C. Estrogen Receptor β Induces Antiinflammatory and Antitumorigenic Networks in Colon Cancer Cells. *Mol Endocrinol.* **2011**;25(6):969-979. doi:10.1210/ME.2010-0452

257. Conneely OM, Sullivan WP, Toft DO, et al. Molecular cloning of the chicken progesterone receptor. *Science*. **1986**;233(4765):767-770. doi:10.1126/SCIENCE.2426779
258. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet*. **1987**;77(3):280-282. doi:10.1007/BF00284486
259. Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol*. **2016**;428(19):3831-3849. doi:10.1016/j.jmb.2016.06.020
260. Diep CH, Daniel AR, Mauro LJ, Knutson TP, Lange CA. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol*. **2015**;54(2):R31-R53. doi:10.1530/JME-14-0252
261. Bain DL, Franden MA, McManaman JL, Takimoto GS, Horwitz KB. The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. Structural analysis and the influence of the DNA binding domain. *J Biol Chem*. **2000**;275(10):7313-7320. doi:10.1074/JBC.275.10.7313
262. Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone Receptor Isoform A But Not B Is Expressed in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. **2000**;85(8):2897-2902. doi:10.1210/JCEM.85.8.6739
263. Demayo FJ, Lydon JP. New insights into progesterone receptor signaling in the endometrium required for embryo implantation. *J Mol Endocrinol*. **2020**;65(1):T1. doi:10.1530/JME-19-0212
264. O'Malley BW, McGuire WL, Kohler PO, Korenman SG. Studies on the mechanism of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins. *Recent Prog Horm Res*. **1969**;25:105-160. doi:10.1016/B978-0-12-571125-8.50006-5
265. O'Malley BW, Sherman MR, Toft DO. Progesterone "receptors" in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1970**;67(2):501-508. doi:10.1073/PNAS.67.2.501
266. Hagan CR, Lange CA. Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC Med*. **2014**;12(1):32. doi:10.1186/1741-7015-12-32
267. Ballaré C, Uhrig M, Bechtold T, et al. Two Domains of the Progesterone Receptor Interact with the Estrogen Receptor and Are Required for Progesterone Activation

- of the c-Src/Erk Pathway in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol.* **2003**;23(6):1994. doi:10.1128/MCB.23.6.1994-2008.2003
268. Pierson-Mullany LK, Lange CA. Phosphorylation of Progesterone Receptor Serine 400 Mediates Ligand-Independent Transcriptional Activity in Response to Activation of Cyclin-Dependent Protein Kinase 2. *Mol Cell Biol.* **2004**;24(24):10542. doi:10.1128/MCB.24.24.10542-10557.2004
269. Lange CA, Shen T, Horwitz KB. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**;97(3):1032. doi:10.1073/PNAS.97.3.1032
270. Le Dily F, Vidal E, Cuartero Y, et al. Hormone-control regions mediate steroid receptor-dependent genome organization. *Genome Res.* **2019**;29(1):29-39. doi:10.1101/GR.243824.118/-/DC1
271. Li W, Wang S, Qiu C, et al. Comprehensive bioinformatics analysis of acquired progesterone resistance in endometrial cancer cell line. *J Transl Med.* **2019**;17(1). doi:10.1186/S12967-019-1814-6
272. Li W, Klein RJ. Genome-wide association study identifies a role for the progesterone receptor in benign prostatic hyperplasia risk. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2021**;24(2):492-498. doi:10.1038/S41391-020-00303-2
273. Vannucchi G, De Leo S, Perrino M, et al. Impact of estrogen and progesterone receptor expression on the clinical and molecular features of papillary thyroid cancer. *Eur J Endocrinol.* **2015**;173(1):29-36. doi:10.1530/EJE-15-0054
274. Kossiakoff AA. The structural basis for biological signaling, regulation, and specificity in the growth hormone-prolactin system of hormones and receptors. *Adv Protein Chem.* **2004**;68:147-169. doi:10.1016/S0065-3233(04)68005-3
275. Goffin V, Kelly PA. The prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **1997**;2(1):7-17. doi:10.1023/A:1026313211704
276. Goffin V. Prolactin receptor targeting in breast and prostate cancers: New insights into an old challenge. *Pharmacol Ther.* **2017**;179:111-126. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2017.05.009
277. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* **2000**;80(4):1523-1631.

doi:10.1152/PHYSREV.2000.80.4.1523

278. McCartney CR, Marshall JC. Neuroendocrinology of Reproduction. *Yen Jaffe's Reprod Endocrinol Physiol Pathophysiol Clin Manag Eighth Ed.* **2019**:1-24.e8. doi:10.1016/B978-0-323-47912-7.00001-9
279. Hu Z-Z, Zhuang L, Meng J, Tsai-Morris C-H, Dufau ML. Complex 5' genomic structure of the human prolactin receptor: multiple alternative exons 1 and promoter utilization. *Endocrinology.* **2002**;143(6):2139-2142. doi:10.1210/ENDO.143.6.8949
280. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev.* **2008**;29(1):1-41. doi:10.1210/ER.2007-0017
281. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1990**;87(18):6934-6938. doi:10.1073/PNAS.87.18.6934
282. Rozakis-Adcock M, Kelly PA. Mutational analysis of the ligand-binding domain of the prolactin receptor. *J Biol Chem.* **1991**;266(25):16472-16477. doi:10.1016/S0021-9258(18)55324-2
283. Xie Y-L, Hassan SA, Qazi AM, Tsai-Morris CH, Dufau ML. Intramolecular disulfide bonds of the prolactin receptor short form are required for its inhibitory action on the function of the long form of the receptor. *Mol Cell Biol.* **2009**;29(10):2546-2555. doi:10.1128/MCB.01716-08
284. Clevenger C V., Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The Role of Prolactin in Mammary Carcinoma. *Endocr Rev.* **2003**;24(1):1. doi:10.1210/ER.2001-0036
285. Boutin JM, Edery M, Shirota M, et al. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* **1989**;3(9):1455-1461. doi:10.1210/MEND-3-9-1455
286. Hu ZZ, Meng J, Dufau ML. Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *J Biol Chem.* **2001**;276(44):41086-41094. doi:10.1074/JBC.M102109200
287. Brooks CL. Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocr Rev.* **2012**;33(4):504-525. doi:10.1210/ER.2011-1040
288. Rui H, Lebrun JJ, Kirken RA, Kelly PA, Farrar WL. JAK2 activation and cell

- proliferation induced by antibody-mediated prolactin receptor dimerization. *Endocrinology*. **1994**;135(4):1299-1306. doi:10.1210/ENDO.135.4.7925093
289. Grimley PM, Dong F, Rui H. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev*. **1999**;10(2):131-157. doi:10.1016/S1359-6101(99)00011-8
290. Llovera M, Pichard C, Bernichtein S, et al. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*. **2000**;19(41):4695-4705. doi:10.1038/SJ.ONC.1203846
291. Schaber JD, Fang H, Xu J, Grimley PM RH. Prolactin activates Stat1 but does not antagonize Stat1 activation and growth inhibition by type I interferons in human breast cancer cells - PubMed. *Cancer Res*. **1998**;1(58):1914-1919. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9581833/>. Accessed September 20, 2022.
292. Harris J, Stanford PM, Oakes SR, Ormandy CJ. Prolactin and the prolactin receptor: new targets of an old hormone. *Ann Med*. **2004**;36(6):414-425. doi:10.1080/07853890410033892
293. Camarillo IG, Linebaugh BE, Rillema JA. Differential tyrosyl-phosphorylation of multiple mitogen-activated protein kinase isoforms in response to prolactin in Nb2 lymphoma cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. **1997**;215(2):198-202. doi:10.3181/00379727-215-44129
294. Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y, Gibori G. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology*. **2001**;142(9):4086-4094. doi:10.1210/ENDO.142.9.8381
295. Maus M V., Reilly SC, Clevenger C V. Prolactin as a chemoattractant for human breast carcinoma. *Endocrinology*. **1999**;140(11):5447-5450. doi:10.1210/ENDO.140.11.7245
296. Bernichtein S, Touraine P, Goffin V. New concepts in prolactin biology. *J Endocrinol*. **2010**;206(1):1-11. doi:10.1677/JOE-10-0069
297. Tran-Thanh D, Arneson NC, Pintilie M, et al. Amplification of the prolactin receptor gene in mammary lobular neoplasia. *Breast Cancer Res Treat*. **2011**;128(1):31-40. doi:10.1007/S10549-010-1025-6
298. Sethi B, Chanukya G, Nagesh Vs. Prolactin and cancer: Has the orphan finally found a home? *Indian J Endocrinol Metab*. **2012**;16(2):195. doi:10.4103/2230-

8210.104038

299. Reuwer AQ, Nowak-Sliwinska P, Mans LA, et al. Functional consequences of prolactin signalling in endothelial cells: a potential link with angiogenesis in pathophysiology? *J Cell Mol Med.* **2012**;16(9):2035-2048. doi:10.1111/J.1582-4934.2011.01499.X
300. Howell SJ, Anderson E, Hunter T, Farnie G, Clarke RB. Prolactin receptor antagonism reduces the clonogenic capacity of breast cancer cells and potentiates doxorubicin and paclitaxel cytotoxicity. *Breast Cancer Res.* **2008**;10(4). doi:10.1186/BCR2129
301. Lapensee EW, Schwemberger SJ, Lapensee CR, Bahassi EM, Afton SE, Ben-Jonathan N. Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase. *Carcinogenesis.* **2009**;30(8):1298-1304. doi:10.1093/CARCIN/BGP120
302. Gromoll J, Ried T, Holtgreve-Grez H, Nieschlag E, Gudermann T. Localization of the human FSH receptor to chromosome 2 p21 using a genomic probe comprising exon 10. *J Mol Endocrinol.* **1994**;12(3):265-271. doi:10.1677/JME.0.0120265
303. Simoni M, Jo" J, Gromoll J, Nieschlag E. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology. *Endocr Rev.* **1997**;18(6):739-773. doi:10.1210/EDRV.18.6.0320
304. Dias JA, Cohen BD, Lindau-Shepard B, Nechamen CA, Peterson AJ, Schmidt A. Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor. *Vitam Horm.* **2002**;64:249-322. doi:10.1016/S0083-6729(02)64008-7
305. Banerjee AA, Dupakuntla M, Pathak BR, Mahale SD. FSH receptor-specific residues L501 and I505 in extracellular loop 2 are essential for its function. *J Mol Endocrinol.* **2015**;54(3):193-204. doi:10.1530/JME-14-0275
306. Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update.* **2002**;8(5):413-421. doi:10.1093/HUMUPD/8.5.413
307. Achrekar SK, Modi DN, Meherji PK, Patel ZM, Mahale SD. Follicle stimulating hormone receptor gene variants in women with primary and secondary amenorrhea. *J Assist Reprod Genet.* **2010**;27(6):317-326. doi:10.1007/S10815-010-9404-9
308. Kreuchwig A, Kleinau G, Krause G. Research Resource: Novel Structural Insights

- Bridge Gaps in Glycoprotein Hormone Receptor Analyses. *Mol Endocrinol.* **2013**;27(8):1357. doi:10.1210/ME.2013-1115
309. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* **2010**;120(4):963. doi:10.1172/JCI41350
310. Huhtaniemi I. A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis. *Horm 2015 144.* **2015**;14(4):468-478. doi:10.14310/HORM.2002.1632
311. Walker WH, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction.* **2005**;130(1):15-28. doi:10.1530/REP.1.00358
312. Sun L, Peng Y, Sharrow AC, et al. FSH Directly Regulates Bone Mass. *Cell.* **2006**;125(2):247-260. doi:10.1016/J.CELL.2006.01.051
313. Robinson LJ, Tourkova I, Wang Y, et al. FSH-Receptor Isoforms and FSH-dependent Gene Transcription in Human Monocytes and Osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* **2010**;394(1):12. doi:10.1016/J.BBRC.2010.02.112
314. Song Y, Wang ES, Xing LL, et al. Follicle-Stimulating Hormone Induces Postmenopausal Dyslipidemia Through Inhibiting Hepatic Cholesterol Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* **2016**;101(1):254-263. doi:10.1210/JC.2015-2724
315. Stille JAW, Christensen DE, Dahlem KB, et al. FSH Receptor (FSHR) Expression in Human Extragonadal Reproductive Tissues and the Developing Placenta, and the Impact of Its Deletion on Pregnancy in Mice. *Biol Reprod.* **2014**;91(3):74-75. doi:10.1095/BIOLREPROD.114.118562
316. Stille JA, Guan R, Duffy DM, Segaloff DL. Signaling Through FSH Receptors on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Promotes Angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* **2014**;99(5):E813. doi:10.1210/JC.2013-3186
317. Planeix F, Siraj MA, Bidard FC, et al. Endothelial follicle-stimulating hormone receptor expression in invasive breast cancer and vascular remodeling at tumor periphery. *J Exp Clin Cancer Res.* **2015**;34(1). doi:10.1186/S13046-015-0128-7
318. Radu A, Pichon C, Camparo P, et al. Expression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Tumor Blood Vessels. *N Engl J Med.* **2010**;363(17):1621-1630. doi:10.1056/NEJMoa1001283
319. Siraj A, Desestret V, Antoine M, et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor by the vascular endothelium in tumor metastases. *BMC Cancer.* **2013**;13:246. doi:10.1186/1471-2407-13-246

320. Maclellan RA, Konczyk DJ, Goss JA, Greene AK. Analysis of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Infantile Hemangioma. *Ann Plast Surg.* **2018**;80(4):S211. doi:10.1097/SAP.0000000000001438
321. Renner M, Goepfert B, Siraj MA, et al. Follicle-stimulating hormone receptor expression in soft tissue sarcomas. *Histopathology.* **2013**;63(1):29-35. doi:10.1111/HIS.12135
322. Oduwole OO, Poliandri A, Okolo A, et al. Follicle-stimulating hormone promotes growth of human prostate cancer cell line-derived tumor xenografts. *FASEB J.* **2021**;35(4). doi:10.1096/FJ.202002168RR
323. Robin B, Planeix F, Sastre-Garau X, et al. Follicle-Stimulating Hormone Receptor Expression in Endometriotic Lesions and the Associated Vasculature: An Immunohistochemical Study. *Reprod Sci* 2015 237. **2016**;23(7):885-891. doi:10.1177/1933719115623647
324. Kerimoglu OS, Yılmaz SA, Pekin A, et al. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms in women with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* **2015**;291(6):1411-1416. doi:10.1007/S00404-014-3562-4/TABLES/2
325. Bhartiya D, Singh J. FSH-FSHR3-stem cells in ovary surface epithelium: basis for adult ovarian biology, failure, aging, and cancer. *Reproduction.* **2015**;149(1):R35-R48. doi:10.1530/REP-14-0220
326. Ulloa-Aguirre A, Zariñán T. The Follitropin Receptor: Matching Structure and Function. *Mol Pharmacol.* **2016**;90(5):596-608. doi:10.1124/MOL.116.104398
327. Kabat GC, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Rohan TE. Reproductive factors and exogenous hormone use and risk of adult glioma in women in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Int J cancer.* **2011**;128(4):944-950. doi:10.1002/ijc.25413
328. Michaud DS, Gallo V, Schlehofer B, et al. Reproductive factors and exogenous hormone use in relation to risk of glioma and meningioma in a large European cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2010**;19(10):2562-2569. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0447
329. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do Steroid Hormones Play a Role in the Etiology of Glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2010**;19(10):2421-2427. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0658
330. Huang K, Whelan EA, Ruder AM, et al. Reproductive factors and risk of glioma in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2004**;13(10):1583-1588.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15466973/>

331. Li W, Graeber MB. The molecular profile of microglia under the influence of glioma. *Neuro Oncol.* **2012**;14(8):958-978. doi:10.1093/neuonc/nos116
332. Kiraga Ł, Cheda Ł, Taciak B, et al. Changes in hypoxia level of CT26 tumors during various stages of development and comparing different methods of hypoxia determination. *PLoS One.* **2018**;13(11):e0206706. doi:10.1371/journal.pone.0206706
333. Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, et al. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells.* **2020**;9(12). doi:10.3390/CELLS9122653
334. Montgomery EJ, Xing E, Campbell MJ, et al. Constitutively Active Androgen Receptor in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* **2022**;23(22). doi:10.3390/IJMS232213768
335. Anestis A, Zoi I, Papavassiliou AG, Karamouzis M V. Androgen Receptor in Breast Cancer-Clinical and Preclinical Research Insights. *Molecules.* **2020**;25(2). doi:10.3390/MOLECULES25020358
336. Werner CK, Nna UJ, Sun H, et al. Expression of the Androgen Receptor Governs Radiation Resistance in a Subset of Glioblastomas Vulnerable to Antiandrogen Therapy. *Mol Cancer Ther.* **2020**;19(10):2163-2174. doi:10.1158/1535-7163.MCT-20-0095
337. Park JH, Lee HK. Current Understanding of Hypoxia in Glioblastoma Multiforme and Its Response to Immunotherapy. *Cancers (Basel).* **2022**;14(5). doi:10.3390/CANCERS14051176
338. Huang S, Michalek JE, Reardon DA, et al. Assessment of tumor hypoxia and perfusion in recurrent glioblastoma following bevacizumab failure using MRI and 18F-FMISO PET. *Sci Rep.* **2021**;11(1):7632. doi:10.1038/S41598-021-84331-5
339. Simińska D, Korbecki J, Kojder K, et al. Androgen Receptor Expression in the Various Regions of Resected Glioblastoma Multiforme Tumors and in an In Vitro Model. *Int J Mol Sci.* **2022**;23(21). doi:10.3390/IJMS232113004
340. Korbecki J, Simińska D, Gąssowska-Dobrowolska M, et al. Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF-κB Activation: A Review of the Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci.* **2021**;22(19). doi:10.3390/IJMS221910701

341. Xu J, Zheng L, Chen J, et al. Increasing AR by HIF-2 α inhibitor (PT-2385) overcomes the side-effects of sorafenib by suppressing hepatocellular carcinoma invasion via alteration of pSTAT3, pAKT and pERK signals. *Cell Death Dis.* **2017**;8(10):e3095. doi:10.1038/CDDIS.2017.411
342. Uo T, Sprenger CC, Plymate SR. Androgen Receptor Signaling and Metabolic and Cellular Plasticity During Progression to Castration Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol.* **2020**;10. doi:10.3389/FONC.2020.580617
343. Su Z, Wang T, Zhu H, et al. HMGB1 modulates Lewis cell autophagy and promotes cell survival via RAGE-HMGB1-Erk1/2 positive feedback during nutrient depletion. *Immunobiology.* **2015**;220(5):539-544. doi:10.1016/J.IMBIO.2014.12.009
344. Boonyaratanakornkit V, Melvin V, Prendergast P, et al. High-Mobility Group Chromatin Proteins 1 and 2 Functionally Interact with Steroid Hormone Receptors To Enhance Their DNA Binding In Vitro and Transcriptional Activity in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol.* **1998**;18(8):4471. doi:10.1128/MCB.18.8.4471
345. Bao D, Cheng C, Lan X, et al. Regulation of p53wt glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression. *Oncotarget.* **2017**;8(14):23142. doi:10.18632/oncotarget.15509
346. Rodríguez-Lozano DC, Velázquez-Vázquez DE, Del Moral-Morales A, Camacho-Arroyo I. Dihydrotestosterone Induces Proliferation, Migration, and Invasion of Human Glioblastoma Cell Lines. *Onco Targets Ther.* **2020**;13:8813-8823. doi:10.2147/OTT.S262359
347. Hou J, Liu Y, Huang P, et al. RANBP10 promotes glioblastoma progression by regulating the FBXW7/c-Myc pathway. *Cell Death Dis.* **2021**;12(11). doi:10.1038/S41419-021-04207-4
348. Orevi M, Shamni O, Zalcman N, et al. [18F]-FDHT PET/CT as a tool for imaging androgen receptor expression in high-grade glioma. *Neuro-Oncology Adv.* **2021**;3(1):1-9. doi:10.1093/NOAJNL/VDAB019
349. Petra Hååg, Jasmin Bektic, Georg Bartsch, Helmut Klocker IEE. Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2005**;96(3-4):251-258. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.04.029

350. Pinacho-Garcia LM, Valdez RA, Navarrete A, Cabeza M, Segovia J, Romano MC. The effect of finasteride and dutasteride on the synthesis of neurosteroids by glioblastoma cells. *Steroids*. **2020**;155:108556. doi:10.1016/J.STEROIDS.2019.108556
351. Orozco M, Valdez RA, Ramos L, Cabeza M, Segovia J, Romano MC. Dutasteride combined with androgen receptor antagonists inhibit glioblastoma U87 cell metabolism, proliferation, and invasion capacity: Androgen regulation. *Steroids*. **2020**:108733. doi:10.1016/j.steroids.2020.108733
352. Chuang J-Y, Lo W-L, Ko C-Y, et al. Upregulation of CYP17A1 by Sp1-mediated DNA demethylation confers temozolomide resistance through DHEA-mediated protection in glioma. *Oncogenesis*. **2017**;6(5):e339. doi:10.1038/ONCSIS.2017.31
353. Lin HY, Ko CY, Kao TJ, et al. CYP17A1 Maintains the Survival of Glioblastomas by Regulating SAR1-Mediated Endoplasmic Reticulum Health and Redox Homeostasis. *Cancers (Basel)*. **2019**;11(9). doi:10.3390/CANCERS11091378
354. Sharpe MA, Baskin DS, Jenson A V., Baskin AM. Hijacking sexual immunoprivilege in GBM-an immuno-evasion strategy. *Int J Mol Sci*. **2021**;22(20):10983. doi:10.3390/IJMS222010983/S1
355. Shin B, Benavides GA, Geng J, et al. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Regulates the Fate Decision between Pathogenic Th17 and Regulatory T Cells. *Cell Rep*. **2020**;30(6):1898-1909.e4. doi:10.1016/J.CELREP.2020.01.022
356. Yague JG, Lavaque E, Carretero J, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Aromatase, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, is expressed by human and rat glioblastomas. *Neurosci Lett*. **2004**;368(3):279-284. doi:10.1016/J.NEULET.2004.07.010
357. Hui AM, Zhang W, Chen W, et al. Agents with Selective Estrogen Receptor (ER) Modulator Activity Induce Apoptosis In vitro and In vivo in ER-Negative Glioma Cells. *Cancer Res*. **2004**;64(24):9115-9123. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2740
358. Sareddy GR, Nair BC, Gonugunta VK, et al. Therapeutic significance of estrogen receptor β agonists in gliomas. *Mol Cancer Ther*. **2012**;11(5):1174-1182. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0960
359. González-Arenas A, De la Fuente-Granada M, Camacho-Arroyo I, et al. Tibolone Effects on Human Glioblastoma Cell Lines. *Arch Med Res*. **2019**;50(4):187-196.

doi:10.1016/J.ARCMED.2019.08.001

360. Hönikl LS, Lämmer F, Gempt J, Meyer B, Schlegel J, Delbridge C. High expression of estrogen receptor alpha and aromatase in glial tumor cells is associated with gender-independent survival benefits in glioblastoma patients. *J Neurooncol.* **2020**;147(3):567. doi:10.1007/S11060-020-03467-Y
361. Hernández-Vega AM, Camacho-Arroyo I. Crosstalk between 17 β -Estradiol and TGF- β Signaling Modulates Glioblastoma Progression. *Brain Sci.* **2021**;11(5). doi:10.3390/BRAINSCI11050564
362. Hernández-Vega AM, Del Moral-Morales A, Zamora-Sánchez CJ, Piña-Medina AG, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I. Estradiol Induces Epithelial to Mesenchymal Transition of Human Glioblastoma Cells. *Cells.* **2020**;9(9). doi:10.3390/CELLS9091930
363. González-Arenas A, Hansberg-Pastor V, Hernández-Hernández OT, et al. Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER α activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* **2012**;1823(2):379-386. doi:10.1016/J.BBAMCR.2011.11.004
364. Qu C, Ma J, Zhang Y, et al. Estrogen receptor variant ER- α 36 promotes tamoxifen agonist activity in glioblastoma cells. *Cancer Sci.* **2019**;110(1):221. doi:10.1111/CAS.13868
365. Liu Y, Huang L, Guan X, et al. ER- α 36, a novel variant of ER α , is involved in the regulation of Tamoxifen-sensitivity of glioblastoma cells. *Steroids.* **2016**;111:127-133. doi:10.1016/J.STEROIDS.2016.02.009
366. Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology. *Acta Pharmacol Sin.* **2015**;36(1):24-31. doi:10.1038/aps.2014.123
367. Habib P, Dang J, Slowik A, Victor M, Beyer C. Hypoxia-induced gene expression of aquaporin-4, cyclooxygenase-2 and hypoxia-inducible factor 1 α in rat cortical astroglia is inhibited by 17 β -estradiol and progesterone. *Neuroendocrinology.* **2014**;99(3-4):156-167. doi:10.1159/000362279
368. Kim M, Neinast MD, Frank AP, et al. ER α upregulates Phd3 to ameliorate HIF-1 induced fibrosis and inflammation in adipose tissue. *Mol Metab.* **2014**;3(6):642.

doi:10.1016/J.MOLMET.2014.05.007

369. Dueñas Jiménez JM, Candanedo Arellano A, Santerre A, et al. Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *J Neurooncol.* **2014**;119(2):275-284. doi:10.1007/s11060-014-1509-z
370. Liu C, Zhang Y, Zhang K, Bian C, Zhao Y, Zhang J. Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer Epidemiol.* **2014**;38(3):291-297. doi:10.1016/j.canep.2014.03.001
371. Paterni I, Bertini S, Granchi C, et al. Highly Selective Salicylketoxime-Based Estrogen Receptor β Agonists Display Antiproliferative Activities in a Glioma Model. *J Med Chem.* **2015**;58(3):1184. doi:10.1021/JM501829F
372. Cao L, Qu D, Wang H, et al. Toosendanin Exerts an Anti-Cancer Effect in Glioblastoma by Inducing Estrogen Receptor β - and p53-Mediated Apoptosis. *Int J Mol Sci.* **2016**;17(11). doi:10.3390/IJMS17111928
373. Wan S, Jiang J, Zheng C, et al. Estrogen nuclear receptors affect cell migration by altering sublocalization of AQP2 in glioma cell lines. *Cell death Discov.* **2018**;4(1). doi:10.1038/S41420-018-0113-Y
374. LIU X, WANG L, CHEN J, et al. Estrogen receptor β agonist enhances temozolomide sensitivity of glioma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. *Mol Med Rep.* **2015**;11(2):1516-1522. doi:10.3892/mmr.2014.2811
375. Kim J-H, Jeong I-Y, Lim Y-H, Lee Y-H, Shin S-Y. Estrogen receptor β stimulates Egr-1 transcription via MEK1/Erk/Elk-1 cascade in C6 glioma cells. *BMB Rep.* **2011**;44(7):452-457. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.7.452
376. Li W, Winters A, Poteet E, et al. Involvement of estrogen receptor β 5 in the progression of glioma. *Brain Res.* **2013**;1503:97-107. doi:10.1016/j.brainres.2013.02.004
377. Attwood KM, Robichaud A, Westhaver LP, et al. Raloxifene prevents stress granule dissolution, impairs translational control and promotes cell death during hypoxia in glioblastoma cells. *Cell Death Dis.* **2020**;11(11). doi:10.1038/S41419-020-03159-5
378. Batistatou A, Stefanou D, Goussia A, Arkoumani E, Papavassiliou A, Agnantis N. Estrogen receptor beta (ER?) is expressed in brain astrocytic tumors and declines

- with dedifferentiation of the neoplasm. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2004**;130(7):405-410. doi:10.1007/s00432-004-0548-9
379. Batistatou A, Kyzas PA, Goussia A, et al. Estrogen receptor beta (ER β) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours. *J Neurooncol*. **2006**;77(1):17-23. doi:10.1007/s11060-005-9005-0
380. Shafiee M, Mafi A, Nilipour Y, Sourati A, Sassanpour P, Tabatabaeefar M. Estrogen Receptor Expression in Glial Tumors of Iranian Patients: A Single Center Experience. *Iran J Pathol*. **2020**;15(1):8-12. doi:10.30699/IJP.2019.95525.1946
381. Liu J, Sareddy GR, Zhou M, et al. Differential Effects of Estrogen Receptor β Isoforms on Glioblastoma Progression. *Cancer Res*. **2018**;78(12):3176-3189. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3470
382. Pratap UP, Sareddy GR, Liu Z, et al. Histone deacetylase inhibitors enhance estrogen receptor beta expression and augment agonist-mediated tumor suppression in glioblastoma. *Neuro-oncology Adv*. **2021**;3(1). doi:10.1093/NOAJNL/VDAB099
383. Kefalopoulou Z, Tzelepi V, Zolota V, et al. Prognostic value of novel biomarkers in astrocytic brain tumors: nuclear receptor co-regulators AIB1, TIF2, and PELP1 are associated with high tumor grade and worse patient prognosis. *J Neurooncol*. **2012**;106(1):23-31. doi:10.1007/s11060-011-0637-y
384. González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, et al. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*. **2007**;32(2):129-135. doi:10.1007/S12020-007-9023-0/FIGURES/4
385. Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Morán MG, Camacho-Arroyo I. Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res Int*. **2014**;2014:393174. doi: 10.1155/2014/393174
386. Piña-Medina AG, Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Cerbón M, Camacho-Arroyo I. Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids*. **2016**;105:19-25. doi:10.1016/j.steroids.2015.11.008
387. Gutiérrez-Rodríguez A, Hansberg-Pastor V, Camacho-Arroyo I. Proliferative and Invasive Effects of Progesterone-Induced Blocking Factor in Human Glioblastoma Cells. *Biomed Res Int*. **2017**;2017. doi:10.1155/2017/1295087

388. González-Arenas A, Valadez-Cosmes P, Jiménez-Arellano C, López-Sánchez M, Camacho-Arroyo I. Progesterone-induced blocking factor is hormonally regulated in human astrocytoma cells, and increases their growth through the IL-4R/JAK1/STAT6 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2014**;144:463-470. doi:10.1016/J.JSBMB.2014.09.007
389. Halasz M, Polgar B, Berta G, Czimbalek L, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cell Mol Life Sci.* **2013**;70(23):4617-4630. doi:10.1007/S00018-013-1404-3/FIGURES/8
390. Patel M, Vogelbaum MA, Barnett GH, Jalali R, Ahluwalia MS. Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. *Expert Opin Investig Drugs.* **2012**;21(9):1247-1266. doi:10.1517/13543784.2012.703177
391. Atif F, Yousuf S, Stein DG. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2015**;146:62-73. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.04.007
392. Atif F, Patel NR, Yousuf S, Stein DG. The Synergistic Effect of Combination Progesterone and Temozolomide on Human Glioblastoma Cells. *PLoS One.* **2015**;10(6). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0131441
393. Zamora-Sánchez CJ, Hernández-Vega AM, Gaona-Domínguez S, Rodríguez-Dorantes M, Camacho-Arroyo I. 5 α -dihydroprogesterone promotes proliferation and migration of human glioblastoma cells. *Steroids.* **2020**;163:108708. doi:10.1016/J.STEROIDS.2020.108708
394. Zamora-Sánchez CJ, Hansberg-Pastor V, Salido-Guadarrama I, Rodríguez-Dorantes M, Camacho-Arroyo I. Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. *Steroids.* **2017**;119:36-42. doi:10.1016/J.STEROIDS.2017.01.004
395. Valdés-Rives SA, Arcos-Montoya D, de la Fuente-Granada M, et al. Lpa1 receptor promotes progesterone receptor phosphorylation through pk α in human glioblastoma cells. *Cells.* **2021**;10(4). doi:10.3390/CELLS10040807/S1
396. Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, et al. Integration of transcriptome and proteome profiles in glioblastoma: looking for the missing link. *BMC Mol Biol.* **2018**;19(1). doi:10.1186/S12867-018-0115-6
397. Song YC, Lu GX, Zhang HW, et al. Proteogenomic characterization and

- integrative analysis of glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. **2017**;8(57):97304. doi:10.18632/ONCOTARGET.21937
398. Arcos-Montoya D, Wegman-Ostrosky T, Mejía-Pérez S, et al. Progesterone Receptor Together with PKC α Expression as Prognostic Factors for Astrocytomas Malignancy. *Onco Targets Ther*. **2021**;14:3757. doi:10.2147/OTT.S280314
399. Khalid H, Shibata S, Kishikawa M, Yasunaga A, Iseki M, Hiura T. Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. *Cancer*. **1997**;80(11):2133-2140. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19971201)80:11<2133::aid-cnrc13>3.0.co;2-%23
400. Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Varakis J. Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors? *Clin Neuropathol*. **1998**;17(1):27-34. <https://europepmc.org/article/MED/9496537>.
401. Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black PML. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery*. **1995**;37(5): 496-504. doi:10.1227/00006123-199509000-00019
402. Tavares CB, Das Chagas Sheyla Almeida Gomes Braga F, Sousa EB, De Melo HACS, De Oliveira Brito JNP. Evaluation of progesterone receptor expression in low- And high-grade astrocytomas. *Rev Assoc Med Bras*. **2021**;67(7):975-978. doi:10.1590/1806-9282.20210360
403. Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, Camacho-Arroyo I. Intracellular Progesterone Receptor Mediates the Increase in Glioblastoma Growth Induced by Progesterone in the Rat Brain. *Arch Med Res*. **2016**;47(6):419-426. doi:10.1016/J.ARCMED.2016.10.002
404. Atif F, Yousuf S, Espinosa-Garcia C, Sergeeva E, Stein DG. Progesterone Treatment Attenuates Glycolytic Metabolism and Induces Senescence in Glioblastoma. *Sci Rep*. **2019**;9(1). doi:10.1038/S41598-018-37399-5
405. Alkharusi A, Yu S, Landázuri N, et al. Stimulation of prolactin receptor induces STAT-5 phosphorylation and cellular invasion in glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. **2016**;7(48):79572-79583. doi:10.18632/oncotarget.12840
406. Asad AS, Nicola Candia AJ, Gonzalez N, et al. Prolactin and its receptor as therapeutic targets in glioblastoma multiforme. *Sci Rep*. **2019**;9(1). doi:10.1038/S41598-019-55860-X

407. Smirnova O V., Petraschuk OM, Kelly PA. Immunocytochemical localization of prolactin receptors in rat liver cells: I. Dependence on sex and sex steroids. *Mol Cell Endocrinol.* **1994**;105(1):77-81. doi:10.1016/0303-7207(94)90037-X
408. Oliveira-Ferrer L, Wellbrock J, Bartsch U, et al. Combination therapy targeting integrins reduces glioblastoma tumor growth through antiangiogenic and direct antitumor activity and leads to activation of the pro-proliferative prolactin pathway. *Mol Cancer.* **2013**;12(1):144. doi:10.1186/1476-4598-12-144
409. Ducret T, Boudina S, Sorin B, et al. Effects of prolactin on intracellular calcium concentration and cell proliferation in human glioma cells. *Glia.* **2002**;38(3):200-214. doi:10.1002/GLIA.10056
410. Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol.* **2019**;39(4):556-570. doi:10.1002/jat.3749
411. Pezet A, Favre H, Kelly PA, Edery M. Inhibition and Restoration of Prolactin Signal Transduction by Suppressors of Cytokine Signaling. *J Biol Chem.* **1999**;274(35):24497-24502. doi:10.1074/JBC.274.35.24497
412. Brantley EC, Benveniste EN. STAT-3: A Molecular Hub for Signaling Pathways in Gliomas. *Mol Cancer Res.* **2008**;6(5):675-684. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2180
413. Merk BC, Owens JL, Lopes MBS, Silva CM, Hussaini IM. STAT6 expression in glioblastoma promotes invasive growth. *BMC Cancer.* **2011**;11:184. doi:10.1186/1471-2407-11-184
414. Ferraris J, Bernichtein S, Pisera D, Goffin V. Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis. *Neuroendocrinology.* **2013**;98(3):171-179. doi:10.1159/000354701
415. Pathipati P, Gorba T, Scheepens A, Goffin V, Sun Y, Fraser M. Growth hormone and prolactin regulate human neural stem cell regenerative activity. *Neuroscience.* **2011**;190:409-427. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.05.029
416. Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol.* **2003**;20(2):65-72. doi:10.1007/BF02483449
417. Chrusciel M, Ponikwicka-Tyszko D, Wolczynski S, Huhtaniemi I, Rahman NA. Extragonadal FSHR Expression and Function—Is It Real? *Front Endocrinol (Lausanne).* **2019**;10:32. doi:10.3389/FENDO.2019.00032

418. Ryu V, Gumerova A, Korkmaz F, et al. Brain atlas for glycoprotein hormone receptors at single-transcript level. *Elife*. **2022**;11:11. doi:10.7554/ELIFE.79612
419. Bi W kai, Shao S shan, Li Z wei, et al. FSHR ablation induces depression-like behaviors. *Acta Pharmacol Sin*. **2020**;41(8):1033. doi:10.1038/S41401-020-0384-8
420. Karlsson M, Zhang C, Méar L, et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv*. **2021**;7(31). doi: 10.1126/sciadv.abh2169
421. Zhang Z, Zhu Y, Lai Y, et al. Follicle-stimulating hormone inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by regulating the OCT4 stem cell signaling pathway. *Int J Oncol*. **2013**;43(4):1194. doi:10.3892/IJO.2013.2054
422. Chen X, Niu W, Fan X, et al. Oct4A palmitoylation modulates tumorigenicity and stemness in human glioblastoma cells. *Neuro Oncol*. **2023**;25(1):82-96. doi:10.1093/NEUONC/NOAC157
423. Zhang Z, Jia L, Feng Y, Zheng W. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor facilitates the development of ovarian epithelial cancer. *Cancer Lett*. **2009**;278(1):56-64. doi:10.1016/J.CANLET.2008.12.024
424. Yang Y, Zhang J, Zhu Y, Zhang Z, Sun H, Feng Y. Follicle-stimulating hormone induced epithelial-mesenchymal transition of epithelial ovarian cancer cells through follicle-stimulating hormone receptor PI3K/Akt-Snail signaling pathway. *Int J Gynecol Cancer*. **2014**;24(9):1564-1574. doi:10.1097/IGC.0000000000000279
425. Alam H, Week J, Maizels E, et al. Role of the Phosphatidylinositol-3-Kinase and Extracellular Regulated Kinase Pathways in the Induction of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Activity and the HIF-1 Target Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Granulosa Cells in Response to Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrinology*. **2009**;150(2):915. doi:10.1210/EN.2008-0850

SPIS TABEL

Tabela 1.	Charakterystyka grupy badanej.	44
Tabela 2.	Skład pożywek hodowlanych stosowanych w doświadczeniu.	45
Tabela 3.	Podsumowanie ekspresji mRNA i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w modelu in vitro.	76
Tabela 4.	Podsumowanie porównania ekspresji mRNA i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych pomiędzy niewzrastającym rdzeniem (R), korą (K) i obrzeżem (O) guzów GBM pozyskanych od pacjentów.	77

SPIS RYCIN

- Rycina 1. Schemat nowej klasyfikacji glejaków rozlanych typu dorosłego bazujący na cechach histologicznych i molekularnych. 15
- Rycina 2. Przykład struktury martwicy pseudopalisadowej. 24
- Rycina 3. Ekspresja mRNA genu *AR* (A) i białka AR (B) w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). 52
- Rycina 4. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka AR w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). 53
- Rycina 5. Ekspresja mRNA genu *AR* (A, B) i białka AR (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnianiem płci (B, D). 54
- Rycina 6. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka AR w niewzrastającym rdzeniu guza (A, białą przerywaną linią zaznaczono obszar martwicy), korze guza (B) i obrzeżu guza (C) zdiagnozowanego jako GBM. 55
- Rycina 7. Ekspresja mRNA genu *ERα* (A) i białka ERα (B) w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). 56
- Rycina 8. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka ERα w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). 57
- Rycina 9. Ekspresja mRNA genu *ERα* (A, B) i białka ERα (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnianiem płci (B, D). 58

- Rycina 10. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka ER α w niewzrastającym rdzeniu guza (A, białą przerywana linią oddzielono obszar martwicy (prawa strona) i obszar kory guza (lewa strona)), korze guza (B) i obrzeżu guza (C) zdiagnozowanego jako GBM. 59
- Rycina 11. Ekspresja mRNA genu ER β (A) i białka ER β (B) w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). 60
- Rycina 12. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka ER β w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). 61
- Rycina 13. Ekspresja mRNA genu ER β (A, B) i białka ER β (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnieniem płci (B, D). 62
- Rycina 14. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka ER β w niewzrastającym rdzeniu guza (A, białą przerywana linią zaznaczono obszar martwicy), korze guza (B) i obrzeżu guza (C, białą przerywana linią oddzielono fragmenty stanowiące korę guza) zdiagnozowanego jako GBM. 63
- Rycina 15. Ekspresja białka PGR w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). 64
- Rycina 16. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka PGR w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). 65

- Rycina 17. Ekspresja mRNA genu *PGR* (A, B) i białka PGR (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnieniem płci (B, D). 66
- Rycina 18. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka PGR w niewzrastającym rdzeniu guza (A, białą przerywana linią zaznaczono obszar martwicy), korze guza (B) i obrzeżu guza (C) zdiagnozowanego jako GBM. 67
- Rycina 19. Ekspresja mRNA genu *PRLR* (A) i białka PRLR (B) w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). 68
- Rycina 20. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka PRLR w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H), nekrozy (N). 69
- Rycina 21. Ekspresja mRNA genu *PRLR* (A, B) i białka PRLR (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnieniem płci (B, D). 70
- Rycina 22. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka PRLR w niewzrastającym rdzeniu guza (A), korze guza (B) i obrzeżu guza (C, białą przerywana linią odznaczono obszar kory guza w lewym górnym rogu) zdiagnozowanego jako GBM. 71
- Rycina 23. Ekspresja białka FSHR w komórkach linii U87 hodowanej w różnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). 72
- Rycina 24. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z zastosowaniem systemu mikroskopii konfokalnej FV1000 (Olympus, Germany) pokazujące ekspresję białka FSHR w komórkach linii U87 hodowanej w poszczególnych warunkach: kontrolnych (K), niedoboru składników odżywczych (G), hipoksji (H) i nekrozy (N). 73

- Rycina 25. Ekspresja mRNA genu *FSHR* (A, B) i białka FSHR (C, D) w poszczególnych strukturach GBM (kora guza (K), niewzrastający rdzeń guza (R), obrzeże guza (O)) pozyskanych od pacjentów, pokazana łącznie (A, C) i z uwzględnieniem płci (B, D). 74
- Rycina 26. Reprezentatywne mikrofotografie pokazujące ekspresję białka FSHR w guzie GBM. 75

STRESZCZENIE

Wstęp: Glejak wielopostaciowy (GBM) jest nowotworem, którego charakterystyczny sposób wzrostu może wywierać wpływ na tworzenie się w jednym guzie różnych linii komórkowych. GBM podczas naciekania zdrowych tkanek tworzy swego rodzaju długie wypustki. Ograniczony dostęp do składników odżywczych i tlenu w niektórych częściach guza, wpływa na powstanie w guzie obszarów martwicy. W wyniku czego w samym guzie powstają różniące się od siebie struktury. Za udziałem receptorów zależnych od hormonów płciowych w zmianie biologii komórek glejaka przemawia fakt, iż występowanie tych nowotworów różni się istotnie pomiędzy płciami. Znacznie częściej chorują mężczyźni, a kobiety w wieku przed menopauzalnym charakteryzują się wyższą przeżywalnością w stosunku do kobiet w wieku po menopauzalnym, czy mężczyzn. Receptory zależne od hormonów płciowych pełnią istotną rolę w progresji wielu nowotworów. Wpływają na regulację szlaków indukujących proliferację i migrację komórek glejaka wielopostaciowego.

Cel: Celem przeprowadzonych badań było określenie ekspresji receptorów zależnych od hormonów płciowych w poszczególnych strukturach guza GBM, a także sprawdzenie wpływu warunków panujących w guzie na ekspresję receptorów zależnych od hormonów płciowych *in vitro*. Cele szczegółowe obejmowały: (1) Sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (receptora androgenowego (AR), progesteronowego (PGR), estrogenowego α (ER α), estrogenowego β (ER β), prolaktynowego (PRLR), folikulotropowego (FSHR)) w poszczególnych strukturach guza (rdzeń, kora, obrzeże guza). (2) Sprawdzenie różnic w ekspresji genów i białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) w poszczególnych strukturach guza (rdzeń, kora, obrzeże guza) u kobiet i mężczyzn. (3) Sprawdzenie ekspresji genów i białek oraz lokalizacji komórkowej białek receptorów zależnych od hormonów płciowych (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) w różnych warunkach występujących w guzie (warunki nekrozy, hipoksji, niedoboru składników odżywczych) w modelu *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek glioblastoma astrocytoma (U87).

Materiał i metody: W badaniu zastosowano dwa modele badawcze. Pierwszy wykorzystywał materiał pochodzący z różnych struktur guza GBM od pacjentów hospitali-

zowanych w Klinice Neurochirurgii PUM. Do projektu włączonych zostało 28 pacjentów, w tym 16 mężczyzn i 12 kobiet, w wieku od 36 do 81 lat. Materiał stanowiły próby pobrane z trzech obszarów guza: niewzrastającego rdzenia guza obejmującego głównie obszary martwicy, kory guza, czyli strefy guza rosnącego i obrzeża guza. Drugi model badawczy, model *in vitro*, został stworzony w celu sprawdzenia, czy analizowane czynniki wpływają na ekspresję badanych receptorów. Hodowle komórkowe linii U87 poddano wpływowi warunków: nekrozy, hipoksji i niedoboru składników odżywczych, imitujących warunki panujące w guzie. W badanym materiale określono ekspresję genów badanych receptorów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Ekspresję białek badanych receptorów określono przy użyciu testów immunoenzymatycznych. Obecność i lokalizację białek receptorów zależnych od hormonów płciowych w badanym materiale dodatkowo wykazano metodami mikroskopii konfokalnej (w komórkach linii U87) i analizy immunohistochemicznej (tkanki guza pochodzące od pacjentów).

Wyniki: W obrzeżu guza GBM zaobserwowano wzrost ekspresji białek AR, ER β , PGR w stosunku do rdzenia guza, a także wzrost białka PGR w stosunku do kory guza. W korze guza zauważono natomiast wzrost białka AR i mRNA ER β w stosunku do rdzenia guza. Po uwzględnieniu podziału na kobiety i mężczyzn w analizach zaobserwowano, że guzy pochodzące od kobiet charakteryzowały się wzrostem białek AR, ER β w obrzeżu guza w stosunku do rdzenia guza. Guzy pozyskane od mężczyzn cechowały się natomiast wzrostem mRNA ER β w korze guza w stosunku do rdzenia guza. Zauważono również, że guzy mężczyzn charakteryzowały się wzrostem białka PRLR w rdzeniu guza w stosunku do guzów kobiet. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji PRLR, ER α , FSHR pomiędzy strukturami guza, a także różnic w ekspresji ER α , FSHR pomiędzy płciami. Warunki niedoboru składników odżywczych wywołały wzrost ekspresji mRNA AR i spadek ekspresji mRNA ER β . Warunki hipoksji spowodowały spadek ekspresji mRNA AR, ER β , PRLR i wzrost ekspresji mRNA ER α . Warunki nekrotyczne nie wywołały natomiast zmian w ekspresji badanych receptorów.

Wnioski: Niewzrastający rdzeń guza GBM, obejmujący obszar martwicy, charakteryzował się obniżonym lub niezmiennym poziomem ekspresji badanych receptorów zależnych od hormonów płciowych w porównaniu do strefy guza rosnącego (kora guza) i obrzeża guza. Strefa silnego wzrostu guza (kora guza) GBM cechowała się obniżonym lub niezmiennym poziomem ekspresji badanych receptorów zależnych

od hormonów płciowych w porównaniu do obrzeża guza. Ekspresja badanych receptorów w poszczególnych strukturach guza nie różniła się u kobiet i mężczyzn, z wyjątkiem ekspresji receptora PRLR w rdzeniu guza, która była niższa u kobiet. Mężczyźni charakteryzowali się niższą ekspresją mRNA receptora ER β w rdzeniu guza w porównaniu do kory guza GBM. Kobiety cechowały się niższą ekspresją białka receptorów AR i ER β w rdzeniu guza w porównaniu do obrzeża guza GBM. Warunki panujące w guzie GBM (hipoksja i niedobór składników odżywczych) były czynnikami, które wywarły wpływ na zmiany w ekspresji badanych receptorów w warunkach *in vitro*. Za udziałem receptorów zależnych od hormonów płciowych w zmianie biologii komórek glejaka wielopostaciowego mogą przemawiać stwierdzone zmiany w ekspresji badanych receptorów u kobiet i mężczyzn. Jednakże dostępne dane nie pozwalają jednoznacznie określić roli tych receptorów w progresji glejaka wielopostaciowego.

SUMMARY

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is a neoplasm whose characteristic way of growth may influence the formation of different cell lines in one tumor. GBM, when infiltrating healthy tissues, forms a kind of long protrusions. Limited access to nutrients and oxygen in certain parts of the tumor results in the formation of areas of necrosis in the tumor. As a result, different structures are formed in the tumor itself. The participation of sex hormone-dependent receptors in changing the biology of GBM cells is supported by the fact that the occurrence of these tumors differs significantly between sexes. Men are affected much more often, and premenopausal women have a higher survival rate than postmenopausal women or men. Sex hormone-dependent receptors play an important role in the progression of many cancers. They affect the regulation of pathways inducing the proliferation and migration of GBM cells.

Aim: The study aimed to determine the expression of sex hormone-dependent receptors in individual structures of the GBM tumor, as well as to check the effect of the conditions in the tumor on the expression of sex hormone-dependent receptors in vitro. Specific objectives included: (1) Checking gene and protein expression and cellular localization of sex hormone-dependent receptor proteins (androgen receptor (AR), progesterone receptor (PGR), estrogen α receptor (ER α), estrogen β receptor (ER β), prolactin receptor (PRLR), follicle-stimulating receptor (FSHR)) in individual tumor structures (tumor core, enhancing tumor region, and peritumoral area). (2) Checking the differences in the expression of genes and proteins of sex hormone-dependent receptors (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) in individual tumor structures (tumor core, enhancing tumor region, and peritumoral area) in women and men. (3) Checking gene and protein expression and cellular localization of proteins of sex hormone-dependent receptors (AR, PGR, ER α , ER β , PRLR, FSHR) in various tumor conditions (necrosis, hypoxia, nutrient deficiency conditions) in in vitro model using a glioblastoma astrocytoma (U87) cell culture.

Material and methods: Two research models were used in the study. The first one used material from various structures of the GBM tumor from patients hospitalized at the Department of Neurosurgery, PUM. 28 patients were included in the project, including 16 men and 12 women, aged 36 to 81. The material consisted of samples taken from three areas of the tumor: the non-growing tumor core, covering mainly areas of necrosis, the enhancing tumor region, and the peritumoral area. The second research model, the in vitro

model, was created to check whether the analyzed factors affect the expression of the studied receptors. Cell cultures of the U87 line were exposed to the following conditions: necrosis, hypoxia, and nutrient deficiency, imitating conditions in a tumor. The expression of genes of the tested receptors in the tested material was determined by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Protein expression of the studied receptors was determined using enzyme immunoassays. The presence and localization of sex hormone-dependent receptor proteins in the examined material were additionally demonstrated by confocal microscopy (in cells of the U87 line) and immunohistochemical analysis (tumor tissues from patients).

Results: In the peritumoral area of the GBM tumor, an increase in the expression of AR, ER β , and PGR proteins was observed in relation to the tumor core, as well as an increase in the PGR protein in relation to the enhancing tumor region. In the enhancing tumor region, however, an increase in the AR protein and ER β mRNA was observed in relation to the tumor core. After considering the division into women and men in the analyses, it was observed that tumors originating from women were characterized by an increase in AR and ER β proteins in the peritumoral area in relation to the tumor core. On the other hand, tumors obtained from men were characterized by an increase in ER β mRNA in the enhancing tumor region in relation to the tumor core. It was also noted that male tumors were characterized by an increase in PRLR protein in the tumor core relative to female tumors. There were no differences in the expression of PRLR, ER α , and FSHR between tumor structures, and no differences in the expression of ER α , and FSHR between sexes. Nutrient-deficient conditions increased AR mRNA expression and decreased ER β mRNA expression. Hypoxic conditions resulted in a decrease in AR, ER β , and PRLR mRNA expression and an increase in ER α mRNA expression. However, necrotic conditions did not cause changes in the expression of the studied receptors.

Conclusions: The non-growing tumor core of the GBM, including the area of necrosis, was characterized by a reduced or unchanged level of expression of the sex hormone-dependent receptors tested in comparison to the enhancing tumor region and the peritumoral area. The zone of strong tumor growth (enhancing tumor region) of GBM was characterized by a reduced or unchanged level of expression of the sex hormone-dependent receptors studied compared to the peritumoral area. The expression of the studied receptors in individual tumor structures did not differ between men and women, except

for PRLR expression in the tumor core, which was lower in women. Males were characterized by a lower mRNA expression of ER β in the tumor core compared to the GBM-enhancing tumor region. Women were characterized by lower AR and ER β protein expression in the tumor core compared to the GBM peritumoral area. The conditions prevailing in the GBM tumor (hypoxia and nutrient deficiency) were the factors that influenced the changes in the expression of the studied receptors in vitro. The participation of sex hormone-dependent receptors in the change in the biology of glioblastoma multiforme cells may be supported by the observed changes in the expression of the studied receptors in women and men. However, the available data do not allow to unambiguously determine the role of these receptors in the progression of glioblastoma multiforme.

SPIS ZAŁĄCZNIKÓW

Załącznik 1.	Opinia komisji bioetycznej.
Załącznik 2.	Wzór ankiety dla pacjenta.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Uchwała nr KB-0012/96/14/A-1 Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie z dnia 09 marca 2020 r.

Na podstawie art. 29 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza i lekarza dentystry (j.t. z 2019 r., Dz.U. poz. 537 z późn. zm.) oraz § 6 rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480) uchwała się, co następuje:

§ 1

Komisja Bioetyczna Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, w składzie według dołączonej do niniejszej Uchwały listy, po zapoznaniu się z dokumentacją dotyczącą zmian w projekcie badawczym pt.:

"Udział receptorów dla nukleotydów w progresji glejaków"

który uzyskał pozytywną opinię Komisji, wyrażoną w Uchwale Nr KB-0012/96/14 z dnia 24.11.2014 r.

wyraża pozytywną opinię na wprowadzenie następujących zmian:

- rozszerzenie projektu o badanie: Ekspresja receptorów zależnych od hormonów płciowych w glejakach o różnej etiologii;
- dołączenie do zespołu badawczego mgr Donaty Simińskiej - doktoranta Zakładu Biochemii,
- dołączenie do zespołu badawczego prof. dr hab. n. med. Elżbieta Uraśńska - Kierownika Katedry i Zakładu Patomorfologii;
- wydłużenie okresu prowadzenia badań do 12.2024

§ 2

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.















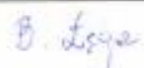
PPZEMKONICZALOV
Komisji Bioetycznej
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
prof. dr hab. n. med. Marek Dmądzek

Posuczenie:

1. Odwołanie od niniejszej uchwały może wnieść:
 - 1) podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny,
 - 2) kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony,
 - 3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloosobowym eksperymencie medycznym.
2. Odwołania, o których mowa w ust. 1, wnoszą się za pośrednictwem Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały.

Lista obecności członków Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

09 marca 2020 r.

	Imię i nazwisko	Miejsce pracy	
1.	prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik (choroby wewnętrzne)	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Kierownik: Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej	
2.	mgr Gabriela Hofman położna	Szczecińska Izba Pielęgniarek i Położnych ul. Kasońskiego 15LU/1 70-237 Szczecin Przewodnicząca Rady Szczecińskiej Izby Pielęgniarek i Położnych	
3.	dr hab. n. med. prof. PUM Anita Chudecka – Głaz (ginekologia i położnictwo, ginekologia onkologiczna)	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologii Ginekologicznej Dorosłych i Dzieciąt	
4.	dr hab. n. med. prof. PUM Marek Mysiak Choroby wewnętrzne, nefrologia, transplantologia	Samodzielny Publiczny Wojewódzki Szpital Zespolony im. Marii Skłodowskiej – Curie 71-455 Szczecin, ul. Arkońska 4 Ordynator: Oddział Nefrologii i Transplantacji Nerek Szpitala Dzieł Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie 70-103 Szczecin, ul. gen. Dąbrowskiego Chłapowskiego 11 Kierownik: Zakład Intensywnej Klinicznej i Medycyny Katastrof	
5.	dr n. med. Anita Horodnicka – Józwa specjalista pediatra, diabetolog, endokrynolog i diabetolog dziecięcy	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Klinika Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii, Chorób Metabolicznych i Kardiologii Wieku Rozwojowego	
6.	dr n. med. Edyta Zagrodnik anestezjologia i intensywina terapia	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego w Szczecinie 72-010 Police, ul. Siedlecka 2 Oddział Kliniczny Anestezjologii i Intensywnej Terapii Dorosłych i Dzieci	
7.	prof. dr hab. n. med. Dariusz Bielecki choroby wewnętrzne, gastroenterologia	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Katedra i Klinika Gastroenterologii	
8.	dr hab. n. med. prof. PUM Andrzej Brodkiewicz pediatria, nefrologia dziecięca	Samodzielny Publiczny Specjalistyczny Zakład Opieki Zdrowotnej „Zdrój” 70-780 Szczecin, ul. Mączna 4 PUM w Szczecinie Kierownik: Oddział Kliniczny Pediatrii, Nefrologii Dziecięcej, Dializoterapii i Leczenia Ostrego Złaza	
9.	dr hab. n. med. Krystyna Lisiecka stomatologia zachowawcza	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Zakład Stomatologii Dziecięcej Emeryt	
10.	prof. dr hab. n. med. Piotr Prowans chirurgia ogólna specjalista chirurgii plastycznej	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego 72-010 Police, ul. Siedlecka 2 Kierownik: Klinika Chirurgii Plastycznej, Endokrynologicznej i Ogólnej	
11.	prof. dr hab. n. med. Jacek Rudnicki pediatria, neonatologia	Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie 70-103 Szczecin, ul. gen. Dąbrowskiego Chłapowskiego 11 Kierownik: Zakład Nauk Humanistycznych w Medycynie	
12.	ks. dr Arkadiusz Wieczorek teologia moralna, bioetyka	Archiwiskopie Wyższe Seminarium Duchowne, ul. Papieża Pawła VI, 2, 71-459 Szczecin	
13.	ks. dr hab. prof. US Wiesław Dyk filozofia, filozofia przyrody	Uniwersytet Szczeciński Wydział Humanistyczny Instytut Filozofii, Szczecin, ul. Krakowska 71	
14.	mgr Witold Frankiewicz prawnik	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokołowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Sekcja Organizacyjno - Prawna	
15.	mgr Bernadeta Łęga farmacja apteczna	Zachodniopomorskie Centrum Kształcenia Zawodowego i Ustawicznego w Szczecinie ul. Broniewskiego 3, 71-460 Szczecin Nauczyciel przedmiotów zawodowych (nauczyciel dyplomowany)	



ANKIETA

UDZIAŁ RECEPTORÓW DLA NUKLEOTYDÓW W PROGRESJI GLEJAKÓW

1. Proszę podać następujące informacje:

- a) data i miejsce urodzenia:.....
- b) miejsce zamieszkania.....
-
- c) płeć: K / M, jeśli K: Czy przyjmuje Pani hormonalną terapię zastępczą: TAK/NIE
- d) masa ciała: _____ kg i wzrost: _____ cm
- e) przyczyna hospitalizacji Pan(i) na oddziale neurochirurgii.....
-

2. Miejsce zamieszkania w latach (możliwość zaznaczenia kilku odp.):

- a) wieś od do
- b) miasto do 10 tys. mieszkańców od do
- c) miasto 10-100 tys. mieszkańców od do
- d) miasto powyżej 100 tys. mieszkańców od do

3. Zawód wykonywany

- a) obecnie : (ile lat).....
- b) w przeszłości: (ile lat).....

4. Czy pracował/a Pan(i) w przemyśle ciężkim?

- a) NIE
- b) TAK – jakim?.....

5. Czy kiedykolwiek palił(a) Pan(i) papierosy (tytoń)?

- a) NIE
- b) TAK : okres palenia papierosów (tytoniu) w latach: od do średnio
dziennie sztuk

6. Czy pacjent/ka posiada implanty: zębów, śruby, płytki, gwoździe, protezy, klipsy, stabilizatory kręgosłupa itp.?

- a) NIE
- b) TAK – jakie?.....

7. Czy pacjent/ka chorował/a w przeszłości lub choruje na poważne schorzenia nerek?

- a) NIE
- b) TAK – jakie?.....

- 8. Czy pacjent/ka chorował/a w przeszłości lub choruje na poważne schorzenia wątroby?**
- a) NIE
b) TAK – jakie?.....
- 9. Czy pacjent/ka chorował/a w przeszłości lub choruje na poważne schorzenia neurologiczne?**
- a) NIE
b) TAK – jakie?.....
- 10. Czy pacjent/ka chorował/a w przeszłości lub choruje na cukrzycę?**
- a) NIE
b) TAK jakiego typu?.....
- 11. Czy pacjent/ka miała w przeszłości problemy z tarczycą?**
- a) NIE
b) TAK jakie?.....
- 12. Czy pacjent/ka przyjmuje suplementy diety?**
- a) NIE
b) TAK – jakie?.....
- 13. Czy pacjent/ka przyjmuje lub przyjmowała leki immunosupresyjne?**
- a) NIE
b) TAK – jakie?.....
- 14. Jak często podejmuje Pan(i) aktywność ruchową?**
- a) codziennie
b) kilka razy w tygodniu
c) rzadko
d) prawie wcale
- 15. Czy dolegliwości bólowe spowodowane przez chorobę zmusiły Pana/Panią do ograniczenia aktywności fizycznej?**
- a) tak, znacznie
b) częściowo
c) nie
- 16. Czy dolegliwości związane z chorobą ograniczyły Pani/Pana zdolności uczenia się i przyswajania nowych umiejętności?**
- a) tak, znacznie
b) częściowo
c) nie
- 17. Czy przyjmuje Pani/Pan leki na nadciśnienie?**
- a) tak
b) nie
- 18. Czy używa Pan/Pani telefonu komórkowego? Jeśli tak, to jak długo?**

- a) tak, mniej niż 5 lat
- b) tak, ponad 5 lat
- c) tak, ponad 10 lat
- d) nie

19. Czy był Pani/Pan narażony na działanie pola elektromagnetycznego?

- a) tak
- b) nie

20. Czy był Pan/Pani narażony na działanie promieniowania jonizujących?

- a) tak
- b) nie

UWAGI:

W przypadku innych istotnych dla tej ankiety informacji proszę o podanie ich i wpisanie poniżej (np. przewlekła choroba reumatyczna, przeszczep, zawał mięśnia sercowego, udar)

.....

Data wypełnienia ankiety:

Podpis: