

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Andelika T. Kalezić

**METABOLIČKI I REDOKS PROFIL ĆELIJA TUMORA I  
MASNOG TKIVA DOJKE PREMENOPAUZALNIH ŽENA:  
VEZA SA GOJAZNOŠĆU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Andelika T. Kalezić

**METABOLIC AND REDOX PROFILE OF BREAST TUMOR  
AND ADIPOSE CELLS IN PREMENOPAUSAL WOMEN:  
THE RELATIONSHIP WITH OBESITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

## **KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **MENTORI**

**dr Bato Korać**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet;  
Naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” –  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

**dr Aleksandra Janković**, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za Biološka  
istraživanja “Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

### **ČLANOVI KOMISIJE**

**dr Aleksandra Korać**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**dr Biljana Srdić Galić**, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet

**dr Milica Labudović Borović**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je urađena na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu i Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru projekta 173055 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Belo ili/i mrko: značaj masnog tkiva u održanju ukupne redoks zavisne metaboličke kontrole u fiziološkim adaptacijama i metaboličkim poremećajima”, pod rukovodstvom prof. Bata Koraća.*

*Ovom prilikom želim posebno da se zahvalim:*

*Prof. Bati Koraću, mentoru, na pruženoj prilici da učim, radim i usavršavam se u njegovom timu.*

*dr Aleksandri Janković, mentoru, na vremenu provedenom u razgovoru i diskusiji o kompleksnim fiziološkim fenomenima i metodološkim pristupima za njihovo proučavanje. Na pomoći i podršci prilikom svakog koraka u izradi doktorske disertacije.*

*Prof. Aleksandri Korać, na dugogodišnjem predočavanju veličanstvene kompleksnosti života na molekulskom nivou. Na pomoći prilikom eksperimentalnog rada, tumačenja rezultata, publikovanja i izrade doktorske disertacije.*

*Prof. Biljani Srdić Galić, na nesebičnoj pomoći i podršci tokom uvođenja u problematiku karcinoma dojke.*

*Prof. Milici Labudović Borović, na pomoći i podršci prilikom izrade doktorske disertacije.*

*Takođe, veliku zahvalnost dugujem:*

*Nikoli, na životnom saputništvu.*

*Stefanu, Kristini, Nini i Marku na prijateljstvu.*

*Tanji i Minji na razumevanju i podršci.*

*Familiji na nepresušnoj inspiraciji i smehu.*

# Metabolički i redoks profil ćelija tumora i masnog tkiva dojke premenopauzalnih žena: veza sa gojaznošću

## REZIME

Incidenca premenopauzalnog karcinoma dojke i gojaznosti je u porastu, a veza između ovih oboljenja je izrazito kompleksna. Gojaznost pokazuje negativnu korelaciju sa incidencom premenopauzalnog karcinoma dojke, ali pozitivnu korelaciju sa stopom metastaza, terapijske rezistencije i smrtnosti. Metaboličko reprogramiranje i visoka plastičnost redoks homeostaze su fundamentalne karakteristike malignog fenotipa koje omogućavaju adaptivni odgovor na povišene energetske zahteve i selektivne pritiske poreklom iz tumorske mikrosredine. U karcinomu dojke adipociti su ključni konstituent tumorske mikrosredine, a dvosmerna komunikacija između kancerskih ćelija i adipocita doprinosi proliferativnom i invazivnom potencijalu kancerskih ćelija. Uprkos ovakvim nalazima, *in vivo* molekularni mehanizmi redoks-senzitivnog metaboličkog reprogramiranja su mahom nepoznati. Cilj ove doktorske disertacije bio je da se okarakteriše redoks i metabolički profil tumorskog i masnog tkiva normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim, odnosno malignim tumorom dojke i identifikuju ključni metabolički putevi i transkripcioni faktori uključeni u redoks-senzitivno metaboličko reprogramiranje. Pokazana povećana ekspresija osnovnih enzima antioksidativne odbrane ukazuje da malignitet indukuje uspostavljanje nove redoks homeostaze, paralelno u tumorskom i masnom tkivu. Diferencijalna ekspresija enzima antioksidativne odbrane i master regulatora redoks homeostaze, nukleusnog faktora-eritroid faktor 2-zavisnog faktora 2 (Nrf2), između normalno uhranjenih i gojaznih žena, ukazuje da gojaznost utiče na uspostavljanje nove redoks homeostaze u tkivima dojke. Simultano sa redoks reprogramiranjem, povećana ekspresija AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK), enzima glikolize i pentozofosfatnog puta ukazuje na uspostavljanje AMPK-zavisnog Varburgovog efekta. Posledično, metabolizam glukoze u tumorskom tkivu je usmeren ka glikolizi uz produkciju laktata i pentozofosfatnom putu, dok je u masnom tkivu usmeren prevashodno ka pentozofosfatnom putu, ističući tkivno specifičan karakter Varburgovog efekta. U skladu sa Varburgovim efektom, smanjena ekspresija enzima oksidativne dekarboksilacije piruvata i Krebsovog ciklusa, a povećana ekspresija enzima oksidativne fosforilacije ukazuju da se metabolizam mitohondrija u tumorskom tkivu održava zahvaljujući plastičnosti anaplerotskih puteva. Sa druge strane, povećan broj kopija mitohondrijske DNK, kao i povećana proteinska ekspresija enzima oksidativne dekarboksilacije piruvata, Krebsovog ciklusa i oksidativne fosforilacije ukazuju da je indukcija oksidativnog metabolizma u osnovi metaboličkog reprogramiranja masnog tkiva u malignitetu. Markantne razlike u ekspresiji enzima uključenih u mobilizaciju,  $\beta$ -oksidaciju i *de novo* sintezu masnih kiselina između normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena ukazuju da gojaznost utiče na smer metaboličkog reprogramiranja u tumorskom i masnom tkivu dojke. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da u procesu neoplastične transformacije tumorsko i masno tkivo dojke čine kompleksan pseudo-organ u kome dolazi do uspostavljanja specifičnih redoks i metaboličkih profila u zavisnosti od sistemskih i lokalnih uticaja gojaznosti na tumorsku mikrosredinu u kojoj se razvija karcinom dojke.

**KLJUČNE REČI:** premenopauzalni karcinom dojke, masno tkivo, redoks homeostaza, metaboličko reprogramiranje, gojaznost.

**NAUČNA OBLAST:** Biologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Biologija ćelija i tkiva

# **Metabolic and redox profile of breast tumor and adipose cells in premenopausal women: the relationship with obesity**

## **SUMMARY**

The incidence of premenopausal breast cancer and obesity is rising, while accumulating evidence shows that the relationship between two diseases is highly complex. Obesity shows a negative correlation with the incidence of premenopausal breast cancer but a positive correlation with the rate of metastasis, therapeutic resistance, and mortality. Metabolic reprogramming and high redox homeostasis threshold are fundamental characteristics of the malignant phenotype that enable adaptive responses to increased energy demands and selective pressures imposed by the tumor microenvironment. In breast cancer, adipocytes represent a crucial component of the tumor microenvironment, where two-way communication between cancer cells and adipocytes contributes to cancer cell proliferation and invasion. Despite such findings, *in vivo* molecular mechanisms of redox-sensitive metabolic reprogramming remain mostly unknown. This doctoral dissertation aimed to characterize the redox and metabolic profile of tumor and adipose tissue of normal-weight and obese premenopausal women with benign or malignant breast tumors and identify key metabolic pathways and transcription factors involved in redox-sensitive metabolic reprogramming. Increased expression of main antioxidant defense enzymes was shown, indicating that malignancy contributes to the establishment of new redox homeostasis, both in tumor and adipose tissue. Differential expression of antioxidant defense enzymes and the master regulator of redox hemostasis, the nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2), between normal-weight and obese women indicates that obesity affects the establishment of new redox homeostasis. Simultaneously with redox reprogramming, increased expression of AMP-activated protein kinase (AMPK), glycolytic, and pentose phosphate pathway enzymes indicates the establishment of an AMPK-dependent Warburg effect. Consequently, glucose metabolism in tumor tissue is directed to glycolysis with lactate production and the pentose phosphate pathway, while in adipose tissue, it is directed primarily to the pentose phosphate pathway, emphasizing the tissue-specific character of the Warburg effect. Consistent with the Warburg effect, decreased expression of pyruvate decarboxylation and Krebs cycle enzymes and increased expression of oxidative phosphorylation enzymes indicate that mitochondrial metabolism in tumor tissue is maintained due to the plasticity of anaerobic pathways. On the other hand, increased mitochondrial copy number, as well as protein expression of pyruvate decarboxylation, Krebs cycle, and oxidative phosphorylation enzymes indicate that the induction of oxidative metabolism underlies metabolic reprogramming of adipose tissue in malignancy. Striking differences in the expression of enzymes involved in mobilization,  $\beta$ -oxidation, and *de novo* synthesis of fatty acids between normal-weight and obese premenopausal women indicate that obesity affects the direction of metabolic reprogramming in breast tumor and adipose tissue. This doctoral dissertation showed that in the process of neoplastic transformation, breast tumor and adipose tissue behave as a complex pseudo-organ in which specific redox and metabolic profiles are established, in accordance with the systemic and local influences of obesity on the tumor microenvironment.

**KEYWORDS:** premenopausal breast cancer, adipose tissue, redox homeostasis, metabolic reprogramming, obesity.

**SCIENTIFIC FIELD:** Biology

**SPECIAL TOPICS:** Cell and Tissue Biology

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Karcinom dojke kod premenopauzalnih žena.....	1
1.2.	Paradoks gojaznosti i karcinoma dojke kod premenopauzalnih žena.....	1
1.3.	Metaboličko reprogramiranje kao osnova maligne transformacije.....	2
1.4.	Redoks homeostaza i neoplastična transformacija.....	6
1.5.	Redoks-senzitivno metaboličko reprogramiranje.....	9
1.6.	Karcinom dojke se razvija u kompleksnoj tumorskoj mikrosredini.....	13
1.7.	Ključni konstituent tumorske mikrosredine: masno tkivo dojke.....	14
1.8.	Sistemska i lokalna uticaja gojaznosti na tumorsku mikrosredinu u karcinomu dojke.....	16
2.	CILJEVI.....	19
3.	MATERIJAL I METODE.....	20
3.1.	Eksperimentalni dizajn - selekcija pacijentkinja i prikupljanje uzoraka.....	20
3.2.	Priprema uzoraka za analize.....	20
3.2.1.	<i>Priprema tkiva za određivanje enzimskih aktivnosti.....</i>	20
3.2.2.	<i>Priprema tkiva za Western blot i PCR analize.....</i>	20
3.2.3.	<i>Priprema tkiva za svetlosnu i konfokalnu mikroskopiju.....</i>	21
3.3.	Određivanje koncentracije proteina.....	21
3.4.	Određivanje koncentracije RNK i DNK.....	22
3.5.	SDS-PAGE i Western blot.....	22
3.5.1.	<i>Elektroforeza proteina.....</i>	22
3.5.2.	<i>Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blot).....</i>	22
3.5.3.	<i>Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom.....</i>	24
3.6.	Određivanje izoenzimskog profila laktat dehidrogenaze.....	25
3.7.	Određivanje ukupne aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze.....	25
3.8.	Određivanje broja kopija mitohondrijske DNK lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (RT-PCR).....	25
3.9.	Analiza lokalizacije proteina mikroskopskim metodama.....	26
3.9.1.	<i>Imunohistohemijska lokalizacija proteina.....</i>	26
3.9.2.	<i>Imunofluorescentna lokalizacija proteina.....</i>	27
3.10.	Statistička obrada rezultata.....	28
4.	REZULTATI.....	29
4.1.	Karakteristike pacijentkinja i patohistološki parametri tumora dojke.....	29
4.2.	Redoks status u tumorskom i masnom tkivu dojke.....	31
4.2.1.	<i>Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CuZnSOD u tumorskom tkivu dojke.....</i>	31

4.2.2.	<i>Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CuZnSOD u masnom tkivu dojke.....</i>	32
4.2.3.	<i>Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije MnSOD u tumorskom tkivu dojke.....</i>	33
4.2.4.	<i>Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije MnSOD u masnom tkivu dojke .....</i>	34
4.2.5.	<i>Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CAT u tumorskom tkivu dojke .....</i>	35
4.2.6.	<i>Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CAT u masnom tkivu dojke.....</i>	36
4.2.7.	<i>Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije GSH-Px u tumorskom tkivu dojke.....</i>	37
4.2.8.	<i>Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije GSH-Px u masnom tkivu dojke .....</i>	38
4.2.9.	<i>Nivo 4-HNE modifikovanih proteina u tumorskom i masnom tkivu dojke.....</i>	39
4.2.10.	<i>Obrazac proteinske ekspresije i ćelijske lokalizacije 4-HNE modifikovanih proteina u tumorskom i masnom tkivu dojke .....</i>	40
4.2.11.	<i>Proteinska ekspresija transkripcionog faktora Nrf2 u tumorskom i masnom tkivu dojke .....</i>	43
4.3.	<i>Glikoliza u tumorskom i masnom tkivu dojke.....</i>	44
4.3.1.	<i>Proteinska ekspresija enzima glikolize u tumorskom tkivu dojke .....</i>	44
4.3.2.	<i>Proteinska ekspresija enzima glikolize u masnom tkivu dojke.....</i>	45
4.3.3.	<i>Obrazac lokalizacije heksokinaze 2 u tumorskom i masnom tkivu dojke.....</i>	45
4.3.4.	<i>Obrazac unutarćelijske lokalizacije heksokinaze u tumorskom tkivu dojke.....</i>	46
4.4.	<i>Metabolizam laktata u tumorskom i masnom tkivu dojke .....</i>	49
4.4.1.	<i>Koncentracija laktata, aktivnost LDH i izoenzimski profil LDH u tumorskom tkivu dojke ....</i>	49
4.4.2.	<i>Koncentracija laktata, aktivnost LDH i izoenzimski profil LDH u masnom tkivu dojke .....</i>	50
4.4.3.	<i>Proteinska ekspresija LDH monomera u tumorskom tkivu dojke .....</i>	51
4.4.4.	<i>Proteinska ekspresija LDH monomera u masnom tkivu dojke .....</i>	51
4.4.5.	<i>Obrazac lokalizacije LDHA i LDHB u tumorskom tkivu dojke .....</i>	52
4.4.6.	<i>Obrazac lokalizacije LDHA i LDHB u masnom tkivu dojke.....</i>	53
4.4.7.	<i>Obrazac lokalizacije LDHA u kancerskim ćelijama i LDHB u adipocitima u malignom tumorskom tkivu dojke .....</i>	54
4.4.8.	<i>Proteinska ekspresija MCT1 i MCT4 u tumorskom tkivu dojke.....</i>	55
4.4.9.	<i>Proteinska ekspresija MCT1 i MCT4 u masnom tkivu dojke .....</i>	55
4.4.10.	<i>Obrazac lokalizacije MCT1 i MCT4 u tumorskom tkivu dojke.....</i>	56
4.4.11.	<i>Obrazac lokalizacije MCT1 i MCT4 u masnom tkivu dojke .....</i>	58
4.4.12.	<i>Obrazac lokalizacije MCT4 u kancerskim ćelijama i MCT1 u adipocitima u malignom tumorskom tkivu dojke .....</i>	60
4.5.	<i>Pentozofosfatni put u tumorskom i masnom tkivu dojke.....</i>	61
4.6.	<i>Proteinska ekspresija AMPK u tumorskom i masnom tkivu dojke .....</i>	62
4.7.	<i>Metabolizam glikogena u tumorskom i masnom tkivu dojke .....</i>	63
4.7.1.	<i>Sadržaj glikogena u tumorskom tkivu dojke.....</i>	63
4.7.2.	<i>Proteinska ekspresija GSK-3 u tumorskom i masnom tkivu dojke.....</i>	64
4.8.	<i>Oksidativna dekarboksilacija piruvata u tumorskom i masnom tkivu dojke .....</i>	65



4.8.1.	<i>Proteinska ekspresija PDH u tumorskom i masnom tkivu dojke</i> .....	65
4.8.2.	<i>Proteinska ekspresija PDK4 u tumorskom i masnom tkivu dojke</i> .....	65
4.9.	Proteinska ekspresija citrat sintaze u tumorskom i masnom tkivu dojke.....	67
4.10.	Oksidativna fosforilacija u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	68
4.10.1.	<i>Proteinska ekspresija kompleksa elektron transportnog lanca i ATP sintaze u tumorskom tkivu dojke</i> .....	68
4.10.2.	<i>Proteinska ekspresija kompleksa elektron transportnog lanca i ATP sintaze u masnom tkivu dojke</i> .....	69
4.11.	Proteinska ekspresija UCP1 u masnom tkivu dojke .....	70
4.12.	Lipoliza u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	71
4.13.	Beta oksidacija masnih kiselina u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	71
4.13.1.	<i>Mitohondrijska <math>\beta</math>-oksidacija masnih kiselina u tumorskom i masnom tkivu dojke</i> .....	71
4.13.2.	<i>Peroksizomalna <math>\beta</math>-oksidacija masnih kiselina u tumorskom i masnom tkivu dojke</i> .....	71
4.14.	Sinteza masnih kiselina u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	73
4.15.	Metabolizam glutamina u tumorskom tkivu dojke .....	75
4.16.	Broj kopija mitohondrijske DNK i stepen ekspresije mitohondrijskog genoma u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	75
4.17.	Proteinska ekspresija PGC-1 $\alpha$ u tumorskom i masnom tkivu dojke.....	77
5.	DISKUSIJA .....	78
5.1.	Redoks profil u tumorskom i masnom tkivu dojke.....	78
5.2.	Nivo i obrazac proteinske ekspresije i ćelijske lokalizacije 4-HNE modifikovanih proteina u tumorskom i masnom tkivu dojke.....	80
5.3.	Proteinska ekspresija transkripcionog faktora Nrf2 u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	81
5.4.	Glikoliza u tumorskom i masnom tkivu dojke.....	82
5.5.	Metabolizam laktata u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	83
5.6.	Uloga AMPK u uspostavljanju tkivno specifičnog Warburgovog efekta u karcinomu dojke.	86
5.7.	Metabolizam glikogena u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	87
5.8.	Oksidativna dekarboksilacija piruvata i Krebsov ciklus u tumorskom i masnom tkivu dojke	88
5.9.	Elektron transportni lanac mitohondrija i oksidativna fosforilacija u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	89
5.10.	Metabolizam lipida u tumorskom i masnom tkivu dojke.....	90
5.11.	Metabolizam glutamina u tumorskom i masnom tkivu dojke.....	92
5.12.	Pregled mitohondrijalne dinamike u tumorskom i masnom tkivu dojke .....	92
6.	ZAKLJUČCI .....	95
	LITERATURA .....	97
	BIOGRAFIJA AUTORA.....	125

# 1. UVOD

## 1.1. Karcinom dojke kod premenopauzalnih žena

Karcinom dojke je najčešće maligno oboljenje kod žena sa preko milion dijagnostikovanih slučajeva godišnje širom sveta (Bray *i sar.*, 2018). U Republici Srbiji karcinom dojke je takođe najčešće maligno oboljenje kod žena sa najvećom stopom mortaliteta u Evropi (Mihajlović *i sar.*, 2013). Na osnovu menopauzalnog statusa karcinom dojke se klasifikuje kao premenopauzalni ili postmenopauzalni ukoliko se javlja kod mladih žena pre menopauze, odnosno starijih žena posle menopauze. Ova distinkcija je važna zato što su uzroci, molekulske karakteristike, dijagnostika, terapijski pristup, prognoza i ishod bolesti u vezi sa menopauzalnim statusom i značajno se razlikuju između premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena (Heer *i sar.*, 2020). Tako je incidenca premenopauzalnog karcinoma dojke u poslednjim decenijama u porastu, dok se incidenca postmenopauzalnog karcinoma dojke smanjuje (Johnson *i sar.*, 2013). Pored toga, epidemiološke studije pokazuju da je rana detekcija otežana kod mladih žena, te da se premenopauzalni karcinom dojke tipično identifikuje u poodmaklim stadijumima (Rosenberg *i sar.*, 2015), kao i da često pokazuje veću agresivnost i nižu stopu preživljavanja u poređenju sa postmenopauzalnim karcinomom dojke (Lewis *i sar.*, 2014). Uprkos ovakvim nalazima, premenopauzalni karcinom dojke je nedovoljno ispitan, a faktori rizika i molekulske karakteristike karcinoma dojke kod premenopauzalnih žena su mahom nepoznati.

Karcinom dojke je heterogeno maligno oboljenje koje se patohistološki može klasifikovati na nekoliko načina: po veličini tumora, histološkom gradusu, zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova i prisustvu hormonskih receptora (Eliyatkin *i sar.*, 2015). Na osnovu prisustva ili odsustva hormonskih receptora, karcinom dojke se može podeliti na estrogen-pozitivan/negativan (ER<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>), progesteron-pozitivan/negativan (PR<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup>) i receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2-pozitivan/negativan (HER2<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>). U odnosu na kombinaciju prisutnih receptora, karcinom dojke se klasifikuje na nekoliko molekulskih podtipova: luminalni tip A (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>), luminalni tip B (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>+</sup>), HER2 pozitivan (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>) i trostruko negativan (ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>). Najčešći tip karcinoma dojke kod premenopauzalnih žena je invazivni duktalni karcinom luminalnog tipa A (Birmann *i sar.*, 2017).

## 1.2. Paradoks gojaznosti i karcinoma dojke kod premenopauzalnih žena

Gojaznost poprima epidemijske razmere, sa preko petsto miliona gojaznih i gotovo milijardu prekomerno uhranjenih ljudi širom sveta. Novije studije dovode gojaznost u vezu sa incidencom nekoliko vrsta malignih oboljenja, uključujući i karcinom dojke (Renahan *i sar.*, 2008). Veza između gojaznosti i postmenopauzalnog karcinoma dojke je dobro opisana i gojaznost se nedvosmisleno smatra jednim od faktora rizika za nastanak karcinoma dojke kod postmenopauzalnih žena (Cheraghi *i sar.*, 2012; Xia *i sar.*, 2014). Takođe, gojaznost se dovodi u vezu sa povećanom incidencom invazivnih karcinoma, stopom recidiva i smrtnosti kod postmenopauzalnih žena (Niraula *i sar.*, 2012; White *i sar.*, 2012). Nasuprot tome, veza između gojaznosti i premenopauzalnog karcinoma dojke je kompleksnija i još uvek nedovoljno ispitan.

Naime, novije studije su pokazale negativnu korelaciju između gojaznosti i incidence premenopauzalnog karcinoma dojke (Rose *i sar.*, 2010; Cheraghi *i sar.*, 2012), posebno kada su u pitanju estrogen- i progesteron-pozitivni podtipovi (Schoemaker *i sar.*, 2018). Interesantno, gojaznost u detinjstvu, adolescenciji i pre menopauze negativno korelira sa rizikom od premenopauzalnog i postmenopauzalnog karcinoma dojke, dok gojaznost posle menopauze pozitivno korelira sa rizikom od karcinoma dojke (Baer *i sar.*, 2010). I pored toga što se gojaznost čak može smatrati protektivnim faktorom u odnosu na razvoj karcinoma dojke kod premenopauzalnih žena, epidemiološke studije pokazuju veće incidence metastaza i terapijske rezistencije, odnosno nižu stopu preživljavanja kod gojaznih premenopauzalnih žena u odnosu na normalno uhranjene žene (Chan *i sar.*, 2014; Lee *i sar.*, 2019). Kako bi se utvrdili molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi ovog, naizgled paradoksalnog odnosa između gojaznosti i premenopauzalnog karcinoma dojke, neophodne su sveobuhvatne *in vivo* studije koje uključuju normalno uhranjene i gojazne premenopauzalne žene.

### 1.3. Metaboličko reprogramiranje kao osnova maligne transformacije

Tumorogeneza je dinamičan višestepeni proces u toku kojeg ćelije stiču niz molekularnih, biohemijskih i morfoloških karakteristika koje čine osnovu maligne transformacije od normalne do invazivne maligne ćelije preko niza premalignih i malignih stanja. Maligni fenotip se može okarakterisati kroz šest fundamentalnih alteracija u ćelijskoj fiziologiji: samoodrživost signala rasta, neosetljivost na inhibitorne signale rasta, izbegavanje programirane ćelijske smrti, neograničen replikativni potencijal, kontinuirana angiogeneza i tkivna invazija i metastaza (Hanahan *i sar.*, 2000). Ove adaptivne osobine počivaju na metaboličkom reprogramiranju esencijalnih bioenergetskih i biosintetskih puteva, obezbeđujući preživljavanje u uslovima stresa, kao i intenzivan rast i proliferaciju, pri čemu se tokom procesa neoplastične transformacije postiče nova tkivna homeostaza kroz interakciju kancerskih ćelija sa tumorskom mikrosredinom (Hanahan *i sar.*, 2011; Fouad *i sar.*, 2017).

Sa aspekta bioenergetike, kancerske ćelije se odlikuju izmenjenom strategijom u odnosu na netransformisane diferencirane ćelije. Oto Warburg je 1924. godine zabeležio da kancerske ćelije proizvode gotovo polovinu ukupne hemijske energije u vidu ATP fermentacijom glukoze do laktata, čak i u prisustvu kiseonika (Warburg *i sar.*, 1927). Terminalno diferencirane ćelije uglavnom metabolišu glukozu do ugljen-dioksida u prisustvu kiseonika, oksidacijom piruvata iz glikolize u Krebsovom ciklusu zarad maksimalne produkcije hemijske energije u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Nasuprot tome, kancerske ćelije nezavisno od prisustva kiseonika obezbeđuju neophodnu količinu ATP u značajno većem udelu iz glikolize, u poređenju sa netransformisanim ćelijama koje za produkciju ATP koriste gotovo isključivo oksidativnu fosforilaciju. Ovaj metabolički svič, od oksidativne fosforilacije ka glikolizi predstavlja jednu od osnovnih biohemijskih karakteristika malignog fenotipa. Iako se glikolizom od jednog molekula glukoze dobijaju 2 molekula ATP u poređenju sa 30 (32) molekula ATP koji se dobijaju potpunom oksidacijom glukoze u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, količina ATP postaje ograničavajući faktor za ćelije samo kada se nalaze u sredini siromašnoj nutrijentima. Zahvaljujući stimulisanju angiogeneze i metaboličkoj kooperaciji sa drugim ćelijama

unutar maligno transformisanih tkiva, proliferišuće kancerske ćelije tipično ne oskudevaju u nutrijentima (Heiden *i sar.*, 2009). Pored toga, povećano preuzimanje glukoze i kontinuirana glikoliza sa produkcijom laktata u prisustvu kiseonika donosi nekoliko metaboličkih prednosti kancerskim ćelijama, za koje su rapidan rast i proliferacija fiziološki imperativ (DeBerardinis *i sar.*, 2020). Povećan glikolitički fluks obezbeđuje bogat izvor glikolitičkih intermedijera za biosintetske puteve. Naime, kancerske ćelije intenzivno sintetišu nukleinske kiseline, proteine i lipide kako bi obezbedile biomasu neophodnu za rast, biogenezu organela i ćelijsku deobu. U skladu sa ovakvim potrebama, kancerske ćelije reprogramiraju katabolizam glukoze ka simultanoj produkciji ATP, ugljenikovih jedinica (acetyl-CoA), riboza i redukujućih ekvivalenata u vidu nikotinamid adenin dinukleotida (NADH/NADPH) kroz uravnoteženu propagaciju puteva glikolize, oksidativne dekarboksilacije piruvata i pentozofosfatnog puta (Pavlova *i sar.*, 2016). Shodno tome, Warburgov efekat predstavlja metaboličku adaptaciju na kojoj počiva selektivna prednost visoko proliferišućih ćelija.

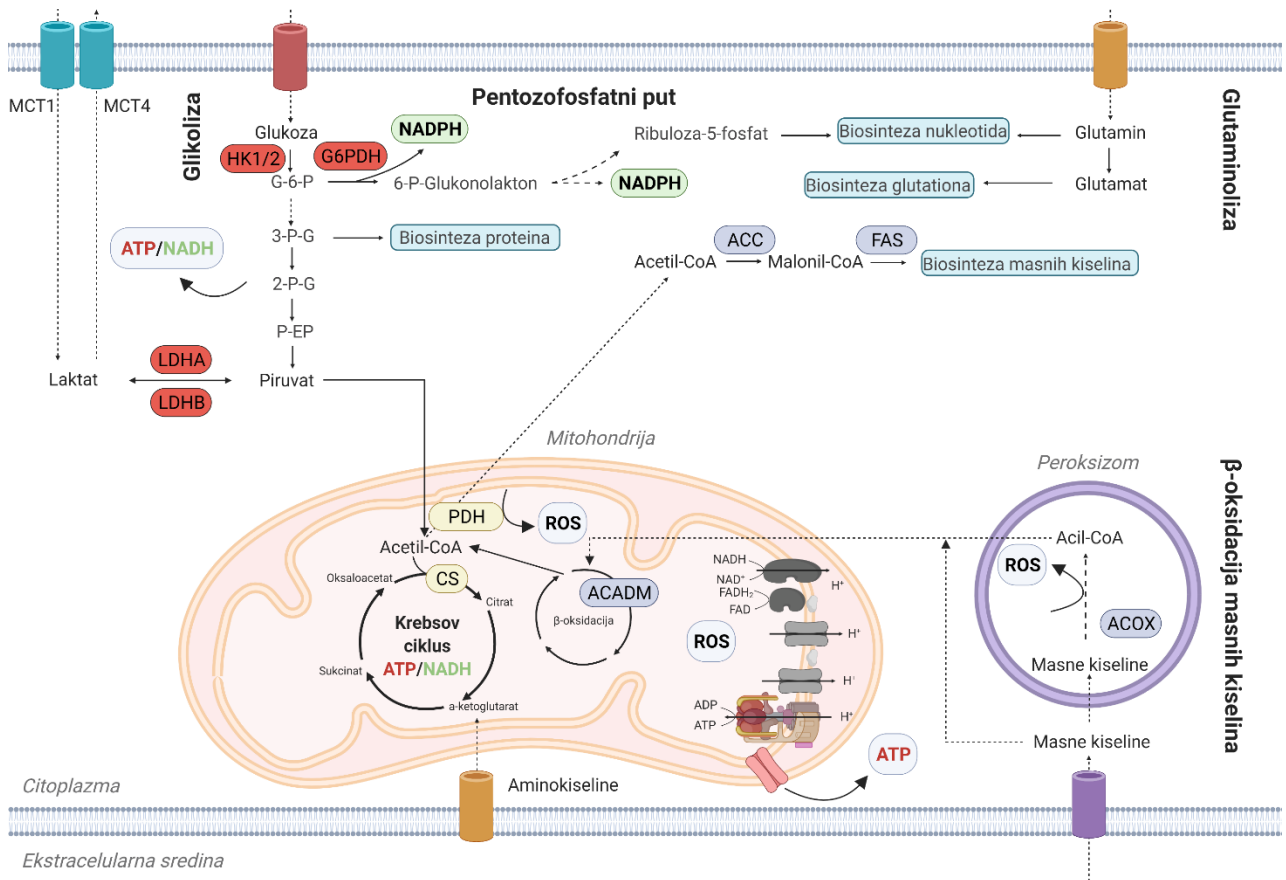
Sa druge strane, centralni katabolički put, Krebsov ciklus, predstavlja izvor redukujućih ekvivalenata za produkciju glavne hemijske energije u vidu ATP u procesu oksidativne fosforilacije, dok su intermedijeri Krebsovog ciklusa izvor prekursora za sintezu biomakromolekula (Ahn *i sar.*, 2015). Uz piruvat iz glikolize i aminokiseline,  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina predstavlja glavni izvor supstrata za Krebsov ciklus u vidu acetyl-CoA. Glutaminoliza, karboksilacija piruvata i metabolizam aminokiselina takođe predstavljaju izvor supstrata za Krebsov ciklus (Owen *i sar.*, 2002). Glutamin konverzijom do glutamata i  $\alpha$ -ketoglutarata u seriji reakcija glutaminolize doprinosi održavanju pula intermedijera Krebsovog ciklusa (Hensley *i sar.*, 2013). Slično, karboksilacija piruvata i aminokiseline predstavljaju izvor oksaloacetata, acetyl-CoA i drugih intermedijera Krebsovog ciklusa (Mayers *i sar.*, 2014). Uporedo sa glikolitičkim reprogramiranjem, fleksibilnost anaplerotskih puteva predstavlja osnovu metaboličke plastičnosti koja kancerskim ćelijama omogućava brz i adekvatan odgovor na varijabilne selektivne pritiske poreklom iz tumorske mikrosredine u kontekstu dostupnosti nutrijenata i kiseonika (Boroughs *i sar.*, 2015). Tokom evolucije tumora u procesu tumorogeneze, bioenergetska strategija je određena trenutnim energetske potrebama kancerskih ćelija u različitim stupnjevima progresije, koje su u velikoj meri definisane interakcijom kancerskih ćelija sa različitim komponentama tumorske mikrosredine.

Metaboličko reprogramiranje bioenergetskih puteva obezbeđuje i gradivne jedinice i hemijsku energiju za sintezu biomakromolekula, u skladu sa zahtevima intenzivnog rasta, proliferacije i migracije kancerskih ćelija, kao i dostupnošću resursa koje diktiraju sistemski i lokalni uticaji tumorske mikrosredine. Biosintetski putevi obuhvataju preuzimanje nutrijenata iz cirkulacije i ekstracelularnog matriksa, konverziju u intermedijere kroz centralne metaboličke puteve kao što su glikoliza, pentozofosfatni put, Krebsov ciklus i oksidativna fosforilacija i konačno sintezu nukleinskih kiselina, proteina i lipida. Sintaza proteina je visoko regulisan proces koji uključuje intenzivirano preuzimanje aminokiselina (esencijalnih i neesencijalnih) iz ekstracelularnog matriksa, što obezbeđuje pul aminokiselina za sintezu proteina, ali i kontinuiranu aktivaciju signalnih puteva koji stimulišu translaciju i biogenezu ribozoma (Laplanche *i sar.*, 2012). Povećano preuzimanje glutamina obezbeđuje intracelularni pul, kako za sintezu neesencijalnih aminokiselina (Cluntun *i sar.*, 2017), tako i za eksport i zamenu za esencijalne aminokiseline

(Nicklin *i sar.*, 2009). U uslovima prolaznog nutritivnog stresa kancerske ćelije privremeno mogu obezbediti aminokiseline, ugljenik i azot iz intra- i ekstracelularne sredine autofagijom (White, 2015) i endocitozom (Commisso *i sar.*, 2013). Kancerske ćelije aktiviraju i puteve *de novo* sinteze masnih kiselina, usled povećanih potreba za sintezom fosfolipida, sekundarnih glasnika i ATP. Acetil-CoA za sintezu masnih kiselina primarno potiče od glukoze, ali izuzetno, glukogene aminokiseline mogu predstavljati alternativni izvor (Yoo *i sar.*, 2004; Metallo *i sar.*, 2012; Schug *i sar.*, 2015; Green *i sar.*, 2016), dok NADPH uglavnom potiče iz pentozofosfatnog puta i u manjoj meri folatnog ciklusa (Fan *i sar.*, 2014). Uporedo sa *de novo* sintezom masnih kiselina ili u uslovima stresa kada je *de novo* sinteza masnih kiselina suprimirana, kancerske ćelije preuzimaju masne kiseline i lipide iz ekstracelularne sredine (DeBerardinis *i sar.*, 2006). Izuzetan replikativni potencijal nameće i visoke potrebe za sintezom nukleinskih kiselina, odnosno purinskih i pirimidinskih nukleotida. Biosinteza nukleotida je kompleksna i zahteva koordinisan priliv supstrata iz nekoliko metaboličkih puteva (Stincone *i sar.*, 2015).

Metaboličko reprogramiranje dovodi i do značajne promene u bazalnim nivoima pojedinih metabolita. Produkti metabolizma čija je koncentracija znatno veća u maligno transformisanim tkivima u odnosu na netransformisana nazivaju se onkometaboliti i specifično učestvuju u održanju i propagaciji malignog fenotipa (Yang *i sar.*, 2013). Neki od do sada definisanih onkometabolita su metabolički produkti glikolize i Krebsovog ciklusa: laktat, fumarat, sukcinat, acetil-CoA i  $\alpha$ -ketoglutarat. Onkometaboliti ostvaruju svoje uloge van konvencionalnih metaboličkih puteva, najverovatnije doprinoseći mehanizmima epigenetičke regulacije kroz modifikaciju histona i posttranslacione regulacije kroz interakciju sa sulfhidrilnim grupama proteina (Adam *i sar.*, 2011; Kaelin *i sar.*, 2013; Chen *i sar.*, 2021).

Opisane alteracije u osnovnim metaboličkim putevima ilustruju generalni princip po kome metaboličko reprogramiranje doprinosi preživljavanju i adaptivnoj prednosti proliferišućih kancerskih ćelija (Shema 1). Metaboličko reprogramiranje je dinamičan proces koji je visoko specifičan za tip kancera i stadijum progresije, a takođe zavisi od sistemskih i lokalnih selektivnih pritisaka poreklom iz tumorske mikrosredine (Jacquet *i sar.*, 2021).



**Shema 1. Pojednostavljen prikaz metaboličkih puteva koji su u osnovi metaboličkog reprogramiranja u kanceru.** Kancerske ćelije produkuj gotovo polovinu hemijske energije u vidu ATP fermentacijom glukoze do laktata, čak i u prisustvu kiseonika. Metabolički svič od oksidativne fosforilacije ka glikolizi je osnovna biohemijska karakteristika malignog fenotipa i po naučniku koji je definisao se naziva Varburgov efekat. Intenzivirano preuzimanje glukoze i glikolitički fluks donose brojne prednosti proliferišućim kancerskim ćelijama kroz suplementaciju biosintetskih puteva i održavanje redoks homeostaze. Glikoliza predstavlja izvor supstrata za biosintezu proteina, dok pentozofosfatni put predstavlja izvor supstrata za biosintezu nukleotida i NADPH. Intermedijeri centralnog kataboličkog puta, Krebsovog ciklusa, potiču od metabolizma glukoze, aminokiselina i masnih kiselina koje se uključuju u Krebsov ciklus preko acetil-CoA i drugih intermedijera. Anaplerotska priroda Krebsovog ciklusa predstavlja osnovu metaboličke plastičnosti koja kancerskim ćelijama omogućava fleksibilnost u odgovoru na vrstu i dostupnost nutrijenata iz tumorske mikrosredine. MCT1, monokarboksilatni transporter 1; MCT4, monokarboksilatni transporter 4; HKs, heksokinaza 1 i heksokinaza 2; LDHA, laktat dehidrogenaza A; LDHB, laktat dehidrogenaza B; G6PDH, glukoza 6-fosfat dehidrogenaza; PDH, piruvat dehidrogenaza; CS, citrat sintaza; IDH, izocitrat dehidrogenaza; ME, malični enzim; ACOX, peroksisomalna acil-CoA dehidrogenaza; ACADM, mitohondrijalna acil-CoA dehidrogenaza srednjeg lanca; ACC, acetil-CoA karboksilaza; FAS, sintaza masnih kiselina; NADPH, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; ATP, adenzin trifosfat; ROS, reaktivne vrste kiseonika; G-6-P, glukoza 6-fosfat; 3-P-G, glicerat 3-fosfat; 2-P-G, glicerat 2-fosfat; P-EP, fosfoenolpiruvat.

#### 1.4. Redoks homeostaza i neoplastična transformacija

Oksidativni metabolizam je neraskidivo povezan sa produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika (*eng.* Reactive oxygen species, ROS), u prvom redu superoksid anjon radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) i hidrosil radikala ( $OH^{\cdot}$ ) (Schieber *i sar.*, 2014). Održavanje fizioloških nivoa reaktivnih vrsta ističe njihovu ulogu kao važnih signalnih molekula u regulaciji vitalnih ćelijskih procesa poput replikacije genoma, deobe, migracije i apoptoze. Prostorno i vremenski lokalizovane promene u koncentraciji reaktivnih vrsta dovode do oksidativnih modifikacija biomolekula i predstavljaju ključni signal u regulaciji transkripcije, protein-protein interakcija, aktivnosti enzima i aktivaciji transkripcionih faktora (D'Autr aux *i sar.*, 2007). Sa druge strane, ukoliko nivoi reaktivnih vrsta prevaziđu kapacitete antioksidativne odbrane, dolazi do oksidativnih oštećenja biomolekula i narušavanja ćelijskih funkcija (Jones *i sar.*, 2015).

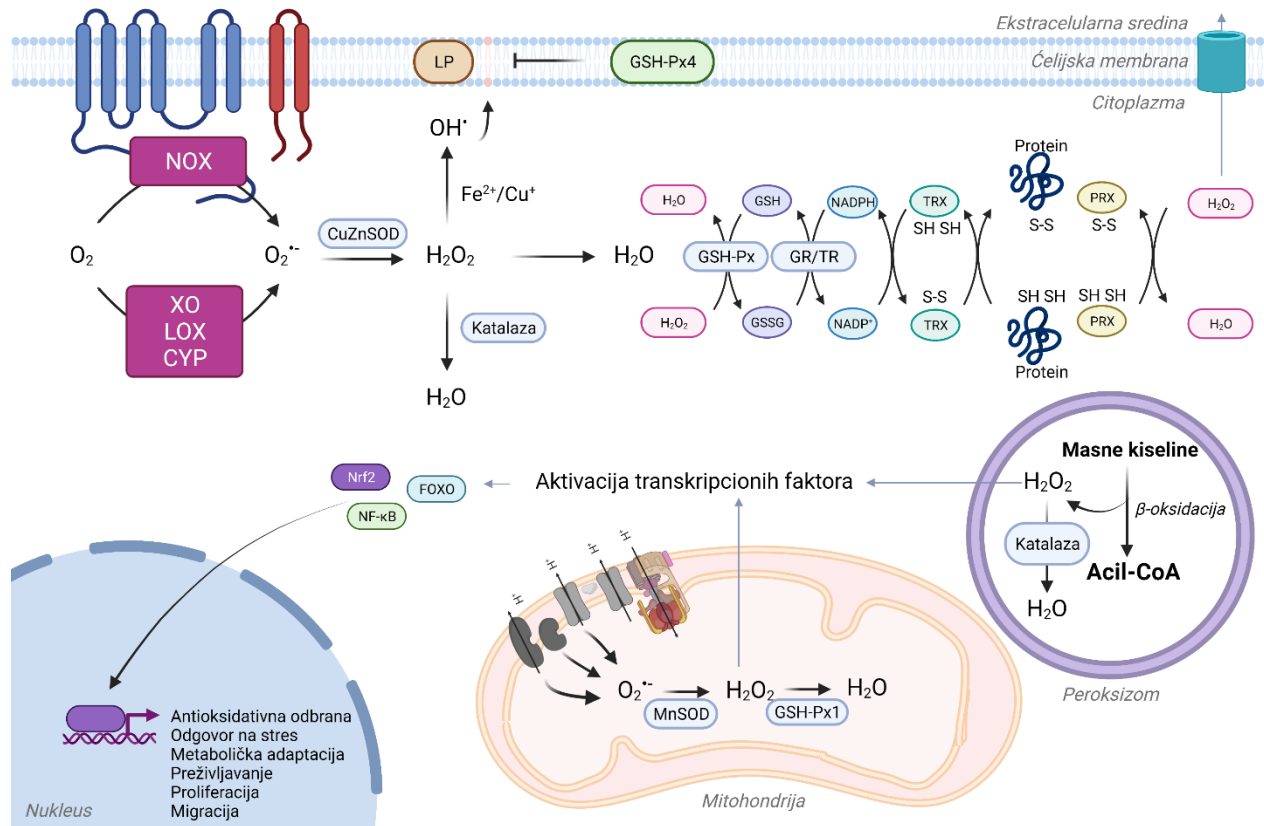
Bazalni nivoi reaktivnih vrsta su određeni stopom kontinuirane produkcije i uklanjanja.  $O_2^{\cdot-}$  je reaktivna, relativno kratkoživeća vrsta koja se dismutacijom brzo prevodi u  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  je slabije reaktivan, relativno stabilan molekul koji ima sposobnost kretanja kroz membrane difuzijom ili membranskim transportom (Wang *i sar.*, 2020).  $H_2O_2$  je važan redoks signalni molekul i sekundarni glasnik redoks-senzitivne signalizacije (Sena *i sar.*, 2012).  $H_2O_2$  u reakciji sa  $O_2^{\cdot-}$  u prisustvu jona  $Fe^{2+}$  i  $Cu^+$  daje visoko reaktivnu vrstu  $OH^{\cdot}$  koja neselektivno reaguje sa molekulskim targetima na mestu produkcije (Glasauer *i sar.*, 2014). Osnovni endogeni izvori reaktivnih vrsta kiseonika uključuju neenzimsku produkciju nepotpunom redukcijom molekulskog kiseonika u elektron transportnom lancu mitohondrija (Muller *i sar.*, 2004) i enzimsku produkciju od strane NADPH oksidaza, ksantin oksidaza, lipoksigenaza i citohroma P450 (Li *i sar.*, 2013). Održavanje fizioloških nivoa ROS u prvom redu je omogućeno antioksidativnom odbranom, čije enzimske i neenzimske komponente specifično uklanjaju ROS. Njihova lokalizacija u citoplazmi (hidrofilne) i membranama (lipofilne), kao i ćelijska kompartmentalizacija u organelama, uključujući mitohondrije, peroksizome, endoplazmin retikulum i nukleus dodatno doprinosi specifičnosti uklanjanja ROS. Enzim superoksid dismutaza (*eng.* Superoxide dismutase, SOD) dismutacijom prevodi  $O_2^{\cdot-}$  do  $H_2O_2$  ubrzavajući reakciju dismutacije za više od tri puta (Halliwell *i sar.*, 2015). Nastali  $H_2O_2$  se primarno uklanja aktivnošću dve grupe enzima. Peroksidaze (npr. glutation peroksidaza, *eng.* Glutathione peroxidase, GSH-Px i peroksiredoksini) razlažu  $H_2O_2$  koristeći ga za oksidaciju drugih supstrata. Sa druge strane, enzim katalaza (*eng.* Catalase, CAT) katalizuje direktnu dekompoziciju  $H_2O_2$  do vode i molekulskog kiseonika (Halliwell *i sar.*, 2015). Antioksidativna odbrana je odgovorna za uspostavljanje redoks homeostaze koja onemogućava nekontrolisanu propagaciju oksidativnih oštećenja biomolekula, održavajući homeostatski nivo reaktivnih vrsta. Detalji puteva produkcije i uklanjanja ROS u ćeliji su prikazani na Shemi 2.

Izmenjena redoks homeostaza je danas prepoznata kao fundamentalna karakteristika malignog fenotipa koja je delom odgovorna za inicijaciju maligne transformacije, progresiju i metastaze (Galadari *i sar.*, 2017). Plastičnost redoks homeostaze ogleda se u promenama bazalnih nivoa reaktivnih vrsta kiseonika i komponenti antioksidativne odbrane, ali i reprogramiranju mehanizama redoks regulacije i puteva redoks-senzitivne signalne transdukcije (Dawane, 2012). Alteracije u redoks homeostazi predstavljaju fiziološki odgovor na promene u metaboličkim zahtevima i tkivno remodeliranje (Glasauer *i sar.*, 2014). Povećana produkcija i povišeni bazalni

nivoi reaktivnih vrsta su česta odlika kancerskih ćelija koja je usko povezana sa uspostavljanjem fundamentalnih karakteristika malignog fenotipa kao što su rast i proliferacija, angiogeneza, autofagija, apoptoza i metastaze (Prasad *i sar.*, 2017). U zavisnosti od koncentracije, ROS iniciraju tumorogenezu indukcijom nestabilnosti nukleusnog i mitohondrijskog genoma putem mutacija (Tafani *i sar.*, 2016) ili epigenetičkih modifikacija (Ushijima, 2005) i posledičnom aktivacijom onkogena, odnosno inaktivacijom tumor supresora (Waris *i sar.*, 2006). ROS takođe aktiviraju signalne puteve koji omogućavaju proliferaciju kancerskih ćelija. Pod uticajem faktora rasta, ulaz u ćelijski ciklus otpočinje regulisanom i lokalizovanom enzimskom produkcijom  $O_2^{\cdot-}$ , nakon čega  $H_2O_2$  kao redoks sekundarni glasnik inaktivacijom, odnosno aktivacijom određenih signalnih puteva inicira propagaciju kroz ćelijski ciklus (Burhans *i sar.*, 2009). Slično, aktivacijom transkripcionih faktora ROS pospešuju preživljavanje, rast i proliferaciju kancerskih ćelija (Klaunig *i sar.*, 2010). Sa druge strane, izuzetno visoka produkcija ROS dovodi do oksidacije specifičnih cisteinskih rezidua i inaktivacije kinaza i transkripcionih faktora, čime se inhibira propagacija kroz ćelijski ciklus. Pored koncentracije, smatra se da i kompartmentalizacija produkcije ROS uslovljava pro-, odnosno antiproliferativne efekte (Cheung *i sar.*, 2016). ROS su takođe uključeni u preživljavanje, proliferaciju i migraciju endotelskih ćelija što doprinosi formiranju novih krvnih sudova u tumorskoj mikrosredini, odnosno angiogenezi (Ushio-Fukai *i sar.*, 2008). Pozitivna povratna sprega između faktora rasta, ROS i integrina je uključena u pokretanje signalne kaskade koja je neophodna za inicijaciju ćelijske invazije u okolna tkiva i metastaze putem regulacije citoskeletne dinamike, interakcije kancerskih ćelija sa ekstracelularnim matriksom i remodeliranja ekstracelularnog matriksa (Lee *i sar.*, 2013). ROS su takođe uključeni u regulaciju programirane ćelijske smrti, različitim mehanizmima inicirajući pro- (Wang *i sar.*, 2008) ili antiapoptotske (Madash *i sar.*, 2001) signalne puteve.

Uloga reaktivnih vrsta u malignoj transformaciji je kompleksna i zavisna kako od trenutnih energetskih potreba kancerskih ćelija tako i od selektivnih pritisaka poreklom iz tumorske mikrosredine. Povećani nivoi ROS doprinose inicijaciji i progresiji tumora, ali istovremeno čine kancerske ćelije osetljivim na indukciju oštećenja biomolekula i ćelijske smrti. Karakterizacija redoks homeostaze u kancerskim tkivima *in vivo*, u zavisnosti od stepena progresije i specifičnih metaboličkih adaptacija, neophodna je za definisanje terapijskih strategija koje se zasnivaju na modulaciji produkcije/eliminacije ROS ili stimulaciji/inhibiciji redoks signalizacije.





**Shema 2. Pojednostavljen prikaz puteva endogene produkcije i eliminacije reaktivnih vrsta kiseonika.** Osnovni endogeni izvori superoksid anjon radikala ( $O_2^{\bullet-}$ ) uključuju neenzimsku produkciju nepotpunom redukcijom molekuskog kiseonika ( $O_2$ ) u elektron transportnom lancu u mitohondrijama i enzimsku produkciju od strane NADPH oksidaza (NOX), ksantin oksidaza (XO), lipoksigenaza (LOX) i citohroma P450 (CYP). Široka distribucija enzimskih i neenzimskih komponenti antioksidativne odbrane koje su lokalizovane u membranama (hidrofobne) i citoplazmi (hidrofilne), kao i u različitim organelama doprinosi specifičnosti uklanjanja reaktivnih vrsta. Enzimi bakar, cink superoksid dismutaza (CuZnSOD) i mangan superoksid dismutaza (MnSOD) dismutacijom brzo prevode  $O_2^{\bullet-}$  iz citoplazme, odnosno mitohondrija do  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  u Fentonovoj reakciji sa jonima  $Fe^{2+}$  ili  $Cu^+$  daje visoko reaktivnu vrstu  $OH^{\bullet}$  koji neselektivno reaguje sa molekulskim targetima na mestu produkcije kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline.  $H_2O_2$  u prvom redu eliminiše enzim katalaza, prevodeći ga do vode ( $H_2O$ ). Takođe, specifični izoenzimi glutation peroksidaze (GSH-Px) kao što su GSH-Px1 i GSH-Px4 uklanjaju  $H_2O_2$  i lipidne perokside (LP), respektivno. Enzim glutation reduktaza (GR) regeneriše glutation (GSH) koristeći nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) kao redukciono sredstvo. U metabolizmu  $H_2O_2$  i reparaciji oksidativnih modifikacija proteina učestvuje i tioredoksin-peroksiredoksin sistem. Tioredoksini (TRX) i peroksiredoksini (PRX) su grupa proteina sa širokom ćelijskom distribucijom koji redukuju cisteinske rezidue na drugim proteinima uz istovremenu oksidaciju sopstvenih cisteinskih rezidua. Tioredoksini učestvuju u regeneraciji peroksiredoksina, dok enzim tioredoksin reduktaza (TR) regeneriše tioredoksine koristeći NADPH kao redukciono sredstvo. Antioksidativna odbrana u prvom redu održava fiziološke nivoe reaktivnih vrsta koje ostvaruju svoje intra- i ekstracelularne uloge u regulaciji vitalnih ćelijskih procesa putem aktivacije receptora i transkripcionih faktora poput Nrf2 (*eng.* Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2), FOXO (*eng.* Forkhead box protein O) i NF- $\kappa$ B (*eng.* Nuclear factor kappa B), odnosno putem modulacije aktivnosti enzima i protein-protein interakcija.

## 1.5. Redoks-senzitivno metaboličko reprogramiranje

Metaboličko reprogramiranje i visoka plastičnost redoks homeostaze su osnovne karakteristike malignog fenotipa. Metaboličko reprogramiranje omogućava proliferišućim kancerskim ćelijama da odgovore na energetske zahteve koje nameće intenzivna produkcija biomase (De Berardinis *i sar.*, 2016). U uslovima povišenih metaboličkih zahteva, povećana produkcija reaktivnih vrsta uslovljava kompenzatorno povećanje kapaciteta antioksidativne odbrane čime se uspostavlja nova redoks homeostaza (Wu *i sar.*, 2016). Metaboličko i redoks reprogramiranje predstavljaju dva nerazdvojna fenomena, gde se specifičnost malignog fenotipa ogleda upravo u kapacitetu kancerskih ćelija za reprogramiranjem metabolizma koji počiva na visokoj plastičnosti redoks homeostaze (Zhang *i sar.*, 2016). Održavanje povišenog bazalnog nivoa produkcije reaktivnih vrsta uz istovremenu zaštitu od oksidativnih oštećenja se ne zasniva samo na antioksidativnoj odbrani, već i na iniciranju metaboličkih adaptacija koje doprinose održavanju redoks homeostaze (Trachootham *i sar.*, 2009). Sa druge strane, ROS kao signalni molekuli i sekundarni glasnici direktno i indirektno utiču na protein-protein interakcije, aktivnost enzima i aktivaciju transkripcionih faktora, čime doprinose reprogramiranju metaboličkih i signalnih puteva (Hornsveld *i sar.*, 2016). Interakcije između ćelijskog metabolizma i redoks signalnih puteva na molekularskom nivou čine redoks-metaboličke regulatorne mreže, koje su u osnovi adaptivnog preživljavanja kancerskih ćelija u dinamičnim uslovima tumorske mikrosredine (Wang *i sar.*, 2019). Uopšteno, promene u oksidativnom metabolizmu, ćelijskoj respiraciji i aktivnosti metaboličkih enzima poput glicerol 3-fosfat dehidrogenaze (*eng.* Glycerol 3-phosphate dehydrogenase, GPDH) i piruvat dehidrogenaze (*eng.* Pyruvate dehydrogenase, PDH) dovode do promena u produkciji reaktivnih vrsta. Reaktivne vrste za uzvrat regulišu aktivnost metaboličkih enzima direktno, oksidacijom cisteinskih rezidua, ili indirektno, inicirajući signalne kaskade i aktivirajući transkripcione faktore. Aktivacija transkripcionih faktora pokreće promene u ekspresiji gena koji kodiraju druge redoks i metaboličke transkripcione faktore, enzime i komponente antioksidativne odbrane, čime se na širokoj skali reprogramira metabolizam u skladu sa energetskim zahtevima ćelije uz istovremeno održavanje redoks homeostaze (Kim *i sar.*, 2016). Iako je istraživanje redoks-metaboličkih regulatornih mreža još uvek u povoju, novi podaci o interakciji metaboličkih i redoks regulatornih puteva nedvosmisleno ukazuju da se integrisan odgovor nalazi u osnovi ćelijske adaptacije (Corkey *i sar.*, 2020). Reaktivnim vrstama indukovana aktivacija ključnih senzora energetskog metabolizma, kao i metabolitima indukovana aktivacija master regulatora redoks homeostaze ilustruje interakciju između redoks i metaboličkih regulatornih mreža, kao i važnost ispitivanja redoks-senzitivnog metaboličkog reprogramiranja u malignoj transformaciji.

### *AMPK je redoks-senzitivni regulator energetskog metabolizma*

AMP-aktivirana protein kinaza (*eng.* 5' AMP-activated protein kinase, AMPK) je evolutivno konzervirana serin/treonin kinaza i jedan je od najvažnijih metaboličkih senzora koji igra ulogu master regulatora energetskog metabolizma i redoks homeostaze. U uslovima nutritivnog stresa, predominantno deplecije glukoze, adenosin monofosfat (*eng.* Adenosine monophosphate, AMP) aktivira AMPK koja inhibira puteve sinteze lipida i sterola, glikogena, RNK i proteina, dok aktivira

katabolizam glukoze i lipida, restituišući nivo ATP (Lin *i sar.*, 2018). Nutritivni stres neminovno vodi redoks stresu kroz depleciju NADPH i glutationa i povećanu produkciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usled kompromitovanog pentozofosfatnog puta (Jeon *i sar.*, 2012). Pod ovakvim uslovima, AMP direktno i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direktno ili indirektno aktiviraju AMPK, koja pored restitucije nivoa ATP igra važnu ulogu u održavanju redoks homeostaze. Naime, AMPK inhibira sintezu i aktivira β-oksidaciju masnih kiselina (Ren *i sar.*, 2019). Takođe, aktivirana AMPK u uslovima povećane produkcije ROS reguliše ekspresiju gena za komponente antioksidativne odbrane aktivacijom transkripcionog koaktivatora PGC-1α (*eng.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) čime doprinosi koordinisanoj regulaciji redoks homeostaze i metabolizma mitohondrija (Chaube *i sar.*, 2015; Rabinovitch *i sar.*, 2017). Još jedan od mehanizama kojim AMPK doprinosi održavanju redoks homeostaze je pokretanje autofagije kojom specifično dolazi do degradacije represornog proteina KEAP1 (*eng.* Kelch-like ECH-associated protein 1) i posledične aktivacije transkripcionog faktora Nrf2 (*eng.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Endo *i sar.*, 2018), odnosno direktne fosforilacije i posledične aktivacije Nrf2 koji reguliše ekspresiju gena uključenih u antioksidativnu odbranu (Joo *i sar.*, 2016). Interesantno, u uslovima nutritivnog stresa, tioredoksin predstavlja esencijalni kofaktor koji redukcijom specifičnih cisteina omogućava aktivaciju AMPK, što je još jedan od primera redoks regulacije energetskog metabolizma (Shao *i sar.*, 2014). U skladu sa ulogom u inhibiciji anaboličkih puteva i propagacije kroz ćelijski ciklus AMPK ostvaruje antitumorske efekte, dok je njena uloga u održavanju redoks homeostaze i energetskog metabolizma kroz stimulaciju glikolize, pentozofosfatnog puta i β-oksidacije masnih kiselina povezana sa protumorskim efektima (Vara-Ciruelos *i sar.*, 2020). Još uvek nisu razjašnjeni mehanizmi dualne uloge AMPK u inicijaciji i progresiji karcinoma dojke.

### *Nrf2 je master integrator redoks-metaboličke regulacije*

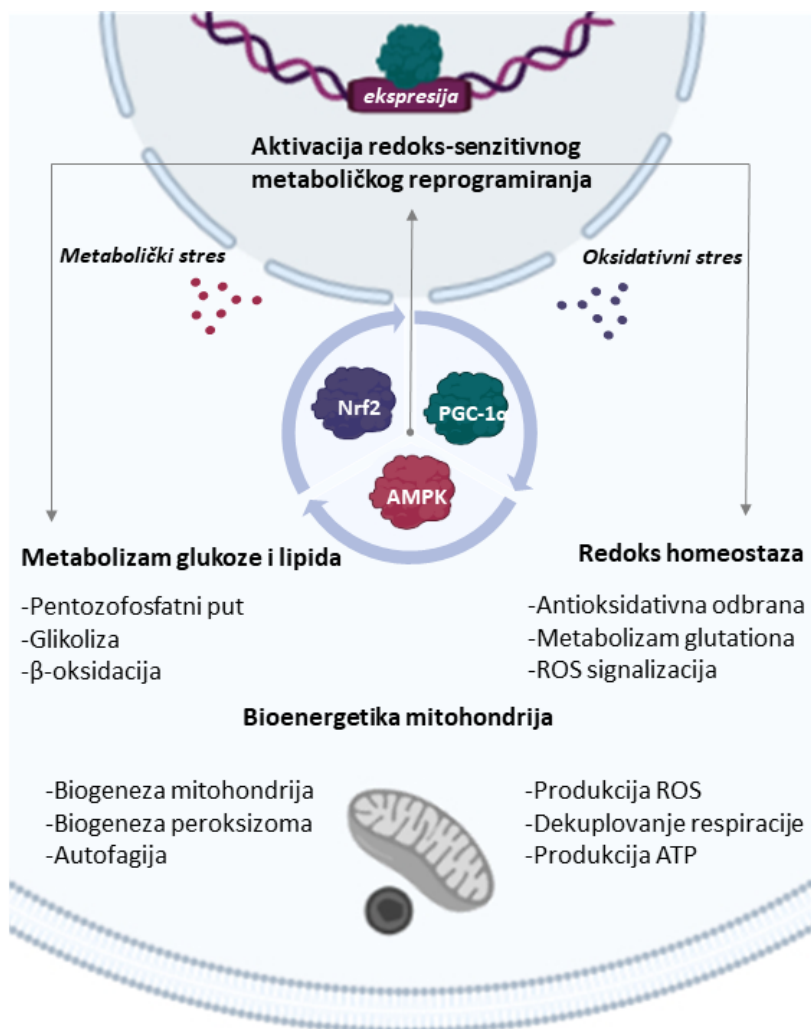
Nrf2 transkripcioni faktor je evolutivno konzerviran master regulator redoks homeostaze koji reguliše ekspresiju preko 200 gena uključenih u zaštitu od ćelijskog stresa, uključujući gene za komponente antioksidativne odbrane i faze II detoksikacije (Aliyev *i sar.*, 2021). Pored toga, Nrf2 reguliše ekspresiju gena uključenih u osnovne metaboličke puteve kao što su glikoliza, pentozofosfatni put, β-oksidacija masnih kiselina, Krebsov ciklus, sinteza nukleotida, glutationa i serina zbog čega se smatra jednim od glavnih integratora redoks-metaboličke homeostaze (Dinkova-Kostova *i sar.*, 2015; Smolková *i sar.*, 2020). U fiziološkim uslovima Nrf2 je u citoplazmi vezan za represorni protein KEAP1 koji dovodi do ubikvitinacije i proteazomalne degradacije kompleksa. U kanonskom putu aktivacije, u uslovima stresa sa oksidativnom, nitrozativnom ili elektrofilnom osnovom, cisteini na KEAP1 i Nrf2 bivaju oksidovani, čime se raskida Nrf2-KEAP1 kompleks i aktivira Nrf2, koji nakon translokacije u nukleus i dimerizacije sa partnerima transaktivacije reguliše ekspresiju gena vezujući se za ARE (*eng.* Antioxidant response element) sekvence (Ru *i sar.*, 2020). U kanceru, perzistentna aktivacija Nrf2 pospešuje rast, proliferaciju, metaboličko reprogramiranje, zaštitu od apoptoze, epitelno-mezenhimalnu tranziciju i terapijsku rezistenciju (Zhang *i sar.*, 2019; Almeida *i sar.*, 2020; Antonucci *i sar.*, 2020). Nrf2 može biti aktiviran i od strane onkometabolita, intermedijera Krebsovog ciklusa i glikolize kao što su fumarat (Ooi *i sar.*, 2011) i metilglioksal (Bollong *i sar.*, 2018). Pored toga

što je aktivacija Nrf2 senzitivna na promene u količini metabolita, aktivacija Nrf2 je u čvrstoj vezi sa aktivnošću glavnog metaboličkog senzora AMPK koja direktnom fosforilacijom aktivira Nrf2 (Joo *i sar.*, 2016; Walker *i sar.*, 2018). Pod određenim uslovima Nrf2 doprinosi Varburgovom efektu, stimulišući glikolizu i pentozofosfatni put i inhibirajući oksidaciju piruvata i metabolizam glutamina (Shin *i sar.*, 2017; Zhang *i sar.*, 2018). Pokazano je da aktivacija Nrf2 promovise indukciju AMPK-zavisnog glikolitičkog fenotipa stimulacijom ekspresije mangan superoksid dismutaze (*eng.* Manganese superoxide dismutase, MnSOD), što takođe podržava koncept koordinisanog redoks-metaboličkog reprogramiranja tokom progresije karcinoma dojke pod uticajem Nrf2 (Hart *i sar.*, 2016).

#### *PGC-1 $\alpha$ je redoks-senzitivni regulator metabolizma mitohondrija*

Transkripcioni koaktivator PGC-1 $\alpha$  je master regulator metaboličkih puteva uključenih u fiziologiju mitohondrija i redoks homeostazu (Villena, 2015; Andrzejewski *i sar.*, 2017). Kao koaktivator, PGC-1 $\alpha$  u interakciji sa preko 20 transkripcionih partnera reguliše biogenezu mitohondrija, lipidni metabolizam, oksidativnu fosforilaciju i antioksidativnu odbranu u odgovoru na metabolički i redoks stres (Mastropasqua *i sar.*, 2018). Nutritivni i oksidativni stres aktiviraju PGC-1 $\alpha$ , čija aktivacija sa jedne strane u invazivnim kancerskim ćelijama stimuliše oksidativnu fosforilaciju što vodi produkciji ROS (Lebleu *i sar.*, 2014; Bost *i sar.*, 2019), dok sa druge strane kompenzatorno aktivira ekspresiju gena za komponente antioksidativne odbrane (Aquilano *i sar.*, 2013). Pored uloge u regulaciji ćelijske respiracije, PGC-1 $\alpha$  u interakciji sa signalnim putevima energetskog metabolizma reguliše glikolizu, glutaminolizu i  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina (Vega *i sar.*, 2000). U skladu sa svojom metaboličkom ulogom, aktivnost PGC-1 $\alpha$  je fino regulisana od strane AMPK (Jäer *i sar.*, 2007). Sa druge strane, u pozitivnoj povratnoj sprezi interakcija između PGC-1 $\alpha$  i Nrf2 vodi međusobnoj aktivaciji i redoks-metaboličkoj integraciji koja je odgovorna za terapijsku rezistenciju u kanceru (Deng *i sar.*, 2020).

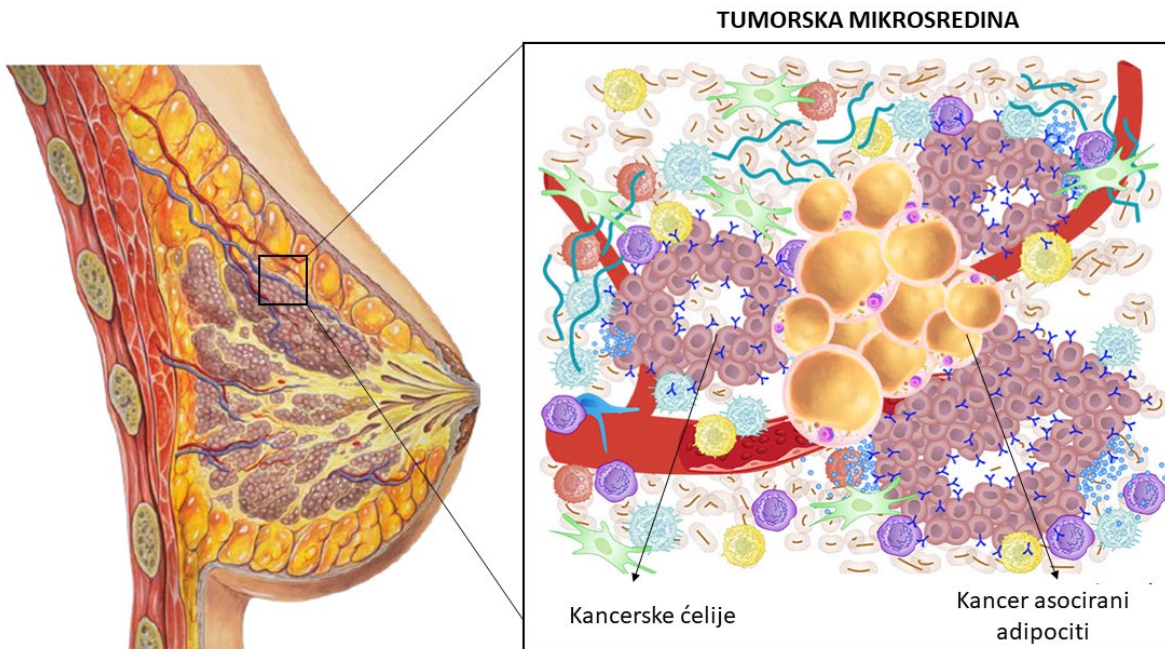
Opisani mehanizmi integracije redoks i metaboličkih regulatornih mreža ilustruju adaptivni kapacitet kancerskih ćelija za adekvatan odgovor na promenljive uslove koje nameće tumorska mikrosredina (Shema 3). Samo celovitom analizom redoks i metaboličkog reprogramiranja kao jedinstvenog fenomena, uzimajući u obzir kompleksnost koja postoji u tumorskim tkivima *in vivo* i uz razumevanje opšteg metaboličkog konteksta u kome dolazi do tumorogeneze, možemo početi da dešifrujemo ove molekulske mehanizme.



**Shema 3. Pojednostavljen prikaz interakcije ključnih regulatora energetskeg metabolizma i redoks homeostaze u aktivaciji redoks-senzitivnog metaboličkog reprogramiranja.** Visoki energetskegi zahtevi dovode do metaboličkog i redoks reprogramiranja koje omogućava kancerskim ćelijama rast, proliferaciju, migraciju i adaptacije na promjenljive selektivne pritiske poreklom iz tumorske mikrosredine. Alteracije u osnovnim metaboličkim putevima i redoks homeostazi uslovljavaju promene u koncentraciji (onko)metabolita i reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). Ovako nastao metabolički i oksidativni stres aktivira ključne senzore energetskeg metabolizma i redoks homeostaze poput AMPK (*eng.* AMP-activated protein kinase), transkripcionog koaktivatora PGC-1α (*eng.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) i transkripcionog faktora Nrf2 (*eng.* Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2). Samostalno ili nakon međusobne interakcije i aktivacije AMPK, PGC-1α i Nrf2 dovode do promena u aktivnosti enzima i ekspresiji gena čime se uspostavlja nova energetska i redoks homeostaza kroz uravnoteženu propagaciju kataboličkih puteva glikolize, pentozofosfatnog puta i β-oksidacije masnih kiselina uz istovremenu regulaciju antioksidativne odbrane, metabolizma ROS i sinteze glutationa.

## 1.6. Karcinom dojke se razvija u kompleksnoj tumorskoj mikrosredini

U karcinomu dojke, fiziologija i ponašanje maligno transformisanih ćelija su uslovljeni interakcijama sa tumorskom mikrosredinom (Mueller *i sar.*, 2004). U solidnim tumorima, kancerske ćelije koegzistiraju sa različitim vrstama stromalnih ćelija unutar dinamične tkivne mikrosredine sa specifičnim sastavom raznorodnih solubilnih faktora i specifično organizovanim ekstracelularnim matriksom, čineći permisivnu nišu za uspostavljanje, održavanje i propagaciju malignog fenotipa (Shema 4) (Liotta *i sar.*, 2001). U ovakvim uslovima, kancerske ćelije su pod konstantnim selektivnim pritiscima koji potiču iz tumorske mikrosredine kao što su varijabilne koncentracije kiseonika, količina i vrsta dostupnih nutrijenata, akumulacija produkata metabolizma i varijacije u sredinskom pH (Li *i sar.*, 2020). Stoga, kancerske ćelije u odgovoru na unutrašnje i spoljašnje signale pokreću adaptivne mehanizme koji su u osnovi ranije pomenutih karakteristika malignog fenotipa kao što su metaboličko i redoks reprogramiranje (Faubert *i sar.*, 2020). Rezultat metaboličkog reprogramiranja u varijabilnim uslovima sredine je metabolička heterogenost kancerskih ćelija (Egeblad *i sar.*, 2010) koja potiče od diferencijalnih bioenergetskih i biosintetskih adaptacija duž koncentracionih gradijenata kiseonika, nutrijenata, metabolita i pH (Gouirand *i sar.*, 2018). Sledeći nivo kompleksnosti potiče od heterogene komunikacije između kancerskih ćelija i komponenti njihove mikrosredine. Fibroblasti, imunske ćelije (limfociti, makrofagi, dendritične ćelije, ćelije prirodne ubice), endotelne ćelije, periciti, mast ćelije i adipociti su najčešći ćelijski konstituenti tumorske mikrosredine sa kojima kancerske ćelije koevoluiraju kroz dvosmernu komunikaciju i uzajamno metaboličko reprogramiranje (Lyssiotis *i sar.*, 2017). U osnovi metaboličke simbioze između kancerskih ćelija iz različitih tumorskih kompartmenata i njima pridruženih stromalnih ćelija stoji dvosmerna razmena metaboličkih supstrata i produkata, signalnih onkometabolita i redoks aktivnih jedinjenja i sekundarnih glasnika (Dias *i sar.*, 2019). Raznovrsnost signala i metaboličkih supstrata poreklom iz stromalnih ćelija doprinosi kapacitetu kancerskih ćelija za metaboličku plastičnost u kontekstu diferencijalnog reprogramiranja metabolizma glukoze, aminokiselina i masnih kiselina. Ovako nastala metabolička heterogenost je ključna za odabir i naseljavanje distinktnih sekundarnih niša u procesu metastaze (Schild *i sar.*, 2018).



**Shema 4. Pojednostavljen prikaz kompleksne tumorske mikrosredine u kojoj se razvija karcinom dojke.** Stromalne ćelije (fibroblasti, imunske ćelije, endotelske ćelije, periciti, mast ćelije i adipociti), komponente ekstracelularnog matriksa i solubilni faktori čine tumorsku mikrosredinu i zajedničkim delovanjem uspostavljaju permisivnu nišu za razvoj malignog fenotipa. U skladu sa histološkom građom dojke, adipociti predstavljaju glavni ćelijski konstituent tumorske mikrosredine u karcinomu dojke i nazivaju se kancer asocirani adipociti. Sekretijom hormona, faktora rasta, adipokina, proinflatornih citokina, metaboličkih supstrata, reaktivnih vrsta i redoks sekundarnih glasnika adipociti doprinose preživljavanju, proliferaciji, migraciji i terapijskoj rezistenciji kancerskih ćelija dojke.

### 1.7. Ključni konstituent tumorske mikrosredine: masno tkivo dojke

Kao ćelijskoj komponenti tumorske mikrosredine, adipocitima je posvećeno relativno malo pažnje, iako je dobro poznato da se nekolicina malignih oboljenja, kao što su karcinom dojke i prostate, prirodno razvija u tkivnoj mikrosredini u kojoj su kancerske ćelije u bliskom kontaktu sa adipocitima. Pored toga, adipociti su deo tkivne mikrosredine u preferiranim metastatskim nišama za kancer dojke kao što su limfni čvorovi i kostna srž. Adipociti su metabolički i endokrino aktivne ćelije koje pored ključne uloge u održavanju metabolizma lipida i glukoze na sistemskom nivou (Sethi *i sar.*, 2007) aktivno sekretuju signalne molekule koji se nazivaju adipokini i uključuju hormone, faktore rasta, hemokine i proinflatorne citokine (Ouchi *i sar.*, 2011). Pored toga, morfofunkcionalna plastičnost masnog tkiva, u odgovoru na sistemske i lokalne energetske zahteve čini masno tkivo odličnim kandidatom za uspostavljanje permisivne mikrosredine za tumorogenezu. Pokazano je da kancerske ćelije i adipociti uspostavljaju kanale bidirekcionne komunikacije, dok su izmenjeni adipociti koji nastaju kao rezultat uzajamne interakcije nazvani kancer asocirani adipociti (Muller, 2013).

Prve opisane karakteristike kancer asociranih adipocita se odnose na promene u morfologiji, parakrinoj i lipolitičkoj aktivnosti. Ove fenotipske i funkcionalne promene uključuju smanjenje lipidnog sadržaja i ekspresije markera zrelih adipocita, kao i povećanje ekspresije inflamatornih citokina i proteaza (Dirat *i sar.*, 2011). Sa fenotipskog aspekta, adipociti manjeg dijametra su uočeni na invazivnom frontu tumora u poređenju sa adipocitima koji su udaljeni od tumorske mase (Nieman *i sar.*, 2011), dok su u centru tumorske mase uočene ćelije koje nalikuju fibroblastima i potencijalno predstavljaju dediferencirane adipocite (Tan *i sar.*, 2011). Sa funkcionalnog aspekta, delipidacija praćena smanjenjem ekspresije markera zrelih adipocita, kao što su vezujući protein masnih kiselina 4 (*eng.* Fatty acid-binding protein 4, FABP4), adiponektin i hormon senzitivna lipaza (*eng.* Hormone-sensitive lipase, HSL), kao i promene u sekretomu adipocita poput povećane sekrecije osteoponina, matriksnih metaloproteinaza (*eng.* Matrix metalloproteinases, MMPs), faktora nekroze tumora  $\alpha$  (*eng.* Tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), interleukina 6 (IL-6) i interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), su definisane kao karakteristike aktiviranog fenotipa kancer asociranih adipocita (Duong *i sar.*, 2017). Ovakve promene u karakteristikama adipocita koje su posledica bidirekcionne komunikacije između adipocita i kancerskih ćelija ultimativno vode ka agresivnijem fenotipu kancerskih ćelija i progresiji kancera. Uticaj adipocita na vijabilnost kancerskih ćelija je evidentan na svim nivoima, od makroskopskog do molekulskog. Naime, kancerske ćelije dojke pokazuju višu stopu proliferacije u ortotopskim modelima kancera dojke, gde se kancerske ćelije injektiraju direktno u mlečnu žlezdu, u poređenju sa subkutananim modelima, gde se tumor razvija potkožno, izvan svoje prirodne mikrosredine (Elliott *i sar.*, 1992; Manabe *i sar.*, 2003). Takođe, prisustvo adipocita je dovedeno u vezu ne samo sa proliferacijom već i sa invazivnim i metastatskim potencijalom (Dirat *i sar.*, 2011), kao i terapijskom rezistencijom (De Angel *i sar.*, 2013; Park *i sar.*, 2013; Duong *i sar.*, 2015).

Kompleksni uticaji adipocita na ponašanje kancerskih ćelija počivaju na nekolicini različitih, ali međusobno povezanih i sinhronizovanih mehanizama. Uticaj adipokina i faktora rasta poreklom iz adipocita je relativno dobro opisan i pokazano je da leptin (Zheng *i sar.*, 2011) i rezistin (Deshmukh *i sar.*, 2015) promovišu, dok adiponektin (Dieudonne *i sar.*, 2006) inhibira rast i proliferaciju kancerskih ćelija. Slično, faktori rasta, hormoni i proinflamatorni citokini koje sekretuju adipociti su dovedeni u vezu sa povećanom proliferacijom, invazivnim i metastatskim potencijalom kancerskih ćelija (Duong *i sar.*, 2017). Pored direktnog efekta na ćelijsku proliferaciju i progresiju tumora, kancer asocirani adipociti su dovedeni u vezu sa serijom indirektnih efekata na tumorsku mikrosredinu koji doprinose progresiji karcinoma dojke kao što su angiogeneza (Gonzalez-Perez *i sar.*, 2010) i remodeliranje ekstracelularnog matriksa (Andarawewa *i sar.*, 2005; Park *i sar.*, 2012). Takođe, adipociti iz udaljenih tkiva poput limfnih čvorova ili kostne srži sekrecijom hemokina usmeravanju migraciju kancerskih ćelija, čime doprinose formiranju metastaza (Templeton *i sar.*, 2015).

Novija istraživanja se okreću ispitivanju još jednog od mehanizama u osnovi interakcije kancerskih ćelija i adipocita koji može biti od izuzetnog značaja za uspostavljanje permisivne mikrosredine za razvoj i progresiju karcinoma dojke, a to je metabolička kooperacija. Iako je koncept metaboličke kooperacije koja se razvija simultano sa metaboličkim reprogramiranjem kancerskih ćelija i adipocita tek u povelju, ovo polje istraživanja je vrlo značajano za razumevanje ne samo uloge adipocita u razvoju kancera već i mehanizama odgovornih za neoplastičnu



transformaciju unutar kompleksne tumorske mikrosredine. Naime, pored adipokina i drugih sekretornih faktora, adipociti predstavljaju bogat i dinamičan izvor raznovrsnih metaboličkih supstrata. Tako, kancerske ćelije indukuju lipolizu u kancer asociranim adipocitima, nakon čeka preuzimaju slobodne masne kiseline, a zatim ih skladište u lipidnim telima (Wang *i sar.*, 2017) ili koriste kao supstrat za  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, što doprinosi proliferaciji i migraciji kancerskih ćelija (Balaban *i sar.*, 2017). Mehanizmi metaboličke kooperacije između kancerskih ćelija i adipocita su mahom nepoznati, posebno oni koji su aktivni *in vivo* i koji se odnose na druge aspekte fiziologije adipocita kao što su metabolizam glukoze, gliceroneogeneza i redoks homeostaza.

Uloga redoks regulacije u funkcionalnoj transformaciji adipocita u kancer asocirane adipocite je potpuno novo polje istraživanja. Esencijalni aspekti jedinstvene morfofunkcionalne plastičnosti masnog tkiva su redoks senzitivni. Adipogeneza, transdiferencijacija, lipoliza i sekretorna aktivnost adipocita su podržani redoks zavisnim alteracijama u homeostazi glukoze i lipida, oksidativnom metabolizmu i antioksidativnoj odbrani (Jankovic *i sar.*, 2014, 2015; Li *i sar.*, 2020). Ipak, mehanizmi uključeni u redoks i metaboličko reprogramiranje adipocita kao i uloga ovih procesa u progresiji kancera su mahom nepoznati. Naši prethodno objavljeni rezultati ističu da je uspostavljanje nove redoks homeostaze, orkestrirano od strane master regulatora redoks homeostaze Nrf2, deo redoks reprogramiranja adipocita u procesu postizanja aktiviranog fenotipa (Kalezic *i sar.*, 2021). Pored toga, simultane promene u antioksidativnoj odbrani u malignom tumorskom tkivu i njemu asociranom masnom tkivu otvaraju pitanje redoks-senzitivne kooperacije između kancerskih ćelija i adipocita kao jednog od mehanizama metaboličke kooperacije (Kalezic *i sar.*, 2021).

## **1.8. Sistemski i lokalni uticaj gojaznosti na tumorsku mikrosredinu u karcinomu dojke**

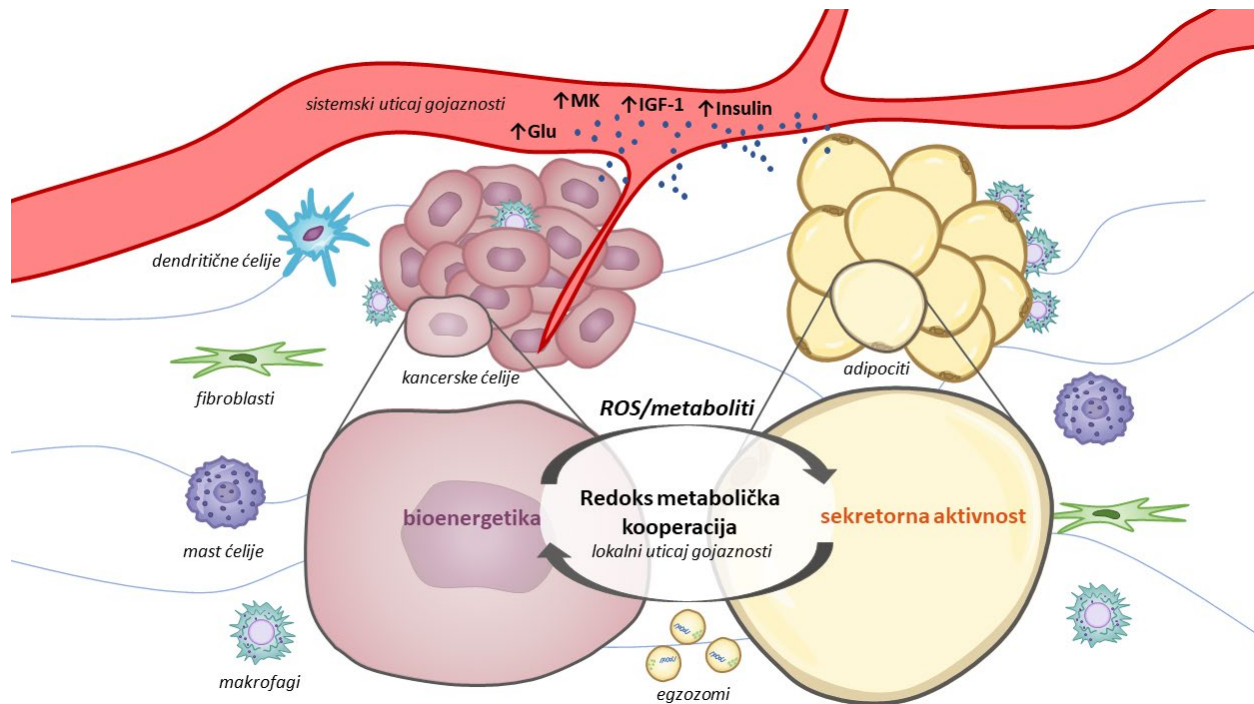
Incidence gojaznosti i karcinoma dojke kod mladih žena su u konstantnom porastu, dok se podaci koji dovode gojaznost u vezu sa lošijom prognozom bolesti akumuliraju (Zimta *i sar.*, 2019). Nasuprot ovakvim zabrinjavajućim trendovima veoma malo se zna o podležućim mehanizmima u osnovi veze između gojaznosti i progresije karcinoma dojke kod premenopauzalnih žena. Uopšteno govoreći, uticaj gojaznosti na razvoj i progresiju karcinoma dojke se može posmatrati na sistemskom i lokalnom nivou, pri čemu se uticaj sistemskih alteracija koje nastaju u gojaznosti može podeliti u dve grupe: direktan uticaj gojaznosti na kancerske ćelije i uticaj gojaznosti na tumorsku mikrosredinu koji indirektno doprinosi razvoju i progresiji neoplastične transformacije. U kanceru dojke, specifično, postoji još jedan nivo kompleksnosti koji potiče od činjenice da je izmenjena funkcija masnog tkiva u gojaznosti istovremeno uzrok sistemskih alteracija kao i da adipociti izmenjene fiziologije čine ključnu komponentu tumorske mikrosredine (Shema 5).

Narušena ravnoteža između kalorijskog unosa i potrošnje u korist hroničnog prekomernog kalorijskog unosa rezultuje kompenzatornim promenama u masnom tkivu koje uključuju hipertrofiju i delimično hiperplaziju adipocita u prvom redu, nakon čega dolazi do ekstenzivnih promena u fiziologiji masnog tkiva usled glukotoksičnosti i lipotoksičnosti i konačno ektopične

depozicije lipida u drugim tkivima kada su svi homeostatski kapaciteti masnog tkiva prevaziđeni (Korac *i sar.*, 2021). Izmenjena funkcija masnog tkiva u gojaznosti dovodi do sistemskih alteracija koje se mogu dovesti u direktnu vezu sa malignim oboljenjima. Ovakve sistemske alteracije uključuju promene u koncentracijama metabolita, hormona, adipokina i inflamatornih medijatora u cirkulaciji. Hiperinsulinemija i posledična insulinska rezistencija su neke od najčešćih posledica gojaznosti koje su povezane sa lošijom prognozom karcinoma dojke (Goodwin *i sar.*, 2002), dok je pokazano da insulin, kao i insulinom stimulirana sinteza insulinu sličnog faktora rasta 1, doprinosi proliferaciji kancerskih ćelija dojke (Christopoulos *i sar.*, 2015). Ovi mehanizmi su posebno značajni u hormon zavisnom karcinomu dojke, budući da insulin i insulinu sličan faktor rasta 1 interaguju sa estrogenskom signalizacijom kroz povećanje aktivnosti aromataze u adipocitima i posledično povećanje nivoa estrogena u cirkulaciji (Key *i sar.*, 2003). Ovaj mehanizam je od značaja kod postmenopauzalnih žena budući da se sinteza estrogena nakon menopauze dominantno odvija u masnom tkivu (Wang *i sar.*, 2015). Estrogenska signalizacija doprinosi progresiji karcinoma dojke putem nekoliko kompleksnih mehanizama koji uključuju genotoksičnost, stimulaciju proliferacije, angiogeneze i inhibiciju apoptoze (Yager *i sar.*, 2006; Péqueux *i sar.*, 2012). Simultano sa hiperinsulinemijom, stimulirana lipoliza u masnom tkivu vodi povećanoj koncentraciji slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji, a slobodne masne kiseline (Balaban *i sar.*, 2017) i FABP4 (Hao *i sar.*, 2018) doprinose rastu i agresivnosti kancerskih ćelija dojke. Funkcionalna karakteristika gojaznosti i disfunkcije masnog tkiva je i izmenjeni sekretorni profil adipocita koji podrazumeva smanjenu sekreciju adiponektina i povećanu sekreciju leptina, dok je ovako izmenjen odnos ključnih adipokina povezan sa neoplastičnom transformacijom (Gui *i sar.*, 2017). Adiponektin se smatra protektivnim faktorom u tumorogenezi, budući da je *in vitro* pokazan inhibični efekat adiponektina na proliferaciju kancerskih ćelija dojke (Grossmann *i sar.*, 2008). Sa druge strane, epidemiološke studije su pokazale da povećani nivoi adiponektina smanjuju rizik od postmenopauzalnog, ali ne i od premenopauzalnog karcinoma dojke (Ye *i sar.*, 2014). Uloga leptina u razvoju karcinoma dojke je dobro opisana. Sa jedne strane *in vitro* studije su pokazale proliferativni efekat leptina na kancerske ćelije (Liang *i sar.*, 2018), dok epidemiološke studije pokazuju korelaciju nivoa leptina sa rizikom od nastanka karcinoma dojke, posebno kod gojaznih postmenopauzalnih žena (Pan *i sar.*, 2018). Još jedan od mehanizama koji može objasniti vezu između karcinoma dojke i gojaznosti je sistemska i lokalizovana inflamacija u masnom tkivu. Gojazne osobe često imaju povišene cirkulatorne nivoe proinflamatornih medijatora koji su povezani sa neoplastičnom transformacijom i progresijom kancera (Hursting *i sar.*, 2012; Morris *i sar.*, 2013).

Na lokalnom nivou, izmenjena funkcija rezidentnih adipocita u bliskom kontaktu sa kancerskim ćelijama doprinosi stimulaciji već postojećih mehanizama kooperacije koji ultimativno vode intenzivnoj progresiji kancera. Stimulirana sekrecija faktora rasta, adipokina, proinflamatornih citokina, matriksnih metaloproteinaza, masnih kiselina, glicerola i ketonskih tela su samo neki od mehanizama putem kojih adipociti u gojaznosti mogu doprineti metaboličkom reprogramiranju i posledično proliferaciji, migraciji i terapijskoj rezistenciji kancerskih ćelija (Duong *i sar.*, 2017). Takođe, izmenjena redoks homeostaza masnog tkiva u gojaznosti kroz povećanu produkciju reaktivnih vrsta, narušenu antioksidativnu odbranu i izmenjenu sekreciju redoks aktivnih sekundarnih glasnika može promeniti sastav tumorske mikrosredine i izmeniti karakter kooperacije između kancerskih ćelija i adipocita (Korac *i sar.*, 2021). Konkretni

metabolički i redoks profili masnog tkiva dojke, kao i mehanizmi kojima izmenjen metabolizam glukoze i masnih kiselina sa alteracijama u redoks homeostazi doprinosi tumorogenezi i progresiji premenopausalnog karcinoma dojke u gojznosti su mahom nepoznati.



**Shema 5. Pojednostavljen prikaz redoks-metaboličke kooperacije između kancerskih ćelija i adipocita u odgovoru na sistemske i lokalne uticaje gojznosti koji oblikuju tumorsku mikrosredinu.** Sistemske nivo cirkulatornih parametara poput glukoze (Glu), masnih kiselina (MK), insulina i insulinu sličnog faktora rasta 1 (*eng.* Insulin-like growth factor 1, IGF-1) oblikuje tumorsku sredinu direktnim uticajem na metabolizam kancerskih ćelija, odnosno indirektnim uticajem na metabolizam adipocita. U gojznosti, hronično povišeni nivoi pomenutih cirkulatornih parametara dovode do promena u morfofunkcionalnoj plastičnosti adipocita i posledično do promena u sekreciji i lokalnim nivoima piruvata, laktata, glicerola, ketonskih tela i masnih kiselina. U odgovoru na vrstu i dostupnost nutrijenata u ekstracelularnoj sredini dolazi do adaptivnog metaboličkog reprogramiranja koje diktira kako bioenergetsku strategiju kancerskih ćelija tako i strategiju metaboličke kooperacije između kancerskih ćelija i adipocita. Uporedo sa metaboličkim reprogramiranjem, uspostavljanje nove redoks homeostaze je fundamentalna karakteristika malignog fenotipa, koja posebno može biti značajna u gojznosti, gde se izmenjena funkcija adipocita zasniva na redoks-senzitivnim alteracijama u metabolizmu glukoze i masnih kiselina. Adaptirano iz (Korac *i sar.*, 2021).

## 2. CILJEVI

Brojne bolesti posmatramo kao sindrome čiji su uzroci i manifestacije multifaktorijalni i gotovo uvek praćeni promenama u redoks homeostazi i metabolizmu. Tako je i sa kancerom koji danas smatramo metaboličkim, sistemskim oboljenjem koje koristi milionima godina evolutivno razvijane molekulske mehanizme redoks i metaboličkog reprogramiranja za nastanak i opstanak.

U ovoj doktorskoj disertaciji se ispituje aspekt redoks-metaboličkog reprogramiranja u karcinomu dojke premenopauzalnih žena u parnim biopsijama tumorskog i asociranog masnog tkiva dojke koje predstavlja dominantnu mikrosredinu za njegov razvoj, posmatrajući ova dva tkiva i njihovu komunikaciju kao kompleksan pseudo-organ. Budući da epidemiološke i molekularno-biološke studije ukazuju na čvrstu vezu između karcinoma dojke i gojaznosti, a da su molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi ovog fenomena mahom nepoznati, u istraživanje je uključen i ovaj faktor.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje redoks i metaboličkog reprogramiranja tumorskog i asociranog masnog tkiva dojke *in vivo* kod normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim tumorom dojke tipa fibroadenom, odnosno malignim tumorom dojke tipa invazivni duktalni karcinom (luminalni tip A, ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>).

Stoga, specifični ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Karakterizacija redoks i metaboličkog profila tumorskog i masnog tkiva dojke;
- Identifikacija i funkcijski aspekt ključnih metabolita i metaboličkih puteva koji mogu biti odgovorni za razvoj malignog fenotipa;
- Karakterizacija transkripcionih i redoks-metaboličkih regulatornih faktora odgovornih za reprogramiranje tumorskog i masnog tkiva;
- Ispitivanje koordinacije redoks i metaboličkog odgovora kancerskih ćelija i njima pridruženih adipocita na ćelijskom nivou.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Eksperimentalni dizajn - selekcija pacijentkinja i prikupljanje uzoraka

Premenopauzalne žene sa tumorom dojke su na osnovu maligniteta (patohistološkog nalaza) i stepena uhranjenosti podeljene u četiri grupe: 1. normalno uhranjene sa benignim tumorom, 2. gojazne sa benignim tumorom, 3. normalno uhranjene sa malignim tumorom i 4. gojazne sa malignim tumorom dojke. Sa aspekta maligniteta, za studiju su odabrane pacijentkinje sa luminalnim tipom A (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>) invazivnog dukalnog karcinoma dojke, dok su žene sa benignim tumorima tipa fibroadenoma služile kao kontrole. Kao kriterijum za stepen uhranjenosti korišćen je indeks telesne mase (*eng.* Body mass index, BMI) izračunat kao odnos telesne mase u kilogramima i kvadrata visine u metrima. Žene sa vrednošću BMI <25 kg/m<sup>2</sup> smatrane su normalno uhranjenim, a žene sa BMI ≥25 kg/m<sup>2</sup> prekomerno uhranjenim i gojaznim. Od svih pacijentkinja su prilikom rutinskih operativnih zahvata pod balansiranom opštom anestezijom uzete parne biopsije tumorskog i masnog tkiva dojke. Tom prilikom, jedan deo uzorka je fiksiran za mikroskopske analize, dok je drugi deo uzorka zaleđen na -80 °C za izolaciju i analizu DNK, RNK i proteina. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Instituta za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica, broj: 4/19/1-1486/2-13.

#### 3.2. Priprema uzoraka za analize

##### 3.2.1. Priprema tkiva za određivanje enzimske aktivnosti

Uzorci tkiva dobijeni parnom biopsijom tumorskog i masnog tkiva dojke su prvo izmereni, a zatim macerirani na ledu. Uzorci su zatim homogenizovani na ledu u saharoznom puferu (0,25 M saharoza, 0,05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4), tri puta po deset sekundi, sa po deset sekundi pauze u električnom homogenizeru (Heidolph DIAX 600). Nakon toga, uzorci su sonifikovani na ledu pri jačini od 10 kHz, tri puta po petnaest sekundi, sa po deset sekundi pauze. Tako dobijeni sonifikat je centrifugiran na ultracentrifugi (Beckam), 90 min. na 38000 g na 4 °C. U supernatantima dobijenim nakon centrifugiranja je određivana enzimska aktivnost.

##### 3.2.2. Priprema tkiva za Western blot i PCR analize

Za sekvencijalnu izolaciju DNK, RNK i proteina iz uzoraka tumorskog i masnog tkiva dojke dobijenih parnom biopsijom korišćen je modifikovani protokol (Chomczynski i Sacchi, 1987) od strane proizvođača TRIzol™ reagensa (Invitrogen). Ukratko, u sterilnim uslovima, 100 mg tkiva je macerirano na ledu i homogenizovano u ručnom staklenom homogenizeru u 1 mL TRIzol™ reagensa. Nakon 5 min. inkubacije na sobnoj temperaturi, na 1 mL TRIzol™ reagensa, dodato je 0,2 mL hloroforma, inkubirano 3 min. i centrifugirano 15 min. na 12000 g na 4 °C. Gornja, vodena faza koja sadrži RNK je alikvotirana u novu sterilnu ependorficu, dok su interfaza i donja organska faza dalje korišćene za izolaciju DNK i proteina. Za dalju izolaciju RNK u gornju vodenu fazu je dodato 0,5 mL izopropanola, inkubirano 10 minuta i centrifugirano 10 min. na 12000 g na 4 °C.

RNK precipitira kao talog nakon centrifugiranja; supernatant je odliven, a talog RNK je reprecipitiran 75% etanolom. 1 mL 75% etanola je dodat u talog RNK, uzorak je kratko vorteksovan, a zatim centrifugiran 5 min. na 7500 g na 4 °C. Supernatant je odbačen, talog RNK je kratko prosušen na vazduhu, a zatim rastvoren u sterilnoj vodi za PCR. Ovako dobijeni uzorci RNK su čuvani na -80 °C. Za dalju izolaciju DNK u donju organsku fazu dodato je 0,3 mL 100% etanola, inkubirano 3 min., a zatim centrifugirano 5 min. na 2000 g na 4 °C. Nakon centrifugiranja, DNK se nalazi u talogu, a supernatant je alikvotiran u novu sterilnu ependorficu za dalju izolaciju proteina. Talog DNK je ispran sa 1 mL 0,1 M natrijum citrata u 10% etanolu, pH 8,5, a zatim centrifugiran 5 min. na 2000 g na 4 °C, nakon 30 min. inkubacije na sobnoj temperaturi. Ovaj korak ispiranja je ponovljen dva puta. Dobijeni talog je resuspendovan u 2 mL 75% etanola, inkubiran 20 min., a zatim centrifugiran 5 min. na 2000 g na 4 °C. Talog DNK je osušen i resuspendovan u 0,3 mL 8 mM NaOH puferisanog sa HEPES puferom do željene pH. Ovako dobijeni uzorci DNK čuvani su na -80 °C. Za dalju izolaciju proteina u preostali fenol-etanolni supernatant dodato je 1,5 mL izopropanola, inkubirano 10 min., a zatim centrifugirano 10 min. na 12000 g na 4 °C. Dobijeni talog proteina je dva puta ispran sa 2 mL 0,3 M guanidin hidrohlorida u 95% etanolu, a zatim centrifugiran 5 min. na 7500 g na 4 °C. Supernatant je odbačen, a talog je ispran 100% etanolom, vorteksovan, inkubiran 20 min. na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugiran 5 min. na 7500 g na 4 °C. Supernatant je odbačen, talog kratko osušen na vazduhu, a zatim resuspendovan u 1% SDS i sonifikovan pri jačini od 10 kHz do potpune solubilizacije proteina. Ovako dobijeni uzorci proteina čuvani su na -20 °C za analizu proteinske ekspresije Western blot metodom.

### 3.2.3. Priprema tkiva za svetlosnu i konfokalnu mikroskopiju

Preostali deo tkiva koji nije korišćen za izolaciju proteina, DNK i RNK je fiksiran u 4% paraformaldehidu u fosfatnom puferu, pH 7,4. Nakon fiksiranja, uzorci su isprani u česmenkoj vodi preko noći, a zatim dehidratirani kroz seriju etanola rastuće koncentracije. Nakon dehidratacije, uzorci su prosvetljeni u ksilolu i ukalupljeni u parafin. Ukalupljeni uzorci tkiva su naknadno sečeni na rotacionom mikrotomu (Reichert) na preseke odgovarajuće debljine, a zatim preneti na mikroskopske pločice (Thermo Fisher Scientific).

## 3.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina iz uzoraka tumorskog i masnog tkiva dojke pripremljenih u saharoznom puferu i u TRIzol™ reagensu određena je spektrofotometrijski po metodi Lowry *i sar.* (1951). Metoda se zasniva na Biuret reakciji u kojoj peptidne veze iz proteina reaguju sa bakrom u alkalnoj sredini. Tako nastali jon  $\text{Cu}^+$  reaguje sa Folinovim reagensom u Folin–Ciocalteu reakciji koja se u osnovi zasniva na redukciji fosfomolibdotungstenata do heteropolimolibdenum plavog, zahvaljujući bakrom katalizovanoj oksidaciji aromatičnih aminokiselina. Rezultat ovih reakcija je plavo obojeni kompleks sa maksimumom apsorpcije na 500 nm talasne dužine, dok je intenzitet boje proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku, tačnije zastupljenosti aromatičnih aminokiselina u ukupnim proteinima. Koncentracija proteina u ispitivanim uzorcima očitava se iz

linearnog opsega standardne krive, konstruisane merenjem apsorbance rastvora albumina rastućih i poznatih koncentracija. Metoda ima senzitivnost od 0,01 mg/mL proteina, a koncentracija ukupnih proteina se izražava u mg/mL.

### 3.4. Određivanje koncentracije RNK i DNK

U uzorcima dobijenim sekvencijalnom izolacijom TRIzol™ reagensom, koncentracija RNK i DNK je određena spektrofotometrijski u UV spektru na spektrofotometru sa ksenonskom lampom (Biophotometer, Eppendorf). Za određivanje koncentracije RNK apsorbancija je snimljena na 260 nm, a koncentracija je izračunata kao  $A_{260} \times \text{dilucija} \times 40 = \mu\text{g RNK/mL}$ . Odnos apsorbanci na 260 nm i 280 nm je korišćen za određivanje čistoće RNK. Odnos  $A_{260}/A_{280} \sim 2$  je smatran za odgovarajuću čistoću izolata RNK. Za određivanje koncentracije DNK apsorbancija je snimljena na 260 nm, a koncentracija je izračunata kao  $A_{260} \times \text{dilucija} \times 50 = \mu\text{g DNK/mL}$ . Odnos apsorbanci na 260 nm i 280 nm je korišćen za određivanje čistoće DNK. Odnos  $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$  je smatran za odgovarajuću čistoću izolata DNK.

### 3.5. SDS-PAGE i Western blot

#### 3.5.1. Elektroforeza proteina

Proteini su razdvajani po molekulskim masama natrijum-dodecil sulfat (*eng.* sodium dodecyl sulfate, SDS) - poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) u Mini-Protean III sistemu (BioRad). Korišćeni gelovi za razdvajanje proteina su bili različite koncentracije akrilamida (AA), zavisno od molekulske mase ciljnog proteina, dok su gelovi za koncentrovanje uvek bili 5% (5% AA, 0,1% SDS, 0,125 M Tris, pH 6,8). Polimerizacija gelova je omogućena dodavanjem 0,05% amonijum-persulfata i 0,033% tetrametiletildiamida. Puffer za razdvajanje je sadržao 0,192 M glicin, 0,1% SDS i 0,025 M Tris, pH 8,3. U određenu zapreminu uzorka proteina dodata je ista zapremina pufera za uzorke (4% SDS, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -merkaptetanol, 0,025% brom-fenol plavo, 0,125 M Tris, pH 6,8). Uzorci su pre nanošenja na gel denaturisani kuvanjem 5 min. na 95 °C. Za sve ispitivane proteine nanošeno je 5-20  $\mu\text{g}$  proteina iz uzorka. Na gelove je nanošen i proteinski marker u cilju određivanja molekulskih masa (Thermo Fisher Scientific). Elektroforeza je trajala 60-90 min. pri konstantnom intenzitetu struje od 70 mA i diskontinuiranom naponu. Napon je nakon prelaska proteina u gel za razdvajanje podešen sa 100 V na 120 V. Nakon elektroforeze, gelovi su korišćeni za Western blot.

#### 3.5.2. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blot)

Mokrim elektrotransferom proteini su sa gelova preneseni na polivinil difluoridne membrane (Roche Diagnostics). Membrane su aktivirane u metanolu (10 sekundi) i destilovanoj vodi (3 minuta). Prenos proteina sa gelova na membrane se odvijao pri konstantnom naponu od 100 V, 60

min. u puferu za transfer (0,192 M glicin, 20% metanol, 0,025 M Tris, pH 8,3). Uspešnost transfera je proveravana 5% rastvorom Ponceau S boje u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Membrane su potom obezbojavane ispiranjem u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween 20 (0,2 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4) i inkubirane 60 min. na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje slobodnih mesta na membrani - 5% BSA (*eng.* bovine serum albumine) u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween 20. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane sa primarnim antitelom rastvorenim u 5% BSA preko noći na 4 °C. Podaci o antitelima korišćenim u ovom eksperimentu kao i njihova koncentracija, prikazani su u Tabeli 1. Nakon inkubacije i ispiranja viška primarnog antitela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima (Abcam) dobijenim imunizacijom kože na IgG zeca, odnosno miša u razblaženju 1:3000, odnosno 1:2000 u 5% BSA u trajanju od 120 min. na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji, membrane su ispirane Tris puferom sa dodatkom deterdženta Tween 20, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju proteina membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu - luminolu, uz dodatak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 min.). Nakon toga, rentgen filmovi (Carestream Health Inc.) su izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana (1-3 min.). Razvijani i skenirani filmovi su korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

**Tabela 1.** Primarna antitela korišćena za Western blot.

Antitelo	Proizvođač, kat. br.	Koncentracija (µg/mL)	Mr (kDa)
LDHA	Abcam, ab47010	1 µg/mL	36
LDHB	Abcam, ab85319	0.1 µg/mL	37
AMPK	Millipore, #07-350SP	1 µg /mL	65
Heksokinaza 1	Santa Cruz, sc-46695	1 µg/mL	120
Heksokinaza 2	Abcam, ab104836	1 µg/mL	102
PFK-1	Abcam, ab119796	1 µg/mL	86
GAPDH	Abcam, ab8245	0.2 µg/mL	36
G6PDH	Abcam, ab76598	1 µg/mL	59
β-aktin	Abcam, ab8226	0.5 µg/mL	42
GSK-3	Abcam ab90366	1 µg/mL	47, 51
VDAC	Abcam, ab34726	1 µg/mL	32
4-HNE	Abcam, ab48506	0.5 µg/mL;	N/A



Nrf2	Abcam, ab31163	1 µg/mL	67
PGC-1 $\alpha$	Abcam, ab54481	1 µg/mL	92
CS	Santa Cruz, sc-390693	1 µg/mL	50
Kompleks I	Abcam, ab55521	0.5 µg/mL	43
Kompleks II	Abcam, ab14715	0.5 µg/mL	70
Kompleks III	Abcam, ab14745	0.2 µg/mL	50
Kompleks IV	Abcam, ab14744	0.5 µg/mL	17
ATP sintaza	Abcam, ab14730	1 µg/mL	52
PDH	Abcam, ab84588	1 µg/mL	39
PDK4	Abcam, ab89295	1 µg/mL	46
ACADM	Abcam, ab92461	1 µg/mL	47
ACOX	Abcam, ab184032	1 µg/mL	50,74
ACC	Abcam, ab45174	0.5 µg/mL	265
FAS	Abcam, ab150508	0.5 µg/mL	273
UCP1	Abcam, ab10983	2 µg/mL	32
MCT1	Abcam, ab238825	1 µg/mL	50
MCT4	Abcam, ab74109	1 µg/mL	49

Skraćenice korišćene u tabeli: LDHA, laktat dehidrogenaza A; LDHB, laktat dehidrogenaza B; AMPK, AMP-aktivirana protein kinaza; PFK-1, fosfofruktokinaza 1; GAPDH, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza; G6PDH, glukoza 6-fosfat dehidrogenaza; GSK-3, kinaza glikogen sintaze 3; VDAC, voltažno zavisni anjonski kanal; 4-HNE, 4-hidroksinonenal; Nrf2, nukleusni faktor-eritroid faktor 2-zavisni faktor 2; PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  koaktivator-1 $\alpha$ ; CS, citrat sintaza; PDH, piruvat dehidrogenaza; PDK4, kinaza piruvat dehidrogenaze 4; ACADM, acil-CoA dehidrogenaza srednjeg lanca; ACOX, peroksizomalna acil-CoA dehidrogenaza; ACC, acetil-CoA karboksilaza; FAS, sintaza masnih kiselina; UCP1, dekuplujući protein 1; MCT1, monokarboksilatni transporter 1; MCT4 monokarboksilatni transporter 4.

### 3.5.3. Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom

ImageJ softverski paket je korišćen za denzitometrijsku kvantifikaciju dobijenih traka. Rezultati su izraženi putem integracije volumena i predstavljaju sumu svih vrednosti piksela pobuđenih signalom (1 piksel = 0,007744 mm<sup>2</sup>) unutar označenog objekta (trake) vizuelizovane na prethodno objašnjen način. Ova vrednost umanjena za fon pozadine (*eng.* background) predstavlja intenzitet zatamnjenja (*eng.* volume) na površini zaokružene trake.

Dobijene vrednosti za proteine od interesa normalizovane su u odnosu na vrednosti dobijene za  $\beta$ -aktin kao standard za konstitutivno eksprimirani protein.

### 3.6. Određivanje izoenzimskog profila laktat dehidrogenaze

Izoenzimski profil laktat dehidrogenaze analiziran je elektroforetski. Za analizu je korišćeno 5  $\mu$ g, odnosno 10  $\mu$ g, proteina izolovanih u saharoznom puferu za tumorsko i masno tkivo respektivno. Izolati proteina iz srca, odnosno jetre, su korišćeni kao pozitivne kontrole za determinaciju elektroforetskih migracionih dužina pet izoenzimskih formi laktat dehidrogenaze. Elektroforeza je rađena pod neredukujućim, nenedaturišućim uslovima na 1% agaroznom gelu u hladnom puferu za elektroforezu pri konstantnoj struji od 100 V u trajanju od 2 h. Izoforme su detektovane vizuelizacijom aktivnosti laktat dehidrogenaze na gelu nakon inkubacije u puferu za aktivnost (115 mM natrijum laktat, 3,75 mg/mL  $\text{NAD}^+$ , 0,075 mg/mL farnezin metilsulfat i 0,75 mg/mL nitro plavo tetrazolijum). Gelovi su inkubirani na 37 °C u trajanju od 20-30 min. u mraku. Nakon inkubacije, gelovi su skenirani, a dobijene trake su denzitometrijski analizirane.

### 3.7. Određivanje ukupne aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze

Ukupna aktivnost laktat dehidrogenaze je određena u uzorcima proteina izolovanim u saharoznom puferu modifikovanom metodom po Amadoru (Amador *i sar.*, 1963). 50  $\mu$ L uzorka je dodato u reakcionu smešu ( $5,25 \times 10^{-8}$  M  $\text{NAD}^+$ , laktat  $7,75 \times 10^{-2}$  M u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 8,5), a zatim je kvarcna kiveta odmah prebačena u spektrofotometar. Porast apsorbance NADH je praćen na 340 nm u trajanju od 3 min. na 30 °C. Za datu koncentraciju supstrata i pH reakcione smeše više od 95% maksimalne aktivnosti svih pet izoformi enzima je izmereno, zbog čega se ova metoda koristi za određivanje aktivnosti ukupne laktat dehidrogenaze. Specifična aktivnost je izražena u nM NADH  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$  proteina i u nM NADH  $\text{min}^{-1}$   $\text{g}^{-1}$  tkiva.

### 3.8. Određivanje broja kopija mitohondrijske DNK lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (RT-PCR)

Nakon sekvencijalne izolacije DNK, RNK i proteina po uputstvima proizvođača TRIzol™ reagensa i spektrofotometrijskog određivanja koncentracije i čistoće DNK, 20 ng ukupne DNK je korišćeno za umnožavanje genskih sekvenci nukleusnog gena za 18S ribozomalnu RNK (18S) i mitohondrijskog gena za nikotinamid adenin dinukleotid dehidrogenazu 2 (ND2) lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu po uputstvima proizvođača (Super Script First Stri Synthesis Kit, Invitrogen). Komercijalne sekvence nukleusnog i mitohondrijskog gena sa odgovarajućim prajmerima su korišćene za konstrukciju standardne krive prema kojoj je finalno izračunat odnos broja kopija mitohondrijskog i nukleusnog genoma u uzorcima tumorskog i masnog tkiva dojke. Serijska razblaženja komercijalnih DNK sekvenci od 20 ng do  $2 \times 10^{-4}$  ng su korišćena za konstrukciju standardnih kriva. Reakciona smeša od 20  $\mu$ L je sadržala 5 pM odgovarajućih prajmera, fluorescentnu boju SYBR Green sa referentnom fluorescentnom bojom

ROX (Applied Biosystems), TaqMan polimerazu i 20 ng ukupne DNK, a ciljne sekvence su umnožene prema protokolu sekvencijalnih ciklusa od 5 min. na 95 °C inicijalne denaturacije, 40 ciklusa od po 15 sekundi denaturacije na 95 °C, 60 sekundi vezivanja prajmera za matricu na 60 °C i 60 sekundi elongacije na 72 °C. U Tabeli 2 su date komercijalne sekvence gena *18S* i *ND2*, kao i sekvence odgovarajućih prajmera za njihovo umnožavanje.

**Tabela 2.** Sekvence gena i parova prajmera korišćenih u lančanoj reakciji polimeraze u realnom vremenu.

Ciljni gen	Sekvenca gena/prajmera
<i>18S</i>	5'- TAGAGGGACAAGTGGCGTTCAGCCACCCGAGATTGAGCAATAACAGG TCTGTGATGCCCTTAGATGTCC-3'
<i>ND2</i>	5'- ACTGCGCTAAGCTCGCACTGATTTTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATA AACATGCTAGCTTTTATTCCA-3'
<i>18S</i>	F: 5'-TAGAGGGACAAGTGGCGT-3' R: 5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGT-3'
<i>ND2</i>	F: 5'-ACTGCGCTAAGCTCGCACTGA-3' R: 5'-GATTATGGATGCGGTTGCTTG-3'

Skraćenice korišćene u tabeli: 18S, 18S ribozomalna RNK; ND2, nikotinamid adenin dinukleotid dehidrogenaza 2.

### 3.9. Analiza lokalizacije proteina mikroskopskim metodama

Parafinski preseci debljine 5 µm korišćeni su za detekciju ekspresije i lokalizacije proteina mikroskopskim metodama. Prethodno, parafinski preseci su sprovedeni kroz rutinski proces deparafinizacije i rehidratacije. Zatim, parafinski preseci su inkubirani 10 min. u 10 mM citratnom puferu (pH 6,0) na 600 W u mikrotalasnoj i ispirani TBS puferom kako bi se otkrili epitopi, odnosno antigena mesta vezivanja.

#### 3.9.1. Imunohistohemijska lokalizacija proteina

Nakon procedure otkrivanja antigena i ispiranja u TBS puferu (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6), endogena peroksidaza je blokirana u 3% rastvoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu u trajanju od 10 min. ABC kit (Abcam) je korišćen za imunohistohemijsku detekciju proteina u uzorcima tumorskog i masnog tkiva dojke. Nespecifična mesta vezivanja antitela su blokirana inkubacijom preseka u Protein Block rastvoru albumina (Abcam), 30 min. na sobnoj temperaturi. Nakon

blokiranja, preseci su inkubirani sa odgovarajućim primarnim antitelima na 4 °C preko noći. Nakon ispiranja u Tris puferu sa dodatkom deterdženta Tween 20, preseci su inkubirani 10 min. na sobnoj temperaturi u univerzalnoj smeši biotiniziranih kozjih anti-mišjih i anti-zečjih sekundarnih antitela (Abcam). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima i ispiranja, preseci su inkubirani 10 min. na sobnoj temperaturi sa streptavidinom konjugovanim sa peroksidazom (Abcam). Detekcija mesta vezivanja antitela za odgovarajuće epitope na proteinima od interesa na tkivnim prescima vršena je inkubacijom preseka u 0,05% 3,3'-diaminobenzidinu rastvorenom u TBS puferu, u prisustvu 0,012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do pojave reakcije. Inkubacija je trajala do 10 min., u mraku. Ispiranjem česmenskom vodom je prekinuto razvijanje bojene reakcije, a preseci su kontrastirani bojenjem Majerovim hematoksilinom. Nakon rutinske dehidracije kroz seriju etanola rastuće koncentracije, trajni preparati su napravljeni montiranjem preseka u DPX medijumu (mešavina distirena i ksilena, Sigma-Alrich). Primarna antitela korišćena za imunohistohemijsku detekciju proteina su data u Tabeli 3. Uzorci tumorskog i masnog tkiva dojke su analizirani na svetlosnom mikroskopu DMLB opremljenim sa DFC295 digitalnom kamerom za snimanje mikrografija (Leica Microsystems).

### 3.9.2. *Imunofluorescentna lokalizacija proteina*

Nakon procedure otkrivanja antigena i ispiranja u TBS puferu, tkivni preseci su inkubirani u 10% normalnom kozjem serumu i 1% BSA u TBS-u na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 min. radi blokiranja nespecifičnih mesta vezivanja antitela. Nakon blokiranja, preseci su inkubirani sa odgovarajućim primarnim antitelima na 4 °C preko noći. Primarna antitela koja su korišćena za imunofluorescentnu detekciju proteina su data u Tabeli 3. Nakon ispiranja primarnog antitela, preseci su inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim sa fluorohromima na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 min. Zatim, preseci su isprani u TBS puferu sa dodatkom deterdženta Tween 20 i inkubirani 5 min. sa fluorescentnom nukleusnom bojom Sytox Orange (Life Technologies). Nakon ispiranja, preseci su montirani u Mowiolu (Sigma-Aldrich). Dve metode su korišćene za kolokalizacione studije u zavisnosti od porekla primarnih antitela: metod dvostruke simultane imunofluorescencije (u slučaju da antitela potiču iz različitih domaćina) i metod dvostruke sekvencijalne imunofluorescencije (u slučaju da primarna antitela potiču iz istog domaćina). Konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems) je korišćen u sekvencijalnom modu kako bi se onemogućilo preklapanje između različitih kanala. Dvojno obojeni uzorci su ekscitovani Ar laserom na 488 nm i HeNe laserom na 633 nm, dok su nukleusne boje ekscitovane korišćenjem HeNe lasera na 543 nm. Izostavljanjem primarnih antitela dobijene su negativne kontrole.

**Tabela 3.** Primarna antitela korišćena za imunohistohemijsku i imunofluorescentnu detekciju lokalizacije proteina.

<b>Antitelo</b>	<b>Proizvođač, kat. br.</b>	<b>Koncentracija (µg/mL)</b>
CuZnSOD	Abcam, ab13498	1 µg/mL
MnSOD	Abcam, ab13533	1 µg/mL
CAT	Abcam, ab1877	1 µg/mL
GSH-Px	Abcam, ab16798	1 µg/mL
LDHA	Abcam, ab47010	1 µg/mL
LDHB	Abcam, ab85319	0.1 µg/mL
Heksokinaza 1	Santa Cruz, sc-46695	1 µg/mL
Heksokinaza 2	Abcam, ab104836	1 µg/mL
VDAC	Abcam, ab34726	1 µg/mL
4-HNE	Abcam, ab48506	1 µg/mL
MCT1	Abcam, ab238825	1 µg/mL
MCT4	Abcam, ab74109	1 µg/mL

Skraćenice korišćene u tabeli: CuZnSOD, bakar, cink superoksid dismutaza; MnSOD, mangan superoksid dismutaza; CAT, katalaza; GSH-Px, glutation peroksidaza; LDHA, laktat dehidrogenaza A; LDHB, laktat dehidrogenaza B; VDAC, voltažno zavisni anjonski kanal; 4-HNE, 4-hidroksinonenal; MCT1, monokarboksilatni transporter 1; MCT4 monokarboksilatni transporter 4.

### 3.10. Statistička obrada rezultata

Statistička značajnost dobijenih rezultata je testirana pomoću GraphPad Software 8.4.3. Za ispitivanje normalnosti raspodele korišćeni su Anderson-Darling, D'Agostino i Pearson, Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov testovi normalnosti. Za poređenje varijanse između grupa i određivanje statističke značajnosti korišćena je parametarska i neparametarska dvofaktorska analiza varijanse (two-way ANOVA) praćena Tukey i Dunnet testovima za višestruka poređenja, respektivno. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće  $p < 0.05$ . Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\pm$  SD) ili srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $\pm$  S.E.M.).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike pacijentkinja i patohistološki parametri tumora dojke

U Tabeli 4 prikazane su karakteristike 36 premenopauzalnih pacijentkinja (starost i BMI) i patohistološki parametri tumora dojke (histološki tip, status hormonskih receptora, molekulski podtip, veličina tumora, histološki gradus tumora i zahvaćenost aksilarnih limfnih čvorova) po sledećim grupama: normalno uhranjene sa benignim tumorima, gojazne sa benignim tumorima, normalno uhranjene sa malignim tumorima i gojazne sa malignim tumorima. U grupi normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima prosečna starost pacijentkinja je  $37.29 \pm 8.01$  godina, a prosečna vrednost BMI je  $20.36 \pm 2.12$  kg/m<sup>2</sup>. Patohistološkom analizom je utvrđeno da svih devet tumora u ovoj grupi pripada fibroadenomima po histološkom tipu, od čega su 4 tumora manja ili jednaka 2 cm u dijimetru, dok je 5 tumora veće od 2 cm u dijimetru. U grupi gojaznih žena sa benignim tumorima prosečna starost pacijentkinja je  $33.60 \pm 9.40$  godina, a prosečna vrednost BMI je  $28.23 \pm 1.49$  kg/m<sup>2</sup>. Patohistološkom analizom je utvrđeno da svih devet tumora u ovoj grupi pripada fibroadenomima po histološkom tipu, od čega je 5 tumora manje ili jednako 2 cm u dijimetru, dok je 4 tumora veće od 2 cm u dijimetru. U grupi normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima prosečna starost pacijentkinja je  $39.83 \pm 7.39$  godina, a prosečna vrednost BMI je  $22.68 \pm 1.17$  kg/m<sup>2</sup>. Patohistološkom analizom je utvrđeno da svih devet tumora u ovoj grupi pripada invazivnim duktalnim karcinomima po histološkom tipu. Na osnovu statusa hormonskih receptora, maligni tumori u ovoj grupi klasifikovani su kao luminalni tip A (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>) po molekulskom podtipu. U ovoj grupi, 6 tumora je manje ili jednako 2 cm u dijimetru, dok su 3 tumora veći od 2 cm u dijimetru. Na osnovu histološkog gradusa tumora, 5 tumora pripada gradusu II, a 4 tumora pripadaju gradusu III. Kod 7 pacijentkinja iz ove grupe nema zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova, dok je kod 2 pacijentkinje detektovana zahvaćenost 1-3 aksilarna limfna čvora. U grupi gojaznih žena sa malignim tumorima prosečna starost pacijentkinja je  $46.67 \pm 3.67$  godina, a prosečna vrednost BMI je  $30.6 \pm 4.29$  kg/m<sup>2</sup>. Patohistološkom analizom je utvrđeno da svih devet tumora u ovoj grupi pripada invazivnim duktalnim karcinomima po histološkom tipu, a na osnovu statusa hormonskih receptora luminalnom tipu A (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>) po molekulskom podtipu. U ovoj grupi, 5 tumora je manje ili jednako 2 cm u dijimetru, dok je 4 tumora veće od 2 cm u dijimetru. Na osnovu histološkog gradusa tumora, 6 tumora pripada gradusu II, a 3 tumora pripadaju gradusu III. Kod 6 pacijentkinja iz ove grupe nema zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova, dok je kod 3 pacijentkinje detektovana zahvaćenost 1-3 aksilarna limfna čvora. Pacijentkinje iz grupe gojaznih sa malignim tumorima su u proseku starije od pacijentkinja iz grupe gojaznih sa benignim tumorima ( $p < 0.01$ ). Takođe, pacijentkinje iz grupe gojaznih sa benignim tumorima u proseku imaju viši BMI u poređenju sa pacijentkinjama iz grupe normalno uhranjenih sa benignim tumorima ( $p < 0.001$ ), dok pacijentkinje iz grupe gojaznih sa malignim tumorima u proseku imaju viši BMI u poređenju sa pacijentkinjama iz grupe normalno uhranjenih sa malignim tumorima ( $p < 0.001$ ).

**Tabela 4.** U tabeli su prikazane karakteristike premenopauzalnih žena, starost u godinama (srednja vrednost±SD) i indeks telesne mase u kg/m<sup>2</sup> (srednja vrednost±SD), kao i patohistološki parametri benignih i malignih tumora dojke.

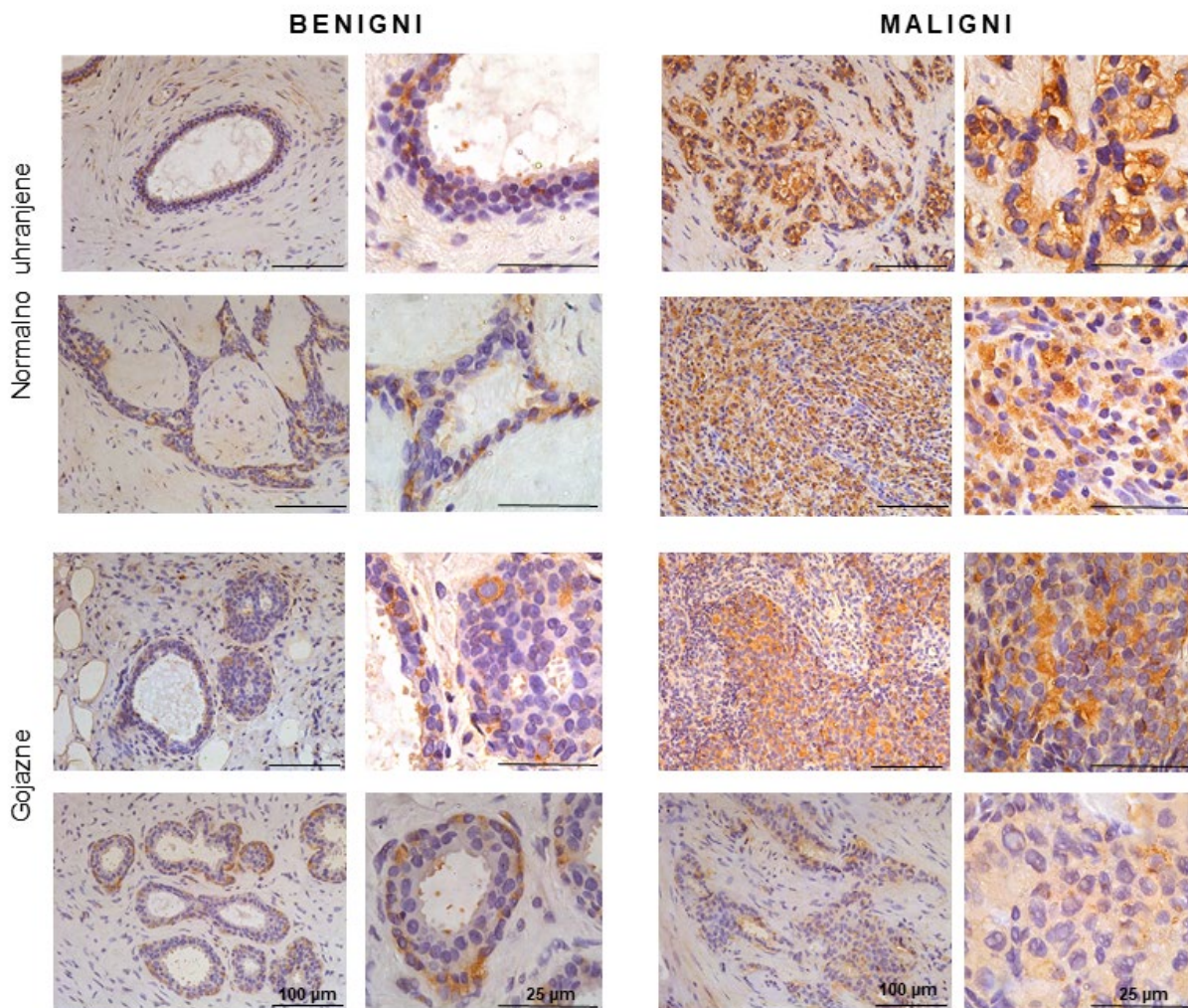
Karakteristike pacijentkinja	Grupe			
	Normalno uhranjene žene sa benignim tumorima (n=9)	Gojazne žene sa benignim tumorima (n=9)	Normalno uhranjene žene sa malignim tumorima (n=9)	Gojazne žene sa malignim tumorima (n=9)
Starost (godine)	37,29±8,01	33,60±9,40	39,83±7,39	46,67±3,67 <sup>a</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20,36±2,12	28,23±1,49 <sup>b</sup>	22,68±1,17	30,6±4,29 <sup>c</sup>
<b>Patohistološki parametri</b>				
Histološki tip tumora	fibroadenom	fibroadenom	invazivni duktalni karcinom	invazivni duktalni karcinom
Status hormonskih receptora	/	/	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>
Molekularni podtip	/	/	luminalni tip A	luminalni tip A
<b>Veličina tumora</b>				
≤2 cm	4	5	6	5
>2 cm	5	4	3	4
<b>Histološki gradus tumora</b>				
Gradus II	/	/	5	6
Gradus III	/	/	4	3
<b>Zahvaćenost aksilarnih limfnih čvorova</b>				
Nema zahvaćenosti	/	/	7	6
Zahvaćenost 1-3 aksilarna limfna čvora	/	/	2	3

Skraćenice korišćene u tabeli: BMI, indeks telesne mase; ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>, estrogen pozitivan/progesteron pozitivan/receptor epidermalnog faktora rasta 2 negativan. a-poređenje sa gojaznim ženama sa benignim tumorima (p < 0.01), b-poređenje sa normalno uhranjenim ženama sa benignim tumorima (p < 0.001), c-poređenje sa normalno uhranjenim ženama sa malignim tumorima (p < 0.001).

## 4.2. Redoks status u tumorskom i masnom tkivu dojke

### 4.2.1. Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CuZnSOD u tumorskom tkivu dojke

Imunohistohemijaska analiza proteinske ekspresije, tkivne i ćelijske lokalizacije bakar, cink superoksid dismutaze (CuZnSOD) u benignom i malignom tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena prikazana je na Figuri 1. U benignom tumorskom tkivu, prisustvo CuZnSOD je zabeleženo u pojedinim epitelnim ćelijama, dok je imunopozitivna reakcija lokalizovana u citoplazmi. Uočen je mali broj izrazito imunopozitivnih ćelija. U malignom tumorskom tkivu, veliki broj kancerskih ćelija se odlikuje visokim stepenom imunopozitivnosti, dok je imunopozitivna reakcija takođe lokalizovana u citoplazmi. Intenzitet imunopozitivnosti u malignom tumorskom tkivu je izuzetno jak u poređenju sa benignim tumorskim tkivom.

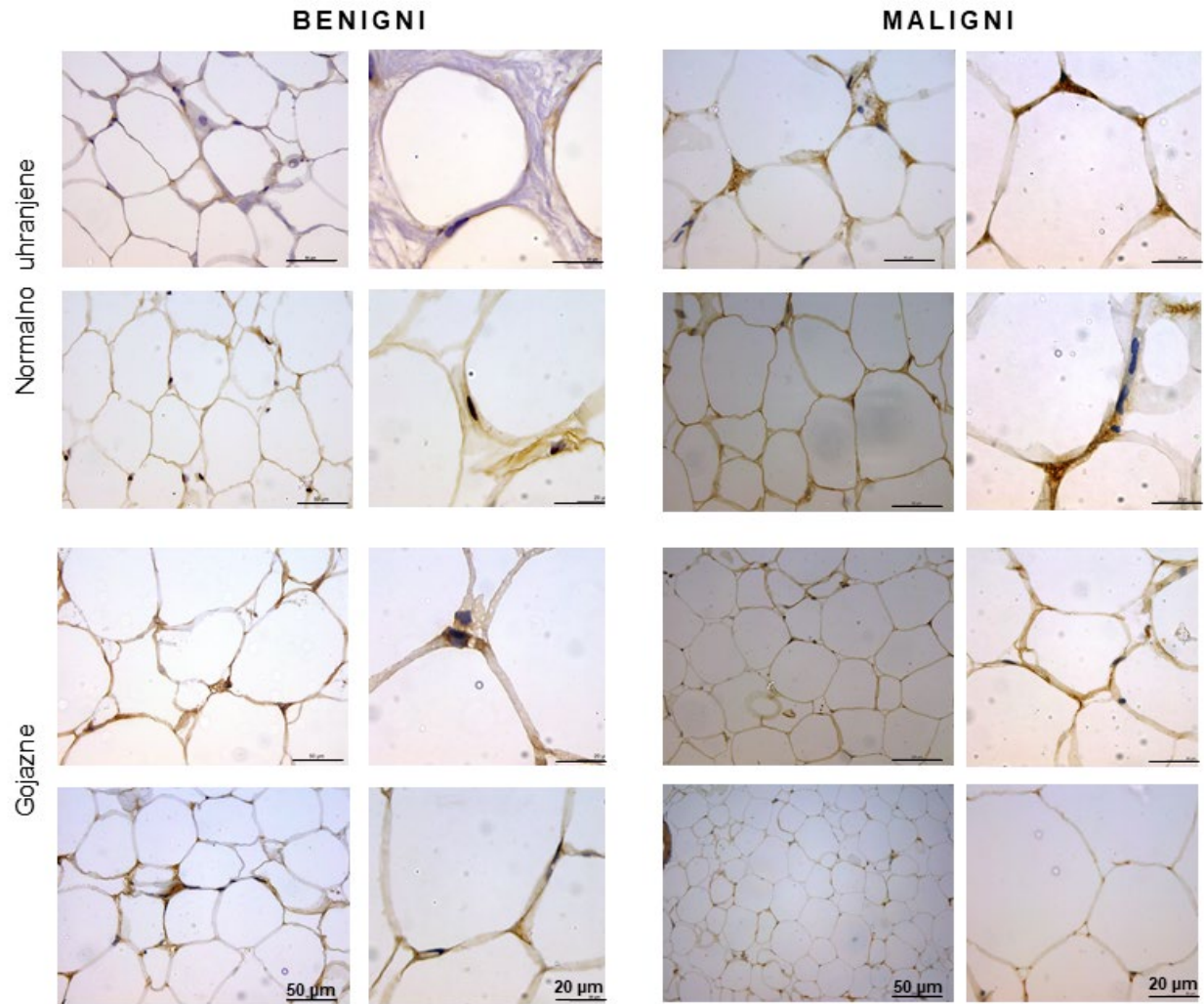


**Figura 1.** Imunohistohemijaska detekcija bakar, cink superoksid dismutaze na presecima benignog i malignog tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. Bar 100 µm i 25 µm.



#### 4.2.2. Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CuZnSOD u masnom tkivu dojke

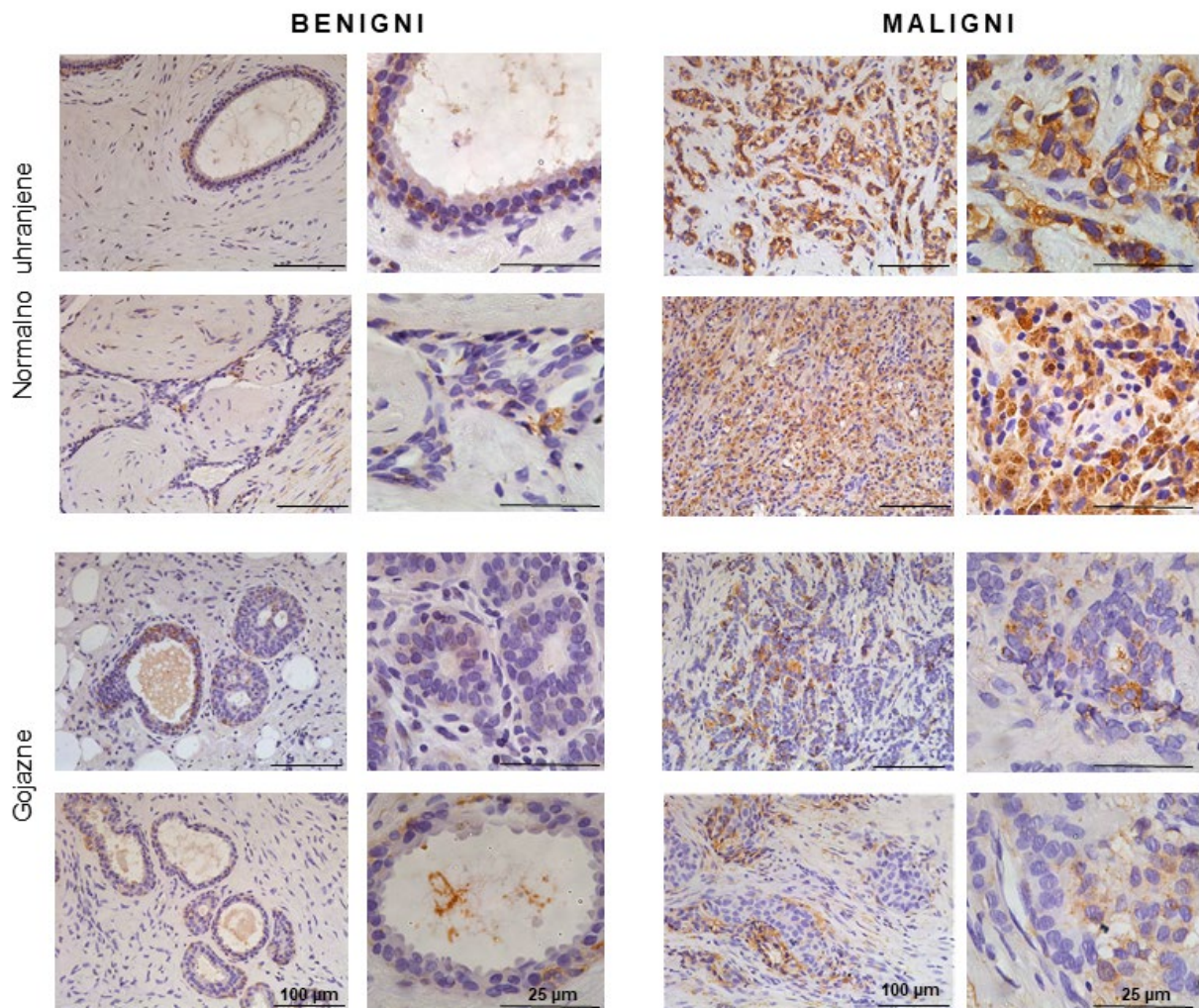
Proteinska ekspresija, tkivna i ćelijska lokalizacija CuZnSOD u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke prikazana je na Figuri 2. CuZnSOD je eksprimirana i specifično lokalizovana u adipocitima kako kod normalno uhranjenih tako i kod gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke. U adipocitima masnog tkiva normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim tumorima dojke intenzitet imunopozitivnosti je slab do umeren, dok je imunopozitivna reakcija lokalizovana u citoplazmi adipocita. U masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima, adipociti poseduju širok obod citoplazme koju odlikuje jak intenzitet imunopozitivnosti. Ovakva izražena imunopozitivna reakcija nije zabeležena u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima u poređenju sa normalno uhranjenim ženama sa malignim tumorima.



**Figura 2.** Imunohistohemijaska detekcija bakar cink superoksid dismutaze na presecima masnog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Bar 50 μm i 20 μm.

#### 4.2.3. Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije MnSOD u tumorskom tkivu dojke

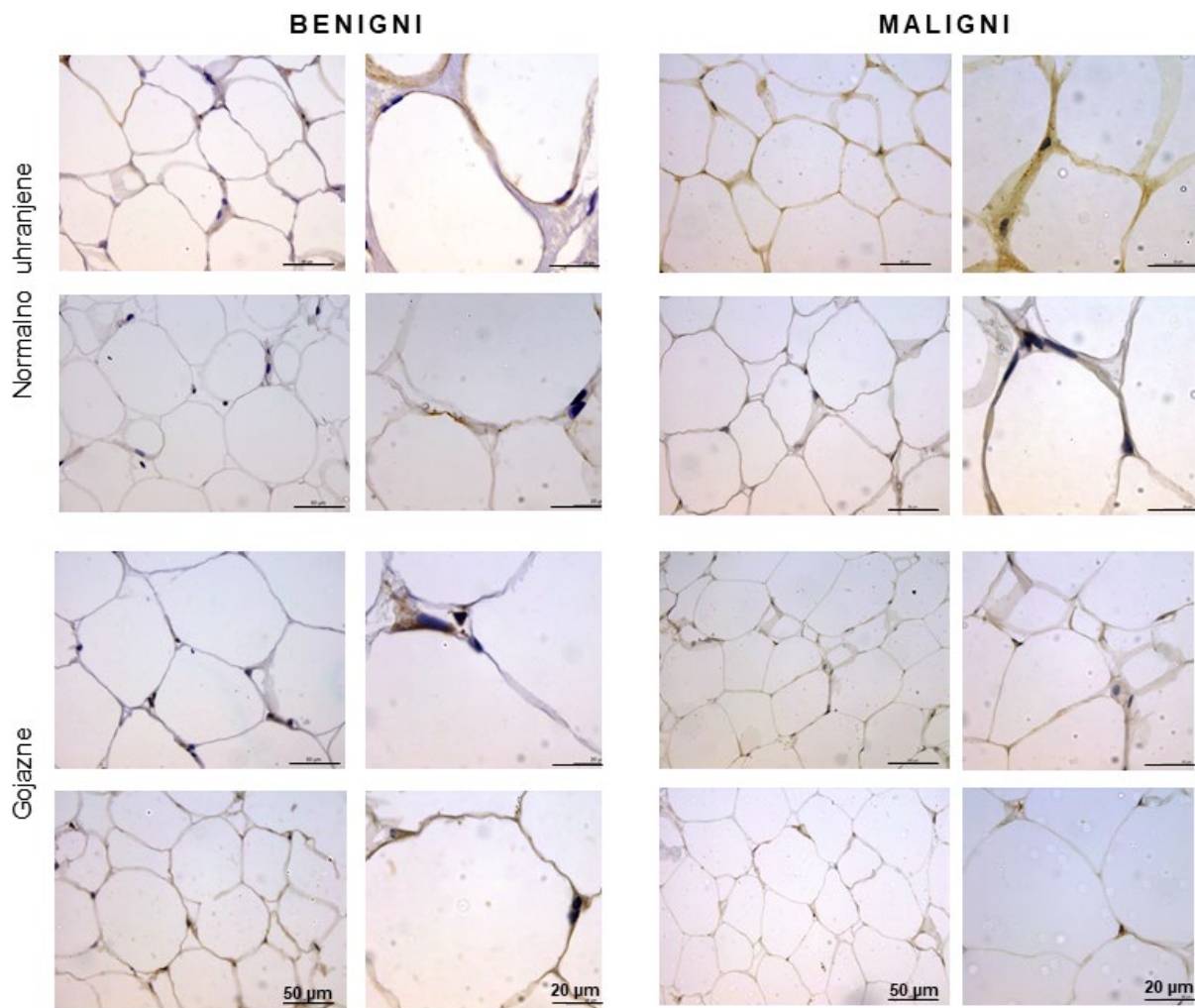
Imunohistohemijska analiza proteinske ekspresije kao i tkivne i ćelijske lokalizacije MnSOD u tumorskom tkivu dojke prikazana je na Figuri 3. U benignom tumorskom tkivu, prisustvo MnSOD je zabeleženo u epitelnim ćelijama, gde se u citoplazmi zapaža granulisani tip imunopozitivne reakcije koji ukazuje na mitohondrijsku lokalizaciju MnSOD. I kod normalno uhranjenih i kod gojaznih žena, mali broj epitelnih ćelija pokazuje slab do umeren intenzitet imunopozitivnosti. U malignom tumorskom tkivu, MnSOD je eksprimirana u kancerskim ćelijama, dok se imunopozitivna reakcija zapaža u mitohondrijama i citoplazmi. U malignom tumorskom tkivu, veliki broj kancerskih ćelija pokazuje visok stepen imunopozitivnosti. Maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena pokazuje najveći broj imunopozitivnih ćelija, kao i najviši stepen imunopozitivnosti kancerskih ćelija u poređenju sa malignim tumorskim tkivom gojaznih žena i u poređenju sa benignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena.



**Figura 3.** Imunohistohemijska detekcija mangan superoksid dismutaze na presecima benignog i malignog tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. Bar 100 µm i 25 µm.

#### 4.2.4. Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije MnSOD u masnom tkivu dojke

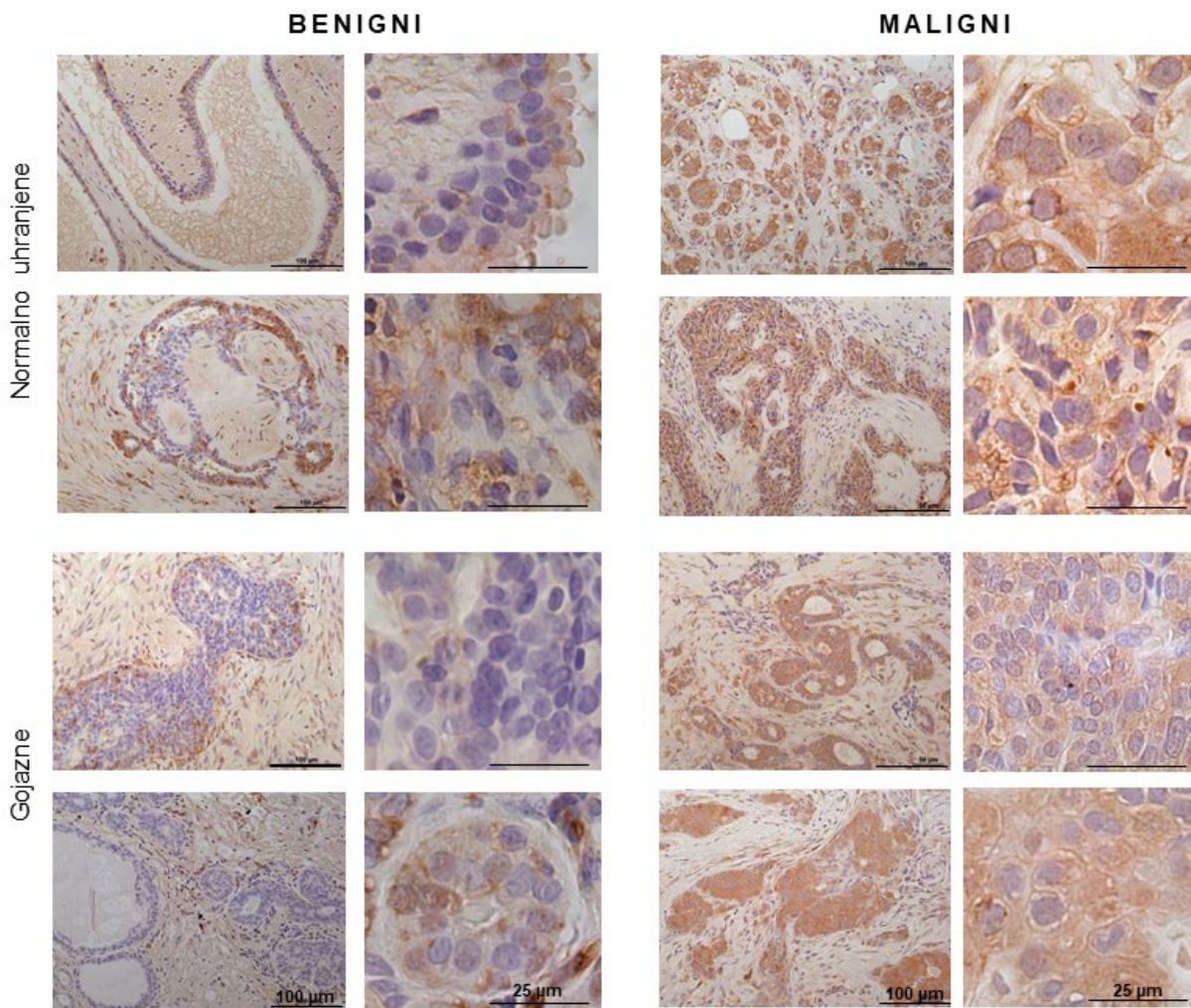
Na Figuri 4 prikazana je proteinska ekspresija i tkivna lokalizacija MnSOD u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke. MnSOD je eksprimirana i specifično lokalizovana u adipocitima masnog tkiva. Zapaža se granulisani tip imunopozitivne reakcije, posebno u perinukleusnom regionu citoplazme, dok je intenzitet imunopozitivne reakcije slab do umeren. U adipocitima masnog tkiva normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima zapaža se jak intenzitet imunopozitivne reakcije, u poređenju sa adipocitima masnog tkiva gojaznih žena sa malignim tumorima, kao i u poređenju sa adipocitima masnog tkiva normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima.



**Figura 4.** Imunohistochemijska detekcija mangan superoksid dismutaze na presecima masnog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Bar 50 μm i 20 μm.

#### 4.2.5. Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CAT u tumorskom tkivu dojke

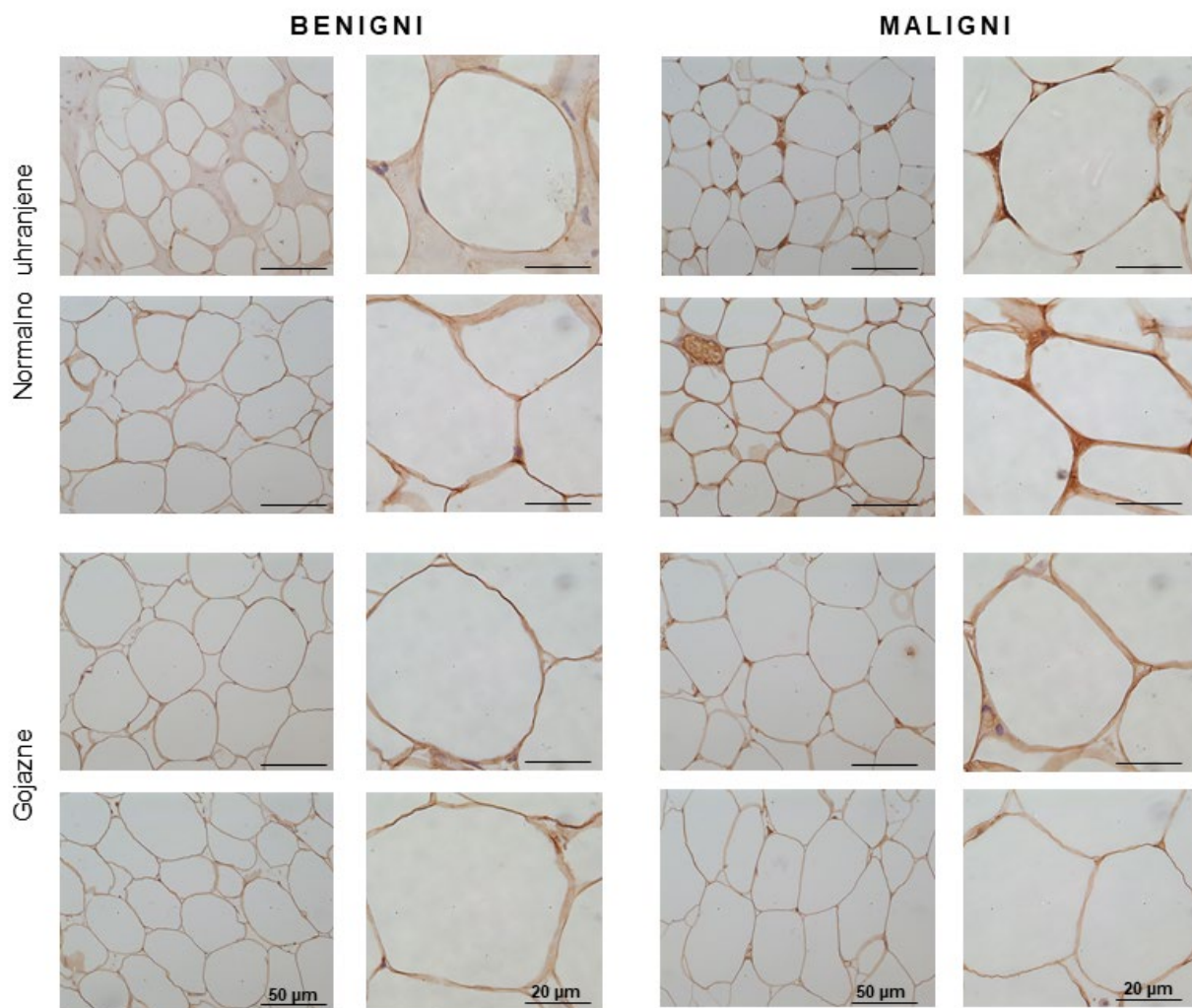
Proteinska ekspresija i obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CAT u benignom i malignom tumorskom tkivu dojke ispitivani su imunohistohemijski (Figura 5). U benignom tumorskom tkivu, prisustvo CAT je zabeleženo u epitelnim ćelijama i fibroblastima. Umeren stepen imunopozitivnosti odlikuje citoplazmu pojedinih epitelnih ćelija. U malignom tumorskom tkivu, CAT je eksprimirana u velikom broju ćelija, dok se visok intenzitet imunopozitivne reakcije zapaža u citoplazmi i pojedinim nukleusima. Zapaža se da je maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih i gojaznih žena izrazito imunopozitivno u poređenju sa respektivnim benignim tumorskim tkivom.



**Figura 5.** Imunohistohemijska detekcija katalaze na presecima benignog i malignog tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. Bar 100 µm i 25 µm.

#### 4.2.6. Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije CAT u masnom tkivu dojke

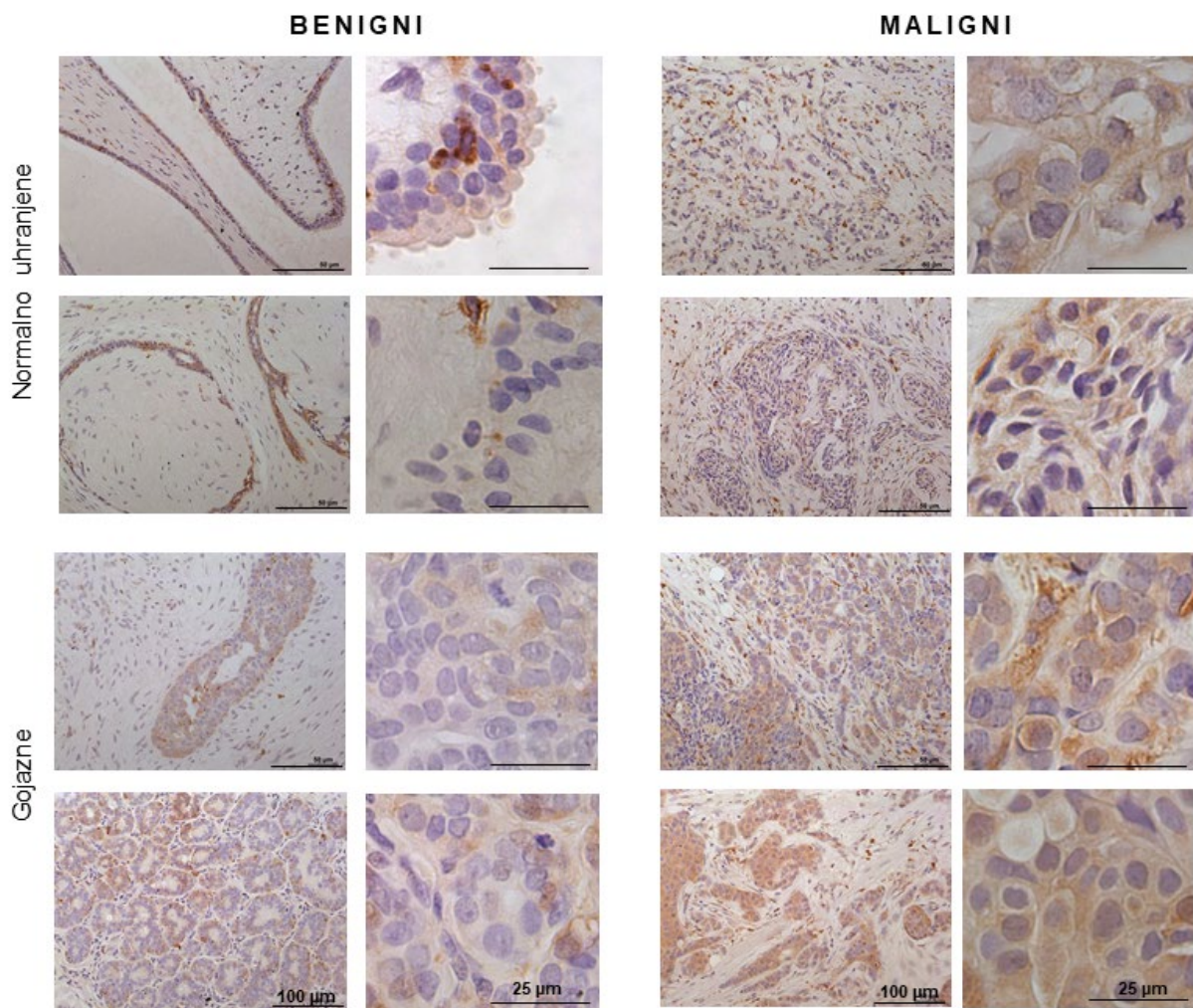
Proteinska ekspresija i tkivna lokalizacija CAT u masnom tkivu dojke prikazana je na Figuri 6. CAT je eksprimirana i specifično lokalizovana u adipocitima masnog tkiva normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke. U benignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena zapaža se uniformna imunopozitivna reakcija umerenog intenziteta u citoplazmi adipocita. Kod normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima zapažaju se karakteristični adipociti čija se citoplazma odlikuje izrazito jakim intenzitetom imunopozitivnosti. Ovakav visok stepen imunopozitivnosti nije zabeležen u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima.



**Figura 6.** Imunohistochemijska detekcija katalaze na presecima masnog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Bar 50 µm i 20 µm.

#### 4.2.7. Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije GSH-Px u tumorskom tkivu dojke

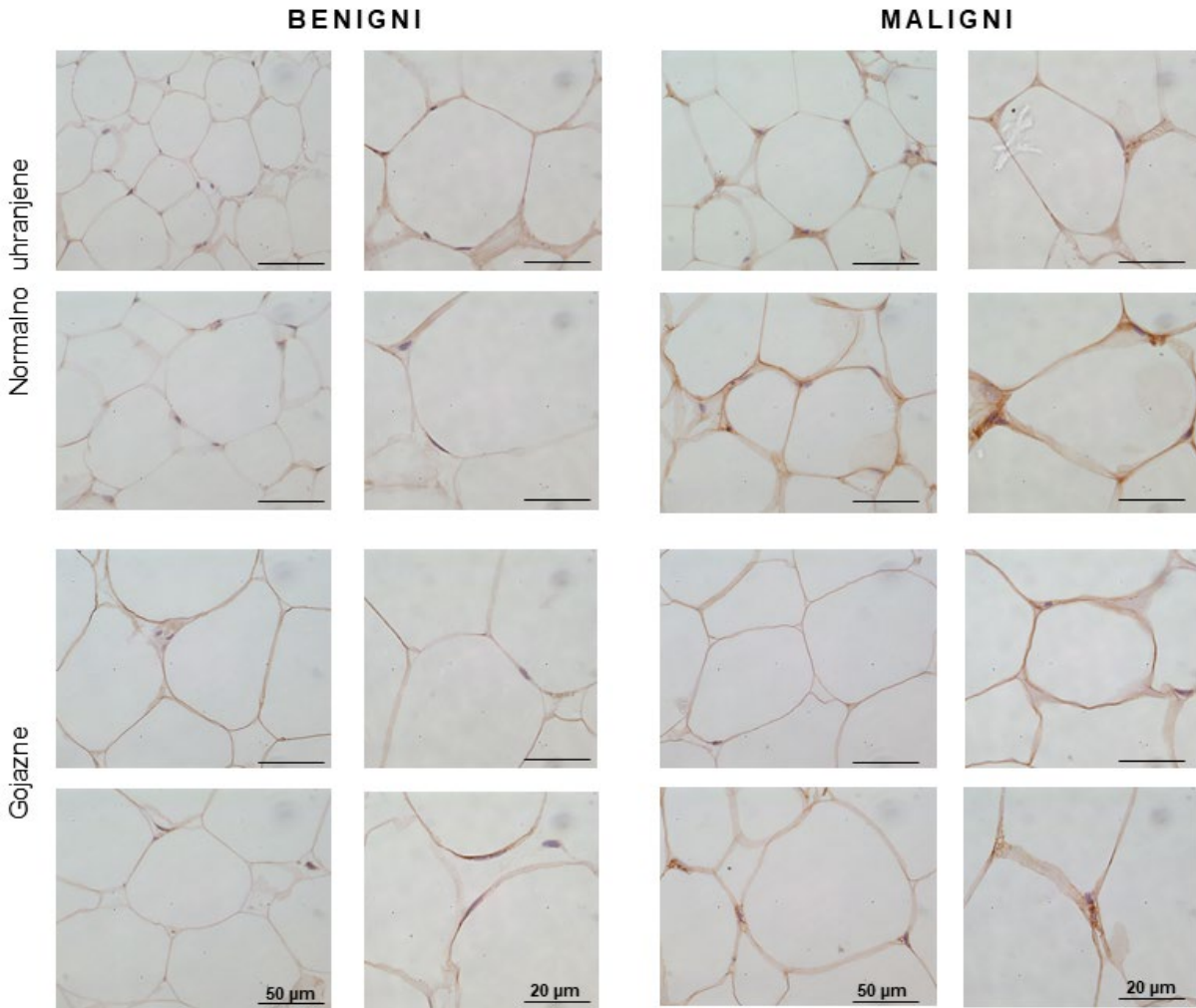
Imunohistohemijska detekcija prisustva i lokalizacije GSH-Px u benignom i malignom tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena prikazana je na Figuri 7. U benignom tumorskom tkivu, prisustvo GSH-Px je zabeleženo u epitelnim ćelijama, dok je imunopozitivna reakcija lokalizovana u citoplazmi. Epitelne ćelije se odlikuju slabim do umerenim intenzitetom imunopozitivnosti, dok izuzetno mali broj ćelija pokazuje jaku imunopozitivnost. U malignom tumorskom tkivu, veliki broj kancerskih ćelija pokazuje visok stepen imunopozitivnosti. Imunopozitivna reakcija ukazuje na citoplazmatsku lokalizaciju, ali se pored toga zapaža i granulisani tip reakcije koji ukazuje na mitohondrijsku lokalizaciju. Maligno tumorsko tkivo je izrazito imunopozitivno u odnosu na benigno tumorsko tkivo kako kod normalno uhranjenih tako i kod gojaznih žena.



**Figura 7.** Imunohistohemijska detekcija glutation peroksidaze na presecima benignog i malignog tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. Bar 100 µm i 25 µm.

#### 4.2.8. Obrazac tkivne i ćelijske lokalizacije GSH-Px u masnom tkivu dojke

Na Figuri 8 prikazana je imunohistohemijska detekcija ekspresije i tkivne lokalizacije GSH-Px u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke. U adipocitima masnog tkiva kod žena sa benignim tumorom dojke zapažena je slaba imunopozitivna reakcija, lokalizovana u perinukleusnom regionu citoplazme. Kod žena sa malignim tumorom dojke zabeleženi su adipociti sa širokim obodom citoplazme koja je umereno do jako imunopozitivna, posebno u perinukleusnom regionu citoplazme.

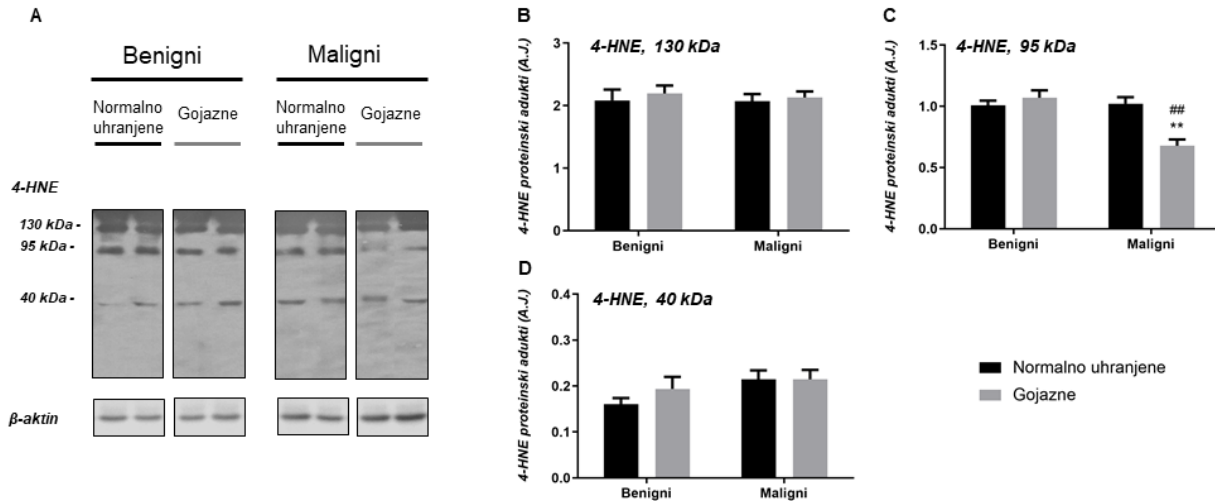


**Figura 8.** Imunohistohemijska detekcija glutation peroksidaze na presecima masnog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Bar 50 μm i 20 μm.

#### 4.2.9. Nivo 4-HNE modifikovanih proteina u tumorskom i masnom tkivu dojke

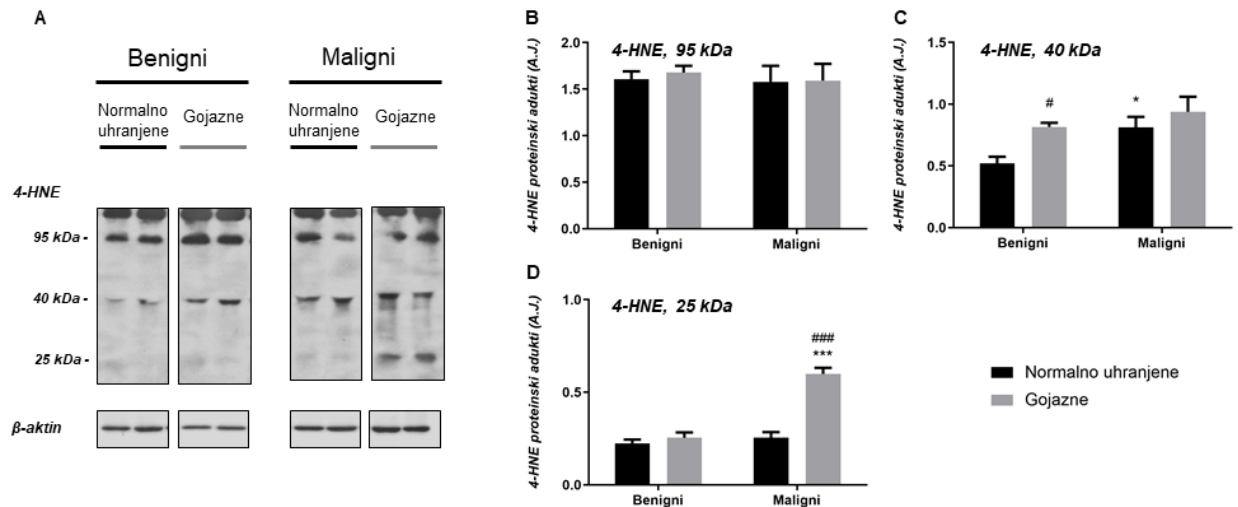
Nivo 4-hidroksinonenal (4-HNE) modifikovanih proteina u tumorskom i masnom tkivu dojke prikazani su na Figurama 9 i 10, respektivno. U tumorskom tkivu dojke detektovane su tri trake (Figura 9A) koje odgovaraju proteinima molekulske mase od 130 kDa (Figura 9B), 95 kDa (Figura 9C) i 40 kDa (Figura 9D). Intenzitet traka na 130 kDa i 40 kDa se ne razlikuje između benignog i malignog tumorskog tkiva dojke kod normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena, ali intenzitet trake koja odgovara 4-HNE modifikovanim proteinima na 95 kDa je manji u malignom tumorskom tkivu gojaznih premenopauzalnih žena u poređenju sa malignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena, kao i u poređenju sa benignim tumorskim tkivom gojaznih premenopauzalnih žena.

Detekcijom 4-HNE modifikovanih proteina u masnom tkivu dojke identifikovane su tri trake (Figura 10A) koje odgovaraju proteinima molekulske mase od 95 kDa (Figura 10B), 40 kDa (Figura 10C) i 25 kDa (Figura 10D). Nisu zabeležene razlike u intenzitetu trake na 95 kDa između masnog tkiva dojke premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Intenzitet trake na 40 kDa je veći u masnom tkivu dojke gojaznih žena sa benignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Takođe, nivo 4-HNE modifikovanih proteina na 40 kDa je veći u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Pored toga, nivo 4-HNE modifikovanih proteina na 25 kDa je veći u masnom tkivu dojke gojaznih žena sa malignim tumorima i u poređenju sa masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima i u poređenju sa masnim tkivom gojaznih žena sa benignim tumorima.



**Figura 9.** Profil 4-hidroksinonenal (4-HNE) modifikovanih proteina u tumorskom tkivu dojke (A). Nivo 4-HNE modifikovanih proteina molekulske mase od 130 kDa (B), 95 kDa (C) i 40 kDa (D) u tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ##  $p < 0.01$ .

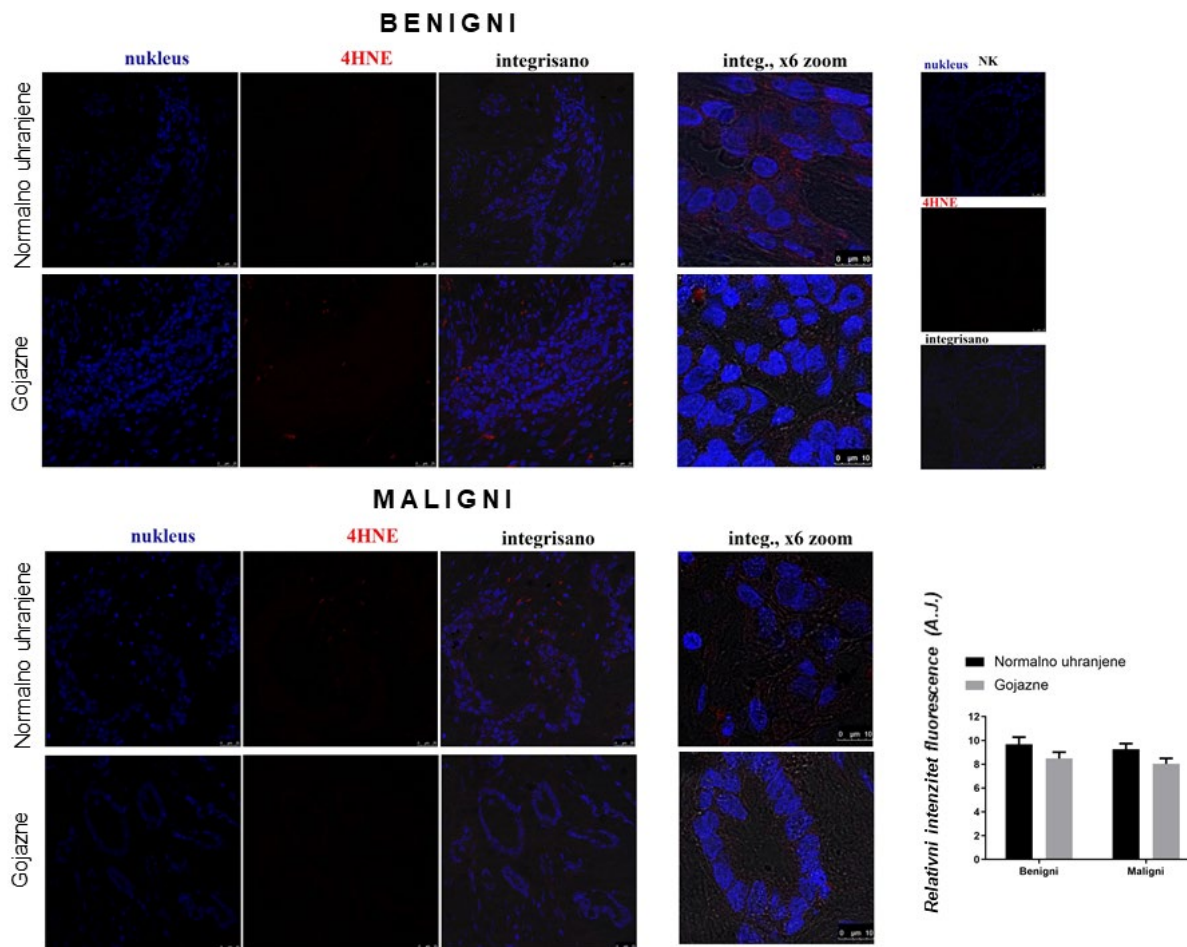




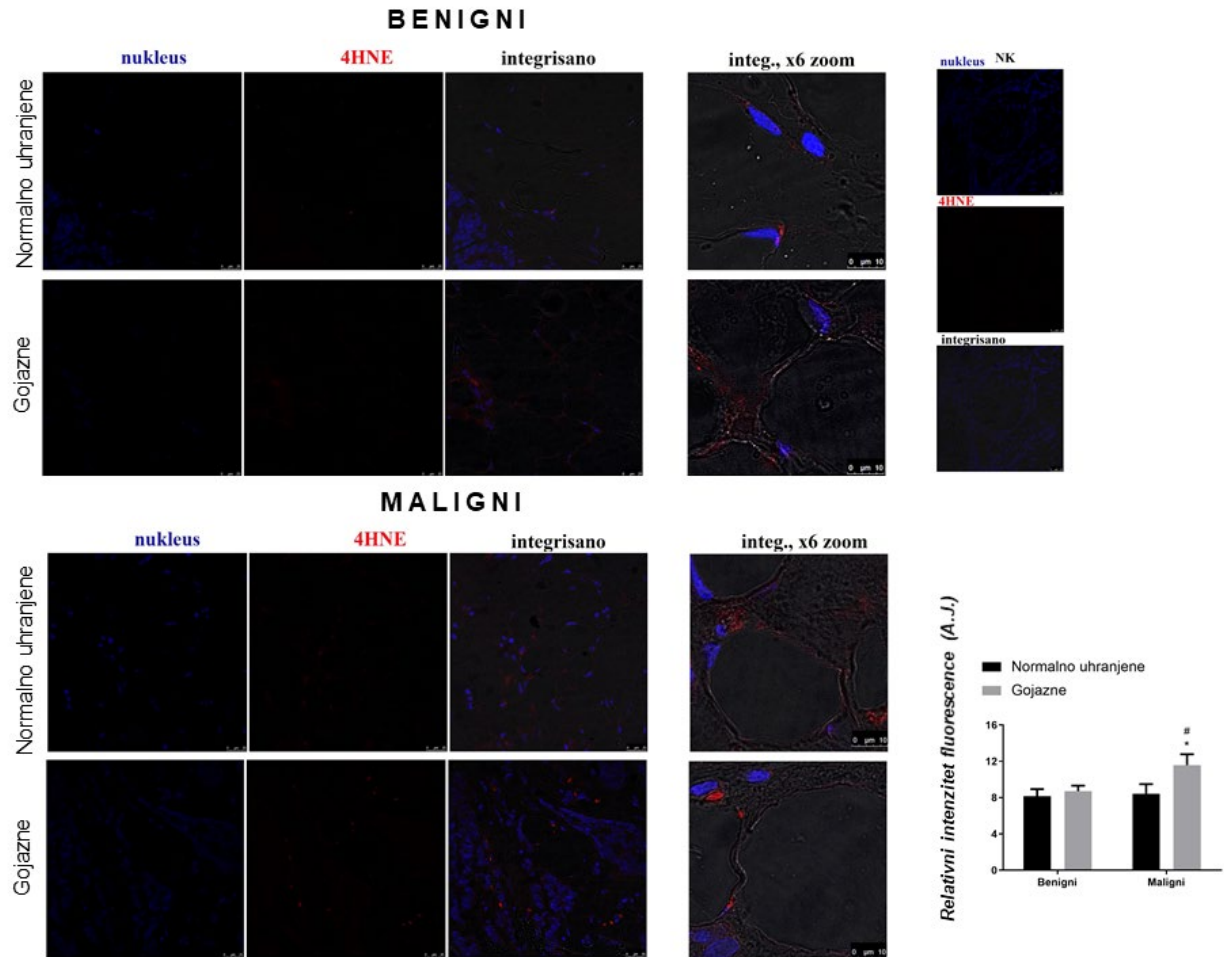
**Figura 10.** Profil 4-hidroksinonenal (4-HNE) modifikovanih proteina u masnom tkivu dojke (A). Nivo 4-HNE modifikovanih proteina molekulske mase od 95 kDa (B), 40 kDa (C) i 25 kDa (D) u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ .

#### 4.2.10. Obrazac proteinske ekspresije i ćelijske lokalizacije 4-HNE modifikovanih proteina u tumorskom i masnom tkivu dojke

Imunofluorescentna detekcija prisustva i proteinske lokalizacije 4-HNE modifikovanih proteina u tumorskom i masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena je prikazana na Figurama 11 i 12. U benignom tumorskom tkivu dojke, imunofluorescentnom analizom je detektovano prisustvo 4-HNE modifikovanih proteina u citoplazmi epitelnih ćelija mlečne žlezde, dok je intenzitet imunofluorescentne reakcije slab do umeren. U malignom tumorskom tkivu, detektovan je slab do umeren intenzitet imunofluorescentne reakcije u citoplazmi kancerskih ćelija kako kod normalno uhranjenih tako i kod gojaznih žena. Nisu zabeležene razlike u relativnom intenzitetu fluorescencije koji odgovara nivou 4-HNE modifikovanih proteina u tumorskom tkivu dojke, nezavisno od maligniteta i gojaznosti. U masnom tkivu dojke, detektovana je slaba do umerena imunofluorescentna reakcija u citoplazmi adipocita, posebno u perinukleusnom regionu citoplazme i kod žena sa benignim i kod žena sa malignim tumorima dojke, nezavisno od gojaznosti. U masnom tkivu dojke gojaznih žena sa malignim tumorima, relativni intenzitet fluorescencije koji odgovara nivou 4-HNE modifikovanih proteina je veći u poređenju sa masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima i u poređenju sa masnim tkivom gojaznih žena sa benignim tumorima.



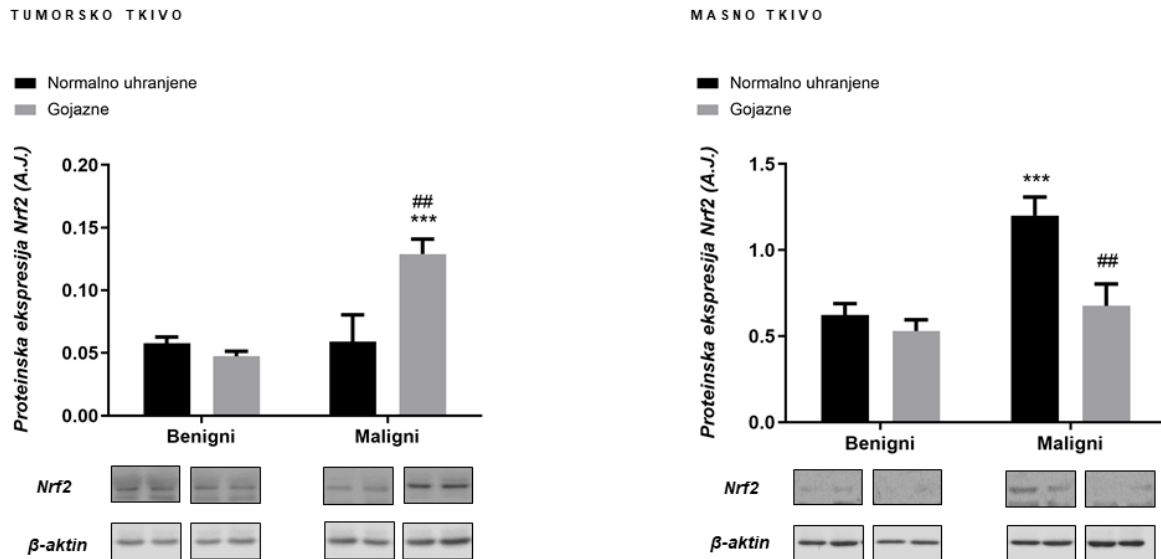
**Figura 11.** Imunofluorescentna detekcija 4-hidroksinonenal (4-HNE) modifikovanih proteina na presecima benignog (gornji panel) i malignog (donji panel) tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. Imunobojenje je prikazano na zasebnom kanalu za 4-HNE (crveno), kao i Sytox Orange bojenje za nukleuse (plavo). Integrisane mikrografije predstavljaju preklopljene kanale sa fazno-kontrastne mikroskopije. NK – negativna kontrola. Bar 25  $\mu$ m, odnosno 10  $\mu$ m na integrisanim mikrografijama x6 dodatno uveličanje.



**Figura 12.** Imunofluorescentna detekcija 4-hidroksinonenal (4-HNE) modifikovanih proteina na presecima masnog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopausalnih žena sa benignim (gornji panel) i malignim (donji panel) tumorima dojke. Imunobojenje je prikazano na zasebnom kanalu za 4-HNE (crveno), kao i Sytox Orange bojenje za nukleuse (plavo). Integrisane mikrografije predstavljaju preklopljene kanale sa fazno-contrastne mikroskopije. NK – negativna kontrola. Bar 25  $\mu\text{m}$ , odnosno 10  $\mu\text{m}$  na integrisanim mikrografijama x6 dodatno uveličanje. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ .

#### 4.2.11. Proteinska ekspresija transkripcionog faktora Nrf2 u tumorskom i masnom tkivu dojke

Razlike u proteinskoj ekspresiji transkripcionog faktora Nrf2 u tumorskom i masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena prikazane su na Figuri 13. U tumorskom tkivu, proteinska ekspresija Nrf2 je veća u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena u poređenju sa malignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena, kao i benignim tumorskim tkivom gojaznih žena. U masnom tkivu dojke, proteinska ekspresija Nrf2 je veća u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u poređenju sa masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Proteinska ekspresija Nrf2 je manja u masnom tkivu dojke gojaznih žena sa malignim tumorima u poređenju sa masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima, dok se ne razlikuje u poređenju sa masnim tkivom gojaznih žena sa benignim tumorima.

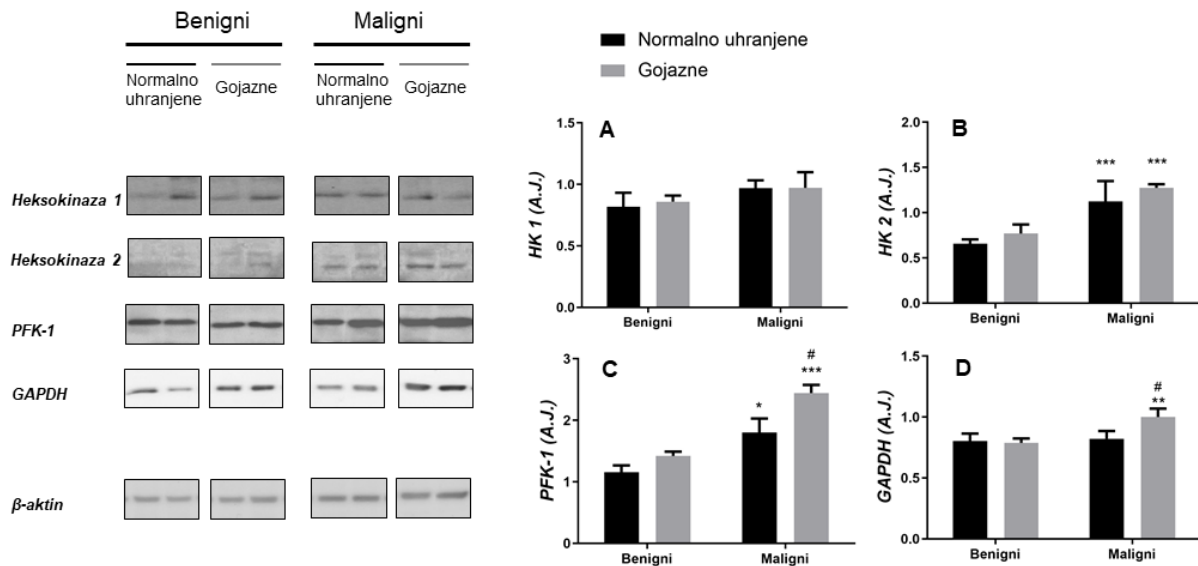


**Figura 13.** Proteinska ekspresija nukleusnog faktora-eritroid faktor 2-zavisnog faktora 2 (Nrf2) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ##  $p < 0.01$ .

### 4.3. Glikoliza u tumorskom i masnom tkivu dojke

#### 4.3.1. Proteinska ekspresija enzima glikolize u tumorskom tkivu dojke

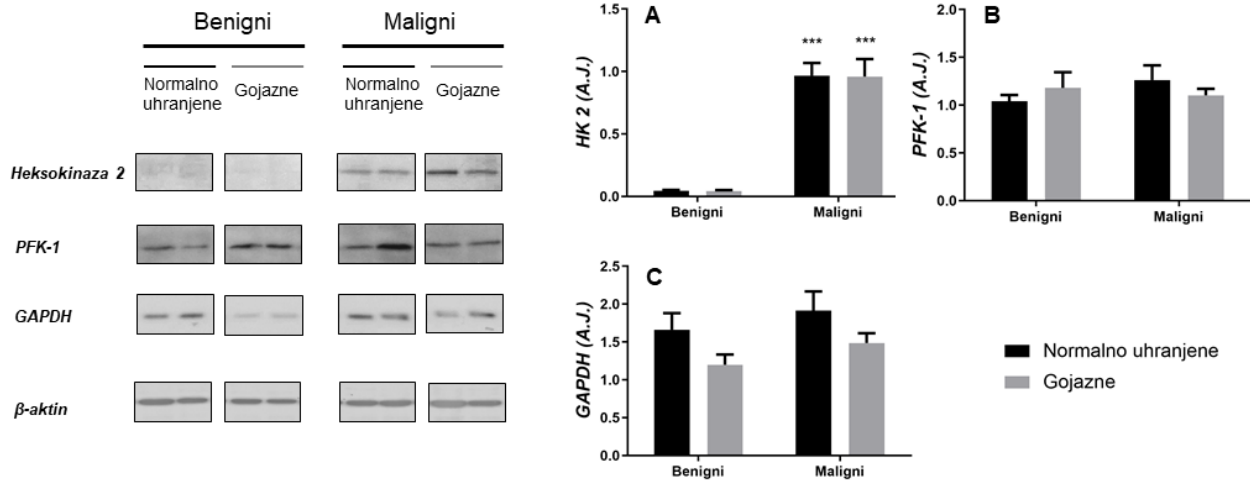
Analiza proteinske ekspresije ključnih glikolitičkih enzima ukazala je na značajno izmenjen metabolizam glukoze u malignom tumorskom tkivu, u odnosu na benigno tumorsko tkivo. Nivoi proteinske ekspresije glavnih regulatornih enzima glikolize: heksokinaze 1 i 2, fosfofruktokinaze 1 (*eng.* Phosphofruktokinase-1, PFK-1) i glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaze (*eng.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) prikazani su na Figuri 14. Heksokinaza 1 je konstitutivno eksprimirana i njena ekspresija se ne razlikuje između benignog i malignog tumorskog tkiva kod normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. Nasuprot tome, proteinska ekspresija heksokinaze 2 je veća u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, nezavisno od gojaznosti. Sličan profil proteinske ekspresije pokazan je i za PFK-1. Proteinska ekspresija PFK-1 je veća u malignom tumorskom tkivu u poređenju sa benignim tumorskim tkivom, i kod normalno uhranjenih i kod gojaznih žena, pri čemu je proteinska ekspresija u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena veća nego u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena. Proteinska ekspresija GAPDH je veća u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena, u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena i u odnosu na benigno tumorsko tkivo gojaznih žena.



**Figura 14.** Proteinska ekspresija heksokinaze 1 (A), heksokinaze 2 (B), fosfofruktokinaze 1 (PFK-1, C) i glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH, D) u benignom i malignom tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ .

#### 4.3.2. Proteinska ekspresija enzima glikolize u masnom tkivu dojke

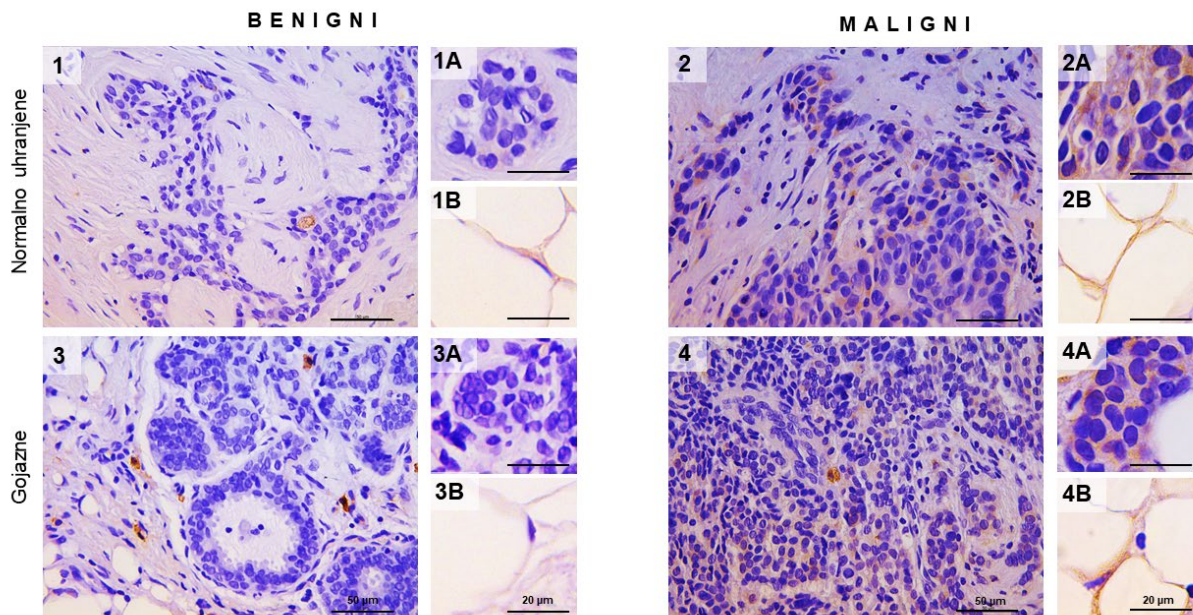
Nivoi proteinske ekspresije glavnih regulatornih enzima glikolize: heksokinaze 2, PFK-1 i GAPDH u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke prikazani su na Figuri 15. U masnom tkivu dojke premenopauzalnih žena sa malignim tumorima pokazana je izrazito veća proteinska ekspresija heksokinaze 2 u odnosu na masno tkivo dojke žena sa benignim tumorima i to nezavisno od gojaznosti. Nisu pokazane razlike u proteinskoj ekspresiji PFK-1 i GAPDH u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke.



**Figura 15.** Proteinska ekspresija heksokinaze 2 (A), fosfofruktokinaze 1 (PFK-1, B) i gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH, C) u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.3.3. Obrazac lokalizacije heksokinaze 2 u tumorskom i masnom tkivu dojke

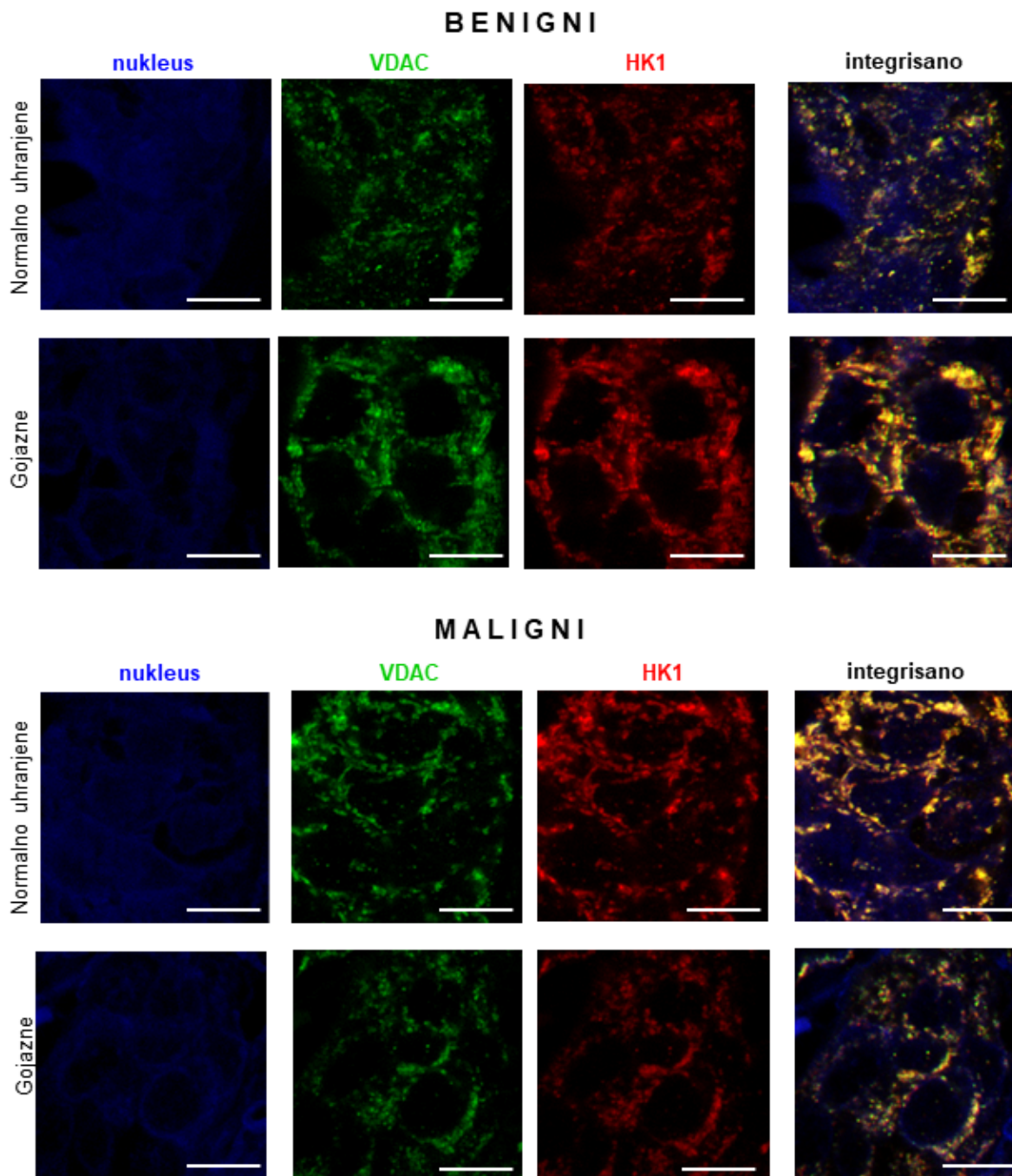
U skladu sa rezultatima dobijenim Western blotom, imunohistohemijska analiza pokazala je umeren do jak intenzitet imunopozitivnosti na heksokinazu 2 u malignom tumorskom tkivu, u odnosu na benigno tumorsko tkivo koje je pokazalo izrazito slab intenzitet imunopozitivnosti (Figura 16). Pored toga, proteinska ekspresija heksokinaze 2 je specifično lokalizovana u kancerskim ćelijama. Slično, u masnom tkivu dojke, intenzitet imunopozitivnosti na heksokinazu 2 je jači kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na respektivno masno tkivo dojke žena sa benignim tumorima. Takođe, heksokinaza 2 je specifično lokalizovana u citoplazmi adipocita.



**Figura 16.** Imunohistochemijska detekcija heksokinaze 2 na presecima tumorskog (inserti 1A, 2A, 3A, 4A) i masnog tkiva (inserti 1B, 2B, 3B, 4B) dojke normalno uhranjenih (paneli 1, 2) i gojaznih (paneli 3, 4) premenopauzalnih žena sa benignim (paneli 1, 3) i malignim (paneli 2, 4) tumorima dojke. Bar 50 µm i 20 µm.

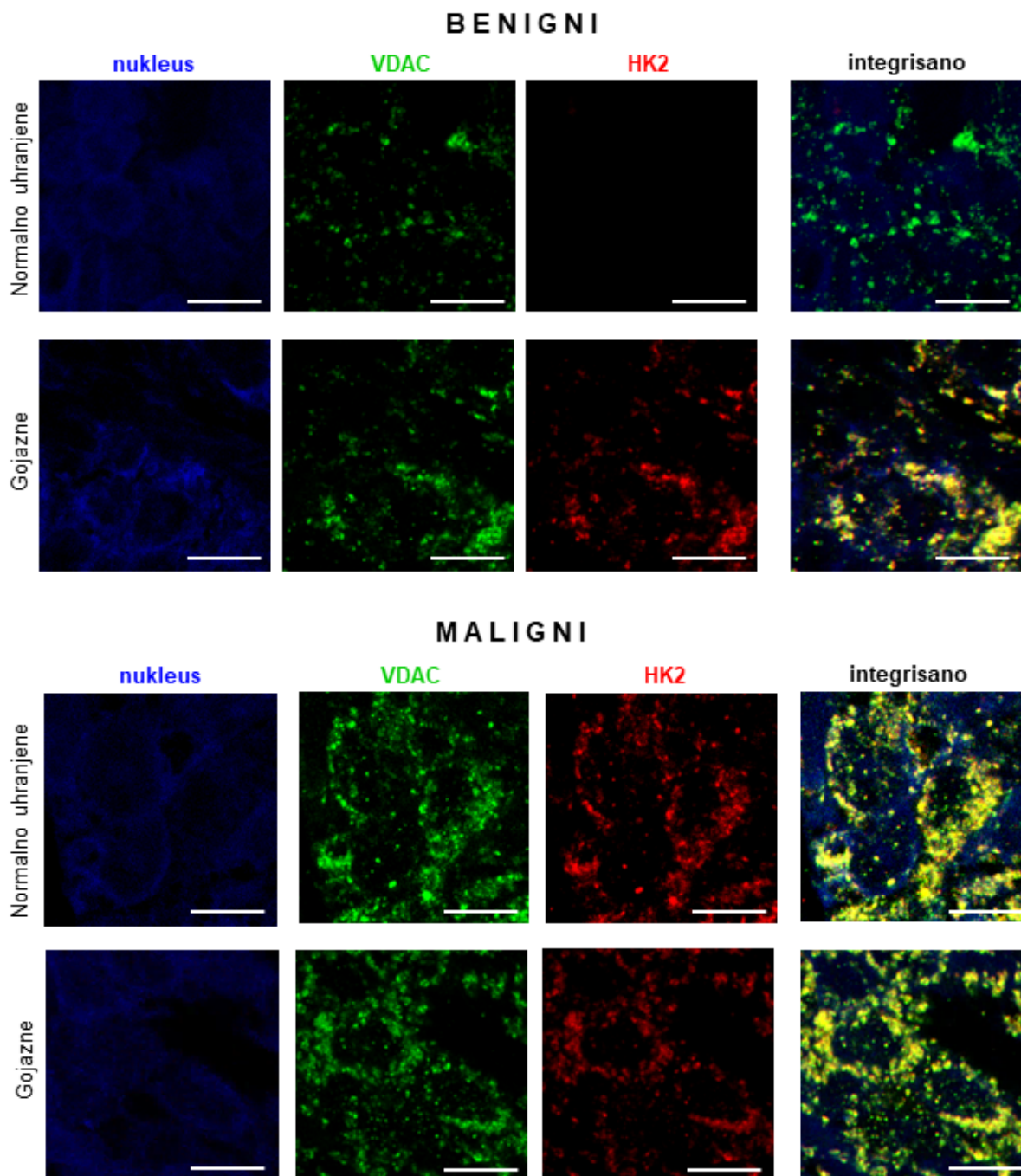
#### 4.3.4. *Obrazac unutarćelijske lokalizacije heksokinaze u tumorskom tkivu dojke*

Imunofluorescijom i konfokalnom mikroskopijom analizirani su obrasci kolokalizacije mitohondrijskog markera, voltažno zavisnog anjonskog kanala (VDAC), sa heksokinazom 1 i heksokinazom 2 kako bi se ispitala unutarćelijska lokalizacija ovih enzima (Figure 17 i 18, respektivno). Potvrđena je konstitutivna proteinska ekspresija heksokinaze 1 u tumorskim tkivima, nezavisno od maligniteta i gojaznosti, budući da se intenzitet imunofluorescentne reakcije ne razlikuje između ispitivanih grupa. Pored toga, utvrđeno je da heksokinaza 1 kolokalizuje sa VDAC, odnosno asocira sa mitohondrijama. Takođe, potvrđeni su rezultati Western blota i imunohistochemije za heksokinazu 2. Pokazano je da je intenzitet imunofluorescentne reakcije jači u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, nezavisno od gojaznosti. Pored toga, potvrđena je kolokalizacija heksokinaze 2 sa VDAC, odnosno njena asocijacija sa mitohondrijama u malignom tumorskom tkivu kod premenopauzalnih žena.



**Figura 17.** Imunofluorescentna detekcija kolokalizacije voltažno zavisnog anjonskog kanala (VDAC) i heksokinaze 1 (HK1) na presjecima tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim (gornji panel) i malignim (donji panel) tumorima dojke. Dvojno imunobojenje je prikazano na zasebnim kanalima za VDAC (zeleno) i HK1 (crveno), odnosno na integriranim kanalima koji pokazuju kolokalizaciju VDAC/HK1 (žuto). Nukleusi su obeleženi Sytox Orange bojom (plavo). Bar 10  $\mu$ m.



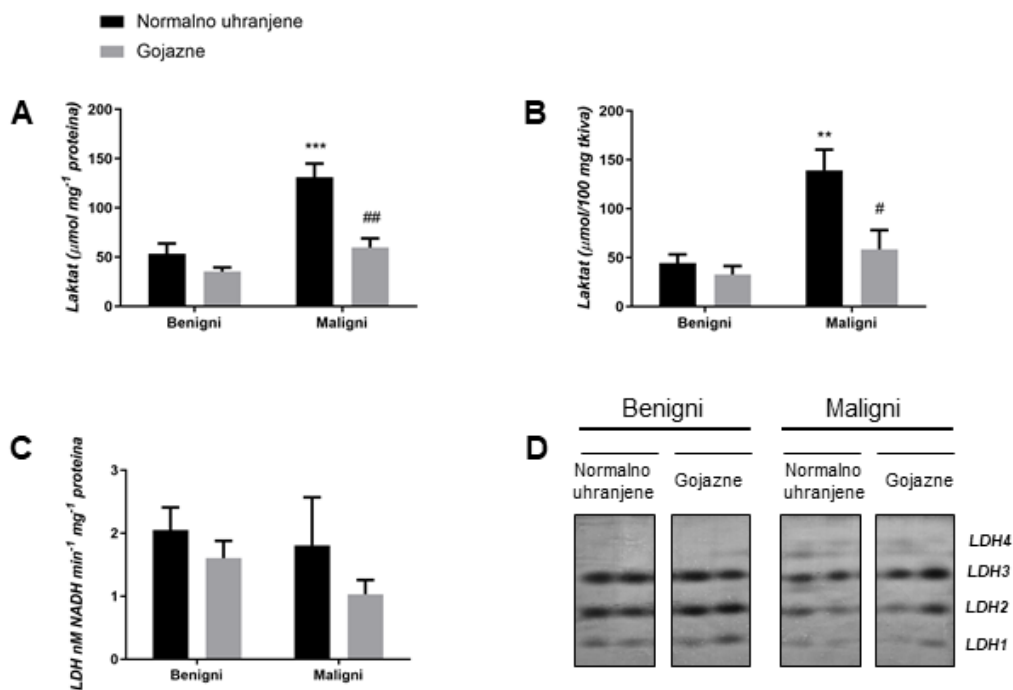


**Figura 18.** Imunofluorescentna detekcija kolokalizacije voltažno zavisnog anjonskog kanala (VDAC) i heksokinaze 2 (HK2) na presecima tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim (gornji panel) i malignim (donji panel) tumorima dojke. Dvojno imunobojenje je prikazano na zasebnim kanalima za VDAC (zeleno) i HK2 (crveno), odnosno na integrisanim kanalima koji pokazuju kolokalizaciju VDAC/HK2 (žuto). Nukleusi su obeleženi Sytox Orange bojom (plavo). Bar 10  $\mu$ m.

#### 4.4. Metabolizam laktata u tumorskom i masnom tkivu dojke

##### 4.4.1. Koncentracija laktata, aktivnost LDH i izoenzimski profil LDH u tumorskom tkivu dojke

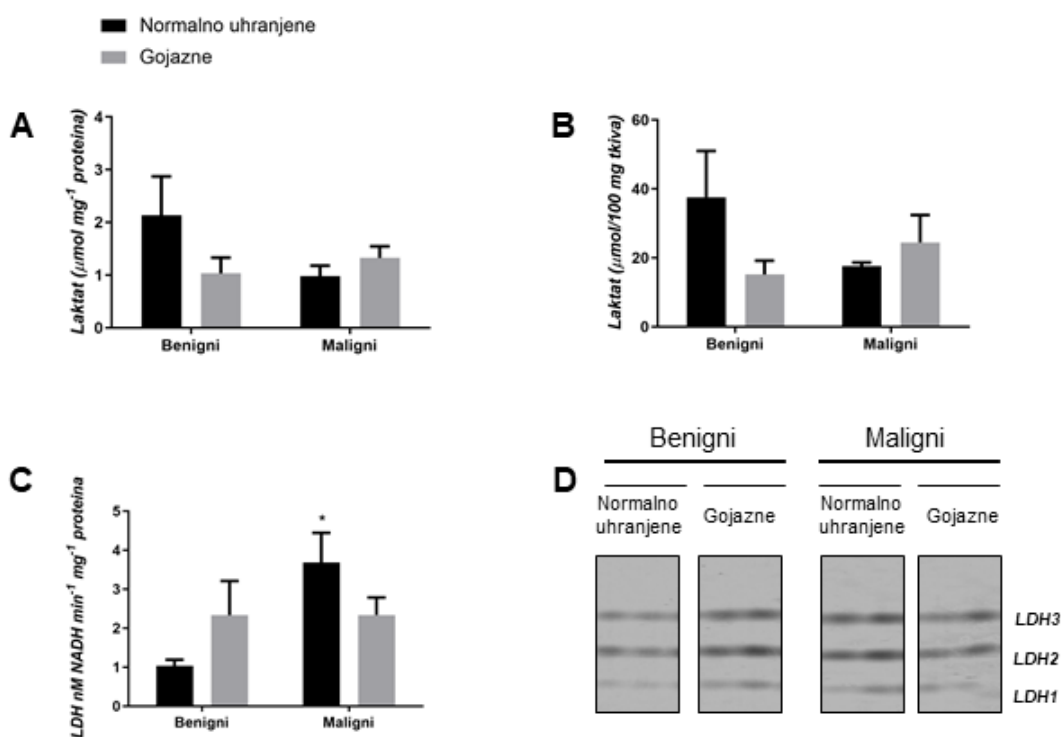
U malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena pokazana je veća koncentracija laktata u poređenju sa benignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena. U malignom tumorskom tkivu gojaznih žena, koncentracija laktata se ne razlikuje u odnosu na benigno tumorsko tkivo gojaznih žena, ali je niža u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena. Isti rezultati su dobijeni kada se koncentracija laktata izrazi u  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  proteina i na 100 mg mase tkiva (Figura 19A i Figura 19B). Iako su pokazane značajne razlike u koncentraciji laktata u malignom tumorskom tkivu između normalno uhranjenih i gojaznih žena, nisu pokazane razlike u ukupnoj aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) između normalno uhranjenih i gojaznih žena (Figura 19C). Određivanjem izoenzimskog profila laktat dehidrogenaze pokazan je isti profil distribucije (prisustvo i zastupljenost LDH1, LDH2 i LDH3) izoenzimskih formi u benignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena. Nezavisno od gojaznosti, u malignom tumorskom tkivu, detektovana je promena u distribuciji izoenzimskih formi LDH u vidu smanjenja intenziteta proteinskih traka koje odgovaraju LDH1 i LDH2 izoenzimskim formama i pojavi proteinskih traka koje odgovaraju izoenzimskoj formi LDH4 (Figura 19D).



**Figura 19.** Koncentracija laktata izražena na mg proteina (A), na 100 mg mase tkiva (B), ukupna aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) (C) i izoenzimski profil laktat dehidrogenaze (D) u benignom i malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) žena. Koncentracija laktata i aktivnost laktat dehidrogenaze su izraženi u apsolutnim jedinicama. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ .

#### 4.4.2. Koncentracija laktata, aktivnost LDH i izoenzimski profil LDH u masnom tkivu dojke

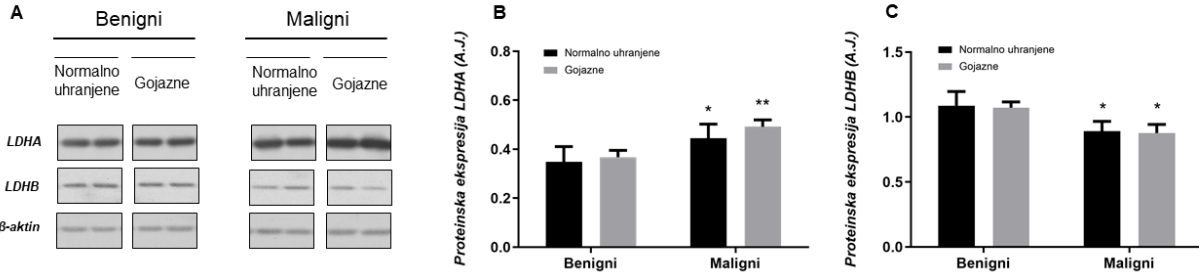
U masnom tkivu dojke, nisu detektovane razlike u koncentraciji laktata ni u odnosu na gojaznost ni u odnosu na malignitet. Isti rezultati su dobijeni kada je koncentracija laktata izražena u  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  proteina i na 100 mg mase tkiva (Figura 22A i Figura 22B). U masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima pokazana je veća ukupna aktivnost laktat dehidrogenaze u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima dojke (Figura 22C). Izoenzimski profil laktat dehidrogenaze pokazao je prisustvo tri izoenzimske forme (LDH1, LDH2 i LDH3) u svim ispitivanim grupama. Intenzitet proteinskih traka koje odgovaraju ovim izoformama je veći u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u poređenju sa masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima, što odgovara razlikama u ukupnoj aktivnosti laktat dehidrogenaze (Figura 22D).



**Figura 22.** Koncentracija laktata izražena na mg proteina (A), na 100 mg mase tkiva (B), ukupna aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) (C) i izoenzimski profil laktat dehidrogenaze (D) u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Koncentracija laktata i aktivnost laktat dehidrogenaze su izraženi u apsolutnim jedinicama. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ .

#### 4.4.3. Proteinska ekspresija LDH monomera u tumorskom tkivu dojke

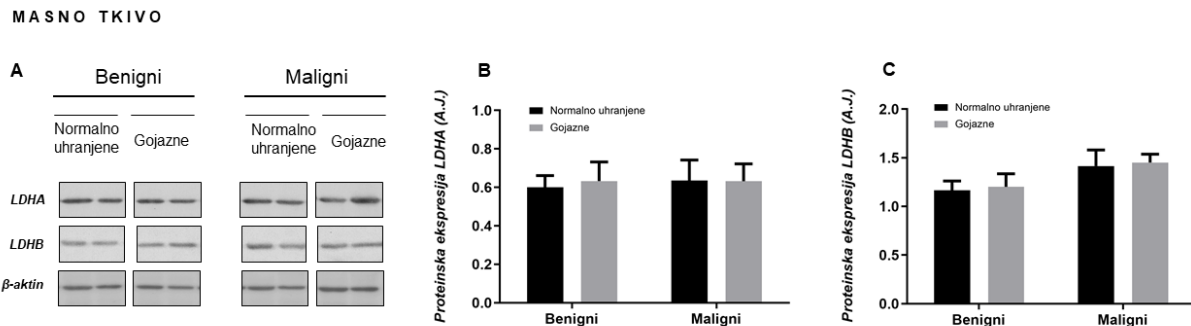
U malignom tumorskom tkivu premenopauzalnih žena, pokazana je veća proteinska ekspresija LDHA (Figura 20B) i manja proteinska ekspresija LDHB (Figura 20C) u poređenju sa benignim tumorskim tkivom, nezavisno od gojaznosti. Ovakva proteinska ekspresija LDHA i LDHB monomera odgovara dobijenom izoenzimskom profilu, gde je detektovano smanjenje zastupljenosti LDH1 i LDH2 i povećanje zastupljenosti LDH4.



**Figura 20.** Proteinska ekspresija monomera laktat dehidrogenaze LDHA (A, B) i LDHB (A, C) u benignom i malignom tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.4.4. Proteinska ekspresija LDH monomera u masnom tkivu dojke

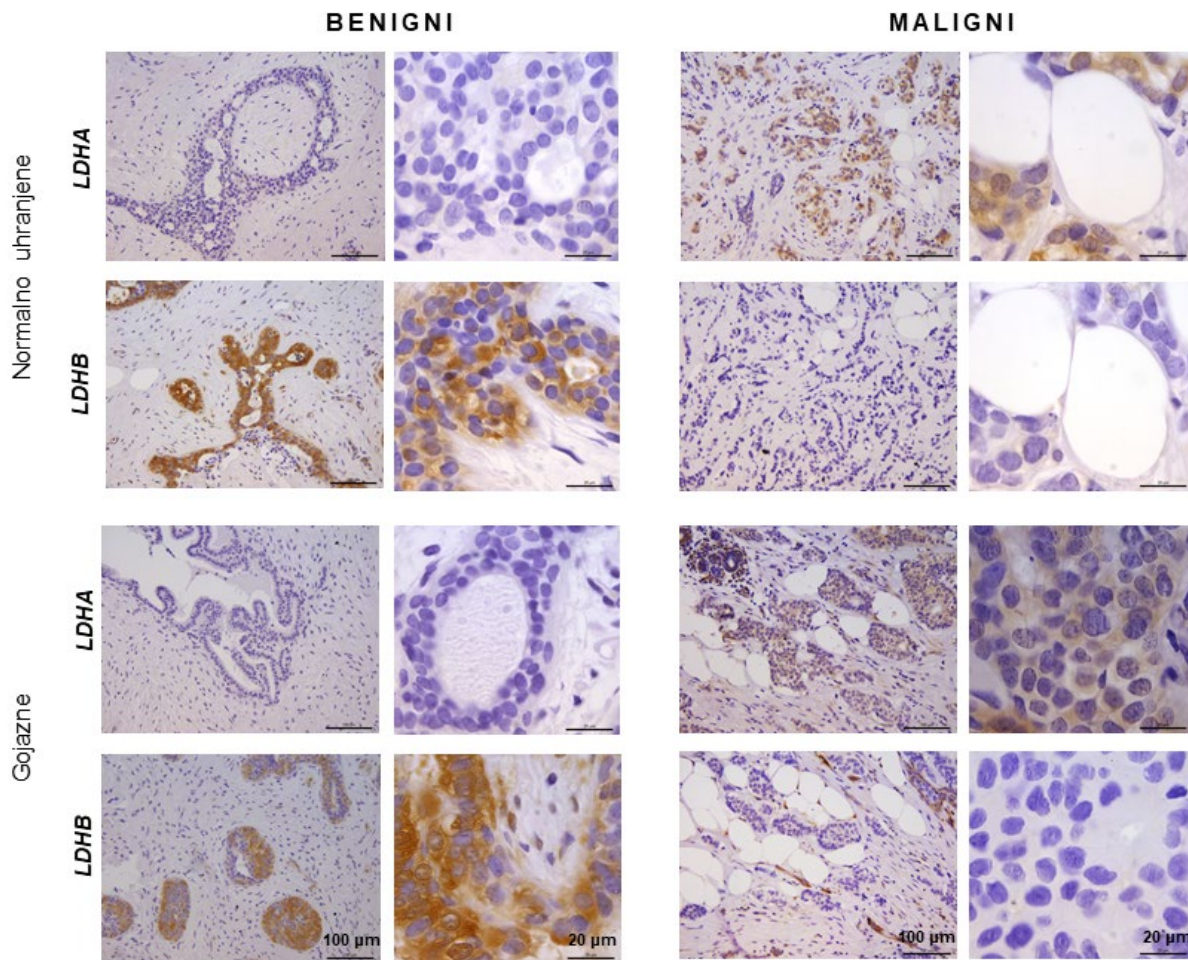
U masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke nisu pronađene razlike u proteinskoj ekspresiji monomera LDH (Figura 23).



**Figura 23.** Proteinska ekspresija monomera laktat dehidrogenaze, LDHA (A, B) i LDHB (A, C) u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M.

#### 4.4.5. Obrazac lokalizacije LDHA i LDHB u tumorskom tkivu dojke

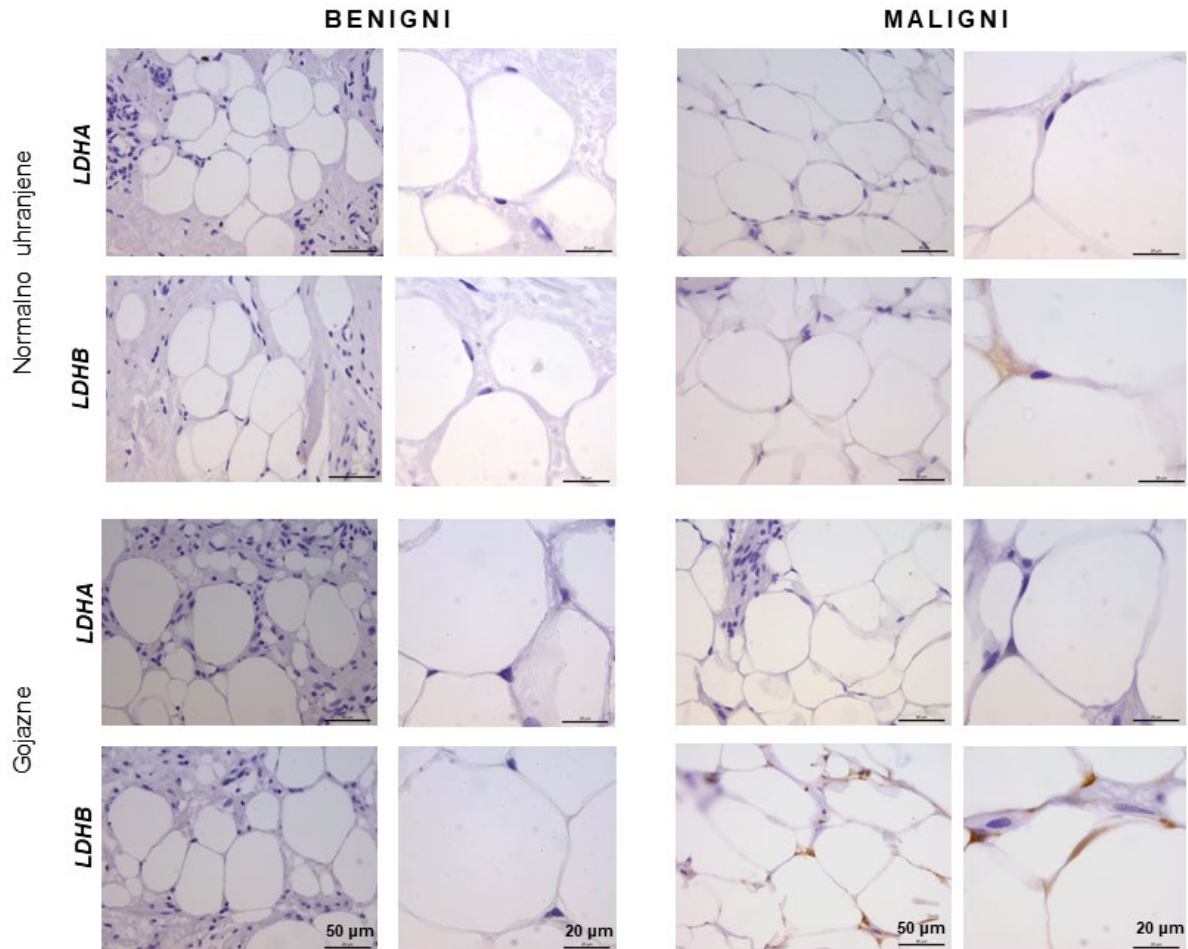
Imunohistohemijomskom detekcijom potvrđeno je da promene u ekspresiji LDHA i LDHB monomera dobijene Western blotom specifično odgovaraju promenama u proteinskoj ekspresiji u epitelnim, odnosno kancerskim ćelijama dojke. Naime, potvrđeno je prisustvo i pokazan je visok stepen imunopozitivnosti na LDHA u citoplazmi kancerskih ćelija, dok je intenzitet imunopozitivne reakcije u epitelnim ćelijama benignog tumorskog tkiva izuzetno slab. Sa druge strane, u citoplazmi epitelnih ćelija benignih tumora potvrđeno je prisustvo i pokazan je izuzetno visok stepen imunopozitivnosti na LDHB, dok je intenzitet imunopozitivne reakcije u kancerskim ćelijama izuzetno slab (Figura 21).



**Figura 21.** Imunohistochemijska detekcija laktat dehidrogenaze A (LDHA) i laktat dehidrogenaze B (LDHB) na preseccima benignog i malignog tumorskog tkiva normalno uhranjenih i gojaznih žena. Bar 100 μm i 20 μm.

#### 4.4.6. Obrazac lokalizacije LDHA i LDHB u masnom tkivu dojke

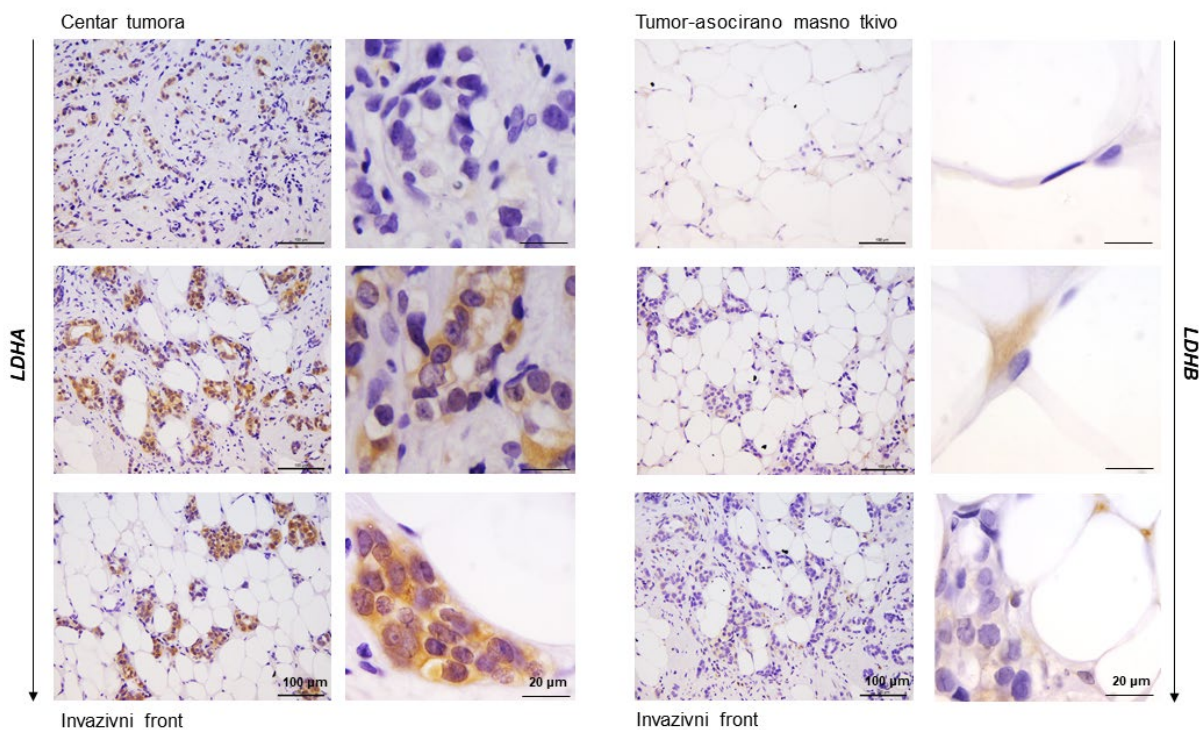
Imunohistohemijskom detekcijom monomera LDH nije detektovana imunopozitivnost adipocita na LDHA u ispitivanim grupama. Sa druge strane, potvrđeno je prisustvo i jak intenzitet imunopozitivne reakcije na LDHB u citoplazmi adipocita u masnom tkivu dojke kod normalno uhranjenih i gojaznih žena sa malignim tumorima. U citoplazmi adipocita u masnom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim tumorima nije detektovana imunopozitivnost na LDHB (Figura 24).



**Figura 24.** Imunohistohemijska detekcija laktat dehidrogenaze A (LDHA) i laktat dehidrogenaze B (LDHB) na preseccima masnog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Bar 50 µm i 20 µm.

#### 4.4.7. Obrazac lokalizacije LDHA u kancerskim ćelijama i LDHB u adipocitima u malignom tumorskom tkivu dojke

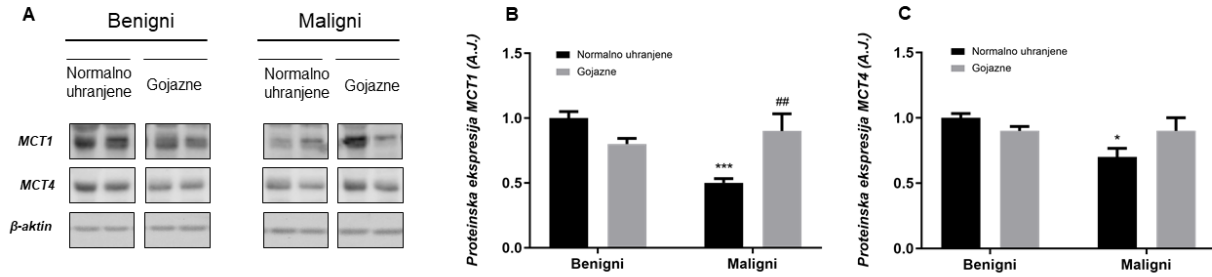
Imunohistohemijom detekcijom LDHA i LDHB uočena je izrazita razlika u ćelijskoj lokalizaciji monomera laktat dehidrogenaze između kancerskih ćelija i adipocita (Figura 25). Naime, imunopozitivna reakcija na LDHA je zapažena u citoplazmi kancerskih ćelija, dok se intenzitet imunopozitivne reakcije i broj imunopozitivnih kancerskih ćelija postepeno povećava od centra tumorske mase ka invazivnom frontu tumora. Nasuprot tome, imunopozitivna reakcija na LDHB je zapažena u citoplazmi adipocita, dok se intenzitet imunopozitivne reakcije i broj imunopozitivnih ćelija postepeno povećava od udaljenog tumor-asociranog masnog tkiva ka invazivnom frontu tumora.



**Figura 25.** Imunohistohemijom detekcija laktat dehidrogenaze A (LDHA) i laktat dehidrogenaze B (LDHB) u centru tumorske mase, invazivnom frontu tumora i udaljenom tumor-asociranom masnom tkivu u malignom tumorskom tkivu dojke. Bar 100 μm i 20 μm.

#### 4.4.8. Proteinska ekspresija MCT1 i MCT4 u tumorskom tkivu dojke

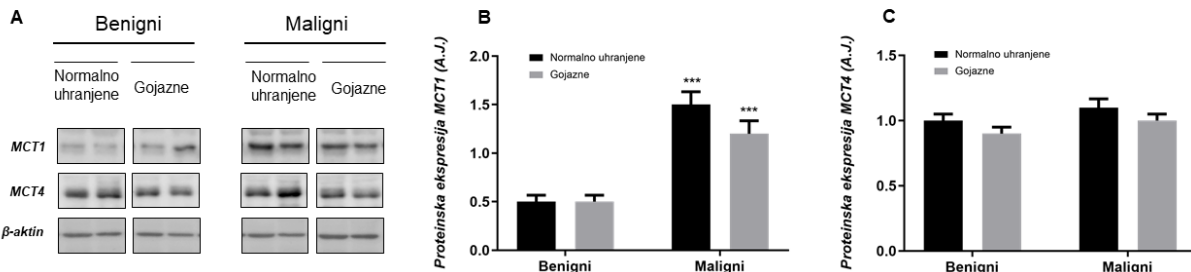
U malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih premenopauzalnih žena pokazana je manja proteinska ekspresija monokarboksilatnog transportera 1 (MCT1) (Figura 26B) i monokarboksilatnog transportera 4 (MCT4) (Figura 26C) u odnosu na respektivnu grupu normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. U malignom tumorskom tkivu gojaznih žena, proteinska ekspresija MCT1 je veća u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena i nepromenjena u odnosu na benigno tumorsko tkivo gojaznih žena (Figura 26B).



**Figura 26.** Proteinska ekspresija monokarboksilatnog transportera 1 (MCT1; A, B) i monokarboksilatnog transportera 4 (MCT4; A, C) u benignom i malignom tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ##  $p < 0.01$ .

#### 4.4.9. Proteinska ekspresija MCT1 i MCT4 u masnom tkivu dojke

U masnom tkivu premenopauzalnih žena sa malignim tumorima pokazana je veća proteinska ekspresija MCT1 nezavisno od gojaznosti (Figura 27B), dok nisu pronađene razlike u proteinskoj ekspresiji MCT4 između ispitivanih grupa (Figura 27C).

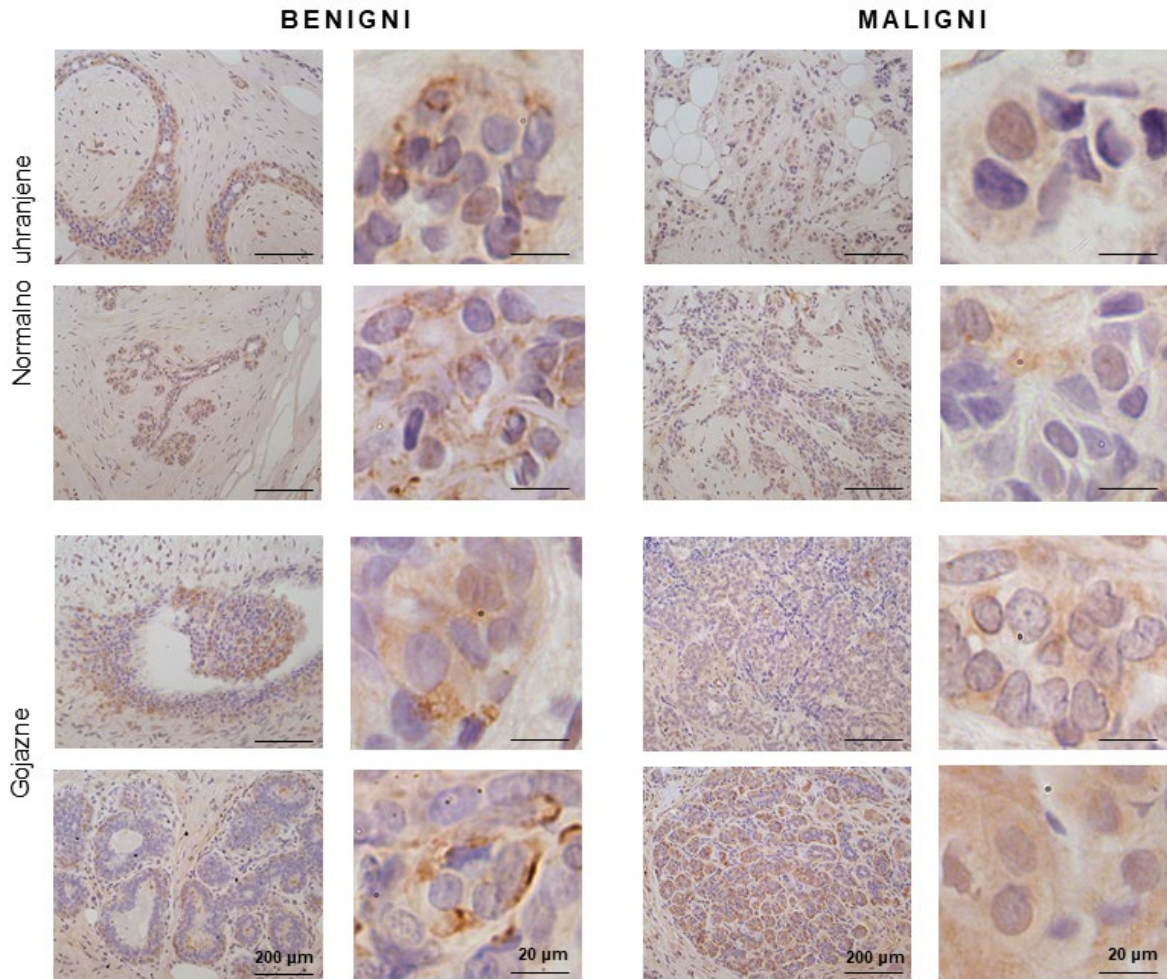


**Figura 27.** Proteinska ekspresija monokarboksilatnog transportera 1 (MCT1; A, B) i monokarboksilatnog transportera 4 (MCT4; A, C) u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*\*  $p < 0.001$ .



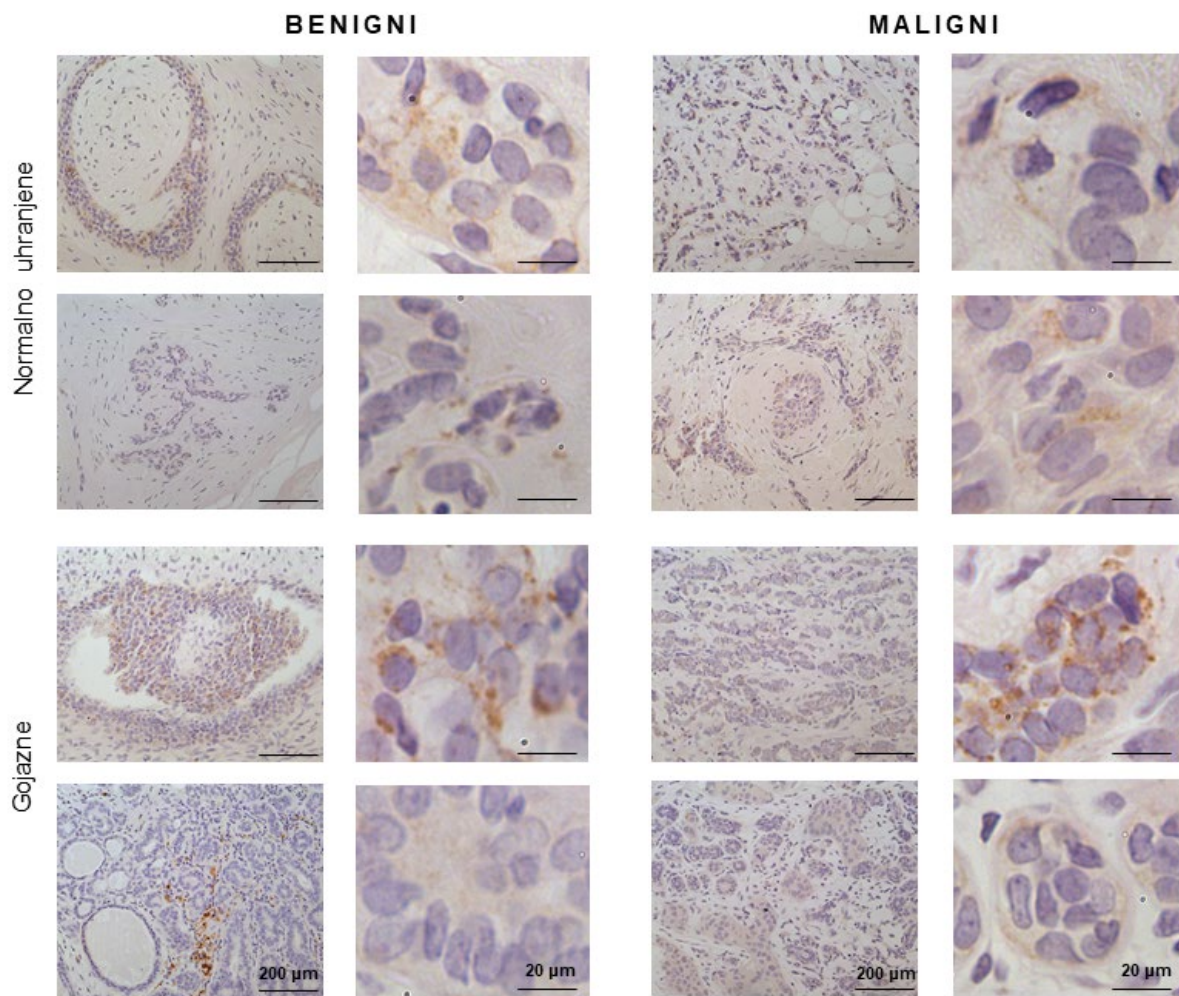
#### 4.4.10. Obrazac lokalizacije MCT1 i MCT4 u tumorskom tkivu dojke

Imunohistohemijskom detekcijom je potvrđeno prisustvo MCT1 i MCT4 u epitelnim ćelijama benignih tumora, odnosno kancerskim ćelijama malignih tumora. U benignom tumorskom tkivu, epitelne ćelije pokazuju granulisani tip imunopozitivne reakcije na MCT1 u citoplazmi i na membrani epitelnih ćelija. Intenzitet imunopozitivne reakcije je slab do umeren u citoplazmi i umeren do jak na membrani epitelnih ćelija (Figura 28). Slično, intenzitet imunopozitivne reakcije na MCT4 je slab do umeren u epitelnim ćelijama benignih tumora, dok granulisani tip imunopozitivne reakcije ukazuje na membransku, ali i mitohondrijsku lokalizaciju (Figura 29).



**Figura 28.** Imunohistohemijska detekcija monokarboksilatnog transportera 1 na presecima benignog i malignog tumorskog tkiva normalno uhranjenih i gojaznih žena. Bar 200 μm i 20 μm.

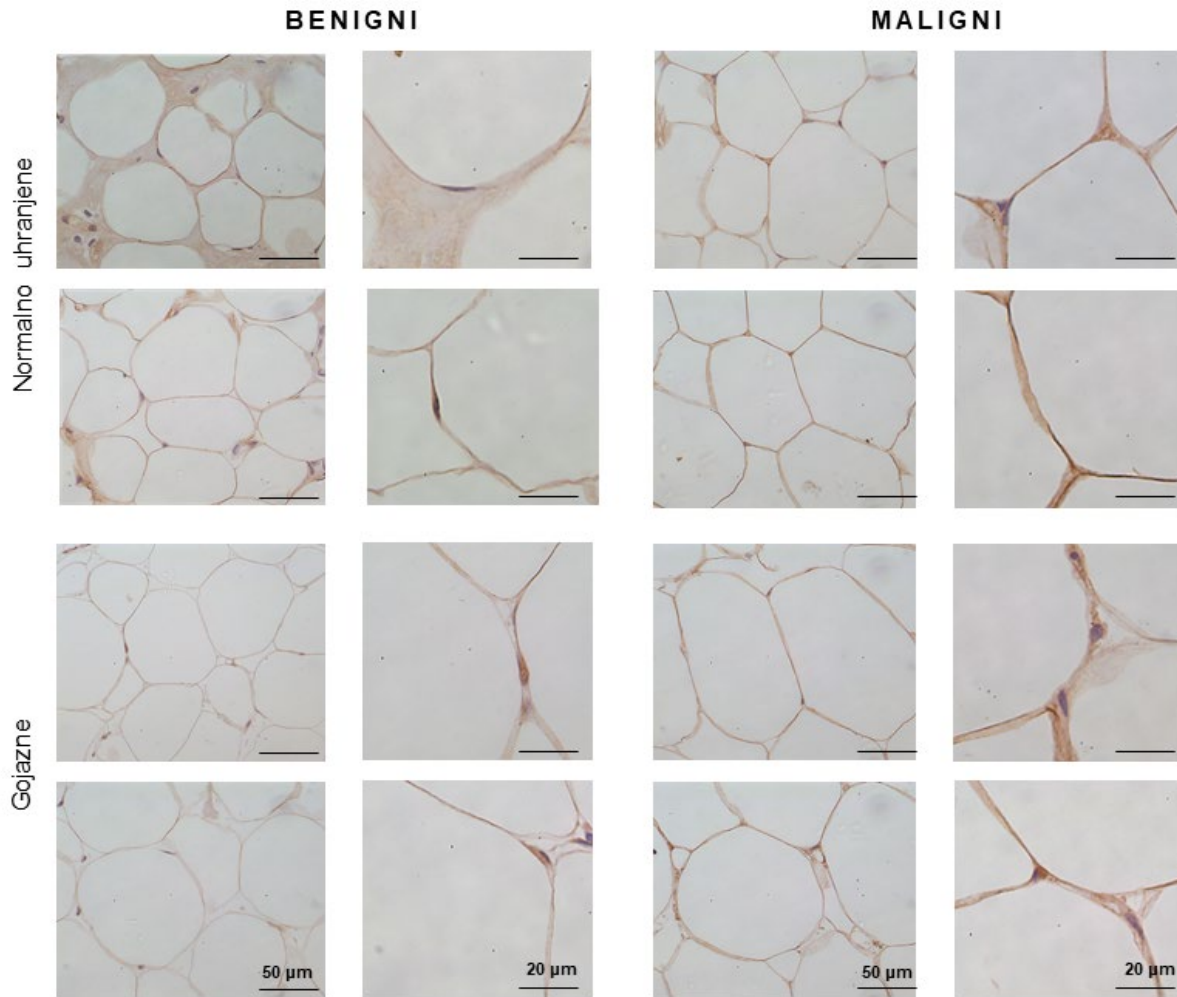
U malignom tumorskom tkivu, intenzitet imunopozitivne reakcije na MCT1 je takođe slab do umeren u citoplazmi kancerskih ćelija, ali nije zabeležena karakteristična imunopozitivna reakcija na membrani kancerskih ćelija. Zabeležena je imunopozitivna reakcija u nukleusima u malom broju kancerskih ćelija. Zabeleženo je i prisustvo imunopozitivne reakcije na MCT4 u kancerskim ćelijama u malignim tumorima dojke, dok granulisan tip imunopozitivne reakcije ukazuje na membransku, odnosno mitohondrijsku lokalizaciju.



**Figura 29.** Imunohistohemijaska detekcija monokarboksilatnog transportera 4 na presecima benignog i malignog tumorskog tkiva normalno uhranjenih i gojaznih žena. Bar 200 µm i 20 µm.

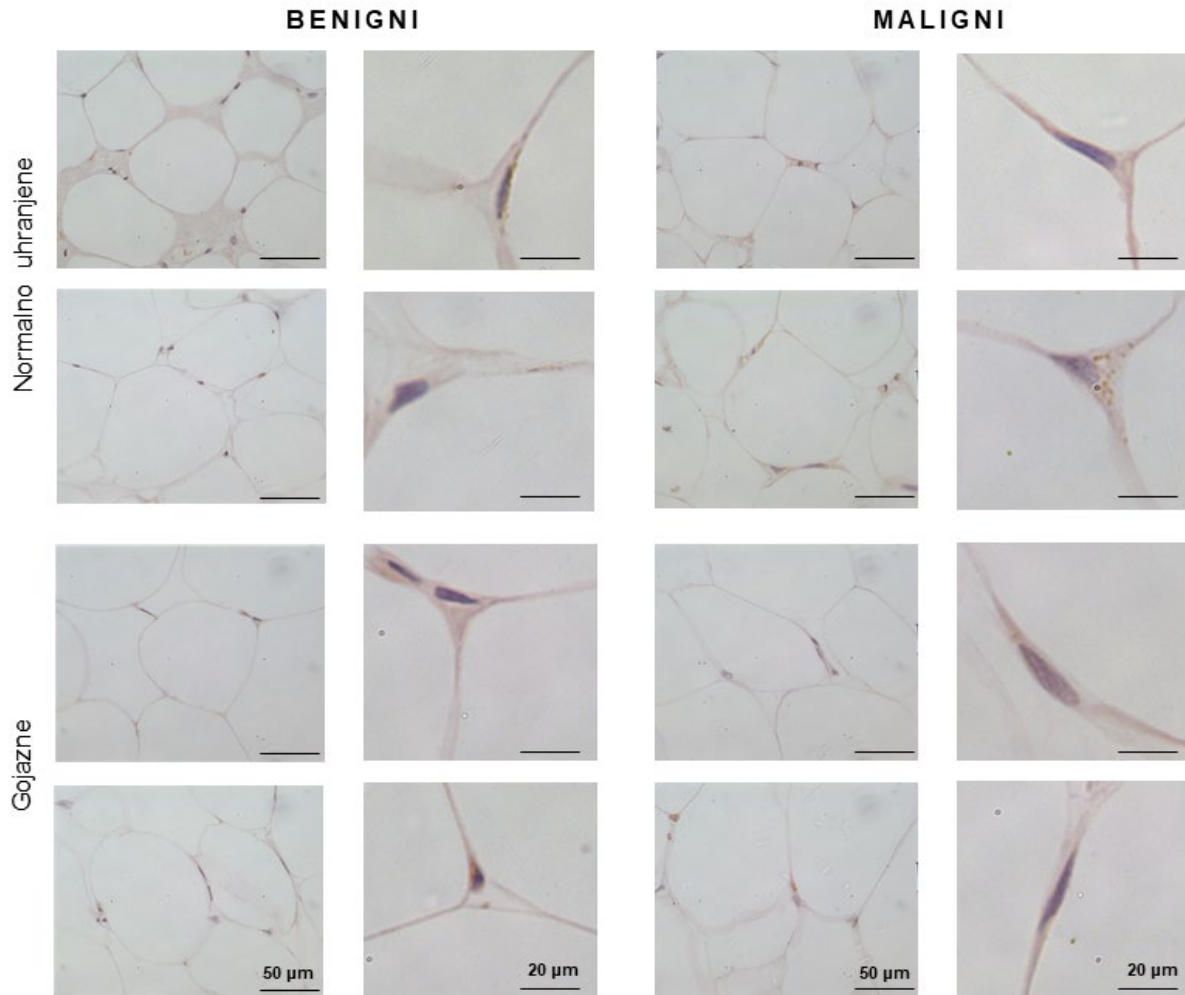
#### 4.4.11. Obrazac lokalizacije MCT1 i MCT4 u masnom tkivu dojke

Imunohistohemijom je potvrđeno prisustvo MCT1 i MCT4 u adipocitima masnog tkiva dojke premenopauzalnih žena sa benignim, odnosno malignim tumorom dojke. Imunopozitivna reakcija na MCT1 je zabeležena na membrani adipocita, slabog intenziteta u masnom tkivu žena sa benignim tumorima i umerenog do jakog intenziteta u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima (Figura 30).



**Figura 30.** Imunohistohemijom je potvrđeno prisustvo MCT1 i MCT4 u adipocitima masnog tkiva dojke premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Bar 50 μm i 20 μm.

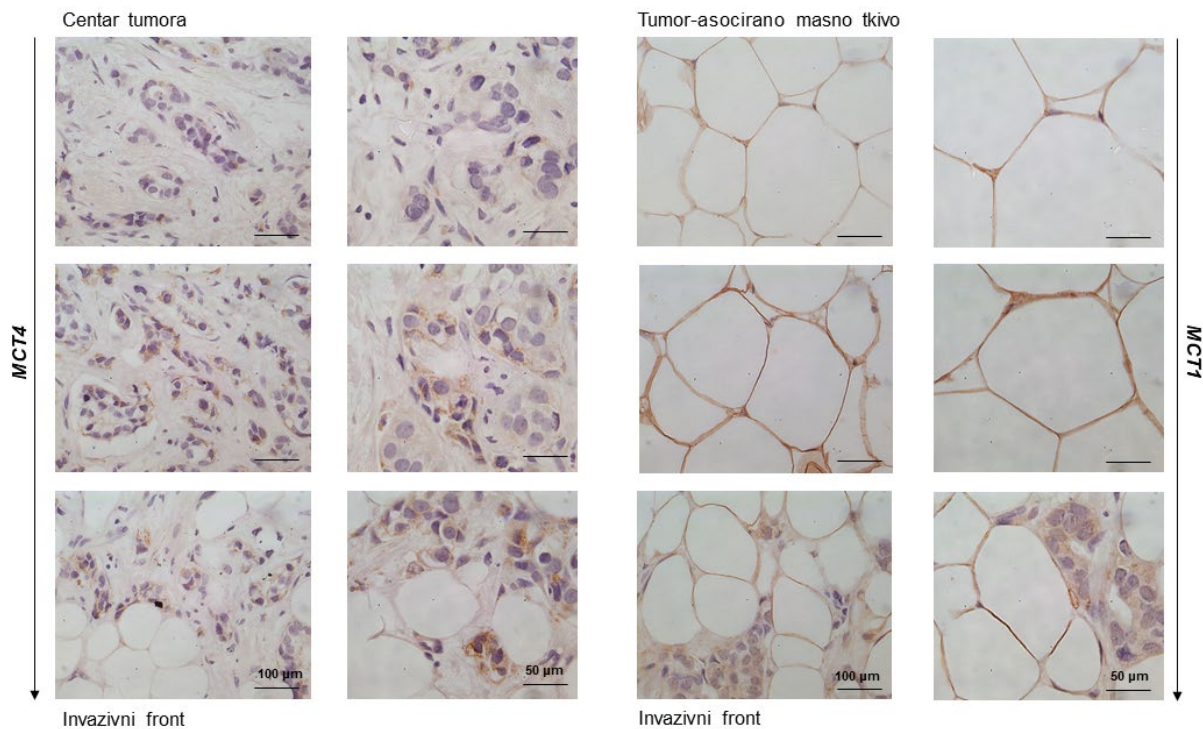
U svim ispitivanim grupama, nezavisno od maligniteta i gojaznosti, zabeležena je slaba imunopozitivna reakcija na MCT4 u perinukleusom regionu adipocita, koja ukazuje na membransku i mitohondrijsku lokalizaciju (Figura 31).



**Figura 31.** Imunohistohemijska detekcija monokarboksilatnog transportera 4 na presecima masnog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Bar 50  $\mu\text{m}$  i 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.12. Obrazac lokalizacije MCT4 u kancerskim ćelijama i MCT1 u adipocitima u malignom tumorskom tkivu dojke

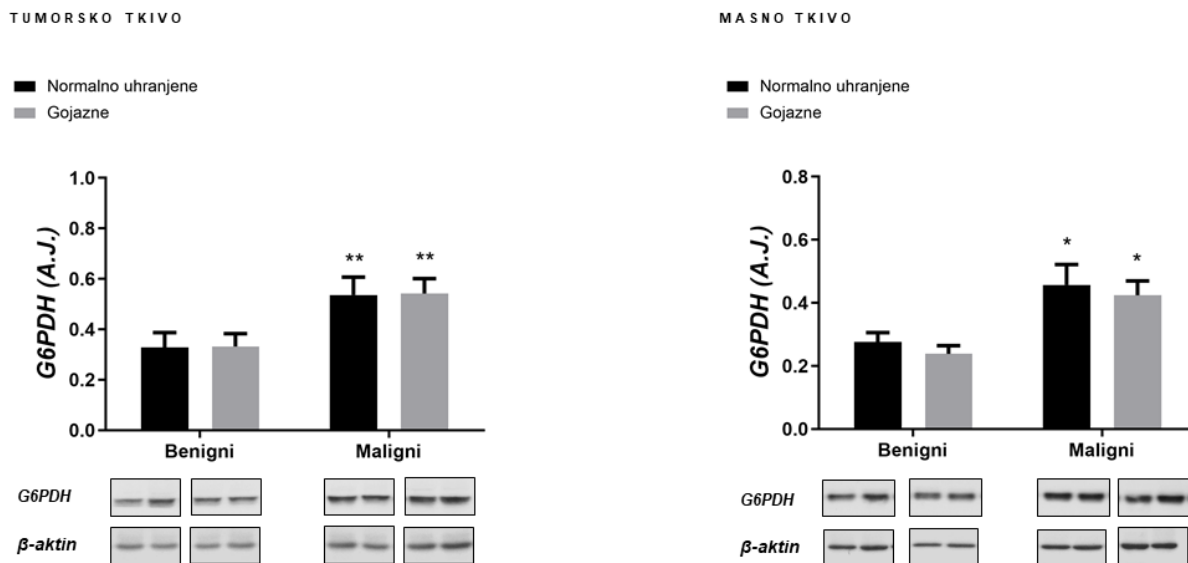
Imunohistohemijskom detekcijom monokarboksilatnih transportera MCT1 i MCT4 uočene su razlike u ćelijskoj lokalizaciji između kancerskih ćelija i adipocita (Figura 32). Intenzitet imunopozitivne reakcije na MCT4 u kancerskim ćelijama i broj imunopozitivnih ćelija se postepeno povećava od centra tumorske mase do invazivnog fronta tumora. Nasuprot tome, intenzitet imunopozitivne reakcije na MCT1 u adipocitima se postepeno povećava od udaljenog tumor-asociranog masnog tkiva do invazivnog fronta tumora.



**Figura 32.** Imunohistohemijska detekcija monokarboksilatnog transportera 1 (MCT1) i monokarboksilatnog transportera 4 (MCT4) u centru tumorske mase, invazivnom frontu tumora i udaljenom tumor-asociranom masnom tkivu u malignom tumorskom tkivu dojke. Bar 100 µm i 20 µm.

#### 4.5. Pentozofosfatni put u tumorskom i masnom tkivu dojke

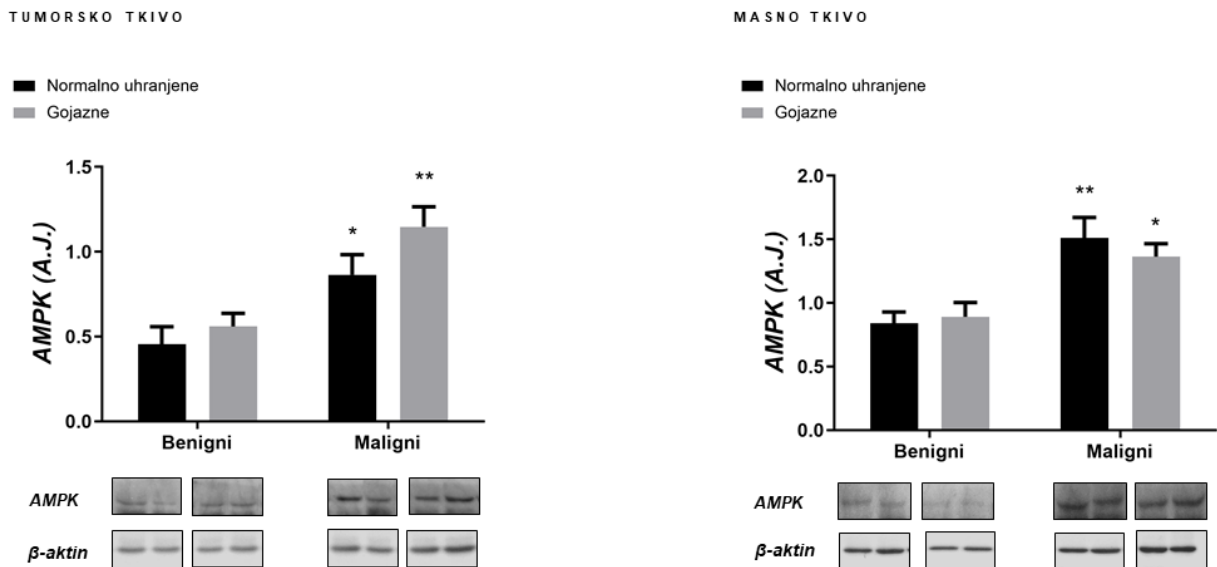
Pentozofosfatni put je ispitivan analizom proteinske ekspresije glukoze-6-fosfat dehidrogenaze (G6PDH), prvog i glavnog regulatornog enzima ovog metaboličkog puta (Figura 33). Proteinska ekspresija G6PDH je veća u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo i kod normalno uhranjenih i kod gojaznih žena. U masnom tkivu dojke, proteinska ekspresija G6PDH je veća u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima, u odnosu na masno tkivo dojke žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti.



**Figura 33.** Proteinska ekspresija glukoze-6-fosfat dehidrogenaze (G6PDH) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.6. Proteinska ekspresija AMPK u tumorskom i masnom tkivu dojke

Proteinska ekspresija AMPK je veća u malignom tumorskom tkivu dojke u odnosu na benigno tumorsko tkivo dojke, nezavisno od gojaznosti. Isti profil je pokazan i u masnom tkivu dojke, gde je proteinska ekspresija AMPK veća u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo dojke žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti (Figura 34).

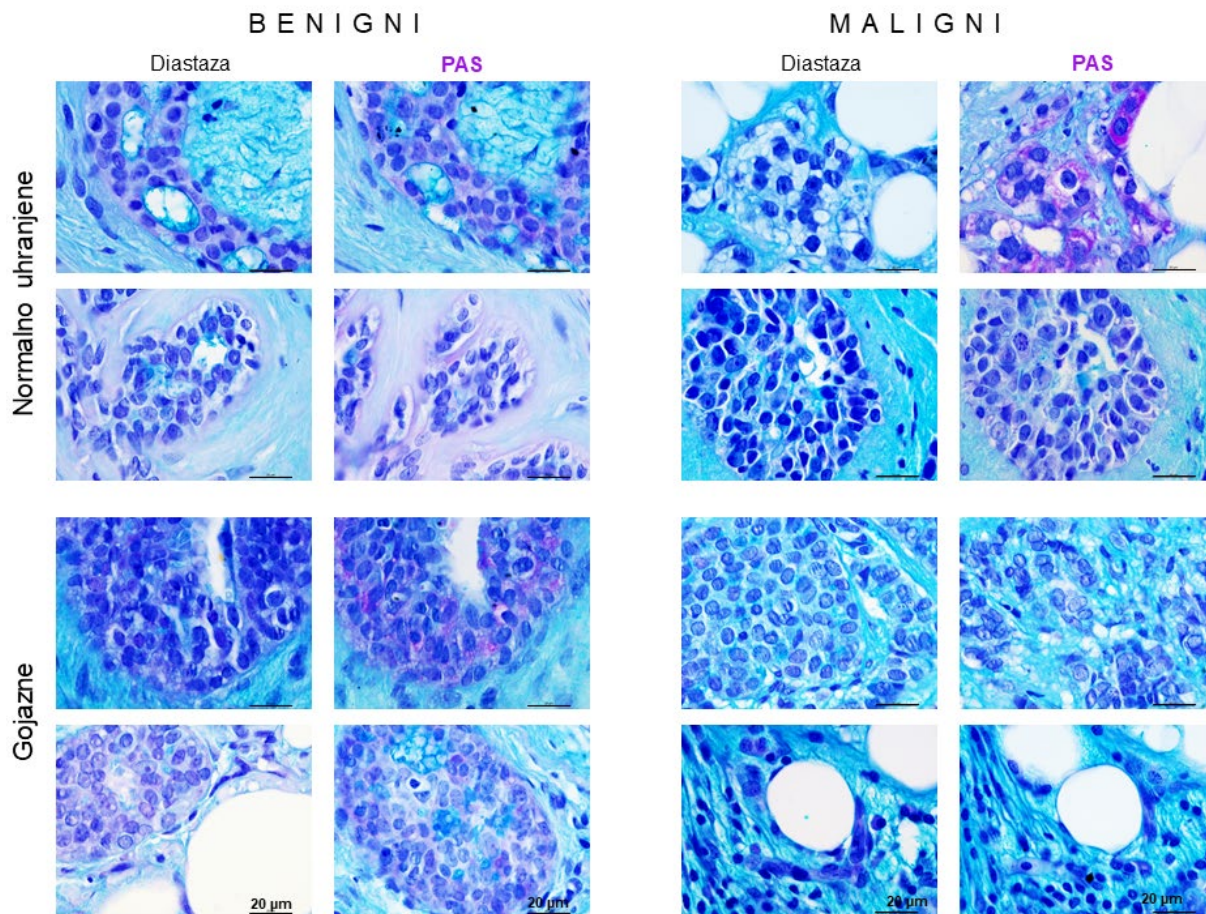


**Figura 34.** Proteinska ekspresija AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

## 4.7. Metabolizam glikogena u tumorskom i masnom tkivu dojke

### 4.7.1. Sadržaj glikogena u tumorskom tkivu dojke

Sadržaj i ćelijska lokalizacija glikogena su analizirani Šifovim bojenjem, kojim se kiseli mucini boje plavom, a neutralni mucini i glikogen ljubičastom bojom (Figura 35). Slaba do umerena reakcija na glikogen je uočena u benignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena, pri čemu je glikogen predominantno lokalizovan u citoplazmi epitelnih ćelija dojke. U malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena uočena je izuzetno izražena citoplazmatska reakcija na glikogen u kancerskim ćelijama, dok u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena nisu uočene prominentne depozicije glikogena.

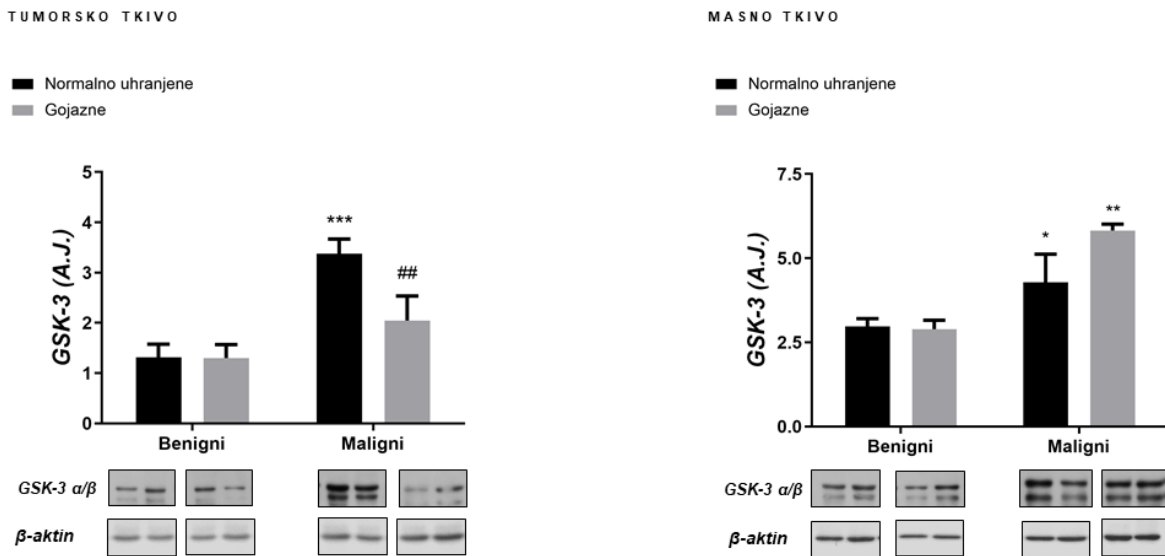


**Figura 35.** Šifovo bojenje glikogena na presecima tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Za svaki uzorak Šifovo bojenje je prikazano pored serijskog preseka koji je pretretiran dijastazom, enzimom koji katalizuje hidrolizu glikogena. Bar 20 µm.



#### 4.7.2. Proteinska ekspresija GSK-3 u tumorskom i masnom tkivu dojke

Razlike u proteinskoj ekspresiji kinaze glikogen sintaze 3 (GSK-3) u tumorskom i masnom tkivu dojke su prikazane na Figuri 36. Proteinska ekspresija GSK-3 je veća u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena u odnosu na benigno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena. Takođe, proteinska ekspresija GSK-3 je manja u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena, dok se ne razlikuje u odnosu na benigno tumorsko tkivo gojaznih žena. U masnom tkivu dojke, proteinska ekspresija GSK-3 je veća kod žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo kod žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti.



**Figura 36.** Proteinska ekspresija kinaze glikogen sintaze 3 (GSK-3) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopausalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ##  $p < 0.01$ .

## 4.8. Oksidativna dekarboksilacija piruvata u tumorskom i masnom tkivu dojke

### 4.8.1. Proteinska ekspresija PDH u tumorskom i masnom tkivu dojke

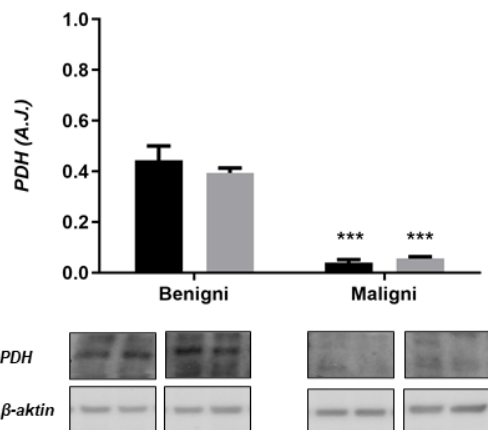
Proteinska ekspresija piruvat dehidrogenaze (PDH) prikazana je na Figuri 37. U tumorskom i masnom tkivu dojke, pokazani su suprotni trendovi u proteinskoj ekspresiji PDH. Proteinska ekspresija PDH je niža u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo dojke, nezavisno od gojaznosti. Nasuprot tome, proteinska ekspresija PDH u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima dojke je veća u odnosu na masno tkivo dojke žena sa benignim tumorima dojke. Iako je proteinska ekspresija PDH značajno veća u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima, istovremeno je umereno manja u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima.

### 4.8.2. Proteinska ekspresija PDK4 u tumorskom i masnom tkivu dojke

Razlike u proteinskoj ekspresiji kinaze piruvat dehidrogenaze 4 (PDK4) u tumorskom i masnom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke su prikazane na Figuri 38. U tumorskom tkivu dojke, proteinska ekspresija PDK4 je manja u malignom tumorskom tkivu dojke u poređenju sa benignim tumorskim tkivom, nezavisno od gojaznosti. U masnom tkivu dojke, proteinska ekspresija PDK4 je viša u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Takođe, proteinska ekspresija PDK4 je manja u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima dojke, dok se ne razlikuje u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima.

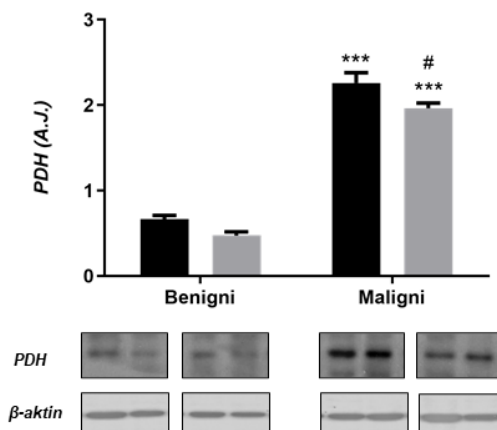
## TUMORSKO TKIVO

■ Normalno uhranjene  
■ Gojazne



## MASNO TKIVO

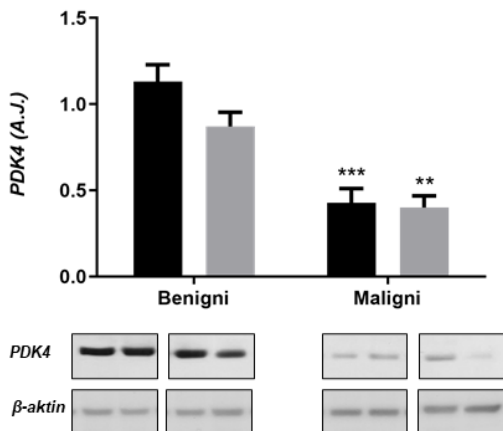
■ Normalno uhranjene  
■ Gojazne



**Figura 37.** Proteinska ekspresija piruvat dehidrogenaze (PDH) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ .

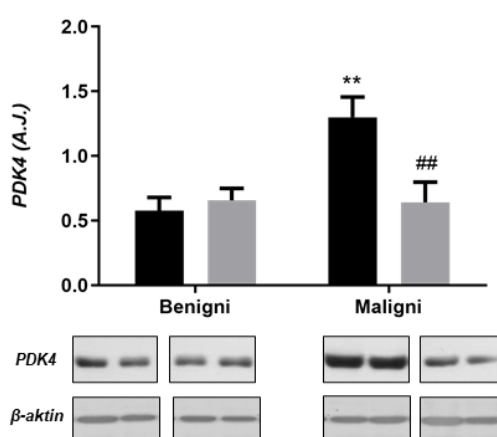
## TUMORSKO TKIVO

■ Normalno uhranjene  
■ Gojazne



## MASNO TKIVO

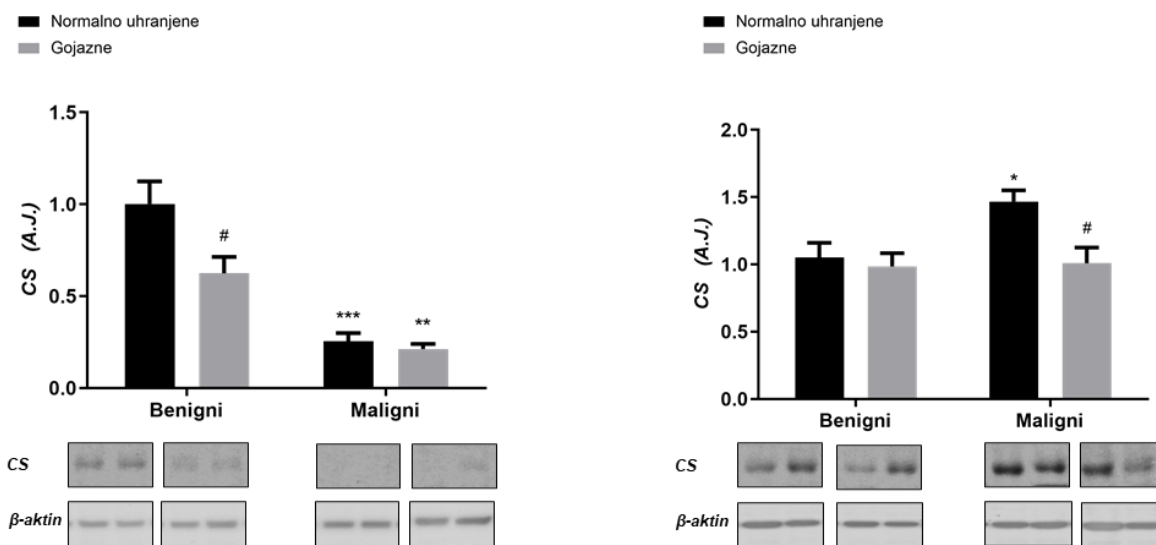
■ Normalno uhranjene  
■ Gojazne



**Figura 38.** Proteinska ekspresija kinaze piruvat dehidrogenaze 4 (PDK4) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ##  $p < 0.01$ .

#### 4.9. Proteinska ekspresija citrat sintaze u tumorskom i masnom tkivu dojke

Razlike u proteinskoj ekspresiji citrat sintaze (CS) su prikazane na Figuri 39. Proteinska ekspresija CS je manja u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, nezavisno od gojaznosti. Pored toga, proteinska ekspresija CS je niža u benignom tumorskom tkivu gojaznih žena u odnosu na benigno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena. U masnom tkivu dojke, proteinska ekspresija CS je veća kod normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na normalno uhranjene žene sa benignim tumorima. Takođe, proteinska ekspresija CS u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima je manja u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima, dok se ne razlikuje u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima.

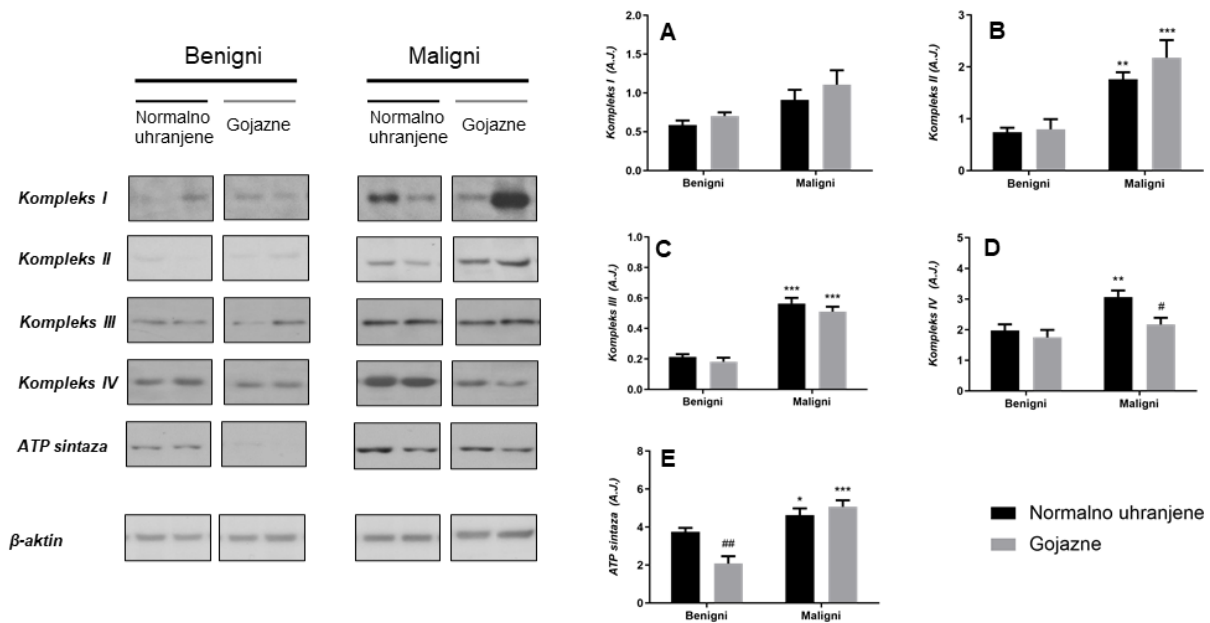


**Figura 39.** Proteinska ekspresija citrat sintaze (CS) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ .

## 4.10. Oksidativna fosforilacija u tumorskom i masnom tkivu dojke

### 4.10.1. Proteinska ekspresija kompleksa elektron transportnog lanca i ATP sintaze u tumorskom tkivu dojke

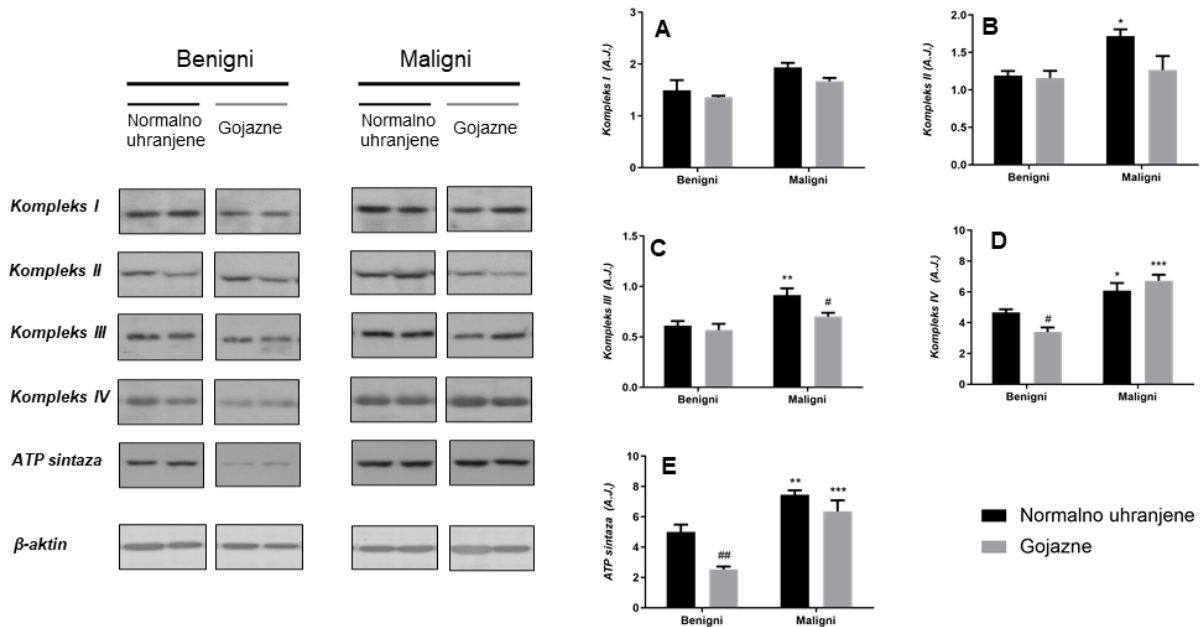
Razlike u proteinskoj ekspresiji kompleksa elektron transportnog lanca i ATP sintaze između benignog i malignog tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena prikazane su na Figuri 40. Nisu pronađene razlike u proteinskoj ekspresiji kompleksa I (Figura 40A), ni u odnosu na malignitet, ni u odnosu na gojaznost. Proteinska ekspresija kompleksa II (Figura 40B) i kompleksa III (Figura 40C) je veća u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, nezavisno od gojaznosti. Proteinska ekspresija kompleksa IV (Figura 40D) je veća u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena u poređenju sa respektivnim benignim tumorskim tkivom, dok je proteinska ekspresija kompleksa IV u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena manja u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena. Proteinska ekspresija ATP sintaze (Figura 40E) je veća u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena u odnosu na njihove respektivne benigne parnjake, iako je proteinska ekspresija ATP sintaze u benignom tumorskom tkivu gojaznih žena manja u odnosu na benigno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena.



**Figura 40.** Proteinska ekspresija kompleksa I (A), kompleksa II (B), kompleksa III (C), kompleksa IV (D) i ATP sintaze (E) u tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ .

#### 4.10.2. Proteinska ekspresija kompleksa elektron transportnog lanca i ATP sintaze u masnom tkivu dojke

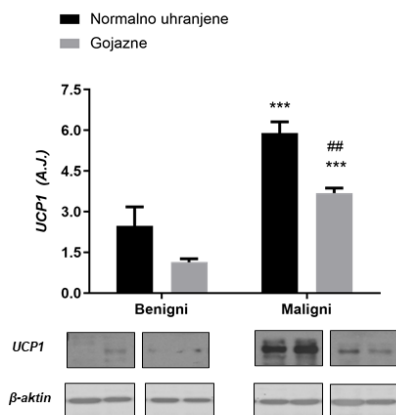
Proteinska ekspresija kompleksa elektron transportnog lanca i ATP sintaze u masnom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim i malignim tumorima dojke prikazana je na Figuri 41. Nisu zabeležene razlike u proteinskoj ekspresiji kompleksa I (Figura 41A) u odnosu na malignitet, ni u odnosu na gojaznost. Proteinska ekspresija kompleksa II (Figura 41B) je veća u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na respektivno masno tkivo žena sa benignim tumorima. Slično, proteinska ekspresija kompleksa III (Figura 41C) je veća u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na respektivno masno tkivo žena sa benignim tumorima. Takođe, proteinska ekspresija kompleksa III je manja u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima, dok se ne razlikuje u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima. Proteinska ekspresija kompleksa IV (Figura 41D) je veća u masnom tkivu žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima nezavisno od gojaznosti, iako je proteinska ekspresija kompleksa IV manja u masnom tkivu gojaznih žena sa benignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Proteinska ekspresija ATP sintaze (Figura 41E) je veća u masnom tkivu dojke kod žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti. Takođe, proteinska ekspresija ATP sintaze je manja u masnom tkivu gojaznih žena sa benignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima.



**Figura 41.** Proteinska ekspresija kompleksa I (A), kompleksa II (B), kompleksa III (C), kompleksa IV (D) i ATP sintaze (E) u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ .

#### 4.11. Proteinska ekspresija UCP1 u masnom tkivu dojke

Proteinska ekspresija dekuplujućeg proteina 1 (UCP1) u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim i malignim tumorima dojke prikazana je na Figuri 42. Proteinska ekspresija UCP1 je veća u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima. Takođe, proteinska ekspresija UCP1 je veća u masnom tkivu dojke gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima, ali je istovremeno manja u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima.



**Figura 42.** Proteinska ekspresija dekuplujućeg proteina 1 (UCP1) u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ##  $p < 0.01$ .

#### 4.12. Lipoliza u tumorskom i masnom tkivu dojke

Proteinska ekspresija adipocitne triacilglicerol lipaze (ATGL) u tumorskom i masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena prikazana je na Figuri 43. U malignom tumorskom tkivu dojke gojaznih premenopauzalnih žena, proteinska ekspresija ATGL je veća u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena, dok se proteinska ekspresija ATGL u benignom tumorskom tkivu ne razlikuje između normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. U masnom tkivu, proteinska ekspresija ATGL je veća u masnom tkivu dojke gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Slično, proteinska ekspresija ATGL je veća u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima kao i u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima.

#### 4.13. Beta oksidacija masnih kiselina u tumorskom i masnom tkivu dojke

##### *4.13.1. Mitohondrijska $\beta$ -oksidacija masnih kiselina u tumorskom i masnom tkivu dojke*

Proteinska ekspresija acil-CoA dehidrogenaze srednjeg lanca (ACADM) prikazana je na Figuri 44. U malignom tumorskom tkivu, proteinska ekspresija ACADM je veća kod gojaznih žena u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena i u odnosu na benigno tumorsko tkivo gojaznih žena. Proteinska ekspresija ACADM u masnom tkivu dojke je manja kod gojaznih žena sa benignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Takođe, u masnom tkivu dojke gojaznih žena sa malignim tumorima proteinska ekspresija ACADM je veća u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima, ali se ne razlikuje u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima.

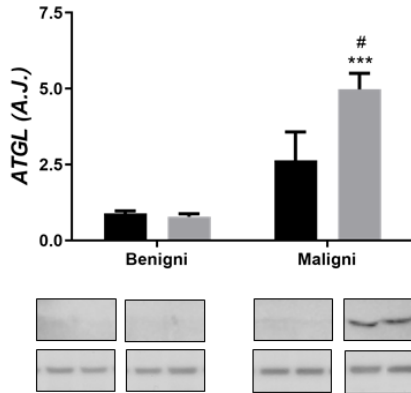
##### *4.13.2. Peroksizomalna $\beta$ -oksidacija masnih kiselina u tumorskom i masnom tkivu dojke*

Na Figuri 45 prikazane su razlike u proteinskoj ekspresiji peroksizomalne acil-CoA dehidrogenaze (ACOX1) u tumorskom i masnom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima. Proteinska ekspresija ACOX1 je veća u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, kako kod normalno uhranjenih, tako i kod gojaznih žena. Međutim, proteinska ekspresija ACOX1 je veća u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena. U masnom tkivu dojke, proteinska ekspresija ACOX1 je veća u masnom tkivu žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti.



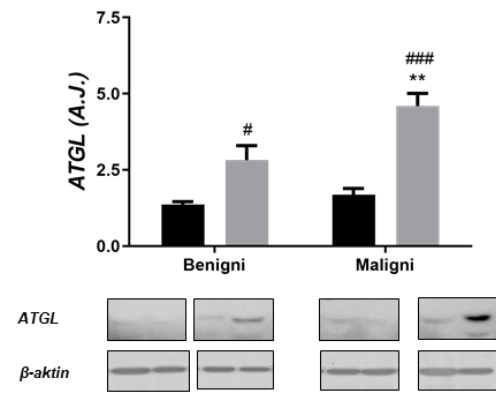
TUMORSKO TKIVO

■ Normalno uhranjene  
■ Gojazne



MASNO TKIVO

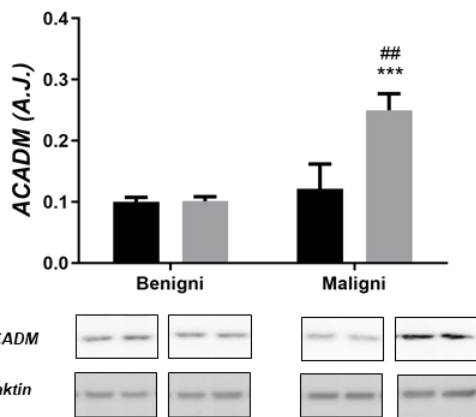
■ Normalno uhranjene  
■ Gojazne



**Figura 43.** Proteinska ekspresija adipocitne triacilglicerol lipaze (ATGL) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopausalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ , ###  $p < 0.001$ .

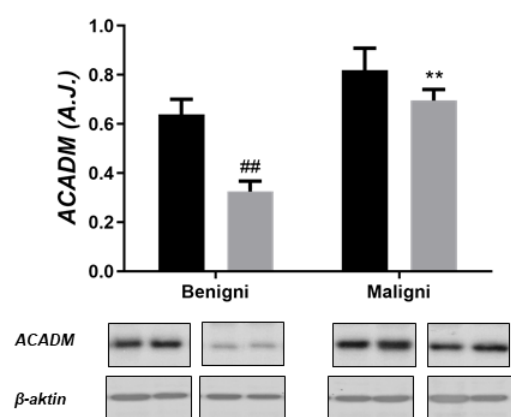
TUMORSKO TKIVO

■ Normalno uhranjene  
■ Gojazne

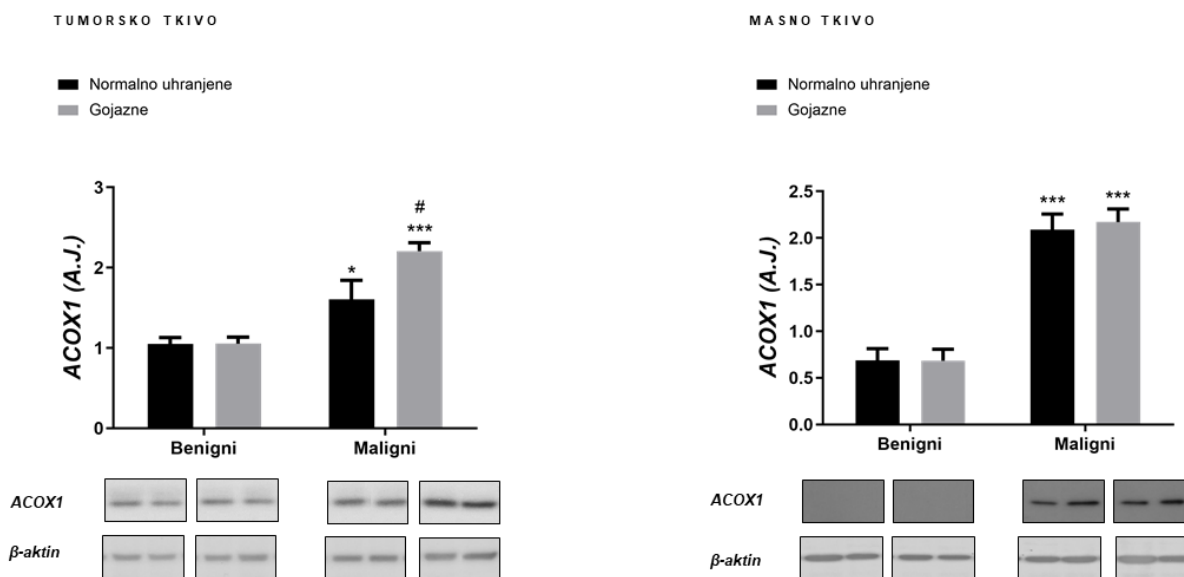


MASNO TKIVO

■ Normalno uhranjene  
■ Gojazne



**Figura 44.** Proteinska ekspresija mitohondrijske acil-CoA dehidrogenaze srednjeg lanca (ACADM) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopausalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ##  $p < 0.01$ .



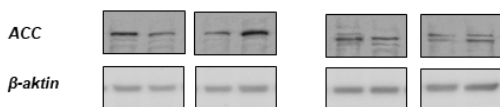
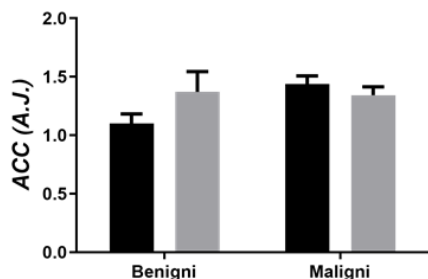
**Figura 45.** Proteinska ekspresija peroksizomalne acil-CoA dehidrogenaze (ACOX1) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopausalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, #  $p < 0.05$ .

#### 4.14. Sinteza masnih kiselina u tumorskom i masnom tkivu dojke

Razlike u proteinskoj ekspresiji acetil-CoA karboksilaze (ACC) u tumorskom i masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim i malignim tumorima dojke prikazane su na Figuri 46. U tumorskom tkivu nisu pronađene razlike u proteinskoj ekspresiji ACC između benignih i malignih tumora kod normalno uhranjenih i gojaznih žena. Proteinska ekspresija ACC je veća u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo dojke žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti. Na Figuri 47 prikazane su razlike u proteinskoj ekspresiji sintaze masnih kiselina (FAS) u tumorskom i masnom tkivu dojke. Proteinska ekspresija FAS je veća u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena u odnosu na benigno tumorsko tkivo gojaznih žena. Takođe, proteinska ekspresija FAS je veća u masnom tkivu dojke kod žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti.

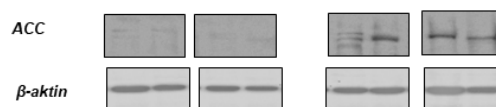
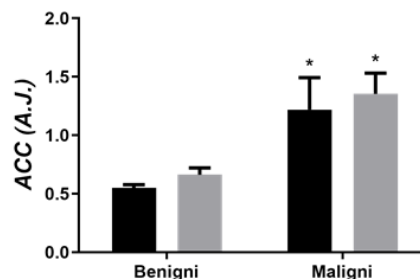
TUMORSKO TKIVO

■ Normalno uhranjene  
 ■ Gojazne



MASNO TKIVO

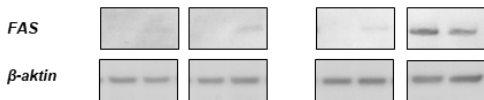
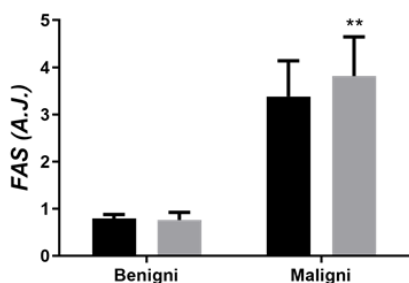
■ Normalno uhranjene  
 ■ Gojazne



**Figura 46.** Proteinska ekspresija acetil-CoA karboksilaze (ACC) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopausalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ .

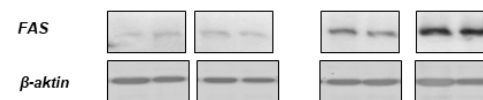
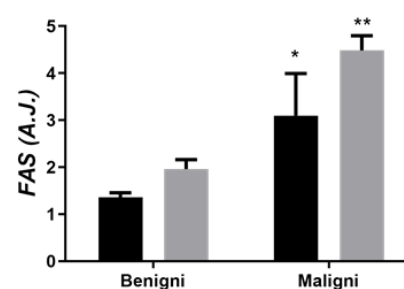
TUMORSKO TKIVO

■ Normalno uhranjene  
 ■ Gojazne



MASNO TKIVO

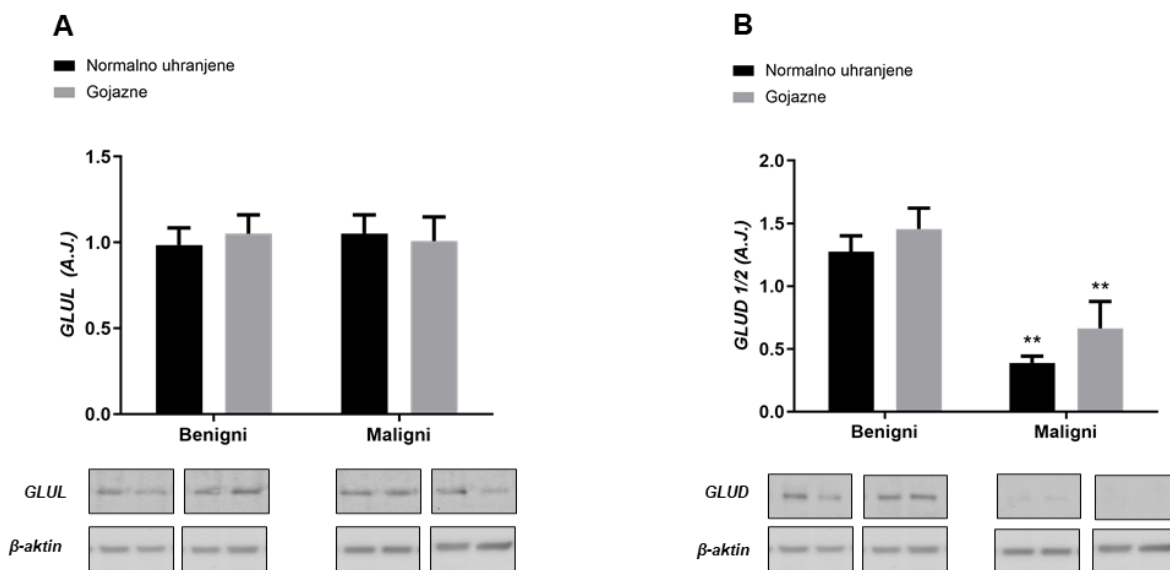
■ Normalno uhranjene  
 ■ Gojazne



**Figura 47.** Proteinska ekspresija sinteze masnih kiselina (FAS) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopausalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.15. Metabolizam glutamina u tumorskom tkivu dojke

Proteinska ekspresija ključnih enzima u metabolizmu glutamina, glutamin sintetaze (GLUL) i glutamat dehidrogenaze (GLUD) u tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa malignim i benignim tumorima dojke prikazana je na Figuri 48. Nisu zabeležene razlike u proteinskoj ekspresiji GLUL između benignog i malignog tumorskog tkiva normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. Nasuprot tome, proteinska ekspresija GLUD je niža u malignom tumorskom tkivu u poređenju sa benignim tumorskim tkivom, nezavisno od gojaznosti.

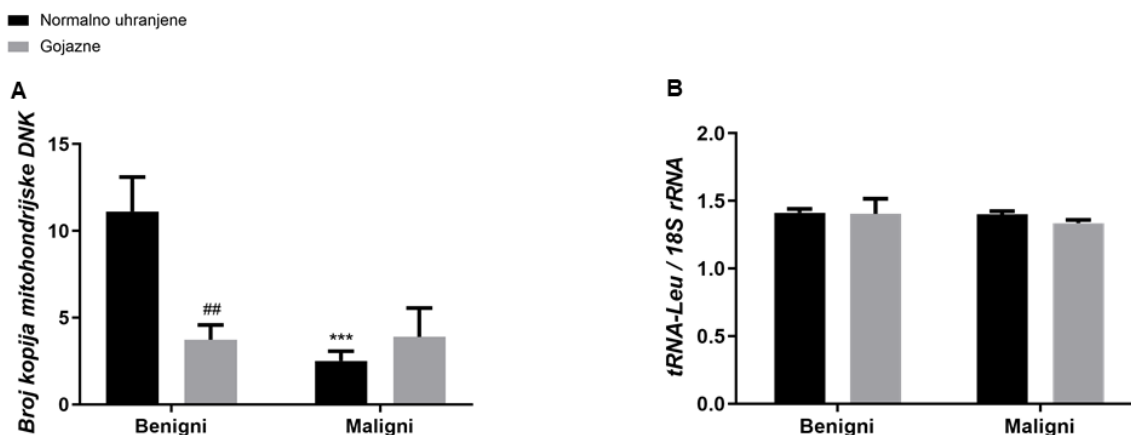


**Figura 48.** Proteinska ekspresija glutamin sintetaze (GLUL, A) i glutamat dehidrogenaze (GLUD, B) u tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*  $p < 0.01$ .

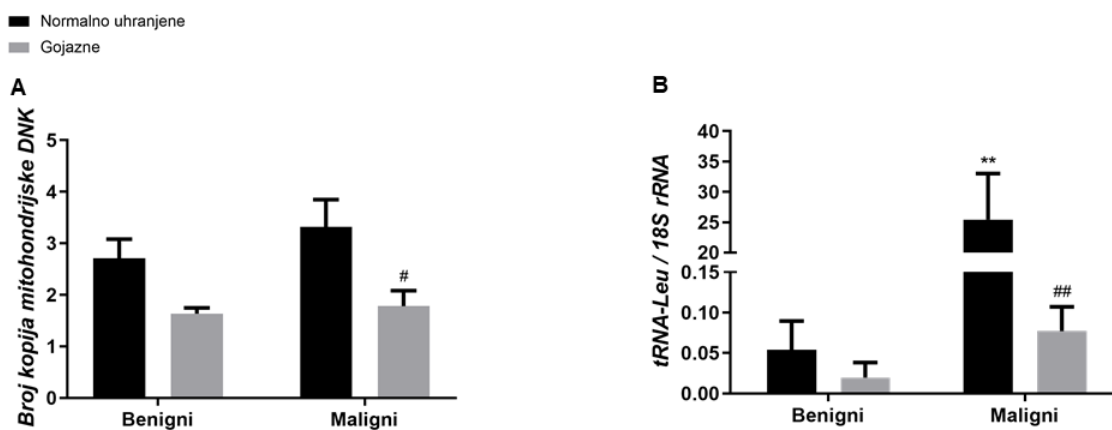
#### 4.16. Broj kopija mitohondrijske DNK i stepen ekspresije mitohondrijskog genoma u tumorskom i masnom tkivu dojke

Na Figurama 49 i 50 prikazane su razlike u broju kopija mitohondrijske DNK i stepenu ekspresije mitohondrijskog genoma u tumorskom i masnom tkivu dojke, respektivno. U tumorskom tkivu, broj kopija mitohondrijske DNK je manji kod normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u poređenju sa normalno uhranjenim ženama sa benignim tumorima. Takođe, broj kopija mitohondrijske DNK je manji u benignom tumorskom tkivu gojaznih premenopauzalnih žena u poređenju sa normalno uhranjenim ženama. U masnom tkivu dojke, zabeležen je trend smanjenja broja kopija mitohondrijske DNK kod gojaznih žena sa benignim i malignim tumorima u odnosu na normalno uhranjene žene. U masnom tkivu dojke gojaznih žena sa malignim tumorima, broj kopija mitohondrijske DNK je manji u odnosu na normalno uhranjene žene sa malignim tumorima. Nisu detektovane razlike u stepenu ekspresije mitohondrijskog genoma u tumorskom tkivu između normalno uhranjenih i gojaznih žena kako sa benignim tako i

sa malignim tumorima. U masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima, stepen ekspresije mitohondrijskog genoma je veći u poređenju sa normalno uhranjenim ženama sa benignim tumorima. Takođe, u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima stepen ekspresije mitohondrijskog genoma je manji u poređenju sa normalno uhranjenim ženama sa malignim tumorima, dok se ne razlikuje u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima.



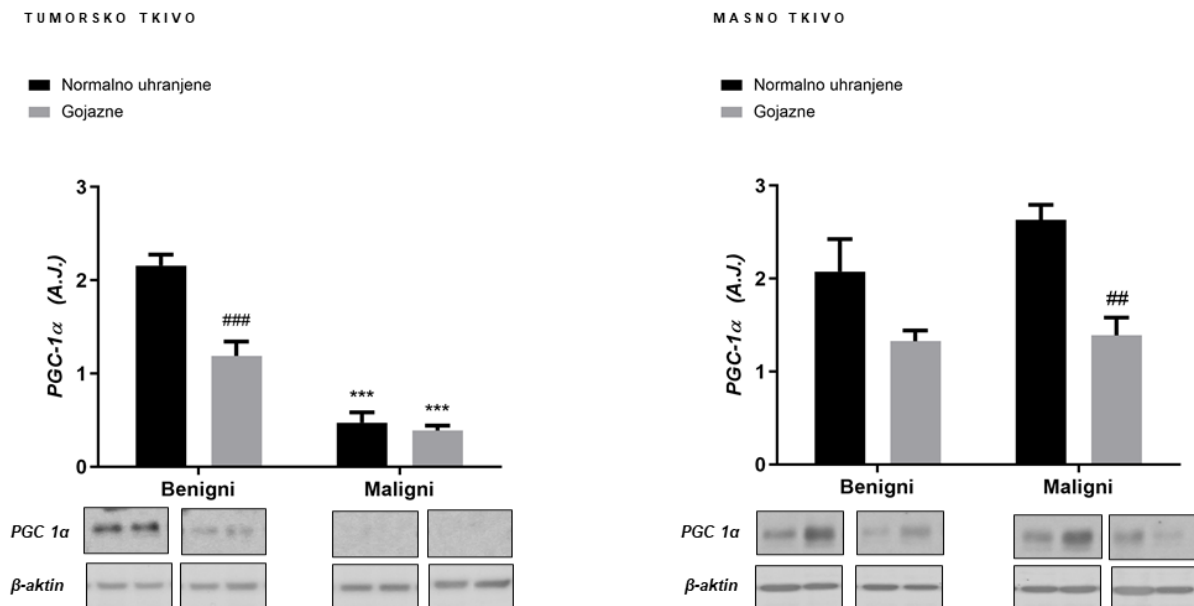
**Figura 49.** Broj kopija mitohondrijske DNK u tumorskom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke (A). Stepen ekspresije mitohondrijskog genoma prikazan kao odnos ekspresije mitohondrijskog transkripta za transportnu RNK za leucin i nukleusnog transkripta za 18S ribozomalnu RNK (B). \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*\* p < 0.001. # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ## p < 0.01.



**Figura 50.** Broj kopija mitohondrijske DNK u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke (A). Stepen ekspresije mitohondrijskog genoma prikazan kao odnos ekspresije mitohondrijskog transkripta za transportnu RNK za leucin i nukleusnog transkripta za 18S ribozomalnu RNK (B). \* poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\* p < 0.01. # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, # p < 0.05, ## p < 0.01.

#### 4.17. Proteinska ekspresija PGC-1 $\alpha$ u tumorskom i masnom tkivu dojke

Na Figuri 51 prikazane su razlike u proteinskoj ekspresiji transkripcionog koaktivatora PGC-1 $\alpha$  u tumorskom i masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke. U tumorskom tkivu dojke, proteinska ekspresija PGC-1 $\alpha$  je manja u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena u odnosu na benigno tumorsko tkivo normalno uhranjenih i gojaznih žena. U benignom tumorskom tkivu, proteinska ekspresija PGC-1 $\alpha$  je manja kod gojaznih u odnosu na normalno uhranjene žene. U masnom tkivu dojke, proteinska ekspresija PGC-1 $\alpha$  je manja u masnom tkivu dojke gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na normalno uhranjene žene sa malignim tumorima, dok se ne razlikuje u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima.



**Figura 51.** Proteinska ekspresija PPAR $\gamma$  koaktivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) u tumorskom (levo) i masnom (desno) tkivu dojke normalno uhranjenih (crni barovi) i gojaznih (sivi barovi) premenopausalnih žena sa benignim i malignim tumorima dojke. Proteinska ekspresija izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.J.). Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  S.E.M. \*poređenje sa respektivnom grupom žena sa benignim tumorima, \*\*\*  $p < 0.001$ . # poređenje sa respektivnom grupom normalno uhranjenih žena, ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ .

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Redoks profil u tumorskom i masnom tkivu dojke

Redoks profil predstavlja set molekulskih karakteristika koji je specifičan za tip kancera i odražava stepen progresije (Tsanou *i sar.*, 2004a), metaboličke zahteve (Hart *i sar.*, 2015) i selektivne pritiske poreklom iz tumorske mikrosredine (Martinez-Outschoorn *i sar.*, 2010). Literaturni podaci o redoks homeostazi koji proističu iz *in vivo* i *in vitro* studija su često kontradiktorni (Halliwell, 2007), dovodeći povišene ili snižene nivoe reaktivnih vrsta, redoks biomarkera i redoks-senzitivnih proteina u vezu sa malignom transformacijom (Punnonen *i sar.*, 1994; Ray *i sar.*, 2000; Kumaraguruparan *i sar.*, 2002a; Kumaraguruparan *i sar.*, 2002b; Gönenç *i sar.*, 2005; Tas *i sar.*, 2005). U pionirskim istraživanjima u polju redoks biologije kancera, Leri Oberli je pokazao da se kancerske ćelije karakterišu izmenjenom redoks homeostazom, odnosno povećanom produkcijom  $O_2^{\cdot-}$  i smanjenom ekspresijom MnSOD, te da ovakva neusklađenost između produkcije i uklanjanja vodi povišenim bazalnim nivoima reaktivnih vrsta (Oberley *i sar.*, 1979). Značaj smanjene ekspresije i aktivnosti MnSOD za održanje malignog fenotipa pokazan je u studijama stabilne transfekcije kancerskih ćelija koje po restituciji ekspresije MnSOD gube replikativni potencijal *in vitro* i *in vivo* (Li *i sar.*, 1995). U osnovi inhibitorynog efekta MnSOD na proliferaciju kancerskih ćelija je akumulacija  $H_2O_2$  i oksidativnih oštećenja, odnosno narušena ravnoteža između dismutacije  $O_2^{\cdot-}$  do  $H_2O_2$  i uklanjanja  $H_2O_2$ . Sa druge strane, smanjenje aktivnosti MnSOD takođe vodi inhibiciji proliferacije kancerskih ćelija putem narušavanja fiziološkog nivoa  $H_2O_2$  koji je neophodan za inicijaciju ćelijske deobe (Ridnour *i sar.*, 2004). Iz ovih, kao i rezultata brojnih drugih autora, proizilazi da se kancerske ćelije odlikuju uspostavljanjem nove redoks homeostaze u poređenju sa netransformisanim neproliferišućim ćelijama, kao i da se održanje malignog fenotipa zasniva na uspostavljanju homeostatske ravnoteže između aktivnosti  $O_2^{\cdot-}$  i  $H_2O_2$  eliminišućih enzima (Miar *i sar.*, 2015; Doskey *i sar.*, 2016). U skladu sa ovakvim nalazima, u ćelijskim linijama karcinoma dojke (Kattan *i sar.*, 2008) i u humanim uzorcima karcinoma dojke (Soini *i sar.*, 2001; Tsanou *i sar.*, 2004; He *i sar.*, 2019) pokazana je izuzetna heterogenost u ekspresiji MnSOD, pri čemu se neinvazivne, aktivno proliferišuće kancerske ćelije u ranim stadijumima progresije kancera odlikuju niskom ekspresijom MnSOD, dok se invazivne metastatske kancerske ćelije u poodmaklim stadijumima progresije kancera odlikuju visokom ekspresijom MnSOD. Ovi rezultati ukazuju na visoku plastičnost redoks homeostaze, gde fine promene u produkciji, odnosno eliminaciji reaktivnih vrsta omogućavaju kancerskim ćelijama adaptaciju na dinamične zahteve koje nameću ćelijska deoba, invazija i migracija u metastatske niše. CuZnSOD takođe pokazuje dinamiku ekspresije koja je povezana sa stadijumom progresije karcinoma dojke, pri čemu se primarni tumori u ranim stadijumima i intenzivno proliferišuće kancerske ćelije odlikuju visokom ekspresijom CuZnSOD, dok je ekspresija CuZnSOD u negativnoj korelaciji sa metastazama i preživljavanjem pacijentkinja (Gomez *i sar.*, 2019). Pored primarne uloge u dismutaciji  $O_2^{\cdot-}$ , CuZnSOD igra važnu ulogu u estrogenskoj signalizaciji u karcinomu dojke, gde asocira sa estrogenskim receptorom  $\alpha$  i učestvuje u regulaciji ekspresije gena. Slično, pokazana je povećana ekspresija katalaze u humanim uzorcima karcinoma dojke i pozitivna korelacija sa lošijim ishodom bolesti (Gomez *i sar.*, 2019). Uloga katalaze u progresiji karcinoma dojke je posebno izražena u metastatskim kancerskim

ćelijama, gde je pokazano da katalaza sa drugim enzimima antioksidativne odbrane doprinosi aktivaciji AMPK i posledičnom održavanju nivoa ATP i redoks homeostaze prilikom gubitka kontakta sa ekstracelularnim matriksom (Davison *i sar.*, 2013). Takođe, pokazana je i pozitivna korelacija između visoke ekspresije GSH-Px i stope metastaza i mortaliteta (Gomez *i sar.*, 2019), dok je ekspresija GSH-Px u *in vitro* studijama dovedena u vezu sa preživljavanjem kancerskih ćelija dojke u uslovima hipoksičnog stresa (Bilodeau *i sar.*, 2002) i sa terapijskom rezistencijom na doksorubicin (Gouazé *i sar.*, 2001).

Heterogenost u ekspresiji enzima antioksidativne odbrane velikim delom potiče od ćelijske heterogenosti koja je prisutna u kompleksnoj tumorskoj mikrosredini karcinoma dojke. Stoga je u ovoj disertaciji imunohistohemijski ispitivano prisustvo, tkivna distribucija i ćelijska lokalizacija osnovnih enzima antioksidativne odbrane u tumorskom i njemu asociranom masnom tkivu dojke. Rezultati ove disertacije su u skladu sa literaturnim podacima i ukazuju na uspostavljanje nove redoks homeostaze u malignom tumorskom tkivu dojke u poređenju sa benignim tumorskim tkivom. Naime, pokazano je da se kancerske ćelije u malignom tumorskom tkivu odlikuju značajno jačim intenzitetom imunopozitivne reakcije na CuZnSOD, MnSOD, katalazu i GSH-Px u odnosu na epitelne ćelije mlečne žlezde u benignom tumorskom tkivu dojke. Takođe, prema našim saznanjima ovo su prvi podaci o ekspresiji i ćelijskog lokalizaciji enzima antioksidativne odbrane u karcinomu dojke kod normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena. Rezultati ove disertacije su pokazali da se maligno tumorsko tkivo karakteriše visokom ekspresijom enzima antioksidativne odbrane, nezavisno od gojaznosti, što je u skladu sa našim prethodno publikovanim rezultatima (Kalezic *i sar.*, 2021). Ovi rezultati ukazuju da su kancerske ćelije, nezavisno od sistemskih i lokalnih uticaja gojaznosti na tumorsku mikrosredinu, izuzetno dobro adaptirane u kontekstu eliminacije reaktivnih vrsta, kao i da uspostavljanje nove redoks homeostaze uključuje očuvanje uravnoteženog kapaciteta za metabolizam različitih reaktivnih vrsta kako  $O_2^{\cdot-}$  tako i  $H_2O_2$ .

Paralelno sa tumorskim tkivom, u ovoj disertaciji ispitivane su promene redoks homeostaze u masnom tkivu dojke premenopauzalnih žena sa malignim, odnosno benignim tumorom dojke. Rezultati ove disertacije su pokazali da u masnom tkivu dojke takođe dolazi do uspostavljanja nove redoks homeostaze, koja se karakteriše povećanom ekspresijom enzima antioksidativne odbrane u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima u poređenju sa masnim tkivom dojke žena sa benignim tumorima. Takođe je pokazano da je imunopozitivna reakcija na CuZnSOD, MnSOD, katalazu i GSH-Px specifično lokalizovana u citoplazmi, odnosno mitohondrijama adipocita. Interesantno, uspostavljanje nove redoks homeostaze u masnom tkivu dojke je zavisno od gojaznosti. Naime, jači intenzitet imunopozitivne reakcije na osnovne enzime antioksidativne odbrane uočen je samo kod normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u poređenju sa normalno uhranjenim ženama sa benignim tumorima, dok ovakvo povećanje nije uočeno kod gojaznih žena. Intenzitet imunopozitivne reakcije na osnovne enzime antioksidativne odbrane u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima je manji u poređenju sa masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima i nepromenjen u odnosu na masno tkivo dojke gojaznih žena sa benignim tumorima. Prema našim saznanjima, ovo su prvi podaci o izmenjenoj redoks homeostazi u kancer asociranom masnom tkivu, kao i o uticaju gojaznosti na uspostavljanje redoks homeostaze u tumorskoj mikrosredini karcinoma dojke. Prethodne studije koje su ispitivale



interakciju kancerskih ćelija sa tumorskom mikrosredinom pokazale su da redoks signalizacija i promene u redoks homeostazi predstavljaju deo dvosmerne komunikacije između kancerskih i stromalnih ćelija. Pokazano je *in vitro* da kancerske ćelije dojke indukuju produkciju reaktivnih vrsta u kancer asociranim fibroblastima, nakon čega dolazi do metaboličkog reprogramiranja i uspostavljanja glikolitičkog fenotipa sa produkcijom laktata u fibroblastima, dok u kancerskim ćelijama dolazi do metaboličkog reprogramiranja koje favorizuje korišćenje laktata kao supstrata za oksidativni metabolizam (Martinez-Outschoorn *i sar.*, 2010; Balliet *i sar.*, 2011). Slično, na modelu kokulture metastatskih kancerskih ćelija pankreasa i adipocita iz kostne srži pokazano je da adipociti indukuju produkciju reaktivnih vrsta u kancerskim ćelijama, što doprinosi njihovom preživljavanju i proliferaciji (Herroon *i sar.*, 2018). Ovi rezultati ističu da je redoks-senzitivna komunikacija integrisani deo metaboličke kooperacije između kancerskih i stromalnih ćelija, iako još uvek nisu poznati mehanizmi koji su u osnovi ovog fenomena. Rezultati ove disertacije podržavaju koncept dvosmerne komunikacije između kancerskih ćelija i adipocita koja uključuje i redoks-senzitivne puteve *in vivo*. Simultano povišena ekspresija enzima antioksidativne odbrane u malignom tumorskom tkivu i njemu asociranom masnom tkivu dojke ukazuje na koordinisan redoks odgovor tkiva dojke u malignitetu. Pored toga, rezultati ove disertacije ističu uticaj gojaznosti na uspostavljanje nove redoks homeostaze u karcinomu dojke, budući da je sinhronizacija u ekspresiji enzima antioksidativne odbrane uočena samo kod normalno uhranjenih žena, odnosno da nije uočena kod gojaznih žena sa malignim tumorom dojke.

## **5.2. Nivo i obrazac proteinske ekspresije i ćelijske lokalizacije 4-HNE modifikovanih proteina u tumorskom i masnom tkivu dojke**

4-hidroksinonenal je produkt lipidne peroksidacije i marker oksidativnog stresa (Benedetti *i sar.*, 1980), ali formirajući kovalentne adukate sa funkcionalnim grupama proteina, nukleinskih kiselina i lipida ostvaruje fiziološku ulogu u redoks signalizaciji (Zhong *i sar.*, 2015). U patofiziološkim stanjima poput gojaznosti i malignih oboljenja, 4-HNE se sa jedne strane smatra nespecifičnim biomarkerom oksidativnog stresa kao pokazatelj stepena lipidne peroksidacije, dok sa druge strane, detekcija specifičnih 4-HNE adukata daje važne informacije o mehanizmima redoks-senzitivne signalne transdukcije uključene u metaboličko i redoks reprogramiranje, kao i vitalne ćelijske procese poput proliferacije, migracije i apoptoze (West *i sar.*, 2006). 4-HNE modifikovani proteini su detektovani u humanim uzorcima karcinoma dojke, pri čemu je pokazana negativna korelacija između intenziteta imunopozitivne reakcije i proliferacije kancerskih ćelija, odnosno stepena progresije karcinoma (Kovács *i sar.*, 2019). *In vitro* je pokazano da 4-HNE u fiziološkim koncentracijama učestvuje u pokretanju citoprotektivnih mehanizama putem aktivacije transkripcionih faktora poput Nrf2 (Huang *i sar.*, 2012), čime doprinosi proliferaciji (Li *i sar.*, 2014) i terapijskoj rezistenciji (Bekele *i sar.*, 2016) kancerskih ćelija dojke. Suprotno, 4-HNE u visokim koncentracijama ostvaruje citotoksične efekte i uključen je u pokretanje apoptotskih puteva (Bose *i sar.*, 2021). U skladu sa literaturnim podacima, rezultati ove disertacije nisu pokazali razlike u profilima ekspresije 4-HNE modifikovanih proteina, niti u ćelijskoj lokalizaciji 4-HNE modifikovanih proteina između benignog i malignog tumorskog tkiva. Nepromenjen nivo 4-HNE modifikovanih proteina, uz povećanu tkivnu ekspresiju enzima antioksidativne odbrane, ukazuje da je visok nivo antioksidativne odbrane u funkciji

uspostavljanja nove redoks homeostaze u malignom tumorskom tkivu, a ne u funkciji akutne odbrane od povećane produkcije reaktivnih vrsta ili lipidne peroksidacije. Šta više, u malignom tumorskom tkivu gojaznih osoba, detektovano je blago smanjenje intenziteta proteinske trake koja odgovara specifično 4-HNE modifikovanim proteinima na 95 kDa u poređenju sa malignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena i benignim tumorskim tkivom gojaznih žena. Funkcionalni značaj ovakve promene u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena nije za sada jasan, ali ovakva promena ističe specifičnost u formiranju 4-HNE proteinskih adukata kao i potencijalni uticaj gojaznosti na redoks signalizaciju u malignom tumorskom tkivu.

Sa druge strane, rezultati ove disertacije pokazali su značajne razlike u profilu 4-HNE modifikovanih proteina u masnom tkivu dojke koje su u vezi kako sa gojaznošću tako i sa malignitetom. Naime, intenzitet proteinske trake koja odgovara 4-HNE modifikovanim proteinima na 40 kDa je veći u masnom tkivu gojaznih žena sa benignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima, kao i u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. U masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima, detektovano je izrazito povećanje intenziteta proteinske trake koja odgovara proteinima na 25 kDa kao i prisustvo novih traka u poređenju sa masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima i masnim tkivom gojaznih žena sa benignim tumorima. Takođe, imunofluorescentnom detekcijom je potvrđeno da je povećanje nivoa 4-HNE modifikovanih proteina specifično lokalizovano u adipocitima masnog tkiva dojke. Povećanje ekspresije enzima antioksidativne odbrane i blago povećanje nivoa 4-HNE modifikovanih proteina u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima ukazuje da malignitet indukuje redoks reprogramiranje i uspostavljanje nove redoks homeostaze u masnom tkivu. Sa druge strane, nepromenjena ekspresija enzima antioksidativne odbrane i povećanje nivoa 4-HNE modifikovanih proteina u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima ukazuje da gojaznost interferira sa uspostavljanjem nove redoks homeostaze u masnom tkivu. Značajne razlike u redoks profilima masnog tkiva dojke između normalno uhranjenih i gojaznih žena su sasvim očekivane, imajući u vidu ključnu ulogu izmenjene redoks homeostaze u patofiziologiji gojaznosti. Naime, prethodno je pokazano da se masno tkivo gojaznih osoba odlikuje inherentno sniženim nivoima antioksidativne odbrane (Jankovic *i sar.*, 2014) i povišenim nivoima 4-HNE (Cohen *i sar.*, 2011; Long *i sar.*, 2013; Li *i sar.*, 2014; Crujeiras *i sar.*, 2016).

### **5.3. Proteinska ekspresija transkripcionog faktora Nrf2 u tumorskom i masnom tkivu dojke**

Rezultati ove disertacije pokazali su povećanu proteinsku ekspresiju Nrf2 u malignom tumorskom tkivu gojaznih premenopauzalnih žena u poređenju sa malignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena i benignim tumorskim tkivom gojaznih žena, dok se proteinska ekspresija Nrf2 nije razlikovala između benignog i malignog tumorskog tkiva normalno uhranjenih žena. Prema našim saznanjima, ovo je prvi podatak o ekspresiji Nrf2 u karcinomu dojke kod gojaznih premenopauzalnih žena. Ovaj podatak može imati izuzetan dijagnostički i terapijski značaj u personalizovanoj medicini, budući da su epidemiološke studije pokazale čvrstu vezu između ekspresije Nrf2 i kliničke progresije i ishoda karcinoma dojke. Visoka ekspresija Nrf2 je u pozitivnoj korelaciji sa stepenom progresije karcinoma dojke (Onodera *i sar.*, 2014), incidencom

metastaza i recidiva (Wang *i sar.*, 2018), odnosno u negativnoj korelaciji sa preživljavanjem pacijentkinja (Almeida *i sar.*, 2020). Takođe, diferencijalna ekspresija Nrf2 između normalno uhranjenih i gojaznih žena koja je pokazana u ovoj disertaciji ukazuje na uticaj gojaznosti na transkripcionu regulaciju uspostavljanja redoks homeostaze u malignom tumorskom tkivu dojke. Imajući u vidu da nisu pokazane razlike u ekspresiji osnovnih enzima antioksidativne odbrane između malignog tumorskog tkiva normalno uhranjenih i gojaznih žena, razlika u proteinskoj ekspresiji Nrf2 može biti indikator finih metaboličkih razlika, odnosno diferencijalnog metaboličkog reprogramiranja u gojaznosti. Naime, Nrf2 ostvaruje plejotropne uloge u redoks-metaboličkom reprogramiranju u kanceru koje uključuju regulaciju redoks homeostaze sa jedne strane i regulaciju energetskeg metabolizma sa druge (Wang *i sar.*, 2018).

Suprotno razlikama u ekspresiji Nrf2 u tumorskom tkivu, rezultati ove disertacije pokazali su povećanu proteinsku ekspresiju Nrf2 u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u poređenju sa masnim tkivom gojaznih žena sa malignim tumorima i masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Ovaj rezultat je u potpunosti u skladu sa ekspresijom enzima antioksidativne odbrane, koja je povećana isključivo u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima i ukazuje na uključenost Nrf2 signalnog puta u uspostavljanju redoks aktiviranog fenotipa masnog tkiva u karcinomu dojke. Prema našim saznanjima, ovde je po prvi put ispitivana ekspresija Nrf2 u humanom masnom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena. Literaturni podaci iz animalnih i *in vitro* studija ističu važnost Nrf2 za (pato)fiziologiju masnog tkiva, ali su njegove uloge u adipogenezi, sekreciji adipokina, insulinskoj senzitivnosti i termogenoj aktivaciji i dalje nedovoljno ispitane (Schneider *i sar.*, 2013; Seo *i sar.*, 2013; Annie-Mathew *i sar.*, 2021).

#### **5.4. Glikoliza u tumorskom i masnom tkivu dojke**

Varburgov efekat opisuje specifičan aspekt metaboličkog reprogramiranja koji doprinosi rastu i proliferaciji kancerskih ćelija i uključuje stimulisanu preuzimanje glukoze i intenziviran glikolitički fluks sa produkcijom laktata, čak i u prisustvu kiseonika (Heiden *i sar.*, 2009). Visoka proteinska ekspresija heksokinaze 2 i asocijacija heksokinaze 2 sa mitohondrijama su najmarkantnije molekulske karakteristike Varburgovog efekta koje su odgovorne za uspostavljanje stabilnog glikolitičkog fenotipa u kancerskim ćelijama (Pedersen, 2007). Rezultati ove disertacije su pokazali da su ove karakteristike evidentne i *in vivo*, u malignom tumorskom tkivu premenopauzalnih žena koje se karakteriše visokom proteinskom ekspresijom heksokinaze 2 i snažnom kolokalizacijom sa mitohondrijskim markerom VDAC u poređenju sa benignim tumorskim tkivom i to nezavisno od gojaznosti. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala korelaciju ekspresije i aktivnosti heksokinaze 2 sa gradusom, agresivnošću i invazivnošću, kao i lošijom prognozom i smanjenom stopom preživljavanja pacijentkinja sa karcinomom dojke (Sato-Tadano *i sar.*, 2013; Coelho *i sar.*, 2015). U skladu sa epidemiološkim nalazima, heksokinaza 2 je jedna od prvih predloženih metaboličkih meta za terapiju karcinoma dojke (Marini *i sar.*, 2013; Lis *i sar.*, 2016). U ovoj disertaciji pokazana je i povećana proteinska ekspresija PFK-1 i G6PDH, što takođe ide u prilog hipotezi koja postulira da se maligno tumorsko tkivo u velikoj meri oslanja na katabolizam glukoze za produkciju energije,

kao i za održavanje intermedijernog metabolizma i redoks homeostaze. Proteinska ekspresija glikolitičkih enzima poseduje i dijagnostički značaj, budući da je dovedena u vezu sa lošijom prognozom bolesti. Aktivnost PFK-1 se povećava sa veličinom tumora i pozitivno korelira sa invazivnošću i agresivnošću (Coelho *i sar.*, 2015), dok visoka genska ekspresija PFK-1 korelira sa smanjenom stopom preživljavanja (C. P. Prasad *i sar.*, 2017). Slično, genska ekspresija GAPDH je u korelaciji sa gradusom tumora i opštom stopom preživljavanja (Révillion *i sar.*, 2000). Interesantno, rezultati ove disertacije su pokazali veću proteinsku ekspresiju PFK-1 i GAPDH u malignom tumorskom tkivu gojaznih u odnosu na normalno uhranjene žene. Ovo su takođe i jedni od prvih molekularnih podataka o metaboličkim razlikama u malignom tumorskom tkivu između gojaznih i normalno uhranjenih žena koji ističu značaj stratifikacije epidemioloških podataka u odnosu na gojaznost i mogu se ispostaviti kao značajni u kontekstu personalizovanih terapijskih pristupa. Takođe, ovi rezultati stavljaju metaboličku plastičnost karcinoma dojke u novu perspektivu u kojoj je metaboličko reprogramiranje zavisno od sistemskih ili lokalnih uticaja gojaznosti. Uporedo sa plejadom glikolitičkih alteracija u tumorskom tkivu, u ovoj disertaciji detektovane su i alteracije u katabolizmu glukoze u masnom tkivu. Naime, pokazana je veća proteinska ekspresija heksokinaze 2 i G6PDH u masnom tkivu žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti (Kalezic *i sar.*, 2021). Ovi rezultati otvaraju mogućnost indukcije tkivno specifičnog Warburgovog efekta u masnom tkivu, gde je fluks glukoze dominantno usmeren ka pentozofosfatnom putu u cilju održavanja redoks homeostaze i lipidnog metabolizma. Takođe, ovo su prvi podaci o metaboličkom reprogramiranju kancer asociiranog masnog tkiva na humanim uzorcima karcinoma dojke koji mogu imati dijagnostički potencijal. Interesantna studija na miševima je pokazala da se ekspresija heksokinaze 2 u masnom tkivu dojke povećava u uslovima hronične socijalne izolacije, što doprinosi kreiranju permisivne sredine za nastanak maligniteta i posledičnoj progresiji karcinoma dojke (Volden *i sar.*, 2013).

## **5.5. Metabolizam laktata u tumorskom i masnom tkivu dojke**

Warburgov efekat, jedan od prvih opisanih mehanizama metaboličkog reprogramiranja u kanceru, intenziviranjem glikolitičkog fluksa vodi ka povećanoj produkciji laktata. (Warburg, 1956). Laktat je danas prepoznat kao onkometabolit od izuzetne funkcionalne važnosti koji doprinosi održavanju kontinuiteta glikolize, služi kao supstrat za oksidativni metabolizam i biosintezu i učestvuje u regulaciji ekspresije gena i redoks homeostaze (San-Millán *i sar.*, 2017; Brooks, 2020). Shodno tome, mnoge *in vivo* i *in vitro* studije su istakle alteracije u metabolizmu laktata u karcinomu dojke. Pre svega, povišenu koncentraciju laktata (Kennedy *i sar.*, 2010; Brodsky *i sar.*, 2019) i aktivnost LDH (Talaiezadeh *i sar.*, 2015) kao posledicu povećane ekspresije LDHA (Huang *i sar.*, 2016), smanjene ekspresije LDHB (Brown *i sar.*, 2013), odnosno promene u zastupljenosti izoenzimskih formi LDH (Hilf *i sar.*, 1976; Hussien *i sar.*, 2011). Pored toga, ove pojedinačne alteracije koje doprinose izmenjenom metabolizmu laktata su dovedene u vezu sa agresivnošću, metastatskim potencijalom i stopom preživljavanja, zbog čega se laktat smatra korisnim prediktivnim biomarkerom u dijagnostici i terapiji karcinoma dojke (Martinez-Outschoorn *i sar.*, 2011). Rezultati ove disertacije su pokazali veću koncentraciju laktata u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena u odnosu na benigno tumorsko tkivo

normalno uhranjenih žena. Sa druge strane, nije pokazana razlika u koncentraciji laktata između malignog i benignog tumorskog tkiva kod gojaznih žena, dok je koncentracija laktata u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena manja u odnosu na maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena. Prema našim saznanjima, ovo je prvi podatak koji opisuje razlike u koncentraciji laktata u malignom tumorskom tkivu dojke u odnosu na gojaznost. U ovoj disertaciji takođe su ispitivane promene u proteinskoj ekspresiji monomera LDH i pokazana je veća proteinska ekspresija LDHA i manja proteinska ekspresija LDHB u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, nezavisno od gojaznosti. Povećana proteinska ekspresija LDHA i smanjena proteinska ekspresija LDHB su prethodno opisane od strane drugih autora kao osnovne molekulske karakteristike luminalnog tipa A invazivnog dukalnog karcinoma dojke (Brown *i sar.*, 2013; Xiao *i sar.*, 2016). Suprotne promene u ekspresiji monomera LDH podržavaju promenu u profilu ekspresije izoenzimskih formi LDH. Naime, u ovoj disertaciji je pokazano povećanje zastupljenosti izoforme LDH4 na račun smanjenja zastupljenosti izoformi LDH1 i LDH2 u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Hilf *i sar.*, 1976). Rezultati ove disertacije ukazuju da je visoka koncentracija laktata u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena dominantno posledica promena u proteinskoj ekspresiji monomera LDH, kao i u posledičnoj promeni u ekspresionom profilu izoformi LDH, budući da nisu zabeležene razlike u aktivnosti ukupne LDH.

Rezultati ove disertacije koji opisuju metabolizam laktata u masnom tkivu dojke predstavljaju gotovo sliku u ogledalu u odnosu na profil promena koji je opisan u tumorskom tkivu. Dok je u malignom tumorskom tkivu detektovano povećanje koncentracije laktata kod normalno uhranjenih žena, u masnom tkivu nisu detektovane razlike u koncentraciji laktata. Nasuprot tome, pokazana je veća aktivnost ukupne LDH u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima, dok nisu zabeležene razlike u aktivnosti ukupne LDH kod gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorima dojke. Povećanje aktivnosti ukupne LDH u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima je potencijalno posledica finih promena u aktivnosti pojedinih izoformi LDH. Naime, u ovoj disertaciji zabeležen je veći intenzitet proteinskih traka koje odgovaraju izoformama LDH2 i LDH3 u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima, dok nisu zabeležene razlike u proteinskoj ekspresiji monomera LDHA i LDHB. Doprinos masnog tkiva metabolizmu laktata u tumorskoj mikrosredini može biti veoma značajan kako sa aspekta produkcije tako i sa aspekta oksidacije laktata. Sa jedne strane, adipociti predstavljaju jedno od glavnih mesta produkcije laktata u organizmu (Arriarán *i sar.*, 2015; Krycer *i sar.*, 2020). Sa druge strane, zahvaljujući prisustvu receptora hidroksikarboksilnih kiselina (Liu *i sar.*, 2009) i monokarboksilatnih transportera (Petersen *i sar.*, 2017), adipociti su osetljivi na ekstracelularnu signalizaciju laktatom. Pokazano je da laktat indukuje metaboličko reprogramiranje u adipocitima, dok adipociti oksiduju laktat do piruvata zarad održavanja redoks homeostaze i funkcije mitohondrija (Carrière *i sar.*, 2014).

Diferencijalne promene u koncentraciji laktata i aktivnosti LDH predstavljaju jednu od prvih indikacija o postojanju kooperacije zasnovane na metabolizmu laktata između tumorskog i masnog tkiva. Kako bi se ispitala potencijalna interakcija između kancerskih ćelija i adipocita, u ovoj disertaciji analizirana je ekspresija LDH monomera u tumorskom i masnom tkivu dojke

imunohistohemijski. Analizom obrasca proteinske lokalizacije LDH monomera u tumorskom tkivu potvrđeni su rezultati proteinske ekspresije; generalno povećanje LDHA i smanjenje LDHB u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo. Takođe je zabeležena heterogena ekspresija LDHA u kancerskim ćelijama iz različitih regiona tumorskog tkiva. Naime, pokazano je da se intenzitet imunohistohemijske reakcije na LDHA postepeno povećava od centra tumorske mase ka invazivnom frontu tumora. Drugi autori su pokazali *in vitro* da visoka ekspresija LDHA doprinosi proliferativnom i invazivnom potencijalu kancerskih ćelija dojke (Chang *i sar.*, 2016; Cai *i sar.*, 2019). Rezultati ove disertacije podržavaju literaturne nalaze, budući da je najjači intenzitet imunopozitivne reakcije na LDHA zabeležen na invazivnom frontu tumora gde dolazi do proliferacije kancerskih ćelija i invazije u okolna tkiva. Nasuprot nalazima u tumorskom tkivu, u masnom tkivu dojke zapažena je heterogenost u imunoekspresiji LDHB monomera. Obrazac imunoekspresije LDHB u masnom tkivu dojke podseća na Harlekin efekat i karakteriše se postepenim povećanjem intenziteta imunopozitivne reakcije od udaljenog masnog tkiva dojke ka invazivnom frontu tumora, gde su adipociti i kancerske ćelije u bliskom fizičkom kontaktu. Asimetrični profil ekspresije LDH monomera na invazivnom frontu tumora, LDHA u kancerskim ćelijama i LDHB u adipocitima dodatno ilustruje mogućnost metaboličke kooperacije zasnovane na metabolizmu laktata.

Kako bi se bliže okarakterisala laktatom dirigovana metabolička kooperacija između kancerskih ćelija i adipocita, u ovoj disertaciji analizirana je proteinska ekspresija, tkivna distribucija i ćelijska lokalizacija monokarboksilatnih transportera odgovornih za transport laktata i piruvata. Prethodno je pokazano da povećana proteinska ekspresija MCT1 (Johnson *i sar.*, 2017) i MCT4 (Baenke *i sar.*, 2015; Xiao *i sar.*, 2020) korelira sa gradusom invazivnog dukalnog karcinoma dojke (Johnson *i sar.*, 2017), dok su oba transportera dovedena u vezu sa glikolitičkim fenotipom kancerskih ćelija. Suprotno ovakvim literaturnim podacima, u ovoj disertaciji pokazana je manja proteinska ekspresija MCT1 i MCT4 u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo i to specifično kod normalno uhranjenih žena, dok se proteinska ekspresija MCT1 i MCT4 nije razlikovala između malignog i benignog tumorskog tkiva kod gojaznih žena. Imajući u vidu da MCT1 i MCT4 transporteri učestvuju i u importu i u eksportu laktata i piruvata, u zavisnosti od šireg metaboličkog konteksta i energetske potrebe tkiva, funkcionalna interpretacija promena u ekspresiji monokarboksilatnih transportera je veoma komplikovana (Nye *i sar.*, 2008; Hong *i sar.*, 2016; Petersen *i sar.*, 2017; Lagarde *i sar.*, 2021). Međutim, ovde pokazane razlike u ekspresiji monokarboksilatnih transportera u malignom tumorskom tkivu između normalno uhranjenih i gojaznih žena mogu biti u čvrstoj vezi sa pokazanim razlikama u metabolizmu laktata i glikogena. Naime, u disertaciji je pokazano da se maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena odlikuje izraženim depozicijama glikogena u citoplazmi kancerskih ćelija, visokom proteinskom ekspresijom GSK-3 i visokom tkivnom koncentracijom laktata, što na molekularnom nivou ukazuje na snažnu indukciju glikolitičkog fenotipa. Sa druge strane, smanjena ekspresija monokarboksilatnih transportera koja je pokazana kod normalno uhranjenih žena može predstavljati još jedan od mehanizama koji kancerskim ćelijama omogućava metaboličku plastičnost u kontekstu simultane stimulacije glikolize i oksidativne fosforilacije. Naime, pokazano je da inhibicija aktivnosti MCT1 dovodi do smanjenog eksporta piruvata iz kancerskih ćelija dojke i posledično povećane ekspresije gena uključenih u Krebsov ciklus i oksidativnu fosforilaciju, ne ometajući transport laktata i glikolitički fluks (Hong *i sar.*, 2016). Nasuprot

smanjenoj proteinskoj ekspresiji MCT1 u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena, u disertaciji je pokazano povećanje proteinske ekspresije MCT1 u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima.

Imunohistohemijskom analizom ekspresije, tkivne distribucije i ćelijske lokalizacije monokarboksilatnih transportera zabeležena je asimetrična lokalizacija MCT1 i MCT4 u tumorskom, odnosno masnom tkivu. U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da se imunoekspresija MCT4 u kancerskim ćelijama postepeno povećava od centra tumorske mase ka invazivnom frontu tumora, dok se imunoekspresija MCT1 u adipocitima postepeno povećava od udaljenog masnog tkiva ka invazivnom frontu tumora. Ovi rezultati, zajedno sa pokazanim povećanjem imunoekspresije LDHA u kancerskim ćelijama i povećanjem imunoekspresije LDHB u adipocitima ukazuju na potencijalan, laktatom dirigovan mehanizam kooperacije između kancerskih ćelija i adipocita koji su u bliskom fizičkom kontaktu. Naime, visoka ekspresija LDHA i MCT4 u kancerskim ćelijama ukazuje na produkciju i eksport laktata koji može biti preuzet od strane adipocita, koji pokazuju visoku ekspresiju MCT1 i LDHB. Sličan mehanizam kooperacije zasnovane na metabolizmu laktata je pokazan *in vitro* između kancerskih ćelija dojke i kancer asociiranih fibroblasta, gde je pokazano da fibroblasti preuzimaju laktat iz kancerskih ćelija i oksiduju ga do piruvata (Patel *i sar.*, 2017). Takođe, predložen je i suprotan smer transporta laktata između kancerskih ćelija dojke i kancer asociiranih fibroblasta (Whitaker-Menezes *i sar.*, 2011), odnosno metastatskih kancerskih ćelija dojke i adipocita iz aksilarnih limfnih čvorova (Sotgia *i sar.*, 2012), gde laktat eksportovan iz adipocita biva preuzet i oksidovan do piruvata od strane kancerskih ćelija.

## **5.6. Uloga AMPK u uspostavljanju tkivno specifičnog Varburgovog efekta u karcinomu dojke**

AMPK je master regulator energetske i redoks homeostaze čija aktivnost na tkivno specifičan način stimuliše kataboličke i inhibira anaboličke puteve, čime doprinosi održanju ćelijskog nivoa ATP i NADPH (Carling, 2017). Reprogramiranje energetskeg metabolizma i uspostavljanje nove redoks homeostaze su ključne odlike maligne transformacije, ali je uloga AMPK u tumorogenezi veoma kompleksna i još uvek nedovoljno ispitana. Prethodne studije na humanim uzorcima karcinoma dojke su dale oprečne podatke, pri čemu su neke studije pokazale povećanu ekspresiju AMPK i pozitivnu korelaciju sa progresijom karcinoma dojke (Liu *i sar.*, 2016; Al-Maghrabi *i sar.*, 2017), dok su druge pokazale smanjenu ekspresiju AMPK i negativnu korelaciju sa progresijom karcinoma dojke (Fox *i sar.*, 2013). Rezultati ove disertacije su pokazali povećanu proteinsku ekspresiju AMPK u malignom tumorskom tkivu u poređenju sa benignim tumorskim tkivom, nezavisno od gojaznosti. Brojne studije ističu važnost aktivacije AMPK za uspostavljanje i održanje malignog fenotipa (Jeon *i sar.*, 2015). Sa jedne strane, AMPK reguliše ćelijski nivo NADPH i održava redoks homeostazu finom regulacijom lipidnog metabolizma, odnosno inhibicijom *de novo* sinteze masnih kiselina (Jeon *i sar.*, 2012). Sa druge strane, AMPK povećava potencijal za metaboličku plastičnost istovremenom stimulacijom glikolize i pentozofosfatnog puta (Laderoute *i sar.*, 2014). Naime, AMPK doprinosi uspostavljanju Varburgovog efekta

stimulacijom preuzimanja glukoze i glikolitičkog fluksa. Sa jedne strane, AMPK fosforiliše tioredoksin interagujući protein nakon čega dolazi do narušavanja njegove interakcije sa GLUT1 i posledične inkorporacije GLUT1 u ćelijsku membranu, odnosno stimulacije preuzimanja glukoze (Wu *i sar.*, 2013). Sa druge strane, AMPK fosforilacijom aktivira fosfofruktokinazu 2, nakon čega njen produkt fruktoza 2,6-bisfosfat stimuliše aktivnost glikolitičkog enzima fosfofruktokinaze 1 (Marsin *i sar.*, 2000). Takođe, stimulacijom ekspresije G6PDH putem histon deacetilaze 10 AMPK doprinosi održavanju fluksa kroz pentozofosfatni put (Shan *i sar.*, 2019). Rezultati ove disertacije ističu značaj AMPK u reprogramiranju energetskeg metabolizma i uspostavljanju nove redoks homeostaze. Naime, simultano sa visokom proteinskom ekspresijom AMPK u malignom tumorskom tkivu pokazana je visoka proteinska ekspresija glikolitičkih enzima (heksokinaze 2 i PFK-1) i enzima pentozofosfatnog puta (G6PDH). Ovakav rezultat ukazuje na uspostavljanje AMPK zavisnog Varburgovog efekta u malignom tumorskom tkivu, koji se karakteriše uravnoteženim usmeravanjem glukoze ka glikolizi i pentozofosfatnom putu. Paralelno sa tumorskim tkivom, u ovoj disertaciji je pokazana veća proteinska ekspresija AMPK u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima. Takođe, istovremeno sa povećanjem proteinske ekspresije AMPK pokazano je povećanje proteinske ekspresije heksokinaze 2 i G6PDH u masnom tkivu žena sa malignim tumorima što ukazuje na čvrstu vezu između aktivacije AMPK i metaboličkog reprogramiranja masnog tkiva u kanceru dojke. Pored toga, ovi rezultati ukazuju na uspostavljanje tkivno specifičnog Varburgovog efekta u masnom tkivu dojke, koji se karakteriše usmeravanjem glukoze primarno ka pentozofosfatnom putu. Prema našim saznanjima, ovo su potpuno novi podaci za humano masno tkivo u kanceru dojke. Jedna prethodna *in vitro* studija je pokazala da kancerske ćelije dojke indukuju aktivaciju AMPK u adipocitima (Sun *i sar.*, 2019). Rezultati ove disertacije su pokazali paralelno povećanje proteinske ekspresije AMPK u malignom tumorskom i masnom tkivu dojke i ukazuju na ulogu AMPK u uspostavljanju tkivno specifičnog Varburgovog efekta u ovim tkivima dojke.

## **5.7. Metabolizam glikogena u tumorskom i masnom tkivu dojke**

Alteracije u metabolizmu glikogena su nedavno definisane kao važan aspekt neoplastične transformacije koji doprinosi proliferaciji, migraciji i terapijskoj rezistenciji kancerskih ćelija (Khan *i sar.*, 2020). Pokazano je da kancerske ćelije dojke akumuliraju citoplazmatske depozicije glikogena u odgovoru na hipoksiju, kao i da inhibicija glikogen fosforilaze smanjuje migratorni potencijal kancerskih ćelija dojke i u hipoksiji i normoksiji (Altemus *i sar.*, 2019). Pored toga, pokazano je da je Šifovo bojenje glikogena koristan metod za diferencijaciju malignih od benignih lezija dojke (Panicker *i sar.*, 2012), dok je Šifovo bojenje metastatskih niša u aksilarnim limfnim čvorovima korisno za predikciju incidence udaljenih metastaza (Buijs *i sar.*, 2004). Rezultati ove disertacije podržavaju literaturne podatke o akumulaciji glikogena u kancerskim ćelijama dojke, pri čemu je ovakav fenotip povezan sa gojaznošću. Naime, izražene citoplazmatske depozicije glikogena su uočene u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena u odnosu na benigno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena. Nasuprot tome, citoplazmatske depozicije glikogena su gotovo potpuno odsutne u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena u poređenju sa malignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena. Takođe, u ovoj disertaciji pokazana je visoka



proteinska ekspresija GSK-3 i to samo u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih žena, što može ukazivati na razlike u regulaciji metabolizma glikogena između normalno uhranjenih i gojaznih žena. Ove razlike u metabolizmu glikogena mogu biti u uskoj vezi sa ovde pokazanim razlikama u metabolizmu glukoze i laktata između normalno uhranjenih i gojaznih žena. Naime, nedavno je pokazano da kancerske ćelije jajnika koriste glikogen kao izvor glukoze za glikolizu i produkciju laktata (Curtis *i sar.*, 2019), dok je u disertaciji pokazana značajno veća koncentracija laktata u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih u odnosu na gojazne žene. Nezavisno od metabolizma glukoze, laktata i glikogena, pokazano je da GSK-3 učestvuje i u održavanju redoks homeostaze, gde fosforilacija Nrf2 od strane GSK-3 vodi ubikvitinaciji i posledičnoj degradaciji Nrf2 (Leinonen *i sar.*, 2014). Jedan od mehanizama koji doprinosi visokoj ekspresiji Nrf2 u kanceru je inhibicija GSK-3 (Rojo de la Vega *i sar.*, 2018). U disertaciji je pokazana simultano manja ekspresija GSK-3 i veća ekspresija Nrf2 u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena u poređenju sa malignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena. Uporedo sa tumorskim tkivom u disertaciji je analiziran metabolizam glikogena u masnom tkivu dojke. Rezultati analize metabolizma glikogena u masnom tkivu dojke pokazali su veću proteinsku ekspresiju GSK-3 kod žena sa malignim tumorima u odnosu na žene sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti. Funkcionalni značaj povećane proteinske ekspresije GSK-3 u masnom tkivu nije u potpunosti jasan, budući da je ovo prvi takav podatak na humanim uzorcima masnog tkiva u karcinomu dojke.

## **5.8. Oksidativna dekarboksilacija piruvata i Krebsov ciklus u tumorskom i masnom tkivu dojke**

Reprogramiranje energetskeg metabolizma u kancerskim ćelijama, koje podrazumeva intenzivnu glikolizu sa produkcijom laktata, je praćeno smanjenim fluksom ugljenika glukoze kroz Krebsov ciklus (Heiden *i sar.*, 2009). Kompleks piruvat dehidrogenaze konvertuje piruvat u acetyl-CoA i kao spona između glikolize i potpune oksidacije glukoze u Krebsovom ciklusu predstavlja važno regulatorno mesto (Patel *i sar.*, 2006). Inhibicija proteinske ekspresije, odnosno aktivnosti PDH transkripcionim i posttranslacionim regulatornim mehanizmima vodi uspostavljanju glikolitičkog fenotipa, koji je karakterističan za Warburgov efekat (McFate *i sar.*, 2008; Yonashiro *i sar.*, 2018). Posttranslaciona regulacija aktivnosti PDH je izuzetno kompleksna i podrazumeva reverzibilnu fosforilaciju i defosforilaciju koja vodi inhibiciji, odnosno aktivaciji PDH. Izoforne kinaze piruvat dehidrogenaze 1-4 su glavni regulatorni enzimi koji fosforilacijom dovode do inhibicije aktivnosti PDH (Atas *i sar.*, 2020). Pokazano je da su ekspresija i aktivnost PDK1 i PDK4 povezani sa metaboličkim reprogramiranjem, metastatskim potencijalom i terapijskom rezistencijom u karcinomu dojke (Dupuy *i sar.*, 2015; Walter *i sar.*, 2015; Guda *i sar.*, 2018; Peng *i sar.*, 2018). Rezultati disertacije ukazuju na metaboličko reprogramiranje koje favorizuje intenzivnu glikolizu sa smanjenim fluksom ugljenika glukoze ka Krebsovom ciklusu. Naime, pokazana je manja proteinska ekspresija PDH u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo dojke, nezavisno od gojaznosti. Istovremeno je pokazana i značajno manja proteinska ekspresija PDK4 u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo. Ovi rezultati su dodatno podržani promenama u proteinskoj ekspresiji prvog enzima Krebsovog ciklusa, citrat sintaze, čija ekspresija je takođe manja u malignom tumorskom tkivu u odnosu na

benigno tumorsko tkivo. Nema puno podataka o ekspresiji citrat sintaze u humanim uzorcima karcinoma dojke, ali je izuzetno niska ekspresija prethodno pokazana u ćelijskim linijama karcinoma dojke (Lin *i sar.*, 2012).

Uporedo sa smanjenjem proteinske ekspresije PDH, PDK4 i citrat sintaze u malignom tumorskom tkivu, detektovane su suprotne promene u masnom tkivu dojke, posebno kod normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima. Naime, u ovoj disertaciji je pokazana veća proteinska ekspresija PDH u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima, pri čemu je ekspresija PDH dodatno veća kod normalno uhranjenih žena u odnosu na gojazne žene sa malignim tumorima. Proteinska ekspresija PDK4 i citrat sintaze je takođe veća u masnom tkivu žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima, ali samo kod normalno uhranjenih žena. Iako ovakve promene nisu prethodno opisane u kancer asociranom masnom tkivu, povećana proteinska ekspresija PDH i citrat sintaze u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena snažno ide u prilog hipotezi da kancerske ćelije indukuju metaboličko reprogramiranje u adipocitima (Dirat *i sar.*, 2011). Nedostatak promena u proteinskoj ekspresiji PDH i citrat sintaze u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima može predstavljati refleksiju disfunkcije mitohondrija u gojaznosti, posebno u uslovima stresa ili povećanih metaboličkih zahteva koji se nameću u malignitetu. Shodno tome, smanjena ekspresija i aktivnost citrat sintaze, kao i smanjena potrošnja kiseonika su prethodno opisani u mišjim modelima gojaznosti (Rong *i sar.*, 2007) i u humanom masnom tkivu gojaznih osoba (Goossens *i sar.*, 2011; Christe *i sar.*, 2013).

## **5.9. Elektron transportni lanac mitohondrija i oksidativna fosforilacija u tumorskom i masnom tkivu dojke**

Funkcija mitohondrija i doprinos oksidativne fosforilacije progresiji karcinoma dojke su još uvek nedovoljno ispitani. Nedostatak podataka o morfologiji i fiziologiji mitohondrija *in vivo*, kao i metodološka ograničenja koja karakterišu *in vitro* studije, su neki od razloga za mnoga otvorena pitanja u ovom polju istraživanja. Postojeći literaturni podaci iz elektron mikroskopskih studija pokazuju da broj i morfologija mitohondrija mogu biti značajno izmenjeni *in vivo*, ističući veliku inter- i intratumorsku heterogenost u karcinomu dojke (Elliott *i sar.*, 2011; Li *i sar.*, 2017). Sa funkcionalnog aspekta, analiza proteinske ekspresije kompleksa respiratornog lanca, *in situ* detekcija aktivnosti kompleksa respiratornog lanca (Whitaker-Menezes *i sar.*, 2011) i funkcionalno merenje respiracije i oksidativne fosforilacije (Kaambre *i sar.*, 2012; Koit *i sar.*, 2017) u humanim uzorcima karcinoma dojke jasno ukazuju na važnost očuvane funkcije mitohondrija za održanje malignog fenotipa. Rezultati ove disertacije predstavljaju prve podatke o proteinskoj ekspresiji kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze u malignom tumorskom tkivu normalno uhranjenih i gojaznih žena i pokazuju generalno povećanje ekspresije kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo. Specifično, pokazano je da je proteinska ekspresija kompleksa II, kompleksa III i ATP sintaze veća u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, nezavisno od gojaznosti. Sa druge strane, proteinska ekspresija kompleksa IV je veća samo kod normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima, u odnosu na benigno tumorsko tkivo normalno uhranjenih

žena. Ovakvi rezultati ističu da se maligno tumorsko tkivo dojke *in vivo* na molekulskom nivou karakteriše visokom ekspresijom kompleksa respiratornog lanca i ATP sintaze i ukazuju na važnost održanja oksidativne forforilacije za neoplastičnu transformaciju. U skladu sa Warburgovom hipotezom (Warburg, 1956) i brojnim novijim studijama (Dupuy *i sar.*, 2015; Chen *i sar.*, 2019; Jia *i sar.*, 2019), rezultati disertacije ističu da oksidativna fosforilacija i glikoliza sa produkcijom laktata nisu međusobno isključive bioenergetske strategije, već neophodne komponente jedinstvene strategije metaboličkog reprogramiranja u karcinomu dojke. Šta više, pokazano je da se metabolizam mitohondrija nalazi u osnovi metaboličke plastičnosti koja omogućava sinergizam glikolize i oksidativne fosforilacije i koja uslovljava metaboličku heterogenost kancerskih ćelija kako u primarnim tumorima tako i u metastatskim nišama (Dupuy *i sar.*, 2015).

Uporedo sa razlikama u proteinskoj ekspresiji kompleksa respiratornog lanca u tumorskom tkivu, u disertaciji su pokazane razlike u proteinskoj ekspresiji kompleksa respiratornog lanca u masnom tkivu dojke. Pokazane su značajne razlike u proteinskoj ekspresiji kompleksa respiratornog lanca između normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim tumorima, gde je u masnom tkivu gojaznih žena pokazana manja proteinska ekspresija kompleksa IV i ATP sintaze u odnosu na masno tkivo dojke normalno uhranjenih žena. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji su pokazali smanjenu gensku i proteinsku ekspresiju pojedinih kompleksa respiratornog lanca (Heinonen *i sar.*, 2017), smanjenu enzimsku aktivnost kompleksa respiratornog lanca (Chattopadhyay *i sar.*, 2011) i smanjenu stopu respiracije (Xiao *i sar.*, 2014) u masnom tkivu gojaznih osoba. Rezultati disertacije pokazali su da i masno tkivo dojke takođe pokazuje alteracije u fiziologiji mitohondrija kako u odnosu na gojaznost tako i u odnosu na malignitet. Naime, pokazana je veća proteinska ekspresija kompleksa II i kompleksa III u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima, dok je proteinska ekspresija kompleksa IV i ATP sintaze veća u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti. Ovi rezultati pokazuju da kod žena sa karcinomom dojke dolazi do metaboličkog reprogramiranja masnog tkiva dojke, koje uključuje molekulske promene na nivou mitohondrija. Interesantno, simultano sa povećanom ekspresijom kompleksa respiratornog lanca pokazana je i veća proteinska ekspresija UCP1 kod normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima. U kanceru dojke povećana proteinska ekspresija UCP1 je prethodno pokazana u adipocitima u *in vitro* studijama (Paré *i sar.*, 2020), animalnim modelima (Singh *i sar.*, 2016) i humanim uzorcima karcinoma dojke (Wang *i sar.*, 2014), ali fiziološki značaj dekuplovanja respiracije za progresiju karcinoma dojke nije još uvek ispitan.

## **5.10. Metabolizam lipida u tumorskom i masnom tkivu dojke**

Metaboličko reprogramiranje u maligno transformisanim tkivima uključuje i reprogramiranje metabolizma lipida, odnosno promene u transportu, *de novo* sintezi i deponovanju masnih kiselina, odnosno mobilizaciji i  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina. Analize genske ekspresije u karcinomu dojke, specifično luminalnom podtipu A, pokazale su povećanu ekspresiju gena uključenih u sintezu, mobilizaciju i  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina u poređenju sa trostruko negativnim karcinomom

dojke koji se dominantno oslanja na preuzimanje i deponovanje masnih kiselina iz ekstracelularne sredine (Monaco, 2017). Rezultati disertacije podržavaju i pružaju dopunu postojećim literaturnim podacima o izmenjenom metabolizmu lipida u karcinomu dojke, doprinoseći novim podacima o uticaju gojaznosti na reprogramiranje metabolizma lipida i ilustrujući metaboličku kooperaciju zasnovanu na metabolizmu lipida između kancerskih ćelija i adipocita.

Metabolička kooperacija između kancerskih ćelija i adipocita na nivou mobilizacije i  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina je literaturno dobro opisana. Pokazano je da kancerske ćelije dojke stimulišu aktivnost ATGL i HSL u adipocitima, promovišući lipolizu i oslobađanje masnih kiselina, koje zatim bivaju preuzete, deponovane u kompleksne lipide ili oksidovane od strane kancerskih ćelija, što vodi povećanoj proliferaciji, posebno u gojaznosti (Balaban *i sar.*, 2017). Slično je pokazano i na modelu karcinoma kolona i akutne monocitne leukemije, gde preuzimanje masnih kiselina iz adipocita podržava proliferaciju kancerskih ćelija putem aktivacije AMPK i posledične stimulacije  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina (Tabe *i sar.*, 2017; Wen *i sar.*, 2017). Rezultati disertacije su u skladu sa predloženim mehanizmom kooperacije između kancerskih ćelija i adipocita po kome stimulisana lipoliza u adipocitima podržava  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina u kancerskim ćelijama, posebno u gojaznosti. Pokazana je veća proteinska ekspresija ATGL u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa benignim tumorima, što podržava hipotezu indukovane lipolize u malignitetu. Interesantno, pokazana je i povećana ekspresija ATGL u malignom tumorskom tkivu, ali samo kod gojaznih žena.

Rezultati disertacije podržavaju nalaze o stimulisanoj  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina u karcinomu dojke i pružaju nove informacije o doprinosu peroksisomalne, odnosno mitohondrijalne  $\beta$ -oksidacije. Pokazano je da je proteinska ekspresija ACOX, indikatora peroksisomalne  $\beta$ -oksidacije, veća u malignom tumorskom tkivu i to posebno u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena, dok je proteinska ekspresija ACADM, indikatora mitohondrijalne  $\beta$ -oksidacije, veća samo u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena. Uporedo sa malignim tumorskom tkivom pokazana je i povećana proteinska ekspresija enzima  $\beta$ -oksidacije u masnom tkivu. Naime, rezultati su pokazali veću proteinsku ekspresiju ACOX u masnom tkivu dojke žena sa malignim tumorima nezavisno od gojaznosti, dok je proteinska ekspresija ACADM veća samo u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima. Značaj povećane  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina u masnom tkivu može biti objašnjen predloženim mehanizmom koordinacije lipidnog metabolizma između kancerskih ćelija i adipocita putem egzozoma. Pokazano je da egzozomi poreklom iz adipocita koji sadrže masne kiseline i enzime  $\beta$ -oksidacije indukuju  $\beta$ -oksidaciju u kancerskim ćelijama melanoma čime se promoviše ćelijska migracija i invazija (Lazar *i sar.*, 2016). Takođe, u gojaznosti je povećana sekrecija egzozoma iz adipocita, dok su sami egzozomi bogatiji masnim kiselinama koje služe kao supstrati za  $\beta$ -oksidaciju u kancerskim ćelijama (Clement *i sar.*, 2020).

Sa aspekta *de novo* sinteze masnih kiselina, rezultati disertacije nisu pokazali razlike u proteinskoj ekspresiji ACC između malignih i benignih tumora, ali je pokazana veća proteinska ekspresija FAS i to samo u malignom tumorskom tkivu gojaznih žena. Nasuprot tome, u masnom

tkivu dojke pokazana je veća proteinska ekspresija i ACC i FAS kod žena sa malignim tumorima u poređenju sa masnim tkivom žena sa benignim tumorima, nezavisno od gojaznosti.

Rezultati snažno ukazuju da je reprogramiranje metabolizma lipida u karcinomu dojke asocirano sa gojaznošću, pri čemu maligno tumorsko tkivo gojaznih žena pokazuje povećanu stopu mobilizacije,  $\beta$ -oksidacije i *de novo* sinteze masnih kiselina. Razlike u ekspresiji enzima uključenih u metabolizam lipida između normalno uhranjenih i gojaznih žena mogu imati dijagnostički i terapijski značaj budući da ekspresija ATGL (Wang *i sar.*, 2017), ACADM (Yu *i sar.*, 2019), ACOX (Jung *i sar.*, 2015), ACC (Moncur *i sar.*, 1998) i FAS (Alo' *i sar.*, 1996; Alò *i sar.*, 1999; Wang *i sar.*, 2001) korelira sa agresivnošću i stepenom progresije karcinoma dojke, kao i da su ovi enzimi predloženi kao metaboličke mete u terapiji karcinoma dojke (Thupari *i sar.*, 2001).

### 5.11. Metabolizam glutamina u tumorskom i masnom tkivu dojke

Glutamin, iako neesencijalna aminokiselina, je fiziološki esencijalan izvor ugljenika i azota za biosintezu nukleotida, aminokiselina i masnih kiselina. Takođe, glutamin doprinosi održavanju redoks homeostaze konvertovanjem do  $\alpha$ -ketoglutarata, supstrata za sintezu glutationa (Cha *i sar.*, 2018). U karcinomu dojke alteracije u metabolizmu glutamina su specifične za molekulske podtipove. Visoka ekspresija transportera neutralnih aminokiselina, glutamat sintetaze i glutaminaze karakteriše trostruko negativni karcinom dojke, koji pokazuje visoke stope preuzimanja glutamina i glutaminolize (Van Geldermalsen *i sar.*, 2016). Suprotno, za luminalni podtip A karakteristična je smanjena ekspresija glutaminaze i glutamat dehidrogenaze u odnosu na HER2-pozitivan podtip (Kim *i sar.*, 2013) i povećana ekspresija glutamin sintetaze u odnosu na HER2-pozitivan i trostruko negativan podtip (Tyanova *i sar.*, 2016). U skladu sa tim, pokazano je da ekspresija glutamin sintetaze korelira sa HER2 ekspresijom u kanceru dojke i stimuliše proliferaciju HER2-pozitivne kancerske ćelijske linije (Wang *i sar.*, 2017). Takođe, pokazano je da trostruko negativni i HER2-pozitivni karcinomi imaju niže nivoe glutamina i više nivoe glutamata u poređenju sa estrogen-pozitivnim karcinomom dojke (Cao *i sar.*, 2014). Rezultati disertacije su u skladu sa literaturnim podacima i pokazali su da se proteinska ekspresija glutamin sintetaze ne razlikuje između benignog i malignog tumorskog tkiva, dok je proteinska ekspresija glutamat dehidrogenaze niža u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo, nezavisno od gojaznosti. Rezultati ukazuju da je metabolizam glutamata u malignom tumorskom tkivu dominantno usmeren ka sintezi glutamina, a ne ka produkciji  $\alpha$ -ketoglutarata. Međutim, i pored smanjene ekspresije glutamat dehidrogenaze ne treba isključiti mogućnost metabolizma glutamata do  $\alpha$ -ketoglutarata, budući da je pokazano da aktivno proliferišuće kancerske ćelije dojke metabolišu glutamat do  $\alpha$ -ketoglutarata putem transaminaza (Coloff *i sar.*, 2016).

### 5.12. Pregled mitohondrijalne dinamike u tumorskom i masnom tkivu dojke

Usled nedostatka protektivnih histona, ograničenog potencijala sistema za reparaciju DNK i visoke stope produkcije ROS u mitohondrijama, mitohondrijska DNK je podložnija mutacijama i oksidativnim oštećenjima u poređenju sa nukleusnom DNK (Croteau *i sar.*, 1997). Kako su

alteracije u produkciji reaktivnih vrsta nezaobilazni deo tumorogeneze, analiza mitohondrijskog genoma i asocijacija sa kliničko-patološkim parametrima su od interesa za personalizovanu dijagnostiku i prognostiku (Reznik *i sar.*, 2016). Takođe, alteracije u vidu mutacija ili promena u broju kopija mitohondrijske DNK mogu pružiti važne informacije o funkciji i broju mitohondrija (Kopinski *i sar.*, 2021). Nekoliko studija je pokazalo prisustvo specifičnih mutacija u mitohondrijskom genomu (Zhu *i sar.*, 2005) i snižen broj kopija mitohondrijske DNK (Mambo *i sar.*, 2005; Tseng *i sar.*, 2006; Fan *i sar.*, 2009; Domínguez-de-la-Cruz *i sar.*, 2020) u karcinomu dojke, ali značaj ovih alteracija nije u potpunosti razjašnjen. Mitohondrijski broj kopija je doveden u vezu sa molekulskim podtipom karcinoma dojke, kao i stepenom progresije, epitelno-mezenhimalnom tranzicijom, metastazama i terapijskom rezistencijom (Bai *i sar.*, 2011; Guha *i sar.*, 2014, 2018). Rezultati disertacije su pokazali manji broj kopija mitohondrijske DNK u malignom tumorskom tkivu u odnosu na benigno tumorsko tkivo i kod normalno uhranjenih i kod gojaznih žena. U benignom tumorskom tkivu detektovan je manji broj kopija mitohondrijske DNK kod gojaznih žena u odnosu na normalno uhranjene žene. Prema našim saznanjima, ovo su prvi podaci koji opisuju promene u broju kopija mitohondrijske DNK u tumorima dojke kod gojaznih žena. Takođe, rezultati ukazuju na kompleksnu vezu između broja kopija mitohondrijske DNK i transkripcione aktivnosti mitohondrijskog genoma, budući da nisu pokazane razlike u transkripcionoj aktivnosti između benignog i malignog tumorskog tkiva dojke. Transkripciona aktivnost mitohondrijskog genoma je tkivno specifična i može predstavljati kompenzatornu adaptaciju na smanjenje broja kopija mitohondrijske DNK, odnosno promene u energetskim zahtevima i oksidativnom metabolizmu (Mohd Khair *i sar.*, 2021). U skladu sa smanjenim brojem kopija mitohondrijske DNK, rezultati disertacije pokazali su manju proteinsku ekspresiju PGC-1 $\alpha$  u malignom tumorskom tkivu u poređenju sa benignim tumorskim tkivom kod normalno uhranjenih i gojaznih premenopausalnih žena, pri čemu je ekspresija PGC-1 $\alpha$  takođe manja u benignom tumorskom tkivu gojaznih žena u poređenju sa benignim tumorskim tkivom normalno uhranjenih žena. Prethodne studije su pokazale smanjenu gensku ekspresiju i smanjen intenzitet imunopozitivne reakcije na PGC-1 $\alpha$  u kancerskim ćelijama dojke (Watkins *i sar.*, 2004), dok je niska ekspresija PGC-1 $\alpha$  dovedena u vezu sa lošijom prognozom bolesti i smanjenim preživljavanjem pacijentkinja (Jiang *i sar.*, 2003). Sa druge strane, *in vitro* je pokazano da aktivacija PGC-1 $\alpha$  stimuliše biogenezu mitohondrija i oksidativnu fosforilaciju, što dovodi do povećanja invazivnog i metastatskog potencijala kancerskih ćelija dojke (Lebleu *i sar.*, 2014; Andrzejewski *i sar.*, 2017). Takođe, pokazana je korelacija između ekspresije PGC-1 $\alpha$  na invazivnom frontu tumora i incidence metastaza, kao i visoka ekspresija PGC-1 $\alpha$  u cirkulišućim kancerskim ćelijama kod pacijentkinja sa karcinomom dojke (Lebleu *i sar.*, 2014), ističući ulogu PGC-1 $\alpha$  u postizanju metastatskog fenotipa.

U disertaciji je po prvi put ispitan broj kopija mitohondrijske DNK *in vivo* u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa benignim, odnosno malignim tumorom dojke. Pokazan je trend povećanja broja kopija mitohondrijske DNK u masnom tkivu dojke normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u poređenju sa masnim tkivom normalno uhranjenih žena sa benignim tumorima. Takođe, pokazan je značajno manji broj kopija mitohondrijske DNK u masnom tkivu dojke gojaznih žena sa malignim tumorima u poređenju sa normalno uhranjenim ženama sa malignim tumorima. Smanjenje broja kopija mitohondrijske DNK u masnom tkivu gojaznih žena je u skladu sa literaturnim podacima koji su pokazali smanjenje broja kopija

mitohondrijske DNK u abdominalnom masnom tkivu gojaznih osoba (Kaaman *i sar.*, 2007). Rezultati disertacije pokazuju da je transkripciona aktivnost mitohondrijskog genoma nekoliko redova veličine veća u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u poređenju sa masnim tkivom žena sa benignim tumorima, kao i u poređenju sa masnim tkivom gojaznih žena sa malignim tumorima. Usklađenost promena u broju kopija mitohondrijske DNK i transkripcionoj aktivnosti mitohondrijskog genoma potencijalno ukazuje na funkcionalni značaj ovih promena u masnom tkivu, budući da je prethodno pokazana korelacija između broja kopija mitohondrijske DNK i ekspresije gena uključenih u oksidativni metabolizam (Heinonen *i sar.*, 2015). U skladu sa promenama u broju kopija mitohondrijske DNK i transkripcionoj aktivnosti mitohondrijskog genoma, u disertaciji je pokazana niža proteinska ekspresija PGC-1 $\alpha$  u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima. Rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji gojaznost dovode u vezu sa disfunkcijom mitohondrija u masnom tkivu. Animalne studije su pokazale da smanjena ekspresija PGC-1 $\alpha$  u subkutanom masnom tkivu dovodi do smanjene ekspresije gena uključenih u oksidativnu fosforilaciju,  $\beta$ -oksidaciju i termogenu aktivaciju (Kleiner *i sar.*, 2012; Cheng *i sar.*, 2018). Takođe, smanjena ekspresija PGC-1 $\alpha$  detektovana je u masnom tkivu gojaznih osoba (Semple *i sar.*, 2004) i osoba sa insulinskom rezistencijom (Hammarstedt *i sar.*, 2003). Rezultati disertacije nisu pokazali razlike u proteinskoj ekspresiji enzima uključenih u  $\beta$ -oksidaciju i oksidativnu fosforilaciju između masnog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih žena sa malignim tumorima, koje bi odgovarale manjoj ekspresiji PGC-1 $\alpha$  u masnom tkivu gojaznih žena u poređenju sa normalno uhranjenim ženama sa malignim tumorima. Međutim, pokazana je manja proteinska ekspresija Nrf2 i osnovnih enzima antioksidativne odbrane u masnom tkivu gojaznih žena sa malignim tumorima, potencijalno ukazujući na vezu između PGC-1 $\alpha$ , metabolizma mitohondrija i redoks homeostaze u masnom tkivu dojke. Nekoliko studija je pokazalo koordinisanu regulaciju ekspresije PGC-1 $\alpha$  i Nrf2, gde ćelijske linije i miševi sa utišanom ekspresijom Nrf2 pokazuju i smanjenu ekspresiju PGC-1 $\alpha$ , dok je farmakološka aktivacija Nrf2 praćena povećanjem ekspresije PGC-1 $\alpha$  (Ryoo *i sar.*, 2018). Takođe, pokazano je da PGC-1 $\alpha$  doprinosi antioksidativnoj odbrani i regulaciji redoks homeostaze kako indirektnom stabilizacijom Nrf2 putem inaktivacije GSK-3 (Choi *i sar.*, 2017) tako i direktnom interakcijom sa Nrf2 i posledičnom aktivacijom ekspresije MnSOD (Cherry *i sar.*, 2014). Uporedo sa ekspresijom PGC-1 $\alpha$ , Nrf2 i enzima antioksidativne odbrane, u disertaciji je pokazana veća proteinska ekspresija UCP1 u masnom tkivu normalno uhranjenih žena sa malignim tumorima u odnosu na masno tkivo gojaznih žena sa malignim tumorima. U svetlu plejotropnih uloga PGC-1 $\alpha$  i Nrf2 u redoks-metaboličkim adaptacijama, ekspresija UCP1 takođe može biti indikator ne samo metaboličkog reprogramiranja već i uspostavljanja nove redoks homeostaze u masnom tkivu. Sa jedne strane, pokazano je aktivacija Nrf2 (Chang *i sar.*, 2021) i PGC-1 $\alpha$  (Bargut *i sar.*, 2017) povećava ekspresiju UCP1 u adipocitima. Sa druge strane, pokazano je da UCP1, pored termogene, ima i važnu antioksidativnu ulogu (Skulachev, 1998; Masschelin *i sar.*, 2020), koja posebno može biti značajna u uslovima povišenih metaboličkih zahteva koji se nameću u malignitetu.

## 6. ZAKLJUČCI

U ovoj doktorskoj disertaciji okarakterisani su redoks i metabolički profili masnog i tumorskog tkiva dojke normalno uhranjenih i gojaznih premenopauzalnih žena sa benignim i malignim tumorom dojke. Identifikovani su ključni metabolički putevi i transkripcioni faktori uključeni u redoks-senzitivno metaboličko reprogramiranje u kontekstu interakcije kancerskih ćelija i adipocita unutar kompleksne tkivne mikrosredine karcinoma dojke. Na osnovu rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- U procesu neoplastične transformacije tumorsko i masno tkivo dojke čine kompleksan pseudo-organ u kome dolazi do uspostavljanja specifičnih redoks i metaboličkih profila u zavisnosti od sistemskih i lokalnih uticaja gojaznosti na tumorsku mikrosredinu.
- Maligna transformacija se karakteriše tkivno specifičnim promenama redoks homeostaze. Maligno tumorsko i njemu asocirano masno tkivo poseduju značajno različite redoks profile u odnosu na respektivno benigno tumorsko i masno tkivo dojke. Po prvi put je pokazano da u masnom tkivu dojke, paralelno sa malignim tumorskim tkivom, dolazi do uspostavljanja nove redoks homeostaze, kao i da je taj proces dirigovan od strane transkripcionog faktora Nrf2. Sinhronizovane, paralelne promene u ekspresiji enzima antioksidativne odbrane otvaraju mogućnost redoks-senzitivne kooperacije između tumorskog i masnog tkiva. Takođe, diferencijalna ekspresija redoks-senzitivnih transkripcionih faktora i enzima antioksidativne odbrane između normalno uhranjenih i gojaznih žena ističe tkivno specifičan uticaj gojaznosti na redoks reprogramiranje maligno transformisanih tkiva.
- Maligna transformacija se karakteriše tkivno specifičnim metaboličkim reprogramiranjem. U malignom tumorskom tkivu i njemu pridruženom masnom tkivu dolazi do indukcije AMPK zavisnog Varburgovog efekta, nezavisno od gojaznosti. U tumorskom tkivu, metabolizam glukoze je usmeren ka glikolitičkom fluksu sa produkcijom laktata i ka pentozofosfatnom putu zarad održavanja bioenergetske, biosintetske i redoks homeostaze, dok je metabolizam glukoze u masnom tkivu primarno usmeren ka fluksu pentozofosfatnog puta. Ovi rezultati ističu da metaboličko reprogramiranje u tkivima dojke vodi uspostavljanju tkivno specifičnog Varburgovog efekta. Takođe, sinhronizovane, recipročne promene u ekspresiji enzima i transportera uključenih u metabolizam laktata otvaraju mogućnost laktatom dirigovane metaboličke kooperacije između tumorskog i masnog tkiva.
- Maligno tumorsko i njemu pridruženo masno tkivo dojke pokazuju tkivno specifične strategije za reprogramiranje oksidativnog metabolizma i metabolizma mitohondrija. Doprinos oksidativnog metabolizma održanju malignog fenotipa pokazan je kroz promene na nivou oksidativne dekarboksilacije piruvata, Krebsovog ciklusa, oksidativne



fosforilacije i  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina. U skladu sa Warburgovim efektom i snažnom indukcijom glikolitičkog fenotipa, oksidativna fosforilacija se održava u tumorskom tkivu zahvaljujući reprogramiranju metabolizma masnih kiselina. Sa druge strane, porast broja kopija mitohondrijske DNK, kao i proteinske ekspresije enzima Krebsovog ciklusa i oksidativne fosforilacije u masnom tkivu ukazuje da je indukcija oksidativnog metabolizma u osnovi metaboličkog reprogramiranja adipocita u malignitetu, dodatno podržavajući postojanje metaboličke simbioze između tumorskog i masnog tkiva dojke.

- Metaboličko reprogramiranje u karcinomu dojke je zavisno od sistemskog i lokalnog uticaja gojaznosti na tumorsku mikrosredinu. Maligno tumorsko tkivo normalno uhranjenih žena karakteriše se visokom koncentracijom laktata, visokom ekspresijom GSK-3 i depozicijama glikogena u citoplazmi kancerskih ćelija, dok se maligno tumorsko tkivo gojaznih žena karakteriše visokom ekspresijom enzima uključenih u mobilizaciju,  $\beta$ -oksidaciju i *de novo* sintezu masnih kiselina.

Generalno, rezultati pokazuju da kod žena sa premenopauzalnim karcinomom dojke dolazi do redoks-senzitivnog metaboličkog reprogramiranja u malignom tumorskom tkivu i njemu pridruženom masnom tkivu. Budući da ova dva tkiva karakteriše koordinisano reprogramiranje, karcinom dojke posmatramo kao kompleksan pseudo-organ koji u procesu tumorogeneze evoluirao u odgovoru, kako na selektivne pritiske poreklom iz tumorske mikrosredine, tako i sistemske kao što je gojaznost.

## LITERATURA

Adam, Julie, Hatipoglu, Emine, O'Flaherty, Linda, Ternette, Nicola, Sahgal, Natasha, Lockstone, Helen, Baban, Dilair, Nye, Emma, Stamp, Gordon W., Wolhuter, Kathryn, Stevens, Marcus, Fischer, Roman, Carmeliet, Peter, Maxwell, Patrick H., Pugh, Chris W., Frizzell, Norma, Soga, Tomoyoshi, Kessler, Benedikt M., El-Bahrawy, Mona, Ratcliffe, Peter J. and Pollard, Patrick J. (2011), Renal Cyst Formation in Fh1-Deficient Mice Is Independent of the Hif/Phd Pathway: Roles for Fumarate in KEAP1 Succination and Nrf2 Signaling. *Cancer Cell*, 20(4): 524–537.

Ahn, Christopher S and Metallo, Christian M (2015), Mitochondria as Biosynthetic Factories for Cancer Proliferation. *Cancer & Metabolism*, 3(1).

Al-Maghrabi, Jaudah, Al-Sakkaf, Kaltoom, Qureshi, Imtiaz Ahmad, Butt, Nadeem Shafique, Damnhory, Lila, Elshal, Mohamed, Al-Maghrabi, Basim, Aldahlawi, Alia, Ashoor, Sawsan, Brown, Barry, Dobson, Pauline and Khabaz, Mohamad Nidal (2017), AMPK Expression Patterns Are Significantly Associated with Poor Prognosis in Breast Cancer Patients. *Annals of Diagnostic Pathology*, 29: 62–67.

Aliyev, Alev Tascioglu, Panieri, Emiliano, Stepanić, Višnja, Gurer-Orhan, Hande and Saso, Luciano (2021), Involvement of NRF2 in Breast Cancer and Possible Therapeutical Role of Polyphenols and Melatonin. *Molecules*, 26(7).

Almeida, Micaela, Soares, Mafalda, Ramalhinho, Ana Cristina, Moutinho, José Fonseca, Breitenfeld, Luiza and Pereira, Luísa (2020), The Prognostic Value of NRF2 in Breast Cancer Patients: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 179(3): 523–532.

Alo', Piero L., Visca, Paolo, Marci, Adele, Mangoni, Antonella, Botti, Claudio and Di Tondo, Ugo (1996), Expression of Fatty Acid Synthase (FAS) as a Predictor of Recurrence in Stage I Breast Carcinoma Patients. *Cancer*, 77(3): 474–482.

Alò, Piero L., Visca, Paolo, Trombetta, Giorgio, Mangoni, Antonella, Lenti, Luisa, Monaco, Simona, Botti, Claudio, Serpieri, Daniele Eleuteri and Di Tondo, Ugo (1999), Fatty Acid Synthase (FAS) Predictive Strength in Poorly Differentiated Early Breast Carcinomas. *Tumori*, 85(1): 35–40.

Altemus, Megan A., Goo, Laura E., Little, Andrew C., Yates, Joel A., Cheriyan, Hannah G., Wu, Zhi Fen and Merajver, Sofia D. (2019), Breast Cancers Utilize Hypoxic Glycogen Stores via PYGB, the Brain Isoform of Glycogen Phosphorylase, to Promote Metastatic Phenotypes. *PLoS ONE*, 14(9).

AMADOR, E., DORFMAN, L. E. and WACKER, W. E. (1963), Serum Lactic Dehydrogenase Activity: An Analytical Assessment of Current Assays. *Clinical chemistry*, 12: 391–399.

Andarawewa, Kumari L., Motrescu, Elena R., Chenard, Marie Pierre, Gansmuller, Anne, Stoll, Isabelle, Tomasetto, Catherine and Rio, Marie Christine (2005), Stromelysin-3 Is a Potent Negative Regulator of Adipogenesis Participating to Cancer Cell-Adipocyte Interaction/Crosstalk at the Tumor Invasive Front. *Cancer Research*, 65(23): 10862–10871.

Andrzejewski, Sylvia, Klimcakova, Eva, Johnson, Radia M., Tabariès, Sébastien, Annis, Matthew

G., McGuirk, Shawn, Northey, Jason J., Chénard, Valérie, Sriram, Urshila, Papadopoli, David J., Siegel, Peter M. and St-Pierre, Julie (2017), PGC-1 $\alpha$  Promotes Breast Cancer Metastasis and Confers Bioenergetic Flexibility against Metabolic Drugs. *Cell Metabolism*, 26(5): 778-787.e5.

De Angel, Rebecca E., Blando, Jorge M., Hogan, Matthew G., Sandoval, Michael A., Lansakara-P, Dharmika S.P., Dunlap, Sarah M., Hursting, Stephen D. and Cui, Zhengrong (2013), Stearoyl Gemcitabine Nanoparticles Overcome Obesity-Induced Cancer Cell Resistance to Gemcitabine in a Mouse Postmenopausal Breast Cancer Model. *Cancer Biology and Therapy*, 14(4): 357–364.

Annie-Mathew, A. S., Prem-Santhosh, Subramanian, Jayasuriya, Ravichandran, Ganesh, Goutham, Ramkumar, Kunka Mohanram and Sarada, D. V.L. (2021), The Pivotal Role of Nrf2 Activators in Adipocyte Biology. *Pharmacological Research*, 173.

Aquilano, Katia, Baldelli, Sara, Pagliei, Beatrice, Cannata, Stefano M., Rotilio, Giuseppe and Ciriolo, Maria R. (2013), P53 Orchestrates the PGC-1 $\alpha$ -Mediated Antioxidant Response upon Mild Redox and Metabolic Imbalance. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(4): 386–399.

Arriarán, Sofía, Agnelli, Silvia, Sabater, David, Remesar, Xavier, Fernández-López, José Antonio and Alemany, Marià (2015), Evidences of Basal Lactate Production in the Main White Adipose Tissue Sites of Rats. Effects of Sex and a Cafeteria Diet. *PLoS ONE*, 10(3).

Atas, Emine, Oberhuber, Monika and Kenner, Lukas (2020), The Implications of PDK1–4 on Tumor Energy Metabolism, Aggressiveness and Therapy Resistance. *Frontiers in Oncology*, 10.

Baenke, Franziska, Dubuis, Sébastien, Brault, Charlene, Weigelt, Britta, Dankworth, Beatrice, Griffiths, Beatrice, Jiang, Ming, MacKay, Alan, Saunders, Becky, Spencer-Dene, Bradley, Ros, Susana, Stamp, Gordon, Reis-Filho, Jorge S., Howell, Michael, Zamboni, Nicola and Schulze, Almut (2015), Functional Screening Identifies MCT4 as a Key Regulator of Breast Cancer Cell Metabolism and Survival. *Journal of Pathology*, 237(2): 152–165.

Baer, Heather J., Tworoger, Shelley S., Hankinson, Susan E. and Willett, Walter C. (2010), Body Fatness at Young Ages and Risk of Breast Cancer throughout Life. *American Journal of Epidemiology*, 171(11): 1183–1194.

Bai, Ren Kui, Chang, Julia, Yeh, Kun Tu, Lou, Mary Ann, Lu, Jyh Feng, Tan, Duan Jun, Liu, Hao and Wong, Lee Jun C. (2011), Mitochondrial DNA Content Varies with Pathological Characteristics of Breast Cancer. *Journal of Oncology*.

Balaban, Seher, Shearer, Robert F., Lee, Lisa S., van Geldermalsen, Michelle, Schreuder, Mark, Shtein, Harrison C., Cairns, Rose, Thomas, Kristen C., Fazakerley, Daniel J., Grewal, Thomas, Holst, Jeff, Saunders, Darren N. and Hoy, Andrew J. (2017), Adipocyte Lipolysis Links Obesity to Breast Cancer Growth: Adipocyte-Derived Fatty Acids Drive Breast Cancer Cell Proliferation and Migration. *Cancer & Metabolism*, 5(1).

Balliet, Renee M., Capparelli, Claudia, Guido, Carmela, Pestell, Timothy G., Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Lin, Zhao, Whitaker-Menezes, Diana, Chiavarina, Barbara, Pestell, Richard G., Howell, Anthony, Sotgia, Federica and Lisanti, Michael P. (2011), Mitochondrial Oxidative Stress in Cancer-Associated Fibroblasts Drives Lactate Production, Promoting Breast Cancer Tumor Growth: Understanding the Aging and Cancer Connection. *Cell Cycle*, 10(23): 4065–4073.

- Bargut, Thereza Cristina Lonzetti, Souza-Mello, Vanessa, Aguila, Marcia Barbosa and Mandarim-De-Lacerda, Carlos Alberto (2017), Browning of White Adipose Tissue: Lessons from Experimental Models. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 31(1).
- Bekele, Raie T., Venkatraman, Ganesh, Liu, Rong Zong, Tang, Xiaoyun, Mi, Si, Benesch, Matthew G.K., MacKey, John R., Godbout, Roseline, Curtis, Jonathan M., McMullen, Todd P.W. and Brindley, David N. (2016), Oxidative Stress Contributes to the Tamoxifen-Induced Killing of Breast Cancer Cells: Implications for Tamoxifen Therapy and Resistance. *Scientific Reports*, 6.
- Benedetti, Angelo, Comporti, Mario and Esterbauer, Hermann (1980), Identification of 4-Hydroxynonenal as a Cytotoxic Product Originating from the Peroxidation of Liver Microsomal Lipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 620(2): 281–296.
- De Berardinis, Ralph J. and Chandel, Navdeep S. (2016), Fundamentals of Cancer Metabolism. *Science Advances*, 2(5).
- Bilodeau, Jean François, Patenaude, Alexandre, Piedboeuf, Bruno, Carrier, Caroline, Petrov, Peter, Faure, Robert and Mirault, Marc Edouard (2002), Glutathione Peroxidase-1 Expression Enhances Recovery of Human Breast Carcinoma Cells from Hyperoxic Cell Cycle Arrest. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(9): 1279–1289.
- Birmann, Brenda, Nieters, Alexandra and Purdue, Mark (2017), Young Adult and Usual Adult Body Mass Index and Multiple Myeloma Risk: A Pooled Analysis in the International Multiple Myeloma Consortium (IMMC). , 26(6): 876–885.
- Bollong, Michael J., Lee, Gihoon, Coukos, John S., Yun, Hwayoung, Zambaldo, Claudio, Chang, Jae Won, Chin, Emily N., Ahmad, Insha, Chatterjee, Arnab K., Lairson, Luke L., Schultz, Peter G. and Moellering, Raymond E. (2018), A Metabolite-Derived Protein Modification Integrates Glycolysis with KEAP1–NRF2 Signalling. *Nature*, 562(7728): 600–604.
- Boroughs, Lindsey K. and Deberardinis, Ralph J. (2015), Metabolic Pathways Promoting Cancer Cell Survival and Growth. *Nature Cell Biology*, 17(4): 351–359.
- Bose, Chhanda, Hindle, Ashly, Lee, Jihyun, Kopel, Jonathan, Tonk, Sahil, Palade, Philip T., Singhal, Sharad S., Awasthi, Sanjay and Singh, Sharda P. (2021), Anticancer Activity of  $\Omega$ -6 Fatty Acids through Increased 4-Hne in Breast Cancer Cells. *Cancers*, 13(24).
- Bost, Frederic and Kaminski, Lisa (2019), The Metabolic Modulator PGC-1 $\alpha$  in Cancer. *American journal of cancer research*, 9(2): 198–211.
- Bray, Freddie, Ferlay, Jacques, Soerjomataram, Isabelle, Siegel, Rebecca L., Torre, Lindsey A. and Jemal, Ahmedin (2018), Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6): 394–424.
- Brodsky, Arthur Nathan, Odenwelder, Daniel C. and Harcum, Sarah W. (2019), High Extracellular Lactate Causes Reductive Carboxylation in Breast Tissue Cell Lines Grown under Normoxic Conditions. *PLoS ONE*, 14(6).
- Brooks, George A. (2020), Lactate as a Fulcrum of Metabolism. *Redox Biology*, 35.
- Brown, Nicola J., Higham, Sue E., Perunovic, Branko, Arafa, Mohammad, Balasubramanian,

Sabapathy and Rehman, Ishtiaq (2013), Lactate Dehydrogenase-B Is Silenced by Promoter Methylation in a High Frequency of Human Breast Cancers. *PLoS ONE*, 8(2).

Buijs, Jeroen T., Cleton, Anne Marie, Smit, Vincent T.H.B.M., Löwik, Clemens W.G.M., Papapoulos, Socrates E. and Van Der Pluijm, Gabri (2004), Prognostic Significance of Periodic Acid-Schiff-Positive Patterns in Primary Breast Cancer and Its Lymph Node Metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 84(2): 117–130.

Burhans, William C. and Heintz, Nicholas H. (2009), The Cell Cycle Is a Redox Cycle: Linking Phase-Specific Targets to Cell Fate. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(9): 1282–1293.

Cai, Hongshi, Li, Jiabin, Zhang, Yadong, Liao, Yan, Zhu, Yue, Wang, Cheng and Hou, Jinsong (2019), LDHA Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression Through Facilitating Glycolysis and Epithelial–Mesenchymal Transition. *Frontiers in Oncology*, 9.

Cao, Maria D., Lamichhane, Santosh, Lundgren, Steinar, Bofin, Anna, Fjøsne, Hans, Giskeødegård, Guro F. and Bathen, Tone F. (2014), Metabolic Characterization of Triple Negative Breast Cancer. *BMC Cancer*, 14(1).

Carling, David (2017), AMPK Signalling in Health and Disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 45: 31–37.

Carrière, Audrey, Jeanson, Yannick, Berger-Müller, Sandra, André, Mireille, Chenouard, Vanessa, Arnaud, Emmanuelle, Barreau, Corinne, Walther, Romy, Galinier, Anne, Wdziekonski, Brigitte, Villageois, Phi, Louche, Katie, Collas, Philippe, Moro, Cédric, Dani, Christian, Villarroja, Francesc and Casteilla, Louis (2014), Browning of White Adipose Cells by Intermediate Metabolites: An Adaptive Mechanism to Alleviate Redox Pressure. *Diabetes*, 63(10): 3253–3265.

Cha, Yoon Jin, Kim, Eun Sol and Koo, Ja Seung (2018), Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3).

Chan, D. S.M., Vieira, A. R., Aune, D., Bandera, E. V., Greenwood, D. C., McTiernan, A., Navarro Rosenblatt, D., Thune, I., Vieira, R. and Norat, T. (2014), Body Mass Index and Survival in Women with Breast Cancer—Systematic Literature Review and Meta-Analysis of 82 Follow-up Studies. *Annals of Oncology*, 25(10): 1901–1914.

Chang, Chia Chi, Zhang, Chenyu, Zhang, Qingling, Sahin, Ozgur, Wang, Hai, Xu, Jia, Xiao, Yi, Zhang, Jian, Rehman, Sumaiyah K., Li, Ping, Hung, Mien Chie, Behbod, Fariba and Yu, Dihua (2016), Upregulation of Lactate Dehydrogenase a by 14-3-3ζ Leads to Increased Glycolysis Critical for Breast Cancer Initiation and Progression. *Oncotarget*, 7(23): 35270–35283.

Chang, Seo Hyuk, Jang, Jaeyool, Oh, Seungjun, Yoon, Jung Hoon, Jo, Dong Gyu, Yun, Ui Jeong and Park, Kye Won (2021), Nrf2 Induces Ucp1 Expression in Adipocytes in Response to B3-AR Stimulation and Enhances Oxygen Consumption in High-Fat Diet-Fed Obese Mice. *BMB Reports*, 54(8): 419–424.

Chattopadhyay, Mrityika, Guhathakurta, Ishita, Behera, Prajna, Ranjan, Kumar Rajeev, Khanna, Manoj, Mukhopadhyay, Satinath and Chakrabarti, Sasanka (2011), Mitochondrial Bioenergetics Is Not Impaired in Nonobese Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60(12): 1702–1710.

- Chaube, B., Malvi, P., Singh, S. V., Mohammad, N., Viollet, B. and Bhat, M. K. (2015), AMPK Maintains Energy Homeostasis and Survival in Cancer Cells via Regulating P38/PGC-1 $\alpha$ -Mediated Mitochondrial Biogenesis. *Cell Death Discovery*, 1(1).
- Chen, An Na, Luo, Yan, Yang, Yu Han, Fu, Jian Tao, Geng, Xiu Mei, Shi, Jun Ping and Yang, Jin (2021), Lactylation, a Novel Metabolic Reprogramming Code: Current Status and Prospects. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Chen, Yu Chih, Sahoo, Saswat, Brien, Riley, Jung, Seungwon, Humphries, Brock, Lee, Woncheol, Cheng, Yu Heng, Zhang, Zhixiong, Luker, Kathryn E., Wicha, Max S., Luker, Gary D. and Yoon, Euisik (2019), Single-Cell RNA-Sequencing of Migratory Breast Cancer Cells: Discovering Genes Associated with Cancer Metastasis. *Analyst*, 144(24): 7296–7309.
- Cheng, Ching Feng, Ku, Hui Chen and Lin, Heng (2018), Pgc-1 $\alpha$  as a Pivotal Factor in Lipid and Metabolic Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11).
- Cheraghi, Zahra, Poorolajal, Jalal, Hashem, Tahereh, Esmailnasab, Nader and Doosti Irani, Amin (2012), Effect of Body Mass Index on Breast Cancer during Premenopausal and Postmenopausal Periods: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 7(12).
- Cherry, Anne D., Suliman, Hagir B., Bartz, Raquel R. and Piantadosi, Claude A. (2014), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Co-Activator 1- $\alpha$  as a Critical Co-Activator of the Murine Hepatic Oxidative Stress Response and Mitochondrial Biogenesis in Staphylococcus Aureus Sepsis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1): 41–52.
- Cheung, Eric C., Lee, Pearl, Ceteci, Fatih, Nixon, Colin, Blyth, Karen, Sansom, Owen J. and Vousden, Karen H. (2016), Opposing Effects of TIGAR- and RAC1- Derived ROS on Wnt-Driven Proliferation in the Mouse Intestine. *Genes and Development*, 30(1): 52–63.
- Choi, Hoon In, Kim, Hye Jin, Park, Jung Sun, Kim, In Jin, Bae, Eun Hui, Ma, Seong Kwon and Kim, Soo Wan (2017), PGC-1 $\alpha$  Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Apoptotic Cell Death by Upregulating Nrf-2 via GSK3 $\beta$  Inactivation Mediated by Activated P38 in HK-2 Cells. *Scientific Reports*, 7(1).
- Christe, Martine, Hirzel, Estelle, Lindinger, Andrea, Kern, Beatrice, von Flüe, Markus, Peterli, Ralph, Peters, Thomas, Eberle, Alex N. and Lindinger, Peter W. (2013), Obesity Affects Mitochondrial Citrate Synthase in Human Omental Adipose Tissue. *ISRN Obesity*, 2013: 1–8.
- Christopoulos, Panagiotis F., Msaouel, Pavlos and Koutsilieris, Michael (2015), The Role of the Insulin-like Growth Factor-1 System in Breast Cancer. *Molecular Cancer*, 14(1).
- Clement, Emily, Lazar, Ikrame, Attané, Camille, Carrié, Lorry, Dauvillier, Stéphanie, Ducoux-Petit, Manuelle, Esteve, David, Menneteau, Thomas, Moutahir, Mohamed, Le Gonidec, Sophie, Dalle, Stéphane, Valet, Philippe, Burlet-Schiltz, Odile, Muller, Catherine and Nieto, Laurence (2020), Adipocyte Extracellular Vesicles Carry Enzymes and Fatty Acids That Stimulate Mitochondrial Metabolism and Remodeling in Tumor Cells. *The EMBO Journal*, 39(3).
- Cluntun, Ahmad A., Lukey, Michael J., Cerione, Richard A. and Locasale, Jason W. (2017), Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends in Cancer*, 3(3): 169–180.
- Coelho, Raquel G., Calaça, Isadora C., Celestrini, Deborah M., Correia-Carneiro, Ana Helena P.,

Costa, Mauricio M., Zancan, Patricia and Sola-Penna, Mauro (2015), Hexokinase and Phosphofructokinase Activity and Intracellular Distribution Correlate with Aggressiveness and Invasiveness of Human Breast Carcinoma. *Oncotarget*, 6(30): 29375–29387.

Cohen, G., Riahi, Y. and Sasson, S. (2011), Lipid Peroxidation of Poly-Unsaturated Fatty Acids in Normal and Obese Adipose Tissues. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 117(3): 131–139.

Coloff, Jonathan L., Murphy, J. Patrick, Braun, Craig R., Harris, Isaac S., Shelton, Laura M., Kami, Kenjiro, Gygi, Steven P., Selfors, Laura M. and Brugge, Joan S. (2016), Differential Glutamate Metabolism in Proliferating and Quiescent Mammary Epithelial Cells. *Cell Metabolism*, 23(5): 867–880.

Commisso, Cosimo, Davidson, Shawn M., Soydaner-Azeloglu, Rengin G., Parker, Seth J., Kamphorst, Jurre J., Hackett, Sean, Grabocka, Elda, Nofal, Michel, Drebin, Jeffrey A., Thompson, Craig B., Rabinowitz, Joshua D., Metallo, Christian M., Vander Heiden, Matthew G. and Barsagi, Dafna (2013), Macropinocytosis of Protein Is an Amino Acid Supply Route in Ras-Transformed Cells. *Nature*, 497(7451): 633–637.

Corkey, Barbara E. and Deeney, Jude T. (2020), The Redox Communication Network as a Regulator of Metabolism. *Frontiers in Physiology*, 11.

Croteau, Deborah L. and Bohr, Vilhelm A. (1997), Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41): 25409–25412.

Crujeiras, A. B., Cabilia, B., Carreira, M. C., Amil, M., Cueva, J., Andrade, S., Seoane, L. M., Pardo, M., Sueiro, A., Baltar, J., Morais, T., Monteiro, M. P., Lopez-Lopez, R. and Casanueva, F. F. (2016), Secreted Factors Derived from Obese Visceral Adipose Tissue Regulate the Expression of Breast Malignant Transformation Genes. *International Journal of Obesity*, 40(3): 514–523.

Curtis, Marion, Kenny, Hilary A., Ashcroft, Bradley, Mukherjee, Abir, Johnson, Alyssa, Zhang, Yilin, Helou, Ynes, Battle, Raquel, Liu, Xiaojing, Gutierrez, Nuria, Gao, Xia, Yamada, S. Diane, Lastra, Ricardo, Montag, Anthony, Ahsan, Nagib, Locasale, Jason W., Salomon, Arthur R., Nebreda, Angel R. and Lengyel, Ernst (2019), Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metabolism*, 29(1): 141-155.e9.

D'Autréaux, Benoît and Toledano, Michel B. (2007), ROS as Signalling Molecules: Mechanisms That Generate Specificity in ROS Homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10): 813–824.

Davison, Calli A., Durbin, Sienna M., Thau, Matthew R., Zellmer, Victoria R., Chapman, Sarah E., Diener, Justin, Wathen, Connor, Leevy, W. Matthew and Schafer, Zachary T. (2013), Antioxidant Enzymes Mediate Survival of Breast Cancer Cells Deprived of Extracellular Matrix. *Cancer Research*, 73(12): 3704–3715.

Dawane, Jayshree Shriram (2012), Understanding Redox Homeostasis and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*.

DeBerardinis, Ralph J. and Chandel, Navdeep S. (2020), We Need to Talk about the Warburg Effect. *Nature Metabolism*, 2(2): 127–129.

- DeBerardinis, Ralph J., Lum, Julian J. and Thompson, Craig B. (2006), Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Modulation of Carnitine Palmitoyltransferase 1A Expression Regulates Lipid Metabolism during Hematopoietic Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49): 37372–37380.
- Deng, Xinyue, Lin, Nan, Fu, Jiaying, Xu, Long, Luo, Haoge, Jin, Yao, Liu, Yanan, Sun, Liankun and Su, Jing (2020), The Nrf2/PGC1 $\alpha$  Pathway Regulates Antioxidant and Proteasomal Activity to Alter Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Deshmukh, Sachin K., Srivastava, Sanjeev K., Bhardwaj, Arun, Singh, Ajay P., Tyagi, Nikhil, Marimuthu, Saravanakumar, Dyess, Donna L., Zotto, Valeria Dal, Carter, James E. and Singh, Seema (2015), Resistin and Interleukin-6 Exhibit Racially-Disparate Expression in Breast Cancer Patients, Display Molecular Association and Promote Growth and Aggressiveness of Tumor Cells through STAT3 Activation. *Oncotarget*, 6(13): 11231–11241.
- Dias, Ana S., Almeida, Catarina R., Helguero, Luisa A. and Duarte, Iola F. (2019), Metabolic Crosstalk in the Breast Cancer Microenvironment. *European Journal of Cancer*, 121: 154–171.
- Dieudonne, Marie Noelle, Bussiere, Marianne, Dos Santos, Esther, Leneveu, Marie Christine, Giudicelli, Yves and Pecquery, René (2006), Adiponectin Mediates Antiproliferative and Apoptotic Responses in Human MCF7 Breast Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(1): 271–279.
- Dinkova-Kostova, Alben T. and Abramov, Andrey Y. (2015), The Emerging Role of Nrf2 in Mitochondrial Function. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Part B): 179–188.
- Dirat, Béatrice, Bochet, Ludivine, Dabek, Marta, Daviaud, Danièle, Dauvillier, Stéphanie, Majed, Bilal, Wang, Yuan Yuan, Meulle, Aline, Salles, Bernard, Le Gonidec, Sophie, Garrido, Ignacio, Escourrou, Ghislaine, Valet, Philippe and Muller, Catherine (2011), Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. *Cancer Research*, 71(7): 2455–2465.
- Domínguez-de-la-Cruz, Eduardo, Muñoz, María de Lourdes, Pérez-Muñoz, Ashael, García-Hernández, Normand, Moctezuma- Meza, Christian and Hinojosa-Cruz, Juan Carlos (2020), Reduced Mitochondrial DNA Copy Number Is Associated with the Haplogroup, and Some Clinical Features of Breast Cancer in Mexican Patients. *Gene*, 761.
- Doskey, Claire M., Buranasudja, Visarut, Wagner, Brett A., Wilkes, Justin G., Du, Juan, Cullen, Joseph J. and Buettner, Garry R. (2016), Tumor Cells Have Decreased Ability to Metabolize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Implications for Pharmacological Ascorbate in Cancer Therapy. *Redox Biology*, 10: 274–284.
- Duong, Minh Ngoc, Cleret, Aurore, Matera, Eva Laure, Chettab, Kamel, Mathé, Doriane, Valsesia-Wittmann, Sandrine, Clémenceau, Béatrice and Dumontet, Charles (2015), Adipose Cells Promote Resistance of Breast Cancer Cells to Trastuzumab-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Breast Cancer Research*, 17(1).
- Duong, Minh Ngoc, Geneste, Aline, Fallone, Frederique, Li, Xia, Dumontet, Charles and Muller, Catherine (2017), The Fat and the Bad: Mature Adipocytes, Key Actors in Tumor Progression and Resistance. *Oncotarget*, 8(34): 57622–57641.



- Dupuy, Fanny, Tabariès, Sébastien, Andrzejewski, Sylvia, Dong, Zhifeng, Blagih, Julianna, Annis, Matthew G., Omeroglu, Atilla, Gao, Dongxia, Leung, Samuel, Amir, Eitan, Clemons, Mark, Aguilar-Mahecha, Adriana, Basik, Mark, Vincent, Emma E., St.-Pierre, Julie, Jones, Russell G. and Siegel, Peter M. (2015), PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metabolism*, 22(4): 577–589.
- Egeblad, Mikala, Nakasone, Elizabeth S. and Werb, Zena (2010), Tumors as Organs: Complex Tissues That Interface with the Entire Organism. *Developmental Cell*, 18(6): 884–901.
- Eliyatkin, Nuket, Yalcin, Evrim, Zengel, Baha, Aktaş, Safiye and Vardar, Enver (2015), Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*, 11(2): 59–66.
- Elliott, Bruce E., Tam, S. -P, Dexter, D. and Chen, Z. Q. (1992), Capacity of Adipose Tissue to Promote Growth and Metastasis of a Murine Mammary Carcinoma: Effect of Estrogen and Progesterone. *International Journal of Cancer*, 51(3): 416–424.
- Elliott, R and Barnett, B (2011), Ultrastructural Observation of Mitochondria in Human Breast Carcinoma Cells. *Microscopy and Microanalysis*, 17(S2): 194–195.
- Endo, Hitoshi, Owada, Satoshi, Inagaki, Yutaka, Shida, Yukari and Tatemichi, Masayuki (2018), Glucose Starvation Induces LKB1-AMPK-Mediated MMP-9 Expression in Cancer Cells. *Scientific Reports*, 8(1).
- Fan, Alex Xiu Cheng, Radpour, Ramin, Haghghi, Mahdi Montazer, Kohler, Corina, Xia, Peng, Hahn, Sinuhe, Holzgreve, Wolfgang and Zhong, Xiao Yan (2009), Mitochondrial DNA Content in Paired Normal and Cancerous Breast Tissue Samples from Patients with Breast Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135(8): 983–989.
- Fan, Jing, Ye, Jiangbin, Kamphorst, Jurre J., Shlomi, Tomer, Thompson, Craig B. and Rabinowitz, Joshua D. (2014), Quantitative Flux Analysis Reveals Folate-Dependent NADPH Production. *Nature*, 510(7504): 298–302.
- Faubert, Brandon, Solmonson, Ashley and DeBerardinis, Ralph J. (2020), Metabolic Reprogramming and Cancer Progression. *Science*, 368(6487).
- Fouad, Yousef Ahmed and Aanei, Carmen (2017), Revisiting the Hallmarks of Cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5): 1016–1036.
- Fox, Melissa M., Phoenix, Kathryn N., Kopsiaftis, Stavros G. and Claffey, Kevin P. (2013), AMP-Activated Protein Kinase  $\alpha$  2 Isoform Suppression in Primary Breast Cancer Alters AMPK Growth Control and Apoptotic Signaling. *Genes and Cancer*, 4(1–2): 3–14.
- Galadari, Sehamuddin, Rahman, Anees, Pallichankandy, Siraj and Thayyullathil, Faisal (2017), Reactive Oxygen Species and Cancer Paradox: To Promote or to Suppress? *Free Radical Biology and Medicine*, 104: 144–164.
- Van Geldermalsen, M., Wang, Q., Nagarajah, R., Marshall, A. D., Thoeng, A., Gao, D., Ritchie, W., Feng, Y., Bailey, C. G., Deng, N., Harvey, K., Beith, J. M., Selinger, C. I., O’Toole, S. A., Rasko, J. E.J. and Holst, J. (2016), ASCT2/SLC1A5 Controls Glutamine Uptake and Tumour Growth in Triple-Negative Basal-like Breast Cancer. *Oncogene*, 35(24): 3201–3208.

- Glasauer, Andrea and Chandel, Navdeep S. (2014), Targeting Antioxidants for Cancer Therapy. *Biochemical Pharmacology*, 92(1): 90–101.
- Gomez, Maria L., Shah, Nagma, Kenny, Timothy C., Jenkins, Edmund C. and Germain, Doris (2019), SOD1 Is Essential for Oncogene-Driven Mammary Tumor Formation but Dispensable for Normal Development and Proliferation. *Oncogene*, 38(29): 5751–5765.
- Gönenç, Aymelek, Tokgöz, Devrim, Aslan, Sabahattin and Torun, Meral (2005), Oxidative Stress in Relation to Lipid Profiles in Different Stages of Breast Cancer. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42(3): 190–194.
- Gonzalez-Perez, Ruben R., Xu, Yanbo, Guo, Shanchun, Watters, Amber, Zhou, Weiqiang and Leibovich, Samuel J. (2010), Leptin Upregulates VEGF in Breast Cancer via Canonic and Non-Canonical Signalling Pathways and NFκB/HIF-1α Activation. *Cellular Signalling*, 22(9): 1350–1362.
- Goodwin, Pamela J., Ennis, Marguerite, Pritchard, Kathleen I., Trudeau, Maureen E., Koo, Jarley, Madarnas, Yolanda, Hartwick, Warren, Hoffman, Barry and Hood, Nicky (2002), Fasting Insulin and Outcome in Early-Stage Breast Cancer: Results of a Prospective Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology*, 20(1): 42–51.
- Goossens, Gijs H., Bizzarri, Alessandro, Venteclef, Nicolas, Essers, Yvonne, Cleutjens, Jack P., Konings, Ellen, Jocken, Johan W.E., Čajlaković, Merima, Ribitsch, Volker, Clément, Karine and Blaak, Ellen E. (2011), Increased Adipose Tissue Oxygen Tension in Obese Compared with Lean Men Is Accompanied by Insulin Resistance, Impaired Adipose Tissue Capillarization, and Inflammation. *Circulation*, 124(1): 67–76.
- Gouazé, Valérie, Mirault, Marc Edouard, Carpentier, Stéphane, Salvayre, Robert, Levade, Thierry and Andrieu-Abadie, Nathalie (2001), Glutathione Peroxidase-1 Overexpression Prevents Ceramide Production and Partially Inhibits Apoptosis in Doxorubicin-Treated Human Breast Carcinoma Cells. *Molecular Pharmacology*, 60(3): 488–496.
- Gouirand, Victoire, Guillaumond, Fabienne and Vasseur, Sophie (2018), Influence of the Tumor Microenvironment on Cancer Cells Metabolic Reprogramming. *Frontiers in Oncology*, 8(APR).
- Green, Courtney R., Wallace, Martina, Divakaruni, Ajit S., Phillips, Susan A., Murphy, Anne N., Ciaraldi, Theodore P. and Metallo, Christian M. (2016), Branched-Chain Amino Acid Catabolism Fuels Adipocyte Differentiation and Lipogenesis. *Nature Chemical Biology*, 12(1): 15–21.
- Grossmann, M. E., Nkhata, K. J., Mizuno, N. K., Ray, A. and Cleary, M. P. (2008), Effects of Adiponectin on Breast Cancer Cell Growth and Signaling. *British Journal of Cancer*, 98(2): 370–379.
- Guda, Maheedhara R, Asuthkar, Swapna, Labak, Collin M, Tsung, Andrew J, Alexandrov, Ilya, Mackenzie, Malcolm J, Prasad, Durbaka Vr and Velpula, Kiran K (2018), Targeting PDK4 Inhibits Breast Cancer Metabolism. *American journal of cancer research*, 8(9): 1725–1738.
- Guha, M., Srinivasan, S., Ruthel, G., Kashina, A. K., Carstens, R. P., Mendoza, A., Khanna, C., Van Winkle, T. and Avadhani, N. G. (2014), Mitochondrial Retrograde Signaling Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Generates Breast Cancer Stem Cells. *Oncogene*, 33(45): 5238–5250.

Guha, Manti, Srinivasan, Satish, Raman, Pichai, Jiang, Yuefu, Kaufman, Brett A., Taylor, Deanne, Dong, Dawei, Chakrabarti, Rumela, Picard, Martin, Carstens, Russ P., Kijima, Yuko, Feldman, Mike and Avadhani, Narayan G. (2018), Aggressive Triple Negative Breast Cancers Have Unique Molecular Signature on the Basis of Mitochondrial Genetic and Functional Defects. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(4): 1060–1071.

Gui, Yu, Pan, Qinwen, Chen, Xianchun, Xu, Shuman, Luo, Xiangdong and Chen, Li (2017), The Association between Obesity Related Adipokines and Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Oncotarget*, 8(43): 75389–75399.

Halliwell, Barry (2007), Oxidative Stress and Cancer: Have We Moved Forward? *Biochemical Journal*, 401(1): 1–11.

Halliwell, Barry and Gutteridge, John M. C. (2015), *Free Radicals in Biology and Medicine*.

Hammarstedt, A., Jansson, P. A., Wesslau, C., Yang, X. and Smith, U. (2003), Reduced Expression of PGC-1 and Insulin-Signaling Molecules in Adipose Tissue Is Associated with Insulin Resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2): 578–582.

Hanahan, Douglas and Weinberg, Robert A. (2000), The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1): 57–70.

Hanahan, Douglas and Weinberg, Robert A. (2011), Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell*, 144(5): 646–674.

Hao, Jiaqing, Zhang, Yuwen, Yan, Xiaofang, Yan, Fei, Sun, Yanwen, Zeng, Jun, Waigel, Sabine, Yin, Yanhui, Fraig, Mostafa M., Egilmez, Nejat K., Suttles, Jill, Kong, Maiying, Liu, Shujun, Cleary, Margot P., Sauter, Edward and Li, Bing (2018), Circulating Adipose Fatty Acid Binding Protein Is a New Link Underlying Obesity-Associated Breast/Mammary Tumor Development. *Cell Metabolism*, 28(5): 689-705.e5.

Hart, Peter C., Mao, Mao, De Abreu, Andre Luelsdorf P., Ansenberger-Fricano, Kristine, Ekoue, Dede N., Ganini, Douglas, Kajdacsy-Balla, Andre, Diamond, Alan M., Minshall, Richard D., Consolaro, Marcia E.L., Santos, Janine H. and Bonini, Marcelo G. (2015), MnSOD Upregulation Sustains the Warburg Effect via Mitochondrial ROS and AMPK-Dependent Signalling in Cancer. *Nature Communications*, 6.

Hart, Peter C., Ratti, Bianca A., Mao, Mao, Ansenberger-Fricano, Kristine, Shajahan-Haq, Ayesha N., Tyner, Angela L., Minshall, Richard D. and Bonini, Marcelo G. (2016), Caveolin-1 Regulates Cancer Cell Metabolism via Scavenging Nrf2 and Suppressing MnSOD-Driven Glycolysis. *Oncotarget*, 7(1): 308–322.

He, Chenxia, Danes, Jeanne M., Hart, Peter C., Zhu, Yueming, Huang, Yunping, de Abreu, Andre Luelsdorf, O'Brien, Joseph, Mathison, Angela J., Tang, Binwu, Frasor, Jonna M., Wakefield, Lalage M., Ganini, Douglas, Stauder, Erich, Zielonka, Jacek, Gantner, Benjamin N., Urrutia, Raul A., Gius, David and Bonini, Marcelo G. (2019), SOD2 Acetylation on Lysine 68 Promotes Stem Cell Reprogramming in Breast Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(47): 23534–23541.

He, Feng, Antonucci, Laura and Karin, Michael (2020), NRF2 as a Regulator of Cell Metabolism and Inflammation in Cancer. *Carcinogenesis*, 41(4): 405–416.

He, Feng, Ru, Xiaoli and Wen, Tao (2020), NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13): 1–23.

Heer, Emily, Harper, Andrew, Escandor, Noah, Sung, Hyuna, McCormack, Valerie and Fidler-Benaoudia, Miranda M. (2020), Global Burden and Trends in Premenopausal and Postmenopausal Breast Cancer: A Population-Based Study. *The Lancet Global Health*, 8(8): e1027–e1037.

Heiden, Matthew G. Vander, Cantley, Lewis C. and Thompson, Craig B. (2009), Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930): 1029–1033.

Heinonen, Sini, Buzkova, Jana, Muniandy, Maheswary, Kaksonen, Risto, Ollikainen, Miina, Ismail, Khadeeja, Hakkarainen, Antti, Lundbom, Jesse, Lundbom, Nina, Vuolteenaho, Katriina, Moilanen, Eeva, Kaprio, Jaakko, Rissanen, Aila, Suomalainen, Anu and Pietiläinen, Kirsi H. (2015), Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes*, 64(9): 3135–3145.

Heinonen, Sini, Muniandy, Maheswary, Buzkova, Jana, Mardinoglu, Adil, Rodríguez, Amaia, Frühbeck, Gema, Hakkarainen, Antti, Lundbom, Jesper, Lundbom, Nina, Kaprio, Jaakko, Rissanen, Aila and Pietiläinen, Kirsi H. (2017), Mitochondria-Related Transcriptional Signature Is Downregulated in Adipocytes in Obesity: A Study of Young Healthy MZ Twins. *Diabetologia*, 60(1): 169–181.

Hensley, Christopher T., Wasti, Ajla T. and DeBerardinis, Ralph J. (2013), Glutamine and Cancer: Cell Biology, Physiology, and Clinical Opportunities. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9): 3678–3684.

Herroon, Mackenzie K., Rajagurubandara, Erandi, Diedrich, Jonathan D., Heath, Elisabeth I. and Podgorski, Izabela (2018), Adipocyte-Activated Oxidative and ER Stress Pathways Promote Tumor Survival in Bone via Upregulation of Heme Oxygenase 1 and Survivin. *Scientific Reports*, 8(1).

Hilf, Russell, Rector, William D. and Orlando, Robert A. (1976), Multiple Molecular Forms of Lactate Dehydrogenase and Glucose 6-phosphate Dehydrogenase in Normal and Abnormal Human Breast Tissues. *Cancer*, 37(4): 1825–1830.

Hong, Candice Sun, Graham, Nicholas A., Gu, Wen, Espindola Camacho, Carolina, Mah, Vei, Maresh, Erin L., Alavi, Mohammed, Bagryanova, Lora, Krotee, Pascal A.L., Gardner, Brian K., Behbahan, Iman Saramipoor, Horvath, Steve, Chia, David, Mellinghoff, Ingo K., Hurvitz, Sara A., Dubinett, Steven M., Critchlow, Susan E., Kurdistani, Siavash K., Goodglick, Lee, Braas, Daniel, Graeber, Thomas G. and Christofk, Heather R. (2016), MCT1 Modulates Cancer Cell Pyruvate Export and Growth of Tumors That Co-Express MCT1 and MCT4. *Cell Reports*, 14(7): 1590–1601.

Hornsveld, Marten and Dansen, Tobias B. (2016), The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective. *Antioxidants and Redox Signaling*, 25(6): 300–325.

Huang, Xiaojia, Li, Xing, Xie, Xinhua, Ye, Feng, Chen, Bo, Song, Cailu, Tang, Hailin and Xie, Xiaoming (2016), High Expressions of LDHA and AMPK as Prognostic Biomarkers for Breast Cancer. *Breast*, 30: 39–46.

Huang, Ying, Li, Wenge and Kong, Ah Ng T. (2012), Anti-Oxidative Stress Regulator NF-E2-Related Factor 2 Mediates the Adaptive Induction of Antioxidant and Detoxifying Enzymes by Lipid Peroxidation Metabolite 4-Hydroxynonenal. *Cell and Bioscience*, 2(1).

Hursting, Stephen D., DiGiovanni, John, Dannenberg, Andrew J., Azrad, Maria, LeRoith, Derek, Demark-Wahnefried, Wendy, Kakarala, Madhuri, Brodie, Angela and Berger, Nathan A. (2012), Obesity, Energy Balance, and Cancer: New Opportunities for Prevention. *Cancer Prevention Research*, 5(11): 1260–1272.

Hussien, Rajaa and Brooks, George A. (2011), Mitochondrial and Plasma Membrane Lactate Transporter and Lactate Dehydrogenase Isoform Expression in Breast Cancer Cell Lines. *Physiological Genomics*, 43(5): 255–264.

Jacquet, Pierre and Stéphanou, Angélique (2021), Metabolic Reprogramming, Questioning, and Implications for Cancer. *Biology*, 10(2): 1–7.

Jäer, Sibylle, Handschin, Christoph, St-Pierre, Julie and Spiegelman, Bruce M. (2007), AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Action in Skeletal Muscle via Direct Phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29): 12017–12022.

Jankovic, Aleksandra, Korac, Aleksandra, Buzadzic, Biljana, Otasevic, Vesna, Stancic, Ana, Daiber, Andreas and Korac, Bato (2015), Redox Implications in Adipose Tissue (Dys)Function-A New Look at Old Acquaintances. *Redox Biology*, 6: 19–32.

Jankovic, Aleksandra, Korac, Aleksandra, Srdic-Galic, Biljana, Buzadzic, Biljana, Otasevic, Vesna, Stancic, Ana, Vucetic, Milica, Markelic, Milica, Velickovic, Ksenija, Golic, Igor and Korac, Bato (2014), Differences in the Redox Status of Human Visceral and Subcutaneous Adipose Tissues - Relationships to Obesity and Metabolic Risk. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(5): 661–671.

Jeon, Sang-Min and Hay, Nissim (2012), The Dark Face of AMPK as an Essential Tumor Promoter. *Cellular Logistics*, 2(4): 197–202.

Jeon, Sang Min, Chandel, Navdeep S. and Hay, Nissim (2012), AMPK Regulates NADPH Homeostasis to Promote Tumour Cell Survival during Energy Stress. *Nature*, 485(7400): 661–665.

Jeon, Sang Min and Hay, Nissim (2015), The Double-Edged Sword of AMPK Signaling in Cancer and Its Therapeutic Implications. *Archives of Pharmacal Research*, 38(3): 346–357.

Jia, Dongya, Lu, Mingyang, Jung, Kwang Hwa, Park, Jun Hyoung, Yu, Linglin, Onuchic, José N., Kaiparettu, Benny Abraham and Levine, Herbert (2019), Elucidating Cancer Metabolic Plasticity by Coupling Gene Regulation with Metabolic Pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(9): 3909–3918.

Jiang, Wen G., Douglas-Jones, Anthony and Mansel, Robert E. (2003), Expression of Peroxisome-Proliferator Activated Receptor-Gamma (PPAR $\gamma$ ) and the PPAR $\gamma$  Co-Activator, PGC-1, in Human Breast Cancer Correlates with Clinical Outcomes. *International Journal of Cancer*, 106(5): 752–757.

Johnson, Jennifer M., Cotzia, Paolo, Fratamico, Roberto, Mikkilineni, Lekha, Chen, Jason,

Colombo, Daniele, Mollae, Mehri, Whitaker-Menezes, Diana, Domingo-Vidal, Marina, Lin, Zhao, Zhan, Tingting, Tuluc, Madalina, Palazzo, Juan, Birbe, Ruth C. and Martinez-Outschoorn, Ubaldo E. (2017), MCT1 in Invasive Ductal Carcinoma: Monocarboxylate Metabolism and Aggressive Breast Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5.

Johnson, Rebecca H., Chien, Franklin L. and Bleyer, Archie (2013), Incidence of Breast Cancer with Distant Involvement among Women in the United States, 1976 to 2009. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 309(8): 800–805.

Jones, Dean P. and Sies, Helmut (2015), The Redox Code. *Antioxidants and Redox Signaling*, 23(9): 734–746.

Joo, Min Sung, Kim, Won Dong, Lee, Ki Young, Kim, Ji Hyun, Koo, Ja Hyun and Kim, Sang Geon (2016), AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Molecular and Cellular Biology*, 36(14): 1931–1942.

Jung, Yoon Yang, Kim, Hye Min and Koo, Ja Seung (2015), Expression of Lipid Metabolism-Related Proteins in Metastatic Breast Cancer. *PLoS ONE*, 10(9).

Kaaman, M., Sparks, L. M., Van Harmelen, V., Smith, S. R., Sjölin, E., Dahlman, I. and Arner, P. (2007), Strong Association between Mitochondrial DNA Copy Number and Lipogenesis in Human White Adipose Tissue. *Diabetologia*, 50(12): 2526–2533.

Kaambre, Tuuli, Chekulayev, Vladimir, Shevchuk, Igor, Karu-Varikmaa, Minna, Timohhina, Natalja, Tepp, Kersti, Bogovskaja, Jelena, Kütner, Riina, Valvere, Vahur and Saks, Valdur (2012), Metabolic Control Analysis of Cellular Respiration in Situ in Intraoperative Samples of Human Breast Cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(5): 539–558.

Kaelin, William G. and McKnight, Steven L. (2013), Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. *Cell*, 153(1): 56–69.

Kalezic, Andjelika, Udicki, Mirjana, Srdic Galic, Biljana, Aleksic, Marija, Korac, Aleksandra, Jankovic, Aleksandra and Korac, Bato (2021a), Redox Profile of Breast Tumor and Associated Adipose Tissue in Premenopausal Women - Interplay between Obesity and Malignancy. *Redox Biology*, 41.

Kalezic, Andjelika, Udicki, Mirjana, Srdic Galic, Biljana, Aleksic, Marija, Korac, Aleksandra, Jankovic, Aleksandra and Korac, Bato (2021b), Tissue-Specific Warburg Effect in Breast Cancer and Cancer-Associated Adipose Tissue—Relationship between Ampk and Glycolysis. *Cancers*, 13(11).

Kattan, Zilal, Minig, Vanessa, Leroy, Pierre, Dauça, Michel and Becuwe, Philippe (2008), Role of Manganese Superoxide Dismutase on Growth and Invasive Properties of Human Estrogen-Independent Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 108(2): 203–215.

Kennedy, Kelly M. and Dewhirst, Mark W. (2010), Tumor Metabolism of Lactate: The Influence and Therapeutic Potential for MCT and CD147 Regulation. *Future Oncology*, 6(1): 127–148.

Key, Timothy J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, A., Dorgan, J. F., Longcope, C., Stanczyk, F. Z., Stephenson, H. E., Falk, R. T., Miller, R., Schatzkin, A., Allen, D. S., Fentiman, I. S., Wang, D. Y., Dowsett, M., Thomas, H. V., Hankinson, S. E., Toniolo, P., Akhmedkhanov, A., Koenig, K., Shore, R. E., Zeleniuch-Jacquotte, A., Berrino, F., Muti, P., Micheli, A., Krogh,

- V., Sieri, S., Pala, V., Venturelli, E., Secreto, G., Barrett-Connor, E., Laughlin, G. A., Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R. G., Neriishi, K., Land, C. E., Cauley, J. A., Kuller, L. H., Cummings, S. R., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Bush, T. L., Comstock, G. W., Gordon, G. B. and Miller, S. R. (2003), Body Mass Index, Serum Sex Hormones, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(16): 1218–1226.
- Khan, Tashbib, Sullivan, Mitchell A., Gunter, Jennifer H., Kryza, Thomas, Lyons, Nicholas, He, Yaowu and Hooper, John D. (2020), Revisiting Glycogen in Cancer: A Conspicuous and Targetable Enabler of Malignant Transformation. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Kim, Jaehong, Kim, Jongdoo and Bae, Jong Sup (2016), ROS Homeostasis and Metabolism: A Critical Liaison for Cancer Therapy. *Experimental and Molecular Medicine*, 48(11).
- Kim, Sewha, Kim, Do Hee, Jung, Woo Hee and Koo, Ja Seung (2013), Expression of Glutamine Metabolism-Related Proteins According to Molecular Subtype of Breast Cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 20(3): 339–348.
- Klaunig, James E., Kamendulis, Lisa M. and Hocevar, Barbara A. (2010), Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38(1): 96–109.
- Kleiner, Sandra, Mepani, Rina J., Laznik, Dina, Ye, Li, Jurczak, Michael J., Jornayvaz, Francois R., Estall, Jennifer L., Bhowmick, Diti Chatterjee, Shulman, Gerald I. and Spiegelman, Bruce M. (2012), Development of Insulin Resistance in Mice Lacking PGC-1 $\alpha$  in Adipose Tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24): 9635–9640.
- Koiti, Andre, Shevchuk, Igor, Ounpuu, Lyudmila, Klepinin, Aleksandr, Chekulayev, Vladimir, Timohhina, Natalja, Tepp, Kersti, Puurand, Marju, Truu, Laura, Heck, Karoliina, Valvere, Vahur, Guzun, Rita and Kaambre, Tuuli (2017), Mitochondrial Respiration in Human Colorectal and Breast Cancer Clinical Material Is Regulated Differently. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Kopinski, Piotr K., Singh, Larry N., Zhang, Shiping, Lott, Marie T. and Wallace, Douglas C. (2021), Mitochondrial DNA Variation and Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21(7): 431–445.
- Korac, Bato, Kalezic, Andjelika, Pekovic-Vaughan, Vanja, Korac, Aleksandra and Jankovic, Aleksandra (2021), Redox Changes in Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes. *Redox Biology*, 42.
- Kovács, Patrik, Csonka, Tamás, Kovács, Tünde, Sári, Zsanett, Ujlaki, Gyula, Sipos, Adrien, Karányi, Zsolt, Szeőcs, Dóra, Hegedűs, Csaba, Uray, Karen, Jankó, Laura, Kiss, Máté, Kiss, Borbála, Laoui, Damya, Virág, László, Méhes, Gábor, Bai, Péter and Mikó, Edit (2019), Lithocholic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Increases Oxidative Stress in Breast Cancer. *Cancers*, 11(9).
- Krycer, James R., Quek, Lake Ee, Francis, Deanne, Fazakerley, Daniel J., Elkington, Sarah D., Diaz-Vegas, Alexis, Cooke, Kristen C., Weiss, Fiona C., Duan, Xiaowen, Kurdyukov, Sergey, Zhou, Ping Xin, Tambar, Uttam K., Hirayama, Akiyoshi, Ikeda, Satsuki, Kamei, Yushi, Soga, Tomoyoshi, Cooney, Gregory J. and James, David E. (2020), Lactate Production Is a Prioritized Feature of Adipocyte Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 295(1): 83–98.

- Kumaraguruparan, R., Subapriya, R., Kabalimoorthy, J. and Nagini, S. (2002), Antioxidant Profile in the Circulation of Patients with Fibroadenoma and Adenocarcinoma of the Breast. *Clinical Biochemistry*, 35(4): 275–279.
- Kumaraguruparan, R., Subapriya, R., Viswanathan, P. and Nagini, S. (2002), Tissue Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Patients with Adenocarcinoma of the Breast. *Clinica Chimica Acta*, 325(1–2): 165–170.
- Laderoute, Keith R., Calaoagan, Joy M., Chao, Wan Ru, Dinh, Dominc, Denko, Nicholas, Duellman, Sarah, Kalra, Jessica, Liu, Xiaohe, Papandreou, Ioanna, Sambucetti, Lidia and Boros, Laszlo G. (2014), 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Supports the Growth of Aggressive Experimental Human Breast Cancer Tumors. *Journal of Biological Chemistry*, 289(33): 22850–22864.
- Lagarde, Damien, Jeanson, Yannick, Portais, Jean Charles, Galinier, Anne, Ader, Isabelle, Casteilla, Louis and Carrière, Audrey (2021), Lactate Fluxes and Plasticity of Adipose Tissues: A Redox Perspective. *Frontiers in Physiology*, 12.
- Laplante, Mathieu and Sabatini, David M. (2012), MTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*, 149(2): 274–293.
- Lazar, Ikrame, Clement, Emily, Dauvillier, Stéphanie, Milhas, Delphine, Ducoux-Petit, Manuelle, LeGonidec, Sophie, Moro, Coédric, Soldan, Vanessa, Dalle, Stephane, Balor, Stéphanie, Golzio, Muriel, Burlet-Schiltz, Odile, Valet, Philippe, Muller, Catherine and Nieto, Laurence (2016), Adipocyte Exosomes Promote Melanoma Aggressiveness through Fatty Acid Oxidation: A Novel Mechanism Linking Obesity and Cancer. *Cancer Research*, 76(14): 4051–4057.
- Lebleu, Valerie S., O'Connell, Joyce T., Gonzalez Herrera, Karina N., Wikman, Harriet, Pantel, Klaus, Haigis, Marcia C., De Carvalho, Fernanda Machado, Damascena, Aline, Domingos Chinen, Ludmilla Thome, Rocha, Rafael M., Asara, John M. and Kalluri, Raghu (2014), PGC-1 $\alpha$  Mediates Mitochondrial Biogenesis and Oxidative Phosphorylation in Cancer Cells to Promote Metastasis. *Nature Cell Biology*, 16(10): 992–1003.
- Lee, Doo Jae and Kang, Sang Won (2013), Reactive Oxygen Species and Tumor Metastasis. *Molecules and Cells*, 35(2): 93–98.
- Lee, Kyuwan, Kruper, Laura, Dieli-Conwright, Christina M. and Mortimer, Joanne E. (2019), The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Current Oncology Reports*, 21(5).
- Leinonen, Hanna M., Kansanen, Emilia, Pölönen, Petri, Heinäniemi, Merja and Levonen, Anna Liisa (2014), Role of the Keap1-Nrf2 Pathway in Cancer. *Advances in Cancer Research*, 122: 281–320.
- Lewis, Denise Riedel, Seibel, Nita L., Smith, Ashley Wilder and Stedman, Margaret R. (2014), Adolescent and Young Adult Cancer Survival. *Journal of the National Cancer Institute - Monographs*, 2014(49): 228–235.
- Li, Fuming and Simon, M. Celeste (2020), Cancer Cells Don't Live Alone: Metabolic Communication within Tumor Microenvironments. *Developmental Cell*, 54(2): 183–195.
- Li, J., Huang, Q., Long, X., Guo, X., Sun, X., Jin, X., Li, Z., Ren, T., Yuan, P., Huang, X., Zhang, H. and Xing, J. (2017), Mitochondrial Elongation-Mediated Glucose Metabolism Reprogramming



Is Essential for Tumour Cell Survival during Energy Stress. *Oncogene*, 36(34): 4901–4912.

Li, J. J., Oberley, L. W., St Clair, D. K., Ridnour, L. A. and Oberley, T. D. (1995), Phenotypic Changes Induced in Human Breast Cancer Cells by Overexpression of Manganese-Containing Superoxide Dismutase. *Oncogene*, 10(10): 1989–2000.

Li, Pengying, Wu, Meilin, Wang, Jing, Sui, Yilun, Liu, Shanlin and Shi, Dongyun (2016), NAC Selectively Inhibit Cancer Telomerase Activity: A Higher Redox Homeostasis Threshold Exists in Cancer Cells. *Redox Biology*, 8: 91–97.

Li, Pengying, Zhang, Dongyang, Shen, Lingxiao, Dong, Kelei, Wu, Meiling, Ou, Zhouluo and Shi, Dongyun (2016), Redox Homeostasis Protects Mitochondria through Accelerating ROS Conversion to Enhance Hypoxia Resistance in Cancer Cells. *Scientific Reports*, 6.

Li, Shiri, Eguchi, Natsuki, Lau, Hien and Ichii, Hirohito (2020), The Role of the Nrf2 Signaling in Obesity and Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18): 1–18.

Li, Xinyuan, Fang, Pu, Mai, Jietang, Choi, Eric T., Wang, Hong and Yang, Xiao Feng (2013), Targeting Mitochondrial Reactive Oxygen Species as Novel Therapy for Inflammatory Diseases and Cancers. *Journal of Hematology and Oncology*, 6(1).

Li, Yao Ping, Tian, Fu Guo, Shi, Peng Cheng, Guo, Ling Yun, Wu, Hai Ming, Chen, Run Qi and Xue, Jin Ming (2014), 4-Hydroxynonenal Promotes Growth and Angiogenesis of Breast Cancer Cells through HIF-1 $\alpha$  Stabilization. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(23): 10151–10156.

Liang, Xi, Wang, Shujun, Wang, Xueju, Zhang, Lijuan, Zhao, Haidong and Zhang, Le (2018), Leptin Promotes the Growth of Breast Cancer by Upregulating the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(2): 767–771.

Lin, Chin Chih, Cheng, Tsung Lin, Tsai, Wen Hui, Tsai, Hui Ju, Hu, Keng Hsun, Chang, Hao Chun, Yeh, Chin Wei, Chen, Ying Chou, Liao, Ching Chun and Chang, Wen Tsan (2012), Loss of the Respiratory Enzyme Citrate Synthase Directly Links the Warburg Effect to Tumor Malignancy. *Scientific Reports*, 2.

Lin, Sheng Cai and Hardie, D. Grahame (2018), AMPK: Sensing Glucose as Well as Cellular Energy Status. *Cell Metabolism*, 27(2): 299–313.

Liotta, Lance A. and Kohn, Elise C. (2001), The Microenvironment of the Tumour - Host Interface. *Nature*, 411(6835): 375–379.

Lis, Paweł, Dylag, Mariusz, Niedźwiecka, Katarzyna, Ko, Young H., Pedersen, Peter L., Goffeau, Andre and Ułaszewski, Stanisław (2016), The HK2 Dependent ‘Warburg Effect’ and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate. *Molecules*, 21(12).

Liu, Changlu, Wu, Jiejun, Zhu, Jessica, Kuei, Chester, Yu, Jingxue, Shelton, Jonathan, Sutton, Steven W., Li, Xiaorong, Su, Jin Yun, Mirzadegan, Taraneh, Mazur, Curt, Kamme, Fredrik and Lovenberg, Timothy W. (2009), Lactate Inhibits Lipolysis in Fat Cells through Activation of an Orphan G-Protein-Coupled Receptor, GPR81. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5): 2811–2822.

- Liu, Peng, Ye, Feng, Xie, Xinhua, Li, Xing, Tang, Hailin, Li, Shuaijie, Huang, Xiaojia, Song, Cailu, Wei, Weidong and Xie, Xiaoming (2016), Mir-101-3p Is a Key Regulator of Tumor Metabolism in Triple Negative Breast Cancer Targeting AMPK. *Oncotarget*, 7(23): 35188–35198.
- Long, Eric K., Olson, Dalay M. and Bernlohr, David A. (2013), High-Fat Diet Induces Changes in Adipose Tissue Trans-4-Oxo-2-Nonenal and Trans-4-Hydroxy-2-Nonenal Levels in a Depot-Specific Manner. *Free Radical Biology and Medicine*, 63: 390–398.
- Lyssiotis, Costas A. and Kimmelman, Alec C. (2017), Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends in Cell Biology*, 27(11): 863–875.
- Madesh, Muniswamy and Hajnóczky, György (2001), VDAC-Dependent Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane by Superoxide Induces Rapid and Massive Cytochrome c Release. *Journal of Cell Biology*, 155(6): 1003–1015.
- Mambo, Elizabeth, Chatterjee, Aditi, Xing, Mingzhao, Tallini, Giovanni, Haugen, Bryan R., Yeung, Sai Ching J., Sukumar, Saraswati and Sidransky, David (2005), Tumor-Specific Changes in MtDNA Content in Human Cancer. *International Journal of Cancer*, 116(6): 920–924.
- Manabe, Yasushi, Toda, Shuji, Miyazaki, Kohji and Sugihara, Hajime (2003), Mature Adipocytes, but Not Preadipocytes, Promote the Growth of Breast Carcinoma Cells in Collagen Gel Matrix Culture through Cancer-Stromal Cell Interactions. *Journal of Pathology*, 201(2): 221–228.
- Marini, Cecilia, Salani, Barbara, Massollo, Michela, Amaro, Adriana, Esposito, Alessia Isabella, Orengo, Anna Maria, Capitanio, Selene, Emionite, Laura, Riondato, Mattia, Bottoni, Gianluca, Massara, Cinzia, Boccardo, Simona, Fabbi, Marina, Campi, Cristina, Ravera, Silvia, Angelini, Giovanna, Morbelli, Silvia, Cilli, Michele, Cordera, Renzo, Truini, Mauro, Maggi, Davide, Pfeffer, Ulrich and Sambuceti, Gianmario (2013), Direct Inhibition of Hexokinase Activity by Metformin at Least Partially Impairs Glucose Metabolism and Tumor Growth in Experimental Breast Cancer. *Cell Cycle*, 12(22): 3490–3499.
- Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D. and Hue, L. (2000), Phosphorylation and Activation of Heart PFK-2 by AMPK Has a Role in the Stimulation of Glycolysis during Ischaemia. *Current Biology*, 10(20): 1247–1255.
- Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Balliet, Renee M., Rivadeneira, Dayana B., Chiavarina, Barbara, Pavlides, Stephanos, Wang, Chenguang, Whitaker-Menezes, Diana, Daumer, Kristin M., Lin, Zhao, Witkiewicz, Agnieszka K., Flomenberg, Neal, Howell, Anthony, Pestell, Richard G., Knudsen, Erik S., Sotgia, Federica and Lisanti, Michael P. (2010), Oxidative Stress in Cancer Associated Fibroblasts Drives Tumor-Stroma Co-Evolution: A New Paradigm for Understanding Tumor Metabolism, the Field Effect and Genomic Instability in Cancer Cells. *Cell Cycle*, 9(16): 3256–3276.
- Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Prisco, Marco, Ertel, Adam, Tsirigos, Aristotelis, Lin, Zhao, Pavlides, Stephanos, Wang, Chengwang, Flomenberg, Neal, Knudsen, Erik S., Howell, Anthony, Pestell, Richard G., Sotgia, Federica and Lisanti, Michael P. (2011), Ketones and Lactate Increase Cancer Cell ‘Stemness’, Driving Recurrence, Metastasis and Poor Clinical Outcome in Breast Cancer: Achieving Personalized Medicine via Metabolo-Genomics. *Cell Cycle*, 10(8): 1271–1286.
- Masschelin, Peter M., Cox, Aaron R., Chernis, Natasha and Hartig, Sean M. (2020), The Impact

of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. *Frontiers in Physiology*, 10.

Mastropasqua, Francesca, Girolimetti, Giulia and Shoshan, Maria (2018), PGC1 $\alpha$ : Friend or Foe in Cancer? *Genes*, 9(1).

Mayers, Jared R., Wu, Chen, Clish, Clary B., Kraft, Peter, Torrence, Margaret E., Fiske, Brian P., Yuan, Chen, Bao, Ying, Townsend, Mary K., Tworoger, Shelley S., Davidson, Shawn M., Papagiannakopoulos, Thales, Yang, Annan, Dayton, Talya L., Ogino, Shuji, Stampfer, Meir J., Giovannucci, Edward L., Qian, Zhi Rong, Rubinson, Douglas A., Ma, Jing, Sesso, Howard D., Gaziano, John M., Cochrane, Barbara B., Liu, Simin, Wactawski-Wende, Jean, Manson, Joann E., Pollak, Michael N., Kimmelman, Alec C., Souza, Amanda, Pierce, Kerry, Wang, Thomas J., Gerszten, Robert E., Fuchs, Charles S., Vander Heiden, Matthew G. and Wolpin, Brian M. (2014), Elevation of Circulating Branched-Chain Amino Acids Is an Early Event in Human Pancreatic Adenocarcinoma Development. *Nature Medicine*, 20(10): 1193–1198.

McFate, Thomas, Mohyeldin, Ahmed, Lu, Huasheng, Thakar, Jay, Henriques, Jeremy, Halim, Nader D., Wu, Hong, Schell, Michael J., Tsz, Mon Tsang, Teahan, Orla, Zhou, Shaoyu, Califano, Joseph A., Nam, Ho Jeoung, Harris, Robert A. and Verma, Ajay (2008), Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity Controls Metabolic and Malignant Phenotype in Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33): 22700–22708.

Metallo, Christian M., Gameiro, Paulo A., Bell, Eric L., Mattaini, Katherine R., Yang, Juanjuan, Hiller, Karsten, Jewell, Christopher M., Johnson, Zachary R., Irvine, Darrell J., Guarente, Leonard, Kelleher, Joanne K., Vander Heiden, Matthew G., Iliopoulos, Othon and Stephanopoulos, Gregory (2012), Reductive Glutamine Metabolism by IDH1 Mediates Lipogenesis under Hypoxia. *Nature*, 481(7381): 380–384.

Miar, Ana, Hevia, David, Muñoz-Cimadevilla, Henar, Astudillo, Aurora, Velasco, Julio, Sainz, Rosa M. and Mayo, Juan C. (2015), Manganese Superoxide Dismutase (SOD2/MnSOD)/Catalase and SOD2/GPx1 Ratios as Biomarkers for Tumor Progression and Metastasis in Prostate, Colon, and Lung Cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 85: 45–55.

Mihajlović, Jovan, Pechlivanoglou, Petros, Miladinov-Mikov, Marica, Živković, Snežana and Postma, Maarten J. (2013), Cancer Incidence and Mortality in Serbia 1999-2009. *BMC Cancer*, 13.

Mohd Khair, Siti Zulaikha Nashwa, Abd Radzak, Siti Muslihah and Mohamed Yusoff, Abdul Aziz (2021), The Uprising of Mitochondrial DNA Biomarker in Cancer. *Disease Markers*, 2021.

Monaco, Marie E. (2017), Fatty Acid Metabolism in Breast Cancer Subtypes. *Oncotarget*, 8(17): 29487–29500.

Moncur, Joel T., Park, Jonathan P., Memoli, Vincent A., Mohandas, T. K. and Kinlaw, William B. (1998), The ‘Spot 14’ Gene Resides on the Telomeric End of the 11q13 Amplicon and Is Expressed in Lipogenic Breast Cancers: Implications for Control of Tumor Metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12): 6989–6994.

Morris, Patrick G., Zhou, Xi Kathy, Milne, Ginger L., Goldstein, Daniel, Hawks, Laura C., Dang, Chau T., Modi, Shanu, Fournier, Monica N., Hudis, Clifford A. and Dannenberg, Andrew J. (2013), Increased Levels of Urinary PGE-M, a Biomarker of Inflammation, Occur in Association with

Obesity, Aging, and Lung Metastases in Patients with Breast Cancer. *Cancer Prevention Research*, 6(5): 428–436.

Mueller, Margareta M. and Fusenig, Norbert E. (2004), Friends or Foes - Bipolar Effects of the Tumour Stroma in Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(11): 839–849.

Muller, Catherine (2013), Tumour-Surrounding Adipocytes Are Active Players in Breast Cancer Progression. *Annales d'Endocrinologie*, 74(2): 108–110.

Muller, Florian L., Liu, Yuhong and Van Remmen, Holly (2004), Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47): 49064–49073.

Nicklin, Paul, Bergman, Philip, Zhang, Bailin, Triantafellow, Ellen, Wang, Henry, Nyfeler, Beat, Yang, Haidi, Hild, Marc, Kung, Charles, Wilson, Christopher, Myer, Vic E., MacKeigan, Jeffrey P., Porter, Jeffrey A., Wang, Y. Karen, Cantley, Lewis C., Finan, Peter M. and Murphy, Leon O. (2009), Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates MTOR and Autophagy. *Cell*, 136(3): 521–534.

Nieman, Kristin M., Kenny, Hilary A., Penicka, Carla V., Ladanyi, Andras, Buell-Gutbrod, Rebecca, Zillhardt, Marion R., Romero, Iris L., Carey, Mark S., Mills, Gordon B., Hotamisligil, Gökhan S., Yamada, S. Diane, Peter, Marcus E., Gwin, Katja and Lengyel, Ernst (2011), Adipocytes Promote Ovarian Cancer Metastasis and Provide Energy for Rapid Tumor Growth. *Nature Medicine*, 17(11): 1498–1503.

Niraula, Saroj, Ocana, Alberto, Ennis, Marguerite and Goodwin, Pamela J. (2012), Body Size and Breast Cancer Prognosis in Relation to Hormone Receptor and Menopausal Status: A Meta-Analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 134(2): 769–781.

Nye, Colleen, Kim, Jaeyeon, Kalhan, Satish C. and Hanson, Richard W. (2008), Reassessing Triglyceride Synthesis in Adipose Tissue. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19(10): 356–361.

Oberley, Larry W. and Buettner, Garry R. (1979), Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Research*, 39(4): 1141–1149.

Onodera, Yoshiaki, Motohashi, Hozumi, Takagi, Kiyoshi, Miki, Yasuhiro, Shibahara, Yukiko, Watanabe, Mika, Ishida, Takanori, Hirakawa, Hisashi, Sasano, Hironobu, Yamamoto, Masayuki and Suzuki, Takashi (2014), NRF2 Immunolocalization in Human Breast Cancer Patients as a Prognostic Factor. *Endocrine-Related Cancer*, 21(2): 241–252.

Ooi, Aikseng, Wong, Jing Chii, Petillo, David, Roossien, Douglas, Perrier-Trudova, Victoria, Whitten, Douglas, Min, Bernice Wong Hui, Tan, Min Han, Zhang, Zhongfa, Yang, Ximing J., Zhou, Ming, Gardie, Betty, Molinié, Vincent, Richard, Stéphane, Tan, Puay Hoon, Teh, Bin Tean and Furge, Kyle A. (2011), An Antioxidant Response Phenotype Shared between Hereditary and Sporadic Type 2 Papillary Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell*, 20(4): 511–523.

Ouchi, Noriyuki, Parker, Jennifer L., Lugus, Jesse J. and Walsh, Kenneth (2011), Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2): 85–97.

Owen, Oliver E., Kalhan, Satish C. and Hanson, Richard W. (2002), The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34):

30409–30412.

Pan, Hui, Deng, Lin Li, Cui, Jia Qi, Shi, Lin, Yang, Yi Chun, Luo, Jiang Hui, Qin, Dan and Wang, Li (2018), Association between Serum Leptin Levels and Breast Cancer Risk. *Medicine (United States)*, 97(27).

Panicker, N. K., Jariwala, P. H., Buch, A. C. and Joshi, M. (2012), The Utility of Periodic Acid Schiff with Diastase and Alcian Blue Stains on Fine Needle Aspirates of Breast and Salivary Gland Neoplasms. *Journal of Cytology*, 29(4): 221–225.

Paré, Martin, Darini, Cédric Y., Yao, Xi, Chignon-Sicard, Bérengère, Rekima, Samah, Lachambre, Simon, Virolle, Virginie, Aguilar-Mahecha, Adriana, Basik, Mark, Dani, Christian and Ladoux, Annie (2020), Breast Cancer Mammospheres Secrete Adrenomedullin to Induce Lipolysis and Browning of Adjacent Adipocytes. *BMC Cancer*, 20(1).

Park, Jiyoung, Morley, Thomas S. and Scherer, Philipp E. (2013), Inhibition of Endotrophin, a Cleavage Product of Collagen VI, Confers Cisplatin Sensitivity to Tumours. *EMBO Molecular Medicine*, 5(6): 935–948.

Park, Jiyoung and Scherer, Philipp E. (2012), Adipocyte-Derived Endotrophin Promotes Malignant Tumor Progression. *Journal of Clinical Investigation*, 122(11): 4243–4256.

Patel, Brijesh B., Ackerstaff, Ellen, Serganova, Inna S., Kerrigan, John E., Blasberg, Ronald G., Koutcher, Jason A. and Banerjee, Debabrata (2017), Tumor Stroma Interaction Is Mediated by Monocarboxylate Metabolism. *Experimental Cell Research*, 352(1): 20–33.

Patel, M. S. and Korotchkina, L. G. (2006), Regulation of the Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Biochemical Society Transactions*, 34(2): 217–222.

Pavlova, Natalya N. and Thompson, Craig B. (2016), The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1): 27–47.

Pedersen, Peter L. (2007), Warburg, Me and Hexokinase 2: Multiple Discoveries of Key Molecular Events Underlying One of Cancers' Most Common Phenotypes, the 'Warburg Effect', i.e., Elevated Glycolysis in the Presence of Oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(3): 211–222.

Peng, F., Wang, J. H., Fan, W. J., Meng, Y. T., Li, M. M., Li, T. T., Cui, B., Wang, H. F., Zhao, Y., An, F., Guo, T., Liu, X. F., Zhang, L., Lv, L., Lv, D. K., Xu, L. Z., Xie, J. J., Lin, W. X., Lam, E. W.F., Xu, J. and Liu, Q. (2018), Glycolysis Gatekeeper PDK1 Reprograms Breast Cancer Stem Cells under Hypoxia. *Oncogene*, 37(8): 1062–1074.

Péqueux, Christel, Raymond-Letron, Isabelle, Blacher, Silvia, Boudou, Frédéric, Adlanmerini, Marine, Fouque, Marie José, Rochaix, Philippe, Noël, Agnès, Foidart, Jean Michel, Krust, Andrée, Chambon, Pierre, Brouchet, Laurent, Arnal, Jean François and Lenfant, Françoise (2012), Stromal Estrogen Receptor- $\alpha$  Promotes Tumor Growth by Normalizing an Increased Angiogenesis. *Cancer Research*, 72(12): 3010–3019.

Petersen, Charlotte, Nielsen, Mette D., Andersen, Elise S., Basse, Astrid L., Isidor, Marie S., Markussen, Lasse K., Viuff, Birgitte M., Lambert, Ian H., Hansen, Jacob B. and Pedersen, Stine F. (2017), MCT1 and MCT4 Expression and Lactate Flux Activity Increase during White and Brown Adipogenesis and Impact Adipocyte Metabolism. *Scientific Reports*, 7(1).

- Prasad, Chandra Prakash, Södergren, Katja and Andersson, Tommy (2017), Reduced Production and Uptake of Lactate Are Essential for the Ability of WNT5A Signaling to Inhibit Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *Oncotarget*, 8(42): 71471–71488.
- Prasad, Sahdeo, Gupta, Subash C. and Tyagi, Amit K. (2017), Reactive Oxygen Species (ROS) and Cancer: Role of Antioxidative Nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387: 95–105.
- Punnonen, K., Ahotupa, M., Asaishi, K., Hyöty, M., Kudo, R. and Punnonen, R. (1994), Antioxidant Enzyme Activities and Oxidative Stress in Human Breast Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 120(6): 374–377.
- Rabinovitch, Rebecca C., Samborska, Bozena, Faubert, Brandon, Ma, Eric H., Gravel, Simon Pierre, Andrzejewski, Sylvia, Raissi, Thomas C., Pause, Arnim, St.-Pierre, Julie and Jones, Russell G. (2017), AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell Reports*, 21(1): 1–9.
- Ray, Gibanananda, Batra, Sanjay, Shukla, Nootan Kumar, Deo, Suryanarayan, Raina, Vinod, Ashok, Seetharaman and Husain, Syed Akhtar (2000), Lipid Peroxidation, Free Radical Production and Antioxidant Status in Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 59(2): 163–170.
- Ren, Yi and Shen, Han Ming (2019), Critical Role of AMPK in Redox Regulation under Glucose Starvation. *Redox Biology*, 25.
- Renehan, Andrew G., Tyson, Margaret, Egger, Matthias, Heller, Richard F. and Zwahlen, Marcel (2008), Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *The Lancet*, 371(9612): 569–578.
- Révillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L. and Peyrat, J. P. (2000), Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Expression in Human Breast Cancer. *European Journal of Cancer*, 36(8): 1038–1042.
- Reznik, Ed, Miller, Martin L., Şenbabaoğlu, Yasin, Riaz, Nadeem, Sarungbam, Judy, Tickoo, Satish K., Al-Ahmadie, Hikmat A., Lee, William, Seshan, Venkatraman E., Hakimi, A. Ari and Sander, Chris (2016), Mitochondrial DNA Copy Number Variation across Human Cancers. *eLife*, 5(FEBRUARY2016): 1–20.
- Ridnour, Lisa A., Oberley, Terry D. and Oberley, Larry W. (2004), Tumor Suppressive Effects of MnSOD Overexpression May Involve Imbalance in Peroxide Generation Versus Peroxide Removal. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6(3): 501–512.
- Rojo de la Vega, Montserrat, Chapman, Eli and Zhang, Donna D. (2018), NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*, 34(1): 21–43.
- Rong, James X., Qiu, Yang, Hansen, Michael K., Zhu, Lei, Zhang, Vivian, Xie, Mi, Okamoto, Yuji, Mattie, Michael D., Higashiyama, Hiroyuki, Asano, Satoshi, Strum, Jay C. and Ryan, Terence E. (2007), Adipose Mitochondrial Biogenesis Is Suppressed in Db/Db and High-Fat Diet-Fed Mice and Improved by Rosiglitazone. *Diabetes*, 56(7): 1751–1760.
- Rose, David P. and Vona-Davis, Linda (2010), Interaction between Menopausal Status and Obesity in Affecting Breast Cancer Risk. *Maturitas*, 66(1): 33–38.

- Rosenberg, Shoshana M. and Partridge, Ann H. (2015), Management of Breast Cancer in Very Young Women. *Breast*, 24: S154–S158.
- Ryoo, In geun and Kwak, Mi Kyoung (2018), Regulatory Crosstalk between the Oxidative Stress-Related Transcription Factor Nfe2l2/Nrf2 and Mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 359: 24–33.
- San-Millán, Iñigo and Brooks, George A. (2017), Reexamining Cancer Metabolism: Lactate Production for Carcinogenesis Could Be the Purpose and Explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*, 38(2): 119–133.
- Sato-Tadano, Akiko, Suzuki, Takashi, Amari, Masakazu, Takagi, Kiyoshi, Miki, Yasuhiro, Tamaki, Kentaro, Watanabe, Mika, Ishida, Takanori, Sasano, Hironobu and Ohuchi, Noriaki (2013), Hexokinase II in Breast Carcinoma: A Potent Prognostic Factor Associated with Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Ki-67. *Cancer Science*, 104(10): 1380–1388.
- Schieber, Michael and Chandel, Navdeep S. (2014), ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24(10).
- Schild, Tanya, Low, Vivien, Blenis, John and Gomes, Ana P. (2018), Unique Metabolic Adaptations Dictate Distal Organ-Specific Metastatic Colonization. *Cancer Cell*, 33(3): 347–354.
- Schneider, Kevin S. and Chan, Jefferson Y. (2013), Emerging Role of Nrf2 in Adipocytes and Adipose Biology. *Advances in Nutrition*, 4(1): 62–66.
- Schoemaker, Minouk J., Nichols, Hazel B., Wright, Lauren B., Brook, Mark N., Jones, Michael E., O'Brien, Katie M., Adami, Hans Olov, Baglietto, Laura, Bernstein, Leslie, Bertrand, Kimberly A., Boutron-Ruault, Marie Christine, Braaten, Tonje, Chen, Yu, Connor, Avonne E., Dorransoro, Miren, Dossus, Laure, Eliassen, A. Heather, Giles, Graham G., Hankinson, Susan E., Kaaks, Rudolf, Key, Timothy J., Kirsh, Victoria A., Kitahara, Cari M., Koh, Woon Puay, Larsson, Susanna C., Linet, Martha S., Ma, Huiyan, Masala, Giovanna, Merritt, Melissa A., Milne, Roger L., Overvad, Kim, Ozasa, Kotaro, Palmer, Julie R., Peeters, Petra H., Riboli, Elio, Rohan, Thomas E., Sadakane, Atsuko, Sund, Malin, Tamimi, Rulla M., Trichopoulou, Antonia, Ursin, Giske, Vatten, Lars, Visvanathan, Kala, Weiderpass, Elisabete, Willett, Walter C., Wolk, Alicja, Yuan, Jian Min, Zeleniuch-Jacquotte, Anne, Sandler, Dale P. and Swerdlow, Anthony J. (2018), Association of Body Mass Index and Age with Subsequent Breast Cancer Risk in Premenopausal Women. *JAMA Oncology*, 4(11).
- Schug, Zachary T., Peck, Barrie, Jones, Dylan T., Zhang, Qifeng, Grosskurth, Shaun, Alam, Israt S., Goodwin, Louise M., Smethurst, Elizabeth, Mason, Susan, Blyth, Karen, McGarry, Lynn, James, Daniel, Shanks, Emma, Kalna, Gabriela, Saunders, Rebecca E., Jiang, Ming, Howell, Michael, Lassailly, Francois, Thin, May Zaw, Spencer-Dene, Bradley, Stamp, Gordon, van den Broek, Niels J.F., Mackay, Gillian, Bulusu, Vinay, Kamphorst, Jurre J., Tardito, Saverio, Strachan, David, Harris, Adrian L., Aboagye, Eric O., Critchlow, Susan E., Wakelam, Michael J.O., Schulze, Almut and Gottlieb, Eyal (2015), Acetyl-CoA Synthetase 2 Promotes Acetate Utilization and Maintains Cancer Cell Growth under Metabolic Stress. *Cancer Cell*, 27(1): 57–71.
- Semple, R. K., Crowley, V. C., Sewter, C. P., Laudes, M., Christodoulides, C., Considine, R. V., Vidal-Puig, A. and O'Rahilly, S. (2004), Expression of the Thermogenic Nuclear Hormone Receptor Coactivator PGC-1 $\alpha$  Is Reduced in the Adipose Tissue of Morbidly Obese Subjects.

*International Journal of Obesity*, 28(1): 176–179.

Sena, Laura A. and Chandel, Navdeep S. (2012), Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell*, 48(2): 158–167.

Seo, Hyun Ae and Lee, In Kyu (2013), The Role of NRF2: Adipocyte Differentiation, Obesity, and Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Sethi, Jaswinder K. and Vidal-Puig, Antonio J. (2007), Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipose Tissue Function and Plasticity Orchestrate Nutritional Adaptation. *Journal of Lipid Research*, 48(6): 1253–1262.

Shan, Changliang, Lu, Zhaoliang, Li, Zhen, Sheng, Hao, Fan, Jun, Qi, Qi, Liu, Shuangping and Zhang, Shuai (2019), 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Promotes Lung Cancer Growth via Pentose Phosphate Pathway (PPP) Flux Mediated by LKB1-AMPK/HDAC10/G6PD Axis. *Cell Death and Disease*, 10(7).

Shao, Dan, Oka, Shin Ichi, Liu, Tong, Zhai, Peiyong, Ago, Tetsuro, Sciarretta, Sebastiano, Li, Hong and Sadoshima, Junichi (2014), A Redox-Dependent Mechanism for Regulation of AMPK Activation by Thioredoxin1 during Energy Starvation. *Cell Metabolism*, 19(2): 232–245.

Shin, Chun Shik, Mishra, Prashant, Watrous, Jeramie D., Carelli, Valerio, D'Aurelio, Marilena, Jain, Mohit and Chan, David C. (2017), The Glutamate/Cystine XCT Antiporter Antagonizes Glutamine Metabolism and Reduces Nutrient Flexibility. *Nature Communications*, 8.

Singh, Rajan, Parveen, Meher, Basgen, John M., Fazel, Sayeda, Meshesha, Meron F., Thames, Easter C., Moore, Brandis, Martinez, Luis, Howard, Carolyn B., Vergnes, Laurent, Reue, Karen and Pervin, Shehla (2016), Increased Expression of Beige/Brown Adipose Markers from Host and Breast Cancer Cells Influence Xenograft Formation in Mice. *Molecular Cancer Research*, 14(1): 78–92.

Skulachev, Vladimir P. (1998), Uncoupling: New Approaches to an Old Problem of Bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1363(2): 100–124.

Smolková, Katarína, Mikó, Edit, Kovács, Tünde, Leguina-Ruzzi, Alberto, Sipos, Adrienn and Bai, Péter (2020), Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 in Regulating Cancer Metabolism. *Antioxidants and Redox Signaling*, 33(13): 966–997.

Soini, Ylermi, Vakkala, Merja, Kahlos, Katriina, Pääkkö, Paavo and Kinnula, Vuokko (2001), MnSOD Expression Is Less Frequent in Tumour Cells of Invasive Breast Carcinomas than in in Situ Carcinomas or Non-Neoplastic Breast Epithelial Cells. *Journal of Pathology*, 195(2): 156–162.

Sotgia, Federica, Whitaker-Menezes, Diana, Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Flomenberg, Neal, Birbe, Ruth C., Witkiewicz, Agnieszka K., Howell, Anthony, Philp, Nancy J., Pestell, Richard G. and Lisanti, Michael P. (2012), Mitochondrial Metabolism in Cancer Metastasis: Visualizing Tumor Cell Mitochondria and the ‘Reverse Warburg Effect’ in Positive Lymph Node Tissue. *Cell Cycle*, 11(7): 1445–1454.

Stinccone, Anna, Prigione, Alessandro, Cramer, Thorsten, Wamelink, Mirjam M.C., Campbell, Kate, Cheung, Eric, Olin-Sandoval, Viridiana, Grüning, Nana Maria, Krüger, Antje, Tauqeer Alam, Mohammad, Keller, Markus A., Breitenbach, Michael, Brindle, Kevin M., Rabinowitz,



Joshua D. and Ralser, Markus (2015), The Return of Metabolism: Biochemistry and Physiology of the Pentose Phosphate Pathway. *Biological Reviews*, 90(3): 927–963.

Sun, Shengrong, Wu, Qi, Li, Juanjuan, Li, Zhiyu, Sun, Si, Zhu, Shan, Wang, Lijun, Wu, Juan, Yuan, Jingping, Zhang, Yimin and Wang, Changhua (2019), Exosomes from the Tumour-Adipocyte Interplay Stimulate Beige/Brown Differentiation and Reprogram Metabolism in Stromal Adipocytes to Promote Tumour Progression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1).

Tabe, Yoko, Yamamoto, Shinichi, Saitoh, Kaori, Sekihara, Kazumasa, Monma, Norikazu, Ikeo, Kazuho, Mogushi, Kaoru, Shikami, Masato, Ruvolo, Vivian, Ishizawa, Jo, Jr, Numsen Hail, Kazuno, Saiko, Igarashi, Mamoru, Matsushita, Hiromichi, Yamanaka, Yasunari, Arai, Hajime, Nagaoka, Isao, Miida, Takashi, Hayashizaki, Yoshihide, Konopleva, Marina and Andreeff, Michael (2017), Bone Marrow Adipocytes Facilitate Fatty Acid Oxidation Activating AMPK and a Transcriptional Network Supporting Survival of Acute Monocytic Leukemia Cells. *Cancer Research*, 77(6): 1453–1464.

Tafari, Marco, Sansone, Luigi, Limana, Federica, Arcangeli, Tania, De Santis, Elena, Polese, Milena, Fini, Massimo and Russo, Matteo A. (2016), The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Talaiezhadeh, Abdolhassan, Shahriari, Ali, Tabandeh, Reza R., Fathizadeh, Payam and Mansouri, Siavash (2015), Kinetic Characterization of Lactate Dehydrogenase in Normal and Malignant Human Breast Tissues. *Cancer Cell International*, 15(1).

Tan, Jinxiang, Buache, Emilie, Chenard, Marie Pierre, Dali-Youcef, Nassim and Rio, Marie Christine (2011), Adipocyte Is a Non-Trivial, Dynamic Partner of Breast Cancer Cells. *International Journal of Developmental Biology*, 55(7–9): 851–859.

Tas, Faruk, Hansel, Hasan, Belce, Ahmet, Ilvan, Sennur, Argon, Andac, Camlica, Hakan and Topuz, Erkan (2005), Oxidative Stress in Breast Cancer. *Medical Oncology*, 22(1): 11–15.

Templeton, Zach S., Lie, Wen Rong, Wang, Weiqi, Rosenberg-Hasson, Yael, Alluri, Rajiv V., Tamaresis, John S., Bachmann, Michael H., Lee, Kitty, Maloney, William J., Contag, Christopher H. and King, Bonnie L. (2015), Breast Cancer Cell Colonization of the Human Bone Marrow Adipose Tissue Niche. *Neoplasia (United States)*, 17(12): 849–861.

Thupari, Jagan N., Pinn, Michael L. and Kuhajda, Francis P. (2001), Fatty Acid Synthase Inhibition in Human Breast Cancer Cells Leads to Malonyl-CoA-Induced Inhibition of Fatty Acid Oxidation and Cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2): 217–223.

Trachootham, Dunyaporn, Alexandre, Jerome and Huang, Peng (2009), Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic Approach? *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7): 579–591.

Tsanou, E., Ioachim, E., Briasoulis, E., Damala, K., Charchanti, A., Karavasilis, V., Pavlidis, N. and Agnantis, N. J. (2004a), Immunohistochemical Expression of Superoxide Dismutase (MnSOD) Anti-Oxidant Enzyme in Invasive Breast Carcinoma. *Histology and Histopathology*, 19(3): 807–813.

- Tsanou, E., Ioachim, E., Briasoulis, E., Damala, K., Charchanti, A., Karavasilis, V., Pavlidis, N. and Agnantis, N. J. (2004b), Immunohistochemical Expression of Superoxide Dismutase (MnSOD) Anti-Oxidant Enzyme in Invasive Breast Carcinoma. *Histology and Histopathology*, 19(3): 807–813.
- Tseng, Ling Ming, Yin, Pen Hui, Chi, Chin Wen, Hsu, Chih Yi, Wu, Chew Wun, Lee, Liang Ming, Wei, Yau Huei and Lee, Hsin Chen (2006), Mitochondrial DNA Mutations and Mitochondrial DNA Depletion in Breast Cancer. *Genes Chromosomes and Cancer*, 45(7): 629–638.
- Tyanova, Stefka, Albrechtsen, Reidar, Kronqvist, Pauliina, Cox, Juergen, Mann, Matthias and Geiger, Tamar (2016), Proteomic Maps of Breast Cancer Subtypes. *Nature Communications*, 7.
- Ushijima, Toshikazu (2005), Detection and Interpretation of Altered Methylation Patterns in Cancer Cells. *Nature Reviews Cancer*, 5(3): 223–231.
- Ushio-Fukai, Masuko and Nakamura, Yoshimasa (2008), Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy. *Cancer Letters*, 266(1): 37–52.
- Vara-Ciruelos, Diana, Dandapani, Madhumita and Hardie, D. Grahame (2020), AMP-Activated Protein Kinase: Friend or Foe in Cancer? *Annual Review of Cancer Biology*, 4: 1–16.
- Vega, Rick B., Huss, Janice M. and Kelly, Daniel P. (2000), The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5): 1868–1876.
- Villena, Josep A. (2015), New Insights into PGC-1 Coactivators: Redefining Their Role in the Regulation of Mitochondrial Function and Beyond. *FEBS Journal*, 282(4): 647–672.
- Volden, Paul A., Wonder, Erin L., Skor, Maxwell N., Carmean, Christopher M., Patel, Feenalie N., Ye, Honggang, Kocherginsky, Masha, McClintock, Martha K., Brady, Matthew J. and Conzen, Suzanne D. (2013), Chronic Social Isolation Is Associated with Metabolic Gene Expression Changes Specific to Mammary Adipose Tissue. *Cancer Prevention Research*, 6(7): 634–645.
- Walker, Alyssa, Singh, Anju, Tully, Ellen, Woo, Juhung, Le, Anne, Nguyen, Tu, Biswal, Shyam, Sharma, Dipali and Gabrielson, Edward (2018), Nrf2 Signaling and Autophagy Are Complementary in Protecting Breast Cancer Cells during Glucose Deprivation. *Free Radical Biology and Medicine*, 120: 407–413.
- Walter, William, Thomalla, Jennifer, Bruhn, Josh, Fagan, Dedra H., Zehowski, Cheryl, Yee, Douglas and Skildum, Andrew (2015), Altered Regulation of PDK4 Expression Promotes Antiestrogen Resistance in Human Breast Cancer Cells. *SpringerPlus*, 4(1): 1–13.
- Wang, Fengliang, Gao, Sheng, Chen, Fei, Fu, Ziyi, Yin, Hong, Lu, Xun, Yu, Jing and Lu, Cheng (2014), Mammary Fat of Breast Cancer: Gene Expression Profiling and Functional Characterization. *PLoS ONE*, 9(10).
- Wang, Hao, Schoebel, Stefan, Schmitz, Florian, Dong, Hansong and Hedfalk, Kristina (2020), Characterization of Aquaporin-Driven Hydrogen Peroxide Transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862(2).
- Wang, Kui, Jiang, Jingwen, Lei, Yunlong, Zhou, Shengtao, Wei, Yuquan and Huang, Canhua

(2019), Targeting Metabolic–Redox Circuits for Cancer Therapy. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(5): 401–414.

Wang, Lingling, Zhang, Chunze, Qin, Litao, Xu, Jingyue, Li, Xiaobo, Wang, Wenhong, Kong, Lingqin, Zhou, Taizhen and Li, Xichuan (2018), The Prognostic Value of NRF2 in Solid Tumor Patients: A Meta-Analysis. *Oncotarget*, 9(1): 1257–1265.

Wang, Liying, Azad, Neelam, Kongkaneramt, Lalana, Chen, Fei, Lu, Yongju, Jiang, Bing-Hua and Rojanasakul, Yon (2008), The Fas Death Signaling Pathway Connecting Reactive Oxygen Species Generation and FLICE Inhibitory Protein Down-Regulation. *The Journal of Immunology*, 180(5): 3072–3080.

Wang, Xuyi, Simpson, Evan R. and Brown, Kristy A. (2015), Aromatase Overexpression in Dysfunctional Adipose Tissue Links Obesity to Postmenopausal Breast Cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 153: 35–44.

Wang, Yan Yang, Chen, Juan, Liu, Xiao Ming, Zhao, Ren and Zhe, Hong (2018), Nrf2-Mediated Metabolic Reprogramming in Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Wang, Yanyan, Fan, Shaohua, Lu, Jun, Zhang, Zifeng, Wu, Dongmei, Wu, Zhiyong and Zheng, Yuanlin (2017), GLUL Promotes Cell Proliferation in Breast Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(8): 2018–2025.

Wang, Young, Kuhajda, Francis P., Li, Ji Nong, Pizer, Ellen S., Han, Wan Fang, Sokoll, Lori J. and Chan, Daniel W. (2001), Fatty Acid Synthase (FAS) Expression in Human Breast Cancer Cell Culture Supernatants and in Breast Cancer Patients. *Cancer Letters*, 167(1): 99–104.

Wang, Yuan Yuan, Attané, Camille, Milhas, Delphine, Dirat, Béatrice, Dauvillier, Stéphanie, Guerard, Adrien, Gilhodes, Julia, Lazar, Ikrame, Alet, Nathalie, Laurent, Victor, Le Gonidec, Sophie, Biard, Denis, Hervé, Caroline, Bost, Frédéric, Ren, Guo Sheng, Bono, Françoise, Escourrou, Ghislaine, Prentki, Marc, Nieto, Laurence, Valet, Philippe and Muller, Catherine (2017), Mammary Adipocytes Stimulate Breast Cancer Invasion through Metabolic Remodeling of Tumor Cells. *Journal of Clinical Investigation*, 2(4).

Warburg, Otto (1956), On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191): 309–314.

Warburg, Otto, Wind, Franz and Negelein, Erwin (1927), The Metabolism of Tumors in the Body. *Journal of General Physiology*, 8(6): 519–530.

Waris, Gulam and Ahsan, Haseeb (2006), Reactive Oxygen Species: Role in the Development of Cancer and Various Chronic Conditions. *Journal of Carcinogenesis*, 5.

Watkins, Gareth, Douglas-Jones, Anthony, Mansel, Robert E. and Jiang, Wen G. (2004), The Localisation and Reduction of Nuclear Staining of PPAR $\gamma$  and PGC-1 in Human Breast Cancer. *Oncology Reports*, 12(2): 483–488.

Wen, Yang An, Xing, Xiaopeng, Harris, Jennifer W., Zaytseva, Yekaterina Y., Mitov, Mihail I., Napier, Dana L., Weiss, Heidi L., Mark Evers, B. and Gao, Tianyan (2017), Adipocytes Activate Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Autophagy to Promote Tumor Growth in Colon Cancer. *Cell Death and Disease*, 8(2).

West, James D. and Marnett, Lawrence J. (2006), Endogenous Reactive Intermediates as

- Modulators of Cell Signaling and Cell Death. *Chemical Research in Toxicology*, 19(2): 173–194.
- Whitaker-Menezes, Diana, Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Flomenberg, Neal, Birbe, Ruth C., Witkiewicz, Agnieszka K., Howell, Anthony, Pavlides, Stephanos, Tsirigos, Aristotelis, Ertel, Adam, Pestell, Richard G., Broda, Paolo, Minetti, Carlo, Lisanti, Michael P. and Sotgia, Federica (2011), Hyperactivation of Oxidative Mitochondrial Metabolism in Epithelial Cancer Cells in Situ: Visualizing the Therapeutic Effects of Metformin in Tumor Tissue. *Cell Cycle*, 10(23): 4047–4064.
- Whitaker-Menezes, Diana, Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Lin, Zhao, Ertel, Adam, Flomenberg, Neal, Witkiewicz, Agnieszka K., Birbe, Ruth C., Howell, Anthony, Pavlides, Stephanos, Gandara, Ricardo, Pestell, Richard G., Sotgia, Federica, Philp, Nancy J. and Lisanti, Michael P. (2011), Evidence for a Stromal-Epithelial ‘Lactate Shuttle’ in Human Tumors: MCT4 Is a Marker of Oxidative Stress in Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Cycle*, 10(11): 1772–1783.
- White, Eileen (2015), The Role for Autophagy in Cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 125(1): 42–46.
- White, Kami K., Park, Song Yi, Kolonel, Laurence N., Henderson, Brian E. and Wilkens, Lynne R. (2012), Body Size and Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort. *International Journal of Cancer*, 131(5).
- Wu, Ning, Zheng, Bin, Shaywitz, Adam, Dagon, Yossi, Tower, Christine, Bellinger, Gary, Shen, Che Hung, Wen, Jennifer, Asara, John, McGraw, Timothy E., Kahn, Barbara B. and Cantley, Lewis C. (2013), AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Molecular Cell*, 49(6): 1167–1175.
- Xia, Xiaoping, Chen, Wei, Li, Jiaoyuan, Chen, Xueqin, Rui, Rui, Liu, Cheng, Sun, Yu, Liu, Li, Gong, Jing and Yuan, Peng (2014), Body Mass Index and Risk of Breast Cancer: A Nonlinear Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *Scientific Reports*, 4.
- Xiao, Sheng, Zhu, Hongjia, Shi, Yujun, Wu, Zhenru, Wu, Hegang and Xie, Mingjun (2020), Prognostic and Predictive Value of Monocarboxylate Transporter 4 in Patients with Breast Cancer. *Oncology Letters*, 20(3): 2143–2152.
- Xiao, Xiangsheng, Huang, Xiaojia, Ye, Feng, Chen, Bo, Song, Cailu, Wen, Jiahuai, Zhang, Zhijie, Zheng, Guopei, Tang, Hailin and Xie, Xiaoming (2016), The MIR-34a-LDHA Axis Regulates Glucose Metabolism and Tumor Growth in Breast Cancer. *Scientific Reports*, 6.
- Xiao, Yin X., Lanza, Ian R., Swain, James M., Sarr, Michael G., Nair, K. Sreekumaran and Jensen, Michael D. (2014), Adipocyte Mitochondrial Function Is Reduced in Human Obesity Independent of Fat Cell Size. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(2).
- Yager, James D. and Davidson, Nancy E. (2006), Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(3): 270–282.
- Yang, Ming, Soga, Tomoyoshi and Pollard, Patrick J. (2013), Oncometabolites: Linking Altered Metabolism with Cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9): 3652–3658.
- Ye, Jingjing, Jia, Jue, Dong, Sijing, Zhang, Caili, Yu, Shuqin, Li, Lianxi, Mao, Chaoming, Wang, Dong, Chen, Junjian and Yuan, Guoyue (2014), Circulating Adiponectin Levels and the Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, 23(3): 158–165.

- Yonashiro, Ryo, Eguchi, Kayoko, Wake, Masaki, Takeda, Norihiko and Nakayama, Koh (2018), Pyruvate Dehydrogenase PDH-E1b Controls Tumor Progression by Altering the Metabolic Status of Cancer Cells. *Cancer Research*, 78(7): 1592–1603.
- Yoo, Hyuntae, Stephanopoulos, Gregory and Kelleher, Joanne K. (2004), Quantifying Carbon Sources for de Novo Lipogenesis in Wild-Type and IRS-1 Knockout Brown Adipocytes. *Journal of Lipid Research*, 45(7): 1324–1332.
- Yu, Yinjue, Zhao, Linfeng and Li, Rong (2019), Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Enhances Invasion and Metastasis Ability of Breast Cancer Cells. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 39(6): 650–656.
- Zhang, Hong Sheng, Du, Guang Yuan, Zhang, Zhong Guo, Zhou, Zhen, Sun, Hong Liang, Yu, Xiao Ying, Shi, Yu Ting, Xiong, Dan Ning, Li, Hu and Huang, Ying Hui (2018), NRF2 Facilitates Breast Cancer Cell Growth via HIF1 $\alpha$ -Mediated Metabolic Reprogramming. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 95: 85–92.
- Zhang, Hong Sheng, Zhang, Zhong Guo, Du, Guang Yuan, Sun, Hong Liang, Liu, Hui Yun, Zhou, Zhen, Gou, Xiao Meng, Wu, Xi Hao, Yu, Xiao Ying and Huang, Ying Hui (2019), Nrf2 Promotes Breast Cancer Cell Migration via Up-Regulation of G6PD/HIF-1 $\alpha$ /Notch1 Axis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(5): 3451–3463.
- Zheng, Qiao, Dunlap, Sarah M., Zhu, Jinling, Downs-Kelly, Erinn, Rich, Jeremy, Hursting, Stephen D., Berger, Nathan A. and Reizes, Ofer (2011), Leptin Deficiency Suppresses MMTV-Wnt-1 Mammary Tumor Growth in Obese Mice and Abrogates Tumor Initiating Cell Survival. *Endocrine-Related Cancer*, 18(4): 491–503.
- Zhong, Huiqin and Yin, Huiyong (2015), Role of Lipid Peroxidation Derived 4-Hydroxynonenal (4-HNE) in Cancer: Focusing on Mitochondria. *Redox Biology*, 4: 193–199.
- Zhu, Weizhu, Qin, Wenyi, Bradley, Paul, Wessel, Amy, Puckett, Charles L. and Sauter, Edward R. (2005), Mitochondrial DNA Mutations in Breast Cancer Tissue and in Matched Nipple Aspirate Fluid. *Carcinogenesis*, 26(1): 145–152.
- Zimta, Alina Andreea, Tigu, Adrian Bogdan, Muntean, Maximilian, Cenariu, Diana, Slaby, Ondrej and Berindan-Neagoe, Ioana (2019), Molecular Links between Central Obesity and Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21).

## BIOGRAFIJA AUTORA

Anđelika T. Kalezić je rođena 03.07.1993. godine u Novom Sadu. Osnovne akademske studije je upisala 2012. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, koje je završila 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,44. Master akademske studije je upisala 2016. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, modul Biologija ćelija i tkiva, koje je završila 2017. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Iste godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Biologija ćelija i tkiva.

Od 2017. godine je zaposlena na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik na projektu 173055 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a potom kao istraživač saradnik od 2019. godine. Od 2019. godine učesnik je na projektu PROMIS, #6066747, WARMED Fonda za nauku Republike Srbije, a od 2022. godine učesnik je na projektu IDEJE, #7750238, REFRAME Fonda za nauku Republike Srbije.

Član je Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju i predsednik odbora društva za mlade istraživače. Član je Evropskog društva Society for Free Radical Research – Europe i potpredsednik pododbora društva za mlade istraživače. Samostalno ili kao koautor objavila je dvanaest radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M21), časopisima od međunarodnog značaja (M22) i međunarodnim časopisima (M23), kao i osamnaest saopštenja sa međunarodnih skupova. Dobitnik je nagrade za najbolju master tezu fondacije „Goran Ljubijankić“ kao i tri nagrade za najbolje mlade istraživače na međunarodnim skupovima: Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju, Society for Free Radical Research - Europe i Oxygen Club of California.