

# Utjecaj 4-hidroksinonenala na HIF-1 $\alpha$ I NRF2 u razvoju malignosti tumora dojke

---

Orešić, Tomislav

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:188159>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





University of Zagreb

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Tomislav Orešić

**UTJECAJ 4-HIDROKSINONENALA NA  
HIF-1 $\alpha$  I NRF2 U RAZVOJU ZLOĆUDNIH  
TUMORA DOJKE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020. godina



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Tomislav Orešić

**INFLUENCE OF 4-HYDROXYNONENAL  
ON HIF-1 $\alpha$  AND NRF2 IN  
DEVELOPMENT OF BREAST CANCER  
MALIGNANCY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020

Ovaj je doktorski rad izrađen u Klinici za tumore, KBC “Sestre milosrdnice” i u Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom prof.dr.sc. Božene Šarčević i doc.dr.sc. Ane Čipak Gašparović, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem mentorima, prof. dr. sc. Boženi Šarčević i dr. sc. Ani Čipak Gašparović na pomoći, savjetima i strpljenju pri izradi ovog rada.

Također zahvaljujem kolegicama prim. dr. sc. Sandi Šitić i dr. sc. Snježani Ramić bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Hvala dr. sc. Miroslavu Banoviću i Zoranu Aćimoviću na tehničkoj podršci.

I naposljetku hvala mojoj supruzi Sandri na razumijevanju i podršci.

## **UTJECAJ 4-HIDROKSINONENALA NA HIF-1 $\alpha$ I NRF2 U RAZVOJU MALIGNOSTI TUMORA DOJKE**

TOMISLAV OREŠIĆ

Tumori dojke jedan su od najčešćih uzroka smrtnosti u žena. Budući da tijekom razvoja tumora dolazi do hipoksije, koja potiče stvaranje krvnih žila, te reoksigenacije, tumori rastu u uvjetima povišenog oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres djeluje na lipide te uzrokuje lipidnu peroksidaciju. Jedan od produkata lipidne peroksidacije je 4-hidroksinonenal, HNE. HNE može modificirati stanične signalne puteve, čime utječe na rast i diferencijaciju stanica. Cilj ovog rada je ispitati utjecaj HNE-a na HIF-1 $\alpha$  i NRF2, transkripcijske faktore koji se mogu aktivirati oksidacijskim stresom. Rezultati upućuju da HNE-a ima najviše u jezgrama trostruko negativnih tumora, dok je NRF2 stabilno eksprimiran, neovisno o stupnju malignosti tumora. HIF-1 $\alpha$  ima najnižu razinu u jezgrama kod trostruko negativnih tumora. Za razliku od tumora, stanice strome pokazuju aktivaciju NRF2 povezano s malignošću pripadajućeg tumora, koju prati izrazito niska razina HNE-a. Rezultati upućuju na ulogu HNE-a u interakciji tumora i strome pri čemu se aktivira antioksidacijska zaštita strome.

Klinika za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Ilica 197, Zagreb i  
Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, Zagreb

(100 stranica, 20 slika, 10 tablica, 208 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *tumori dojke, HIF-1 $\alpha$ , NRF2, HNE, oksidacijski stres*

Mentori: *prof.dr.sc. Božena Šarčević*

*Doc.dr.sc. Ana Čipak Gašparović, viši znanstveni suradnik*

Ocjenjivači:

*(ime, prezime, zvanje)*

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral thesis

**INFLUENCE OF 4-HYDROXYNONENAL ON HIF-1 $\alpha$  AND NRF2 IN  
DEVELOPMENT OF BREAST CANCER MALIGNANCY**

TOMISLAV OREŠIĆ

Breast cancer is one of the leading causes of mortality of women. During tumor development periods of hypoxia are followed by reoxygenation leading to oxidative stress. Oxidative stress causes lipid peroxidation resulting in formation of reactive aldehydes. Aldehyde 4-hydroxynonenal, HNE, can modify cellular signaling pathways thereby influencing cell growth and differentiation. The aim of this thesis is to evaluate influence of HNE on HIF-1 $\alpha$  and NRF2, transcription factors affected by oxidative stress. The highest HNE content was found in the triple negative tumor nuclei, while NRF2 expression was unaffected by the tumor malignancy. HIF-1 $\alpha$  had the lowest content in the triple negative tumor nuclei. In contrast to tumor, stroma had increased NRF2 in the nuclei with increasing malignancy, followed by extremely low levels of HNE. These results indicate that HNE could play a role in tumor stroma interaction by activating antioxidative defence of stroma.

University Hospital Centre „Sestre milosrdnice“, Ilica 197, Zagreb and Ruđer Bošković  
Institute, Bijenička 54, Zagreb

(100 pages, 20 figures, 10 tables, 208 references, original in Croatian)

Keywords: *breast cancer, HIF-1 $\alpha$ , NRF2, HNE, oxidative stress*

Supervisors: *prof.dr.sc. Božena Šarčević*

*Doc.dr.sc. Ana Čipak Gašparović*

Reviewers:

*(ime, prezime, zvanje)*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	3
2.1. Građa dojke .....	3
2.2. Tumori .....	5
2.2.1. Klinička klasifikacija tumora.....	5
2.2.2. Histogenetska klasifikacija tumora.....	6
2.2.3. Biologija nastanka tumora .....	6
2.2.4. Uzroci nastanka tumora .....	7
2.2.5. Karcinogeneza i karcinogeni .....	9
2.2.6. Geni odgovorni za malignu transformaciju .....	10
2.3. Tumori dojke .....	12
2.3.1. Genski faktori u karcinogenezi raka dojke .....	13
2.3.2. Histološki gradus .....	14
2.3.3. Imunofenotip .....	15
2.4. Oksidacijski stres i 4-hidroksinonenal.....	19
2.4.1. Reaktivne kisikove vrste (ROS) .....	20
2.4.2. Utjecaj ROS-a.....	20
2.4.3. Masne kiseline bioloških membrana .....	21
2.4.4. Funkcije HNE-a.....	22
2.4.5. HNE kao regulator signalnih puteva u tumora .....	23
2.4.6. Lipidna peroksidacija i tumor-specifična pojavnost HNE-a .....	24
2.4.7. Utjecaj HNE-a na rast stanica.....	25
2.5. Antioksidacijska zaštita .....	27
2.6. NRF2 .....	28



2.6.1. NRF2-KEAP1 put .....	28
2.6.2. Uloga oksidacijskog stresa i NRF2-KEAP1 puta u karcinogenezi .....	29
2.7. HIF-1 $\alpha$ .....	32
2.7.1. Funkcija HIF-1 $\alpha$ u tumorima.....	32
2.7.2. HIF-1 $\alpha$ i ROS .....	34
2.7.3. HIF-1 $\alpha$ i karcinogeneza .....	35
3. MATERIJALI I METODE.....	37
3.1. Pacijentice.....	37
3.2. Metode .....	38
3.2.1. Uzimanje i obrada uzoraka .....	38
3.2.2. Imunohistokemijsko bojenje.....	38
3.2.3. Evaluacija imunohistokemijskih podataka .....	38
3.3. Stanične linije tumora dojke .....	39
3.3.1. Uzgoj staničnih linija tumora dojke.....	39
3.3.2. Tretman vodikovim peroksidom .....	39
3.3.3. Izolacija proteina .....	39
3.3.4. Kapljična analiza proteina i HNE-proteinskih konjugata.....	40
3.4. Statistička analiza .....	40
4. REZULTATI .....	42
4.1. Analiza razlika među odabranim skupinama pacijentica .....	42
4.2. Imunohistokemijka prisutnost HIF-1 $\alpha$ , NRF2 i HNE-a .....	44
4.2.1. Analiza HIF-1 $\alpha$ .....	44
4.2.2. Analiza NRF2.....	46
4.2.3. Analiza HNE .....	48
4.3. Analiza korelacija među parametrima .....	50
4.3.1. Analiza korelacija po gradusu tumora .....	50

4.3.2. Analiza korelacija po imunofenotipu tumora .....	55
4.4. Stanice .....	62
5. RASPRAVA.....	64
6. ZAKLJUČCI .....	77
7. LITERATURA.....	79
8. ŽIVOTOPIS .....	100

# 1. UVOD

Jedan od vodećih uzroka smrtnosti žena u razvijenijim državama svakako je karcinom dojke [1]. O učestalosti govori i podatak za 2018. godinu, u kojoj je od tumora dojke obolili više od 2 milijuna žena, dok više od 600 000 umrlo od istog [1]. Incidencija ove maligne bolesti još uvijek je u porastu i smrtnost je i dalje visoka unatoč napretku u ranome otkrivanju i strategiji liječenja. Dojke su kao organ izrazito podložne utjecaju hormona te je njihov razvoj vezan uz estrogen i progesteron tijekom puberteta, a njihov manjak u menopauzi uzrokuje njihovu involuciju [2]. Uzevši to u obzir, ne iznenađuje podatak da estrogeni imaju ključnu ulogu u razvoju tkiva dojke i nastanku tumora [3,4]. Ako dođe do izostanka funkcije jajnika, dolazi do potpunog zastoja u razvoju tkiva dojke te je nužna nadomjesna hormonska terapija u obliku estradiola da bi se uspostavio normalan razvoj dojke [2]. Povećana izloženost promjenjivim razinama estradiola u tijeku menstrualnog ciklusa, za vrijeme ranog puberteta, kasne menopauze ili kasne prve trudnoće povećava rizik nastanka karcinoma dojke u jednakoj mjeri kao i korištenje egzogenih estrogena u obliku oralnih kontraceptiva ili hormonske nadomjesne terapije [5]. Dokazano je da anti-estrogenska terapija smanjuje incidenciju karcinoma dojke u visoko rizičnih žena [6]. Uz genetiku i biologiju nastanka i rasta tumora dojke, oksidacijski stres je svakako jedan od faktora koji može regulirati bilo nastanak bilo razvoj tumora. Reaktivne kisikove vrste (ROS od engl. *Reactive Oxygen Species*), kao i drugi slobodni radikali oštećuju DNA pri čemu se generiraju mutacije. Ove mutacije, ukoliko u samom početku nisu letalne, uzrokuju gubitak kontrole nad staničnim ciklusom te vode u nekontroliranu proliferaciju [7]. Izvori ROS-a mogu biti endogeni i egzogeni, od dišnog lanca u mitohondrijima, oksidacije joda i oksidacijskog praska neutrofila pa do ionizirajućeg zračenja, duhanskog dima i raznim toksičnih kemikalija, kao što su pesticidi i kemoterapeutici. Također, promjene u razini kisika unutar stanica/tkiva tijekom vremena (hipoksija/reoksigenacija) također uzrokuje promjene koje dovode do povišenja razine ROS-a. ROS su izrazito reaktivni i kratkoživi te lako reagiraju s molekulama u svojoj okolini (DNA, proteini i lipidi). Djelovanjem na lipide potiču lančanu reakciju lipidne peroksidacije, pri čemu se stvaraju reaktivni aldehidi, među kojima je i 4-hidroksinonenal (HNE). Ovi aldehidi su izrazito reaktivni, a istovremeno i stabilni te mogu difundirati i širiti krug oksidacijskog oštećenja [8]. Navedene promjene dovode do oksidacijskog stresa, što je narušena homeostaza stanice. Jedna od pojava koja može narušiti homeostazu mitohondrija, čime dolazi do stvaranja ROS-a, je hipoksija koja nastaje kao posljedica rasta tumora i

neadekvatnog/sporijeg rasta krvnih žila. Iz ovih razloga neki dijelovi tumora nisu adekvatno opskrbljeni kisikom te zapadaju u hipoksiju različitog intenziteta. Kako je rečeno, hipoksija uzrokuje stvaranje ROS-a što dalje aktivira hipoksija-inducirani faktor 1 (engl. *Hypoxia inducible factor 1*, HIF-1) [9] koji potiče angiogenezu te rastom krvnih žila dolazi do normalizacije razine kisika.

Evolucijski, stanice su razvile i antioksidacijsku zaštitu koja se sastoji od transkripcijskih faktora, enzimatskih kaskada i niza malih nespecifičnih molekula koje dovode do potpune detoksifikacije ROS-a te drugih elektrofila koje dovode do stvaranja oksidacijskog stresa. Uz općepoznati sustava superoksid dismutaza-katalaze te glutationski sustav enzima, jedan od najvažnijih transkripcijskih faktora je NRF2, koji regulira ekspresiju većine gena u navedenim enzimatskim kaskadama.

Uzevši u obzir da rast tumora podrazumijeva zone hipoksije koje stimuliraju angiogenezu preko HIF-1 $\alpha$  faktora čime dolazi do povećanog stvaranja ROS-a što posljedično aktivira antioksidacijske zaštitne mehanizme postavljena je sljedeća hipoteza: u tumorima dojke doći do porasta faktora HIF-1 $\alpha$ , i posljedično lipidne peroksidacije zbog smanjenja  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, što će pokrenuti oksidacijska oštećenja i antioksidacijsku zaštitu aktivacijom NRF2 antioksidacijskog transkripcijskog faktora.

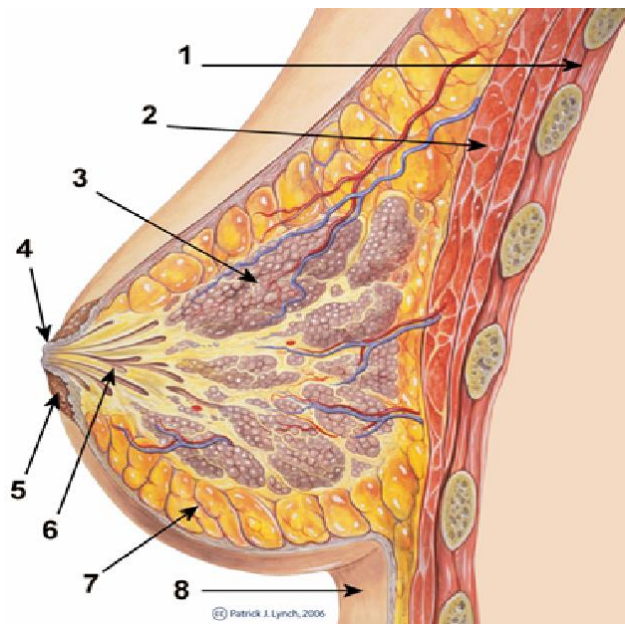
Hipoteza je istražena kroz sljedeće ciljeve:

1. Odrediti ovisnost razine HIF-1 $\alpha$  o gradusu tumora dojke
2. Odrediti korelaciju HIF-1 $\alpha$  i 4-hidroksinonenala, produkta lipidne peroksidacije u razvoju tumora dojke
3. Odrediti ulogu NRF2 antioksidacijskog transkripcijskog faktora kao faktora u razvoju tumora
4. Odrediti korelaciju HIF-1 $\alpha$  i NRF2 o ovisnosti o gradusu i intrinzičkom tipu tumora dojke
5. Rezultate morfološke analize i ispitivanih biljega usporediti s faktorima rizika razvoja tumora dojke

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Građa dojke

Dojka je žlijezda građena od žljezdanog, masnog i vezivnog tkiva (Slika 1). Smještena je na pektoralnom mišiću stijenke prsnog koša s kojim je vezana fibroznim tračcima poznatima kao Cooperovi ligamenti. Režnjići zrelog masnog tkiva okružuju žljezdano tkivo dojke te se pružaju kroz cijelu dojku dajući joj mekanu konzistenciju [10].



Slika 1. Građa dojke, sagitalni presjek: 1 - prсни koš; 2 - veliki prсни mišić; 3 - mliječne žlijezde; 4 - bradavica; 5 - areola; 6 - mliječni kanali; 7 - masno tkivo; 8 - koža (Preuzeto iz: Lynch PJ, medicinski ilustrator;

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast\\_anatomy\\_normal\\_scheme.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast_anatomy_normal_scheme.png))

Areola, bradavica i završni dio laktifernog duktusa prekriveni su mnogoslojnim pločastim epitelom koji prelazi u višeslojni cilindrični epitel, a potom u dvoredni niski, kubični epitel. U normalnoj dojci kanalići i režnjići obloženi su s dva tipa stanica, diskontinuiranim slojem

mioepitelnih kontraktilnih stanica na bazalnoj membrani te luminalnim epitelnim stanicama koje oblažu lumen. Mioepitelne stanice pomažu u sekreciji mlijeka tijekom laktacije i imaju važnu ulogu u održanju normalne strukture i funkcije režnjića i bazalne membrane dok epitelne stanice oblažu lumen [2]. Luminalne stanice terminalnih kanalića i režnjića proizvode mlijeko, za razliku od stanica koje oblažu veće kanale.

Ženske dojke počinju rasti u pubertetu. Početak proizvodnje estrogena i progesterona ujedno signalizira i početak razvoja dojke. Početno, s nastupom puberteta, a zbog nedovršenih ovulacija u jajnicima te posljedično manjeg stvaranja progesterona, estrogen ima primarnu ulogu u stimulaciji rasta stanica i tkiva dojke. Tako estrogen potiče rast razgranatog sustava kanalića, povećanje perikanalikularnog vezivnog tkiva, prokrvljenost i odlaganje masti. Kasnije u pubertetu dolazi do kompletnih ovulacija i stvaranja progesterona. Pod utjecajem progesterona žljezdane se stanice povećavaju, dijele i poprimaju sekrecijska obilježja (dominantna uloga progesterona). Sve to povećava masu dojki. Za rast sustava kanalića važna su još najmanje četiri hormona: hormon rasta, prolaktin, glukokortikoidi nadbubrežne žlijezde i inzulin. U muškaraca izostaje hormonska stimulacija koja se događa u žena, tako da se muška dojka sastoji od kanalića bez režnjića. U reproduktivskom razdoblju žene dolazi do mjesečnih cikličkih promjena izlučivanja spolnih hormona. Te promjene utječu na stanice žljezdanog i potpornog tkiva dojke koje također prolaze kroz cikličke faze rasta, diferencijacije i propadanja (apoptoze). Trudnoća i dojenje također izazivaju dodatne prepoznatljive promjene u tkivu dojke. Nastupom menopauze, a zbog „iscrpljenja“ jajnika, odnosno zbog smanjenoga i izostalog stvaranja estrogena i progesterona, dolazi do involucije dojki. Žljezdani dijelovi gotovo potpuno nestaju, a ostaje samo pokoji atrofičan izvodni kanal. Količina masnog tkiva starenjem se povećava [2].

S obzirom na ulogu hormona u razvoju dojke nije iznenađujući podatak da estrogeni imaju ključnu ulogu u razvoju tkiva dojke i nastanak tumora [3,4]. U prilog tome govore brojni klinički i epidemiološki podaci. Uslijed izostanka funkcije jajnika, dolazi do potpunog zastoja u razvoju tkiva dojke te je nužna nadomjesna hormonska terapija u obliku estradiola da bi se uspostavio normalan razvoj dojke [2]. Povećana izloženost promjenjivim razinama estradiola u tijeku menstrualnog ciklusa, za vrijeme ranog puberteta, kasne menopauze ili kasne prve trudnoće povećava rizik nastanka karcinoma dojke u jednakoj mjeri kao i korištenje egzogenih estrogena u obliku oralnih kontraceptiva ili hormonske nadomjesne terapije [5]. Dokazano je da anti-estrogenska terapija smanjuje učestalost karcinoma dojke u visoko rizičnih žena [6]. Pokusi na eksperimentalnim životinjama u kojima je izbačen gen za receptore estrogena ( $ER\alpha$ ) potvrdili su neizostavnu ulogu estradiola na razvoj tkiva dojke i nastanak tumora [11].

Žljezdano tkivo u tim pokusnim životinjama sastoji se od rudimentarnih kanalića ograničenih na područje oko bradavice, a niti terapija estradiolom ne može potaknuti njihov razvoj. Oni su također rezistentni na malignu transformaciju nakon transdukcije s onkogenima.

## 2.2. Tumori

Tumore (novotvorine) je najbolje definirao australsko-engleski patolog Rupert Willis: „Novotvorine su abnormalne nakupine tkiva, čiji rast nadmašuje i nije usklađen s rastom normalnih tkiva, a nastavlja rasti u prekomjernom obliku i nakon što je uklonjen uzrok te promjene“ [12]. Tumori ili novotvorine su patološke tvorbe za koje također možemo reći da rastu neorganizirano, autonomno, nesvrhovito te parazitarno.

### 2.2.1. Klinička klasifikacija tumora

#### Dobročudni (benigni) tumori

Benigni tumori rastu polagano, ekspanzivno, ograničeni su na organ u kojem su nastali. Oštro su ograničeni od okolnog tkiva, dobro prokrvljeni. Histološki su građeni od dobro diferenciranih stanica koje nalikuju na stanice normalnih tkiva ili organa u kojima su nastali. Nakon kompletnog uklanjanja ne recidiviraju te u većini slučajeva imaju dobru prognozu [13,14].

#### Zloćudni (maligni) tumori

Maligni tumori rastu mnogo brže od benignih tumora, nepravilnih su oblika, neoštrih rubova, infiltrativnog rasta. Šire se u okolne organe, a krvlju ili limfom se mogu proširiti u druge dijelove tijela. Često i unatoč kirurškom odstranjenju recidiviraju. Građeni su od atipičnih stanica koje često ne nalikuju na stanice tkiva ili organa iz kojih je tumor nastao. Mitoze su brojnije nego u benignih tumora, češće su nekroza i kalcifikacije [13].

### 2.2.2. Histogenetska klasifikacija tumora

Histogenetska klasifikacija tumora označava tkivno podrijetlo tumora koje se potvrđuje mikroskopskim pregledom. Tumori se prema ovoj klasifikaciji svrstavaju u 6 velikih skupina [15]:

- Epitelni tumori koji nastaju iz bilo kojeg epitelnog tkiva
- Mezenhimalni tumori nastaju iz vezivnog tkiva, kostiju, mišićja te drugih mezodermalnih stanica ili tkiva
- Tumori limfocita i hematopoetskih stanica nastaju iz matičnih stanica koštane srži ili limfatičnih organa
- Neuralni tumori nastaju iz stanica preteča živčanim stanicama budući da se zrele živčane stanice ne dijele. U ovu skupinu spadaju i tumori nastali iz melanocita koji su podrijetla fetalnog neuralnog grebena te stanice srži nadbubrežne žlijezde
- Tumori potpornih stanica živčanog sustava koji nastaju iz glijalnih stanica središnjeg živčanog sustava, moždanih ovojnica i perifernih živaca
- Tumori spolnih stanica nastaju u testisu ili jajniku

### 2.2.3. Biologija nastanka tumora

Hanahan i Weinberg su predložili 6 glavnih skupina karakteristika progresije od normalne do maligne stanice [16]:

- Stalni poticaj stanične proliferacije (deregulacijom staničnih receptora i njihovih izvanstaničnih faktora, kao i unutarstaničnih posrednika)
- Izbjegavanje supresora rasta (dva glavna mehanizma su gubitak funkcije proteina/gena odgovornih za usporavanje stanične diobe - supresori tumorskog rasta/antionkogeni) i gubitak kontaktne stanične inhibicije rasta
- Izbjegavanje apoptoze (pomak ravnoteže između proapoptotskih i antiapoptotskih staničnih mehanizama)
- Mogućnost replikativne imortalizacije (abnormalna aktivnost telomeraza omogućuje neograničenu replikaciju kromosoma)
- Razvoj novog krvotoka (neoangiogeneza)
- Invazija, metastaziranje i kolonizacije udaljenih organa



Dodatne dvije karakteristike malignih tumora su promjene u staničnom energetske metabolizmu i izbjegavanje imunološkog nadzora [17].

#### 2.2.4. Uzroci nastanka tumora

Postoje dvije osnovne skupine rizičnih faktora koji pogoduju nastanku tumora, a to su predodređeni, tj. oni koji se ne mogu mijenjati (dob, spol i genetska predispozicija) te varijabilni, na koje se može utjecati (prehrana, okoliš, infekcije, lijekovi i radioterapija).

Dob – Iako zloćudni tumori mogu nastati u bilo kojoj dobi, jedna od njihovih podvrsta, karcinomi, većinom se pojavljuju u starijoj životnoj dobi. Epidemiološki podaci iz SAD-a govore da je vjerojatnost nastanka karcinoma u osoba mlađih od 40 godina 1:60, dok u dobi od 70 godina ona raste na 1:3 za muškarce i 1:4 za žene [18,19].

Spol – Zbog određenih spolnih razlika potpuno je jasno zašto se pojedine vrste tumora javljaju u žena, tj. muškaraca (tumori jajnika ili testisa). No, spolne razlike u učestalosti pojedinih tumora su još uvijek nejasne. Npr. karcinom štitnjače je četiri puta češći u žena, karcinom jednjaka četiri puta češći u muškaraca, kao i karcinom pluća [18,19]. Tumori crijeva se u jednakim omjerima pojavljuju i u muškaraca i u žena [18,19].

Genetska predispozicija – Neki tumori vezani su uz određene genske mutacije te su česti u obiteljima koje su nosioci te mutacije, kao npr. u neurofibromatozi tipa 1 i 2, obiteljskoj adenomatoznoj polipozi debelog crijeva, sindromu multiplih endokrinih neoplazija (MEN) tip 1 i 2 [20–22]. Kod tih je pacijenata mehanizam nastanka tumora povezan s mutacijama tumorsupresorskih gena kao što su *NF-1* gen u neurofibromatozi tip 1 ili *RB-1* gen u retinoblastomima [22,23].

Prehrana – U današnje se vrijeme sve više pažnje posvećuje prehrani, budući da su velika epidemiološka istraživanja ukazala na povećanu učestalost pojedinih vrsta tumora probavnog sustava s određenim tipom ili načinom konzumacije hrane. Tako je, na primjer, karcinom želuca u Japanu jedan od najčešćih zloćudnih tumora [24], karcinom jednjaka u dijelovima Kine i srednje Azije pripisan utjecaju specifične prehrane [25]. U zemljama Europe i Sjeverne Amerike karcinom debelog crijeva je daleko češći, a pripisuje se prehrani koja sadržava manju količinu neprobavljivih vlakana, a više rafiniranih ugljikohidrata i masti nego u nerazvijenim

zemljama [26]. Dugotrajna upotreba alkohola smatra se odgovornom za karcinome jednjaka i gušterače [27,28].

Okoliš – U velikim je gradovima veća učestalost karcinoma pluća nego u ruralnim područjima pa se vjeruje da tome uvelike doprinosi onečišćenje zraka [29]. Također pokazana je znatno veća učestalost ne samo raka pluća, već i usne šupljine, jednjaka, gušterače, mokraćnog mjehura i vrata maternice kod pušača [29]. Radnici u industriji azbesta su znatno češće oboljevali od mezotelioma i karcinoma pluća od ostale populacije [30]. Radioaktivni jod u zraku nakon eksplozije atomske centrale u Černobilu je bio uzrok povećanom broju karcinoma štitnjače u mlađih dobnih skupina u Ukrajini i susjednim zemljama [31]. Izloženost UV zrakama sunčanjem ili odlascima u solarije utječe na nastanak tumora kože [32].

Infekcije – Brojne virusne, bakterijske i parazitske infekcije povezane su s nastankom tumora. Najpoznatija spolna infekcija humanim papiloma virusom povezana je s karcinomom vrata maternice [33]. Infekcija Epstein-Barrovim virusom povezana je u subsaharskoj Africi s pojavom Burkittovog limfoma, a u Kini nazofaringealnog karcinoma [33]. Od bakterijskih je infekcija najpoznatiji *Helicobacter pylori* koji uzrokuje kronični gastritis, a pogoduje i nastanku limfoma i karcinoma želuca [33]. Od parazitarne infekcije *Shistosoma hematobium* je poznati uzročnik tumora koji je u dijelovima sjeverne Afrike uzročnik kroničnog cistitisa te pogoduje nastanku karcinoma mokraćnog mjehura [33].

Lijekovi i radioterapija – Na žalost, pokazalo se da napretkom i razvojem farmaceutske industrije osim brojnih nuspojava lijekova, primjena određenih vrsta lijekova može uzrokovati i zloćudne tumore. Najpoznatiji i najučestaliji primjer je kemoterapija i citostatici, koji u onkologiji liječe i izliječe jednu vrstu tumora, da bi se nakon par godina pojavila nova vrsta zloćudnog tumora [34]. Imunosupresivni lijekovi koji se daju bolesnima s transplantiranim organima također pogoduju razvoju tumora [35]. Radioterapija i primjena radioaktivnih izotopa također se povezuje s povećanom učestalošću zloćudnih tumora, prvenstveno zloćudnim tumorima mekih tkiva, sarkomima [36].

## 2.2.5. Karcinogeneza i karcinogeni

Brojna istraživanja zadnjih stoljeća dovela su do spoznaje da je neoplastični rast, kada ga promatramo na staničnom nivou, gotovo uvijek povezan s promjenama u genskom sustavu stanice. Te se promjene nazivaju mutacijama. Brojni su uzroci tih mutacija, a tvari i kemikalije koje uzrokuju mutacije, i posljedično tumore, nazivamo karcinogenima (onkogenima). Te karcinogene tvari mogu se podijeliti u tri osnovne skupine: kemijske, fizikalne te biološke (virusna i bakterijska karcinogeneza) [12].

Kemijski karcinogeni – Još je davne 1775. godine Sir Percival Pott primijetio povećanu učestalost raka skrotuma u dimnjačara u Londonu te pretpostavio da taj rak nastaje zbog mehaničkog prijenosa čađi na prepone dok su dimnjačari zajahivali na dimnjake. Nakon uvođenja obaveznog kupanja uspjeli su spriječiti tu bolest što je predstavljalo jedan od ranih uspjeha prevencije raka uzrokovanih okolišem. Nakon identifikacije dibenzantracena kao glavnog karcinogena u katranu, rak kože u radnika u katranskoj industriji te rak pluća u pušača počeo su povezivati s tim karcinogenom.

Kemijski karcinogeni vežu se za DNA te kemijski mijenjaju baze, pri čemu dolazi do mutacije [37]. Mutacija može rezultirati promjenom aminokiselinskog slijeda u proteinu te promjenom njegove aktivnosti. Ukoliko se opisana promjena dogodi u proteinu koji je važan za kontrolu i sam proces proliferacije, dolazi do poticanja proliferacije stanice. Daljnjim dijeljenjem generiraju se nove mutacije te u konačnici nastaju različiti klonovi stanica koji rastu brže od okolnog, normalnog tkiva, ne ovise o signalima okoliša za proliferaciju, neosjetljivi su na inhibitorne signale okoline te izbjegavaju imunološki nadzor organizma. S obzirom da su tumori heterogeni, unutar jednog se tumora nalazi mnogo različitih klonova stanica, ali njegova sklonost metastaziranju i invaziji ovise o maloj, ali izrazito agresivnoj subpopulaciji stanica [7].

Fizikalni karcinogeni – U ovu skupinu se ubrajaju različite vrste ionizirajućeg zračenja: UV zračenje, rendgenske zrake,  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  zrake. Glavni izvor UV zračenja su sunčeve zrake te svjetiljke koje se upotrebljavaju u solarijima za tamnjenje kože. S obzirom da ih koža apsorbira, oni ne prodiru duboko u potkožno tkivo nego uzrokuju oštećenja DNA u površinskom sloju tijela uzrokujući karcinome kože i melanome [32]. Karcinogeni učinak rendgenskih zraka uočen je u pionirsko doba rendgenologije kada se nije koristila zaštita medicinskog osoblja i

pacijenata, a količina je zračenja bila veća nego u današnje doba. Tada je primijećena znatno veća učestalost raka kože i leukemija u izloženih osoba.

Virusna i bakterijska karcinogeneza – Virusi se po molekuli nositelju genske informacije dijele u dvije skupine: DNA i RNA virusi. Karakteristika RNA virusa je da se njihova RNA prepisuje enzimom reverzna transkriptaza u DNA te se ta sekvenca ugrađuje u genom domaćina pri čemu kod nekih virusa može doći do maligne transformacije stanice domaćina. Onkogeni virusi kod ljudi su rijetki, a jedan od primjera je virus humane T-stanične leukemije (HTLV) koja je endemična u Japanu i na karipskim otocima. Leukemija se pojavljuje u samo 3-5% kronično inficiranih osoba, obično nakon latentnog razdoblja od 20-50 godina [38].

Onkogeni DNA virusi su daleko brojniji, najpoznatiji je Humani papiloma virus (HPV) od kojeg je otkriveno oko 80 podtipova. Samo su neki podtipovi karcinogeni te ih nazivamo podtipovima visokog rizika [39]. Svi podtipovi pokazuju tropizam za pločaste stanice te u inficiranim stanicama uzrokuju brojne promjene koje u konačnici rezultiraju nastankom papiloma u spolnim organima, usnoj šupljini ili grkljanu. Podtipovi visokog rizika integriraju se u genom domaćina rezultirajući nastankom planocelularnog karcinoma ako se na vrijeme ne liječe [39].

Epstein-Barr virus (EBV) je još jedan primjer onkogenog DNA virusa koji spada u skupinu herpes virusa. Iako je za većinu ljudi bezopasan te infekcija prođe asimptomatski ili s infektivnom mononukleozom, u pojedinih skupina ljudi inicira nastanak nekih oblika Hodgkinovog limfoma, Burkittov limfom, B-stanični limfom u bolesnika s AIDS-om te nazofaringealni karcinom [39].

Od onkogenih bakterija je najvažnija *Helicobacter pylori* uzročnik kroničnog atrofijskog gastritisa i peptičkog ulkusa. Povezan je s nastankom adenokarcinoma i limfoma želuca [40]. Za razliku od karcinogenih virusa, genom ove bakterije se ne prenosi u stanice želuca te mehanizam karcinogeneze nije do kraja razjašnjen, ali se pretpostavlja da zloćudni tumori nastaju zbog interakcije između infekcijom oštećenih stanica želučane sluznice i upalnih stanica koje ih okružuju [40].

#### 2.2.6. Geni odgovorni za malignu transformaciju

Onkogeni – Prvi onkogeni su geni otkriveni kao dijelovi kancerogenih onkogenih virusa, no također je otkriveno da mutacijama normalnih staničnih gena, protoonkogeni, nastaju

onkogeni. Onkogeni iz protoonkogeni mogu nastati brojnim promjenama kao što su točkaste mutacije, translokacije, delecije/insercije više baza, amplifikacije [41]. Protoonkogeni sudjeluju u regulaciji normalnog staničnog rasta i diobe, te su odgovorni za autonomni rast neoplastičnih stanica koje rastu i bez vanjskih faktora rasta i ne odgovaraju na normalne endogene i egzogene kontrolne mehanizme [41]. Proteini, produkti protoonkogeni, imaju ulogu u staničnom ciklusu te su izuzetno značajni u proliferaciji stanica. Najpoznatiji su faktori rasta (EGF, FGF), receptori za faktore rasta (receptor za epidermalni faktor rasta, EGFR, receptor za faktor rasta podrijetlom iz trombocita, PDGFR, receptor za faktore rasta matičnih stanica; c-KIT), signalne molekule (RAS, SRC), regulatori mitotičnog ciklusa (ciklini), molekule koje se vežu na DNA (FOS-JUN, MYB) [41].

Geni koji zaustavljaju rast tumora – Geni koji kontroliraju rast stanica zaustavljanjem proliferacije nazivaju se još i tumorsupresorskim genima. Oni djeluju suprotno onkogenima te suprimiraju pretjeranu proliferaciju stanica. Neoplastična pretvorba stanica nastaje ako se ti geni izgube delecijom ili prestanu normalno funkcionirati zbog mutacije. Gubitak tumorsupresorskog gena se očituje kao gubitak heterozigotnosti (engl. *loss of heterozygosity*, LOH) [42].

Najpoznatiji tumorsupresorski gen je *RB-1*. Tumor supresori se nasljeđuju po principu recesivnosti, dakle, potrebne su promjene na oba gena. U hereditarnom obliku bolesti jedan mutirani gen se nasljeđuje dok se drugi inaktivira nekom mutacijom. Kao posljedica oba mutirana gena u takve djece nastaje retinoblastom [23]. U sporadičnim tumorima događaju se mutacije na oba gena.

*TP53* se smatra najvažnijim tumorsupresorskim genom, čije se mutacije kao i mutacije gena koji reguliraju njihovu ekspresiju nalaze u većini ljudskih tumora [43]. S obzirom da je jedna od najznačajnijih funkcija ovog tumorsupresor gena kontrola prelaska stanica iz G1 u S fazu, u stanica u kojih je on mutiran ili oštećen ta kontrola izostane pa sve stanice, uključujući i one koje imaju defektnu DNA prolaze u S fazu i dijele se [44]. Stanice koje imaju oštećenu DNA tako postanu neoplastične i nastave se nekontrolirano dijeliti.

Geni koji sudjeluju u apoptozi – Apoptoza ili programirana stanična smrt je jedan od homeostatskih mehanizama koji održava ravnotežu između stanica koje su obavile svoju funkciju i stare su te novostvorenih stanica [45]. Apoptoza je vrlo složen proces u kojem sudjeluju brojni proteini. Mutacija bilo kojeg od tih gena, a koja uzrokuje nefunkcionalni protein, može uzrokovati poremećaje regulacije apoptoze s posljedičnim stvaranjem tumora. Za razliku od tumora koje nastaju djelovanjem onkogeni ili zbog poremećaja tumorsupresorskih gena, tumori koji nastaju zbog poremećaja apoptoze ne pokazuju pojačanu

mitotsku aktivnost te rastu znatno sporije kao posljedica nakupljanja stanica koje ne umiru [46]. Postoji nekoliko skupina gena koji sudjeluju u apoptozi: kaspaze, proapoptotični proteini, antiapoptotični proteini i BH-3 proteini [47]. Najpoznatiji tumor koji nastaje zbog povećane produkcije BCL2 proteina, a čija je funkcija inhibicija proapoptotičnih enzima nalazi se u limfocitima, je folikularni limfom B-imunofenotipa [48].

Geni koji sudjeluju u popravku DNA – Enzimi koji popravljaju DNA su vrlo bitni budući da popravljaju nepravilnosti i oštećenja DNA, a koja mogu biti uzrokovana raznim toksičnim kemikalijama, radikalima kisika ili fizikalnim faktorima. Ako se oštećenja DNA ne poprave prije ulaska stanice u mitozu, ta se oštećenja prenose u novonastale stanice s posljedičnom neoplastičnom pretvorbom tih stanica. Oštećenja gena MSH2, MLH1 i PMS2, koji sudjeluju u popravku DNA vode povećanoj učestalosti razvoja tumora endometrija, jajnika, gušterače te posebno poznatog obiteljskog nepolipoznog karcinoma debelog crijeva [49]. Obiteljski nepolipozni karcinom debelog crijeva je nasljedna bolest u kojoj zloćudni tumori nastaju na ravnoj plohi debelog crijeva bez prethodnog stvaranja adenomatoznih polipa. Kako je već spomenuto, bolest nastaje zbog mutacija jednog od nekoliko gena za popravak pogrešno sparenih baza DNA. Zbog izostanka popravka dolazi do nakupljanja mutacija koje se pojavljuju 1000 puta češće nego u normalnoj populaciji. Krivo spojene baze dovode do mikrosatelitske nestabilnosti DNA što pogoduje nastanku zloćudnih novotvorina u debelom crijevu [49].

### **2.3. Tumori dojke**

Karcinom dojke daleko je najzastupljeniji tip karcinoma kod žena, i najčešći je uzrok smrti žena u razvijenim zemljama [6]. Više od milijun žena oboli, a oko pola milijuna žena umre svake godine od raka dojke širom svijeta. Učestalost ove maligne bolesti još uvijek je u porastu, a i smrtnost je i dalje visoka unatoč napretku u ranome otkrivanju i strategiji liječenja. Američko društvo za rak (American Cancer Society, ACS) izdalo je procjenu za 2019. godinu, 268 600 novooboljelih žena te 41 760 smrtnih slučajeva. Nadalje, prema podacima ACS, učestalost karcinoma dojke pala je za 2,1% između 2012 do 2016. godine, ali samo u skupinama žena iznad 50 godina što se pripisuje smanjenju upotrebe hormona i menopauzi [50]. Nažalost, sve je više novooboljelih mladih žena kod kojih je tijek bolesti znatno agresivniji [18].

Godine 2018. u svijetu je bilo 2,17 milijuna novootkrivenih slučajeva karcinoma dojke [1], a u Hrvatskoj je bilo 2 856 novih slučajeva [1]. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO), tumori dojke su vodeći uzrok i oboljenja i smrti od malignih bolesti među ženama [1]. Podaci WHO govore o porastu učestalosti karcinoma dojke od 2012. do 2018. 20%, dok je procjena za period od 2018. do 2040. za dodatnih 35% [1].

Generalno, globalni trend pokazuje da je u zemljama u razvoju, koje prolaze kroz brze i korjenite društveno-ekonomske promjene, promjena životnoga stila i navika prema onome tipičnom za razvijene industrijalizirane zemlje rezultirao porastom učestalosti je i prevalencije tumora povezanih s reproduktivnim, hormonskim i prehrambenim rizičnim faktorima. Učestalost raka dojke u porastu je u većini regija svijeta, no postoje značajne epidemiološke razlike i nejednakosti između bogatih i siromašnih zemalja. Učestalost je i dalje najviša u razvijenim zemljama, no smrtnost je relativno viša u zemljama u razvoju zbog nedostatka probira i rane detekcije kao i slabije dostupnosti terapijskih opcija. Primjerice, u zapadnoj je Europi incidencija karcinoma dojke prešla 90 novih slučajeva na 100000 žena godišnje, dok je u istočnoj Africi bila trostruko niža (30/100000 žena) [51]. Usprkos razlici u učestalosti, stope smrtnosti od karcinoma dojke u ove dvije regije skoro su identične (15/100000 žena godišnje), što jasno ukazuje na odgođenu dijagnozu i značajno lošije preživljenje raka dojke u zemljama u razvoju.

U Republici Hrvatskoj 2016. godine zabilježeno je 2644 novih slučajeva karcinoma dojke, što je 26% svih novodijagnosticiranih tumora u žena [51,52]. Iste godine od karcinoma dojke u Hrvatskoj je umrla 1071 žena [52]. Zadnjih godina karcinom dojke čini oko 25% svih karcinoma kod žena i daleko je najčešće sjelo karcinoma; slijede karcinom kolorektuma (13%) i bronhopulmonarni karcinom (8%). Iako je identificiran niz genetskih i okolišnih faktora koji utječu na rizik za nastanak karcinoma dojke, etiologija još nije u potpunosti razjašnjena i još uvijek nema učinkovitih metoda za primarnu prevenciju. Karcinom je dojke izrazito heterogena skupina tumora. Razlikuju se 24 histološka tipa i podtipa karcinoma dojke; svaki od njih ima određene histološke, histokemijske, imunohistokemijske i molekularne karakteristike te ima određenu prognozu.

### 2.3.1. Genski faktori u karcinogenezi raka dojke

Kao i kod ostalih tumora, i kod dojke genska je osnova vrlo bitna pri čemu postoje dva različita seta gena. Prvi skup čine geni koji uključeni u nasljedni povećani rizik od pojave karcinoma dojke u 10-15% slučajeva. Patogene promjene gena BRCA1 i BRCA2 povećavaju rizik od

razvoja karcinoma dojke za 40-80% u obiteljima s više slučajeva karcinoma dojke ili jajnika u odnosu na sporadične karcinome dojke. Oko 5% rizika pripisuje se drugim visokim penetrantnim genima poput TP53, CDH1, PTEN, STK11, RAD51C i RAD51D, te nekim genima s niskom do umjerenom penetracijom, kao što su ATM, CHEK2, BRIP1 i PALB2. Identifikacija pacijentica s karcinomom dojke koje nose mutaciju BRCA1 ili BRCA2 i članova njihovih obitelji obrađuje se prema Smjernicama za genetsko savjetovanje i testiranje na nasljedni karcinom dojke i jajnika [53].

Drugi skup gena su povezani s razvojem specifičnih podtipova karcinoma dojke. Najčešće su zabilježene mutacije u TP53 (40%), PIK3CA (42%), ESR1 (14,3%), CDH1 (10%), GATA3 (11,3%), MAP3K1 (7,5%), PTEN (6%), NF1 (5%), KMT2C (5%) i RB1 (3%) i amplifikacije u ERBB2 (15%), CCND1 (13%), FGFR (14%) i MYC (8%) [54,55].

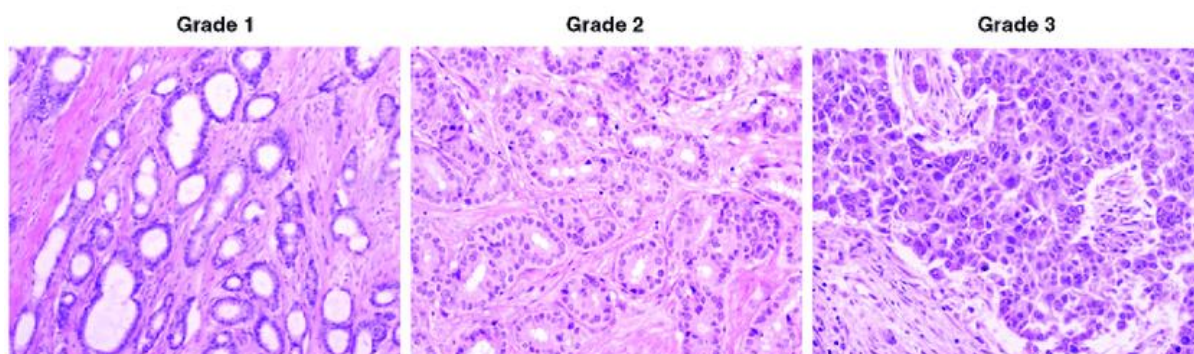
### 2.3.2. Histološki gradus

Određivanjem histološkog gradusa tumora prema Elston-Ellisovom sustavu prikazanim u Tablici 1 procjenjujemo agresivnost tumorskog fenotipa i njegovu histološku sličnost sa zdravim tkivom iz kojeg je nastao. Histološki gradus (Slika 2) predstavlja zbroj bodova pojedinačnih kategorija pri čemu gradus I ima 3-5 bodova, gradus II 6-7 te gradus III, 8-9 bodova. Gradus I predstavlja dobro diferenciran tumor i pokazuje bolju prognozu od slabo diferenciranog tumora gradusa III. Histološki gradus je značajan neovisan prognostički faktor, a njegova prognostička vrijednost još raste u kombinaciji s drugim prognostičkim faktorima od kojih su najvažniji veličina tumora i stanje regionalnih limfnih čvorova [56]. Tumori višeg gradusa bolje reagiraju na kemoterapiju zbog pojačane proliferacije, ali karcinomi gradusa III imaju devet puta veći rizik od povrata bolesti unutar pet godina nego oni gradusa I [56].



Tablica 1. Osnovni kriteriji procjene histološkog gradusa karcinoma dojke

<b>Bod</b>	<b>Tubularne formacije</b>	<b>Polimorfizmi jezgre</b>	<b>Broj mitozâ (u 10/HPF)</b>
<b>1</b>	>75%	minimalne varijacije	0-9
<b>2</b>	10-75%	srednje varijacije	10-19
<b>3</b>	<10%	jako izražene varijacije	>20



Slika 2. Mikrofotografije karcinoma dojke histološkog gradusa I-III (Preuzeto i modificirano iz [56])

### 2.3.3. Imunofenotip

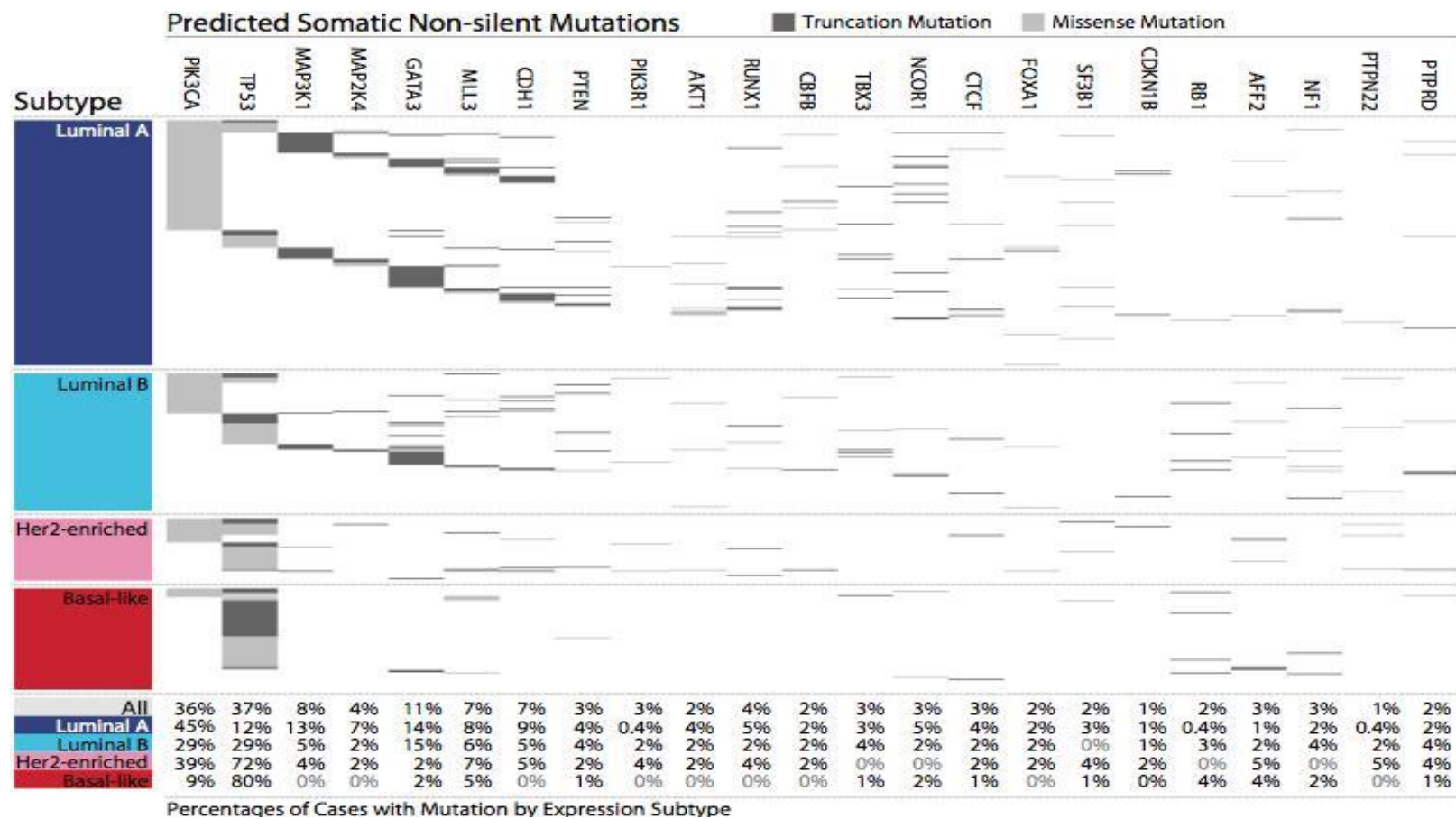
Osim prema histološkim podtipovima (duktalni, lobularni, medularni, papilarni, apokrini) i histološkom gradusu, karcinome dojke možemo podijeliti i prema prisutnosti/odsutnosti određenih molekula/receptora na površini tumorskih stanica [13]. To se prvenstveno odnosi na izraženost hormonskih (estrogenskih ER i progesteronskih PR) receptora u tumorskim stanicama, ali i na prisutnost pojačane izraženosti HER2 receptora, receptora za epidermalni faktor rasta. Za praćenje zloćudnoga potencijala karcinoma dojke, planiranje kirurške i postoperacijske terapije i praćenja pacijentica, danas se koriste brojni prediktivni i prognostički faktori vezani uz pacijenticu kao što su dob i komorbiditeti, opće stanje i hormonski status pacijentice te pokazatelji vezani za tumor: veličina tumora, multicentričnost, histološki tip i podtip tumora prema WHO (World Health Organisation) klasifikaciji, histološki gradus (I-III),

status hormonskih receptora (ER i PR), HER2 status (IHC, SISH, FISH), limfovaskularna invazija, određivanje statusa limfnih čvorova aksile, prisutnost udaljenih metastaza [3,14].

Analiza gore navedenih pokazatelja rezultirala je prognostičkim sustavom koji omogućuje raspodjelu pacijentica s karcinomima dojke u nekoliko kategorija. Pokazalo se da su hormonski pozitivni tumori, koji su češći kod pacijentica starije životne dobi, blažeg tijeka i odgovaraju na hormonsku terapiju. Prema preporukama Američkog udruženja patologa i NCCN-a (National Comprehensive Cancer Network) tumori su ER i PR pozitivni ako je najmanje 1% stanica pozitivno na spomenute receptore i preporuča se odrediti broj pozitivnih tumorskih stanica na određeni receptor te utvrditi intenzitet bojenja [57]. Prekomjerna izraženost receptora za humani epidermalni faktor rasta (HER2/neu ili ErbB-2) prisutna je u 15-25% invazivnih karcinoma dojke. Prekomjerna izraženost gena HER2/neu ukazuje na agresivniji fenotip i lošiju prognozu [58]. Stoga je bilo izuzetno važno razviti antitijelo na taj receptor.

Jedan je od takvih lijekova humano monoklonsko antitijelo trastuzumab (Herceptin®, Genetech) koje se veže na izvanstaničnu jukstamembransku domenu HER2 te inhibira proliferaciju i preživljenje tumora ovisnih o HER2. Prema preporukama Američkog društva za kliničku onkologiju i Udruženja američkih patologa (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists), na svim karcinomima dojke imunohistokemijskom se analizom očitava izraženost transmembranskog proteina HER2 [59]. Ako se reakcija očita kao pozitivna, smatra se da te pacijentice imaju HER2 pozitivne tumore i uvodi im se terapija Herceptinom.

Tijekom desetljeća istraživanja i praćenja pacijentica s karcinomom dojke u stotinama neovisnih studija, došlo se do zaključka da su pokazatelji biologije tumora važniji od numeričkih pokazatelja (veličina tumora, broj zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova). Također, posljednjega se desetljeća postigao značajan napredak u genskoj analizi karcinoma dojke (engl. *DNA- microarray expression profiling analyses*) te se uočilo da karcinomi dojke mogu biti podijeljeni u biološki i klinički smislene skupine. S obzirom da je genska analiza (OncoTypeDx, MammaPrint) preskupa za većinu zemalja prihvaćeno je da se imunohistokemijski određuje imunofenotip karcinoma dojke na četiri osnovna biljega koji u visokom postotku odgovaraju molekularnoj klasifikaciji.



Slika 3. Karakteristične mutacije u genomu karcinoma dojke po intrinzičnim skupinama. (Preuzeto iz: <http://massgenomics.org/2012/09/a-comprehensive-atlas-of-breast-cancer-genomes.html> [60])

Genskim analizama tumorskih stanica (Slika 3) pokazalo se da postoje značajne razlike u izraženosti određenih gena kod različitih karcinoma dojke pa se karcinomi dojke mogu prema tim razlikama podijeliti u četiri skupine [61–64]. Te genske podskupine odgovaraju i imunofenotipskim podskupinama što se određuju temeljem izraženosti hormonskih receptora (ER, PR), membranskog proteina HER2 te Ki-67 (proliferacijskog indeksa), a prema kojima se određuje daljnja terapija i prognoza:

#### LUMINALNI TIP A

Ovi tumori izražavaju hormonske receptore, ER i PR, te imaju niski indeks proliferacije, Ki67, koji je manji od 20% pozitivnih stanica. Ovaj tip tumora je najčešći, a ujedno i najmanje agresivan. Javlja se kod češće kod pacijentica starije životne dobi. Gledano po gradusima, tu obično spadaju tumori niže gradusa te su dobro diferencirani što za ishod ima bolju prognozu. Zbog dobre izraženosti hormonskih receptora ovi tumori dobro odgovaraju na hormonsku terapiju.

#### LUMINALNI TIP B

Kao i luminalni tip A tumori, ovi tumori izražavaju hormonske receptore, pri čemu je ER pozitivan, a PR pozitivan u manje od 20% stanica ili čak negativan. Međutim, za razliku od luminalnih tip A tumora ovi imaju viši indeks proliferacije, Ki67, koji je izražen u više od 20% stanica. Ovu grupu možemo podijeliti na dvije podgrupe, koje su u ovom radu vođene odvojeno budući da se značajno razlikuju u molekulanim mehanizmima, a to su HER2 pozitivni i HER2 negativni. Radi jednostavnosti, dalje u tekstu ove će se grupe navoditi kao luminalni tip B za HER2 negativne te luminalni tip B/HER2+ za HER2 pozitivne luminalne tip B tumore. Ovi tumori slični su luminalnom tip A tumoru, ali imaju lošiju prognozu. Pogodni su za endokrinu terapiju, ali se ova terapija kombinira s citotoksičnom terapijom zbog visokog proliferacijskog indeksa, ili s anti-HER2 terapijom kod HER2 pozitivnih tumora.

#### HER2 POZITIVAN

Ovaj tip tumora ne izražava hormonske receptore (ni ER ni PR), ali izražava HER2, receptor za epidermalni faktor rasta 2. Stoga je ovaj tip tumora izrazito agresivan, te često visokog

gradusa, slabije je diferenciran. Za razliku od luminalnih tipova tumora HER2 pozitivni tumori se češće javljaju kod mlađih žena (ispod 40-e godine života). Anti-HER2 ciljana terapija znatno poboljšava ishod bolesti.

#### TROSTRUKO NEGATIVAN

Trostruko negativni tip karcinoma dojke, ili engl. „Basal like“ dobio je ime po tome što ne izražava oba hormonska receptora (ER ni PR), a niti HER2. Kao što se može pretpostaviti ovaj tip tumora je izrazito agresivan, slabo diferenciran te zbog nedostatka ciljnih molekula nema ni ciljane terapije za njega. Kao i kod HER2 pozitivnih tumora, veći je rizik razvoja u mlađoj životnoj dobi (ispod 40-e godine života). Kod ovog tumora je prisutan nasljedni faktor s obzirom da se većina BRCA1 mutacija nalazi u ovom tipu tumora. U odnosu na ostale podtipove imaju veću osjetljivost na kemoterapiju na bazi platine (cisplatina, karboplatina, oksalplatina), DNA interkalirajućih agensa (doksorubicin), agensa koji blokiraju diobu (paklitaksel-blokira tubulin, PARP inhibitori-blokiraju enzim popravka poli-ADP riboza polimerazu).

Naknadno je otkrivena i peta podskupina/fenotip karcinoma dojke [15]. To su tzv. kladin-niski karcinomi dojke, tj. tumori sa sniženom izraženosti kladina (stanice nalik tumorskim matičnim stanicama, s niskom izraženosti biljega luminalne diferencijacije, niske izraženosti međustaničnih 'proteina čvrste veze' (*tight junction protein*) E-kadherina, kladina i okcludina). Neki autori navode još i skupinu karcinoma koji nalikuju normalnim stanicama dojke, a kod kojih je genetski profil, kao i histološka slika, najmanje različit od zdravoga tkiva dojke.

#### **2.4. Oksidacijski stres i 4-hidroksinonenal**

Evolucija živih organizama od anaerobnih prema aerobnima nastaje pojavom kisika u atmosferi. To je prekretnica u evoluciji jer se aerobnim mehanizmima generira znatno više energije od anaerobnih, ali istovremeno povlači za sobom opasnost od toksičnosti kisika, tj. pojavu oksidacijskog stresa [65].

Oksidacijski je stres pomak ravnoteže prema oksidaciji u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama [8,66]. Mogu ga izazvati ili povećano stvaranje slobodnih radikala ili smanjena antioksidacijska zaštita [66,67]. Iako paradoksalno na prvi pogled, antioksidacijska zaštita ali i

oksidacija bitni su za normalan metabolizam, provođenje signala i regulaciju stanične funkcije. Stoga je ravnoteža/homeostaza između ova dva procesa izrazito bitna za normalnu funkciju i metabolizam svake stanice u organizmu [68].

#### 2.4.1. Reaktivne kisikove vrste (ROS)

Slobodni radikali su nestabilne čestice kratkog života (oko  $10^{-4}$ s) koje u vanjskom omotaču imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Nespareni elektron ih čini vrlo reaktivnima te lako ulaze u oksidacijsko-redukcijske reakcije sa staničnim makromolekulama. Radikali uzrokuju oštećenja okolnih makromolekula: DNA, proteina, lipida, pri čemu dolazi do mutacija, inaktivacije funkcije enzima/proteina i lipidne peroksidacije [69]. U biološkim sustavima najčešći su kisikovi slobodni radikali te jednako reaktivne molekule koje zajedničkim nazivom zovemo reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), u koje spadaju superoksidni ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) i hidroksilni ( $\bullet\text{OH}$ ) radikal te neradikalni, ali jednako reaktivni, derivati kisika, vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), hipoklorna kiselina ( $\text{HClO}$ ) te ozon ( $\text{O}_3$ )[66].

#### 2.4.2. Utjecaj ROS-a

Pluća su organ u kojem se atmosferski kisik apsorbira, prelazi u krv te se prenosi do svih stanica organizma, pri čemu se 1-3% kisika pretvara u ROS [70]. Općenito, stvaranje ROS-a možemo podijeliti na endogeno i egzogeno. Endogeno se ROS stvaraju u stanici i organizmu kao rezultat "curenja" elektronskog transportnog lanca, u mitohondrijskoj membrani, oksidacijskim praskom (kao reakcija obrane imunskog sustava na patogen), enzimskim reakcijama citokroma P450, lipooksigenaza, prostaglandin sintaze, oksidaza, flavoproteina, ksantin oksidaze, te u štitnjači prilikom oksidacije joda [8,71]. Egzogeni izvori ROS-a su ionizirajuće zračenje, lijekovi, herbicidi, duhanski dim.

Učinak ROS-a ovisi, osim o njihovoj koncentraciji, i o vrsti stanica na koje djeluju. Djelovanjem na diferencirane ili mitotski neaktivne stanice (kao što su stanice bubrega, mozga i srca) ROS oštećuju normalne stanične funkcije i na taj način mogu dovesti do nastanka degenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova bolest ili kardiovaskularne bolesti [72] ili do nastanka karcinoma kroz oštećenja DNA. Lipidna peroksidacija može izazvati karcinogenezu na nekoliko različitih načina. Uz mutageno oštećenje DNA, lipidna peroksidacija može izazvati delecije i amplifikacije, koje ukoliko zahvaćaju onkogene ili tumor supresore mogu voditi u transformaciju i razvoj tumora [73]. Kod tumora bubrega uočen je i dokazan još jedan mehanizam karcinogeneze. Naime, apoptoza

potaknuta lipidnom peroksidacijom uzrokuje kompenzatornu regeneraciju pri čemu, zbog gubitka kontrole proliferacije, dolazi do razvoja tumora [73]. Ovaj primjer zorno prikazuje kako ROS i posljedična lipidna peroksidacija mogu bit dvosjekli mač. Naime, i sporo-proliferirajućim tkivima, povišene koncentracije ROS-a uzrokuju apoptozu, koja utječe i oštećuje normalne stanice te dolazi do razvoja tumora. U brzo-proliferirajućim tkivima pak povišene koncentracije ROS-a uzrokuju velika oštećenja DNA te posljedične stanične smrti koja tu onemogućava rast te djeluje antiproliferacijski/antikarcinogeno [73]. U prilog ovim opažanjima je i nalaz da su nediferencirane stanice osjetljivije na citotoksičnost uzrokovanu ROS-om od diferenciranih, zrelih stanica [74].

#### 2.4.3. Masne kiseline bioloških membrana

Masne kiseline čine oko 30-80% masenog udjela bioloških membrana, dok preostali dio čine proteini (20-60%) i ugljikohidrati (0-10%). U sastavu lipida membrana nalaze se zasićene i nezasićene masne kiseline. Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA, engl. *PolyUnsaturated Fatty Acids*) podložne su lipidnoj peroksidaciji zbog prisutnosti dvostrukih veza između ugljika [69,75]. Nisu svi ROS jednako reaktivni, pa tako lipidnu peroksidaciju mogu inicirati samo hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ), alkoksilni radikal ( $\text{RO}\bullet$ ) i peroksilni radikal ( $\text{ROO}\bullet$ ) [8,76]. Peroksidacijom PUFA nastaju reaktivni aldehidi kao npr. 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), malondialdehid (MDA), akrolein i drugi srodni  $\alpha,\beta$ -nezasićeni aldehidi [8]. Zbog relativno dugog života, pojedini aldehidi opasniji su za stanicu od samih slobodnih radikala, zato što su dovoljno reaktivni da oštete stanicu, izazovu lančanu reakciju progresije oksidacijskog stresa, čime mogu izazvati i smrt stanice. Dok slobodni radikali djeluju na mjestu svog nastanka, aldehidi su stabilni i imaju sposobnost reverzibilnog vezanja na biološke molekule, stoga mogu difundirati te imati puno šire područje djelovanja [8,77].

Jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije je HNE koji je ujedno i jedini reaktivni aldehid koji se nalazi u mjerljivim količinama i u fiziološkim uvjetima [78]. HNE se veže i za proteine s kojima tvori stabilne i biološki aktivne konjugate [79–81]. Tako su, na primjer, u kroničnom alkoholnom pankreatitisu (CAP) povećane koncentracije HNE-a u acinarnim stanicama te dolazi do pojačane ekspresije prokolagena I u okolnom vezivnom tkivu [82]. Budući da u tkivu pankreasa nije prisutan HNE, rezultati ukazuju da lipidna peroksidacija u CAP-u uzrokuje sintezu kolagena I koji je odgovoran za nastanak fibroze [82]. HNE može potaknuti sintezu kolagena I i kod štakora te u aktiviranim pankreatičnim stelatnim stanicama preko aktivacije p38MAP kinaze i c-Jun-N-terminalne kinaze (JNK), ali ne i NF- $\kappa$ B puta [83].

Istraživanja na jetrenim stelatnim stanicama pokazala su da HNE stimulira transkripciju i translaciju prokolagena tipa I u stelatnim stanicama jetre direktnim vezanjem na JNK izoforme što ima ključnu ulogu u nastanku fibroze jetre [84].

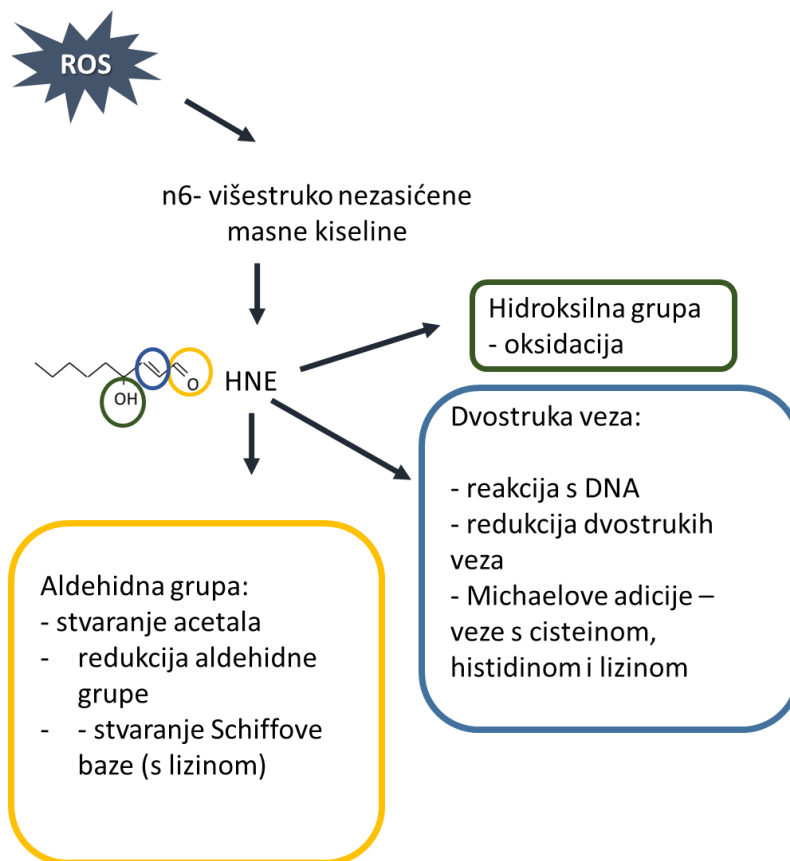
#### 2.4.4. Funkcije HNE-a

Nakon otkrića HNE su nazivali „sekundarnim toksičnim glasnikom slobodnih radikala“ [80,82] obzirom na njegovu toksičnost i pojavu u mnogim patološkim stanjima kao npr. tumorima [73,85], neurodegenerativnim bolestima [86,87], dijabetesu [88], autoimunskim bolestima [89] te u starenju [90].

Danas, kada su poznati dokazi o njegovoj ulozi u biološkim procesima, sve se češće naziva biomarkerom [78]. Utjecaj HNE-a na stanice može biti dvojak, može uzrokovati njeno preživljenje ili smrt. HNE se veže i inhibira brojne enzime, npr. glukoza-6-fosfat dehidrogenazu, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu, glutation-S-transferazu i druge [91–93]. Uz inhibiciju enzima, HNE može izazvati apoptozu aktivacijom kaskade kaspaza neovisnih o FasL i otpuštanjem mitohondrijskog citokroma c [94,95]. HNE-proteinski konjugati mogu opteretiti i narušiti aktivnost proteasoma koji time ne mogu više degradirati oštećene proteine. Smanjenjem njihove aktivnosti dolazi do nakupljanja HNE-om modificiranih proteina te posljedično do stanične smrti [96]. HNE regulira inhibitora NF- $\kappa$ B, čime posljedično regulira imunski odgovor [97,98].

Osim početno opisanih citotoksičnih učinaka na stanicu, pokazano je da je učinak HNE-a ovisan o koncentraciji, pri čemu niže koncentracije pokreću obrambene mehanizme. U tim nižim koncentracijama, HNE vezanjem aktivira izoforme c-Jun terminalne kinaze i p38 [84,99], što uzrokuje povećanje transkripcije c-i posljedično dovodi do aktivacije AP-1 transkripcijskog faktora [92,99]. HNE može vezanjem aktivirati i druge proteine u putevima prijenosa signala; receptore EGF (engl. *Epithelial Growth Factor*) i PDGF (engl. *Platelet-Derived Growth Factor*), protein kinazu C, fosfolipazu C i fosfolipazu D [100–104]. Djelovanjem na signalne puteve i transkripcijske faktore, HNE potiče svoju detoksifikaciju te stimulira stanični rast [105].





Slika 4. Shematski prikaz reakcija 4-hidroksinonenala po svakoj reaktivnoj skupini.

Budući da je HNE toksičan u višim koncentracijama, postoji i sustav njegove detoksikacije. Neki od enzima koji mogu detoksicirati HNE su glutation-S-transferaza, aldoza reduktaza i alhid dehidrogenaza [69,106]. HNE se metabolizira konjugacijom na glutation (GSH), međutim ova se reakcija ubrzava nekoliko stotina puta enzimom glutation-S-transferazom [69]. HNE konjugiran na GSH izbacuje se iz stanice aktivno, pomoću RLIP76 (Ral-vezujućeg proteina) membranskog proteina, visoko specifičnog za ovaj konjugat [107]. Oko 80% GS-HNE-a se na taj način izbacuje iz stanice, a uz ovaj transporter postoje još i MRP1 (engl. *Multidrug Resistance Protein 1*) i u manjoj mjeri MRP2 (engl. *Multidrug Resistance Protein 2*) koji su odgovorni za ostalih 20-ak % [69].

#### 2.4.5. HNE kao regulator signalnih puteva u tumora

Tanka je linija između „dobrog“ i „lošeg“ stresa te je lako premostiva otvarajući put agresivnim medijatorima oksidacijskog stresa da postignu neželjeni učinak uključujući i karcinogenezu. Kao što je poznato, jedno od obilježja tumorskog tkiva je poremećena homeostaza oksidacijsko-

redukcijskih odnosa koja rezultira povišenim vrijednostima reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koji, kada su povišeni, mogu inicirati zloćudnu transformaciju stanica u stadiju stresa te potaknuti rast i diseminaciju zloćudnih tumorskih stanica [108]. U svrhu prevencije ROS-inducirane toksičnosti tumorske stanice mijenjaju metaboličke puteve te aktiviraju mehanizme antioksidacijske zaštite [109]. Karcinogeni učinci ROS-a su rezultat oštećenja DNA, no ROS utječu i na druge stanične makromolekule, uključujući lipide, te dolazi do lipidne peroksidacije [69]. Krajnji produkti lipidne peroksidacije su reaktivni aldehidi, među kojima je i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) [8]. Dok su ROS kratko živeći te je polje njihovog djelovanja vrlo maleno (nm ili  $\mu\text{m}$ ) HNE posjeduje snažan afinitet vezanja za proteine formirajući relativno stabilne produkte koji imaju sposobnost difuzije s mjesta nastanka pritom mijenjajući strukturu i funkciju proteina [8]. Zaključno tome HNE može utjecati na proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu tumorskih stanica s jedne strane dok istovremeno može utjecati na funkciju genoma [108].

#### 2.4.6. Lipidna peroksidacija i tumor-specifična pojavnost HNE-a

Prva istraživanja koja su uočila toksičnost konačnih produkata lipidne peroksidacije (LPO) pojavila su se u sedamdesetim godinama prošlog stoljeća [110]. Početkom devedesetih su opisana daljnja svojstva genotoksičnosti tih produkata [8,111]. Posljedično tome, konačni produkti lipidne peroksidacije su intenzivno proučavani te imenovani „drugim toksičnim glasnicima slobodnih radikala“ naglašavajući njihovu važnost u toksičnosti procesa u kojima su uključeni slobodni radikali [8]. Sljedeća istraživanja pokazala su da HNE nije „samo toksičan“ te se fokus istraživanja pomiče prema njegovoj ulozi regulatora rasta i signalne molekule u sklopu bioloških procesa kao što su kemotaksija, prijenos signala, ekspresija gena, proliferacija i diferencijacija stanica te stanična smrt [112–114]. Ti su procesi ključni u regulaciji normalnog staničnog ciklusa stoga njihova modulacija pomoću HNE-om može interferirati s kontrolom rasta i metabolizmom normalnih i malignih stanica na taj način pomažući i/ili inhibirajući rast tumora [105].

Značaj HNE-a u modulaciji rasta malignih stanica može se lako shvatiti promatrajući njegovu interakciju sa signalnim putevima koje su Hanahan i Weinberg prikazali u sklopu obilježja karcinoma [17]. Rani podaci o HNE-u kao faktoru koji modulira rast bili su prikazani u *in vitro* eksperimentima u kojima su se koristile stanice karcinoma [113]. Navedeno istraživanje uputilo je novi put u istraživanju HNE-a, te postavio hipotezu da su regulatorni učinci HNE-a posljedica njegove interakcije s citokinima i pripadajućim humoralnim faktorima rasta. Posljedično, od interesa je definirati sintezu i akumulaciju HNE-a unutar normalnih i malignih stanica te

njegovu interferenciju sa citokinima koji reguliraju rast *in vivo*, naročito u slučajevima karcinoma [109].

Zahvaljujući monoklonskom HNE antitijelu na HNE-proteinske konjugate pokazalo se razlika u količini HNE-a između normalnog tkiva bubrega i tumora bubrega, s varijacijama u intenzitetu ovisno o tipu tumora i tipu stanica unutar normalnog tkiva bubrega [115]. U kolorektalnom karcinomu je količina HNE-proteinskih konjugata niža nego u normalnom tkivu debelog crijeva, s izuzetkom karcinoma visokog gradusa [85]. U korelaciji sa sniženim razinama HNE-a u humanom kolorektalnom karcinomu, je i ekspresija TGF- $\beta$ 1, što ukazuje na potencijalnu regulatornu ulogu HNE-a u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma [116]. Međutim, potrebno je naglasiti da obrazac pojavnosti HNE-a na histološkim uzorcima nije univerzalan te ovisi o histološkom porijeklu tumora [105]. Tako na primjer, u tumorima mozga količina HNE-proteinskih produkata povećavala se proporcionalno povećanju malignosti tumora [117,118].

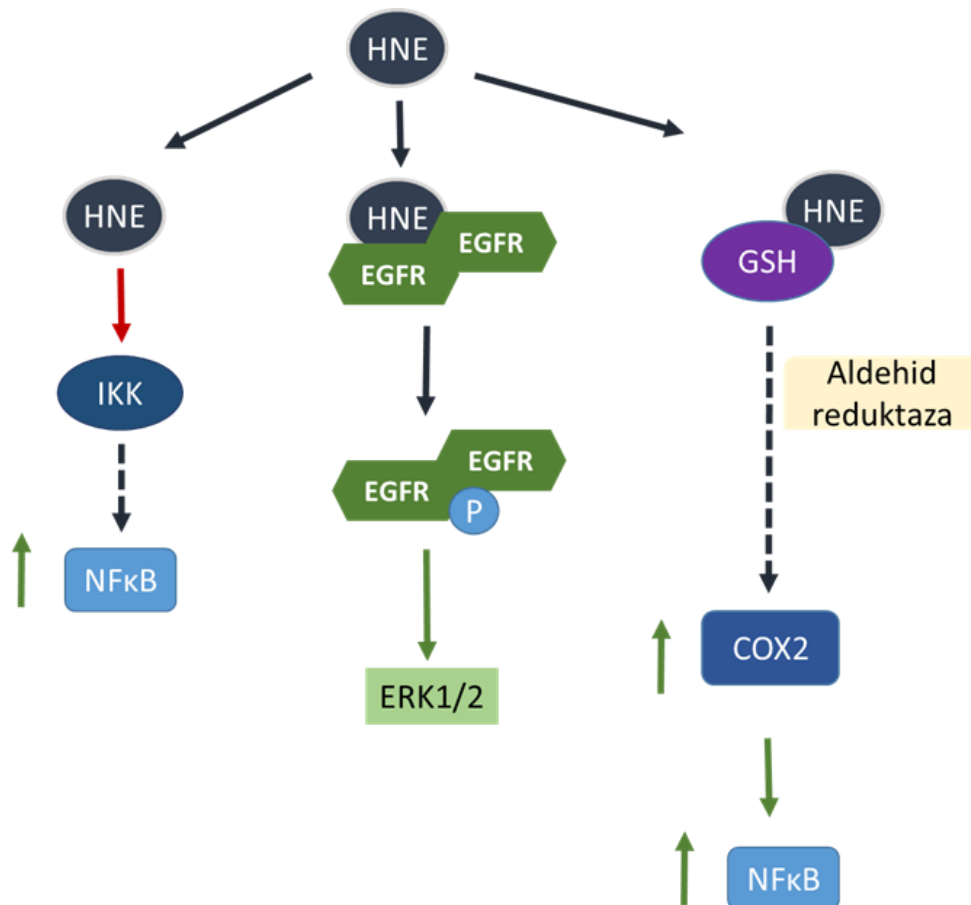
Također, prisutnost i lokalizacija HNE-a u normalnom tkivu može biti povezana s njegovom fiziološkom ulogom kao i uzročnom uključenošću u rani razvoj patoloških procesa. U prilog tome govori i promjena u subcelularnoj lokaciji HNE-a koja je uočena u pacijenata s duodenalnim ulkusom u kojem je HNE bio prisutan u citoplazmama žljezdanih stanica mukoze želuca kao i u jezgrama tih stanica [119]. Kao potvrda navedenih istraživanja su i rezultati dobiveni na Long-Evans Cinnamon (LEC) modelu hepatitisa u štakora koji spontano razvijaju hepatitis, cirozu i na kraju tumore jetre [120]. Prisutnost HNE-a u jezgri jetrenih stanica u ranim stadijima hepatitisa upućuje na njegov doprinos u nastanku karcinoma jetre [120].

#### 2.4.7. Utjecaj HNE-a na rast stanica

Već se u ranim istraživanjima pokazalo da je HNE modulator rasta, a posebice da se radi o bifazičnom faktoru rasta; pri niskim razinama djelovao je kao stimulator rasta, a pri visokim razinama kao supresivni/citotoksični faktor [113]. Dualni učinak HNE-a ovisi o koncentracijama, ali i o vrsti stanica, pri čemu je pokazano da citotoksične koncentracije HNE-a na leukemijske stanice zapravo potiču na rast normalne limfocite [121]. Međutim, niske koncentracije HNE-a mogu potaknuti i tumorske stanice na rast, što je ranije spomenuti slučaj kolorektalnog karcinoma, u kojem niže razine HNE-a koreliraju s povećanom malignosti i sniženom razinom TGF $\beta$  [85].

Jedan od problema kod istraživanja HNE-a jesu stanice na kojima se istražuje. Kako je već rečeno, stanice različitog porijekla i različitog stupnja diferenciranosti daju različite odgovore na iste ili slične koncentracije HNE-a [122]. Tako je, npr. na humanim hepatalnim stelatnim

stanicama HNE inducira proliferaciju putem aktivacije p46 i p54 izoformi c-Jun-a, ali ne c-fos-a [84]. Nasuprot tome, na stanicama, HeLa, inhibicija proliferacije uzrokovana HNE-om povezana je s povećanjem ekspresije c-fos-a [123]. Također, razne mutacije mogu kod istih tipova stanica dati različiti odgovor, kao kod karcinoma kolona gdje se kod Apc(+/+) stanica drugačije metabolizira nego kod Apc (min/+) što dovodi do razvoja tumora [124]. Uz to što različiti putevi detoksifikacije HNE-a mogu činiti razliku u osjetljivosti na njega, HNE može mijenjati i faktore u serumu te time djelovati na rast tumora, što je pokazano *in vitro*, na stanicama HeLa [125,126]. HNE svoje djelovanje ostvaruje vezujući se za signalne molekule selektivno, pa se tako veže za Akt2 direktno dok na Akt1 djeluje indirektno, preko inhibicije fosforilacije [127]. Shematski prikaz signalnih puteva na koje djeluje HNE prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz učinka HNE na aktivaciju signalnih puteva važnih u razvoju karcinoma. HNE se veže na inhibitor NFκB, IKK, čime se NFκB otpušta i aktivira se signalni put. HNE može aktivirati EGFR signalni put dimeriziranjem EGFR, dok vezanjem na glutation (GSH) postaje supstrat za aldehid reduktazu te posljedično, nizom reakcija aktivira COX2, koji dalje aktivira NFκB (preuzeto i modificirano iz [108]).

## 2.5. Antioksidacijska zaštita

Stanice su kroz evoluciju stvorile obrambene mehanizme kako bi se zaštitile od prekomjernog stvaranja slobodnih radikala koji se stvaraju i u fiziološkim uvjetima u enzimatskim reakcijama ili „curenjem“ elektrona dišnog lanca u mitohondrijima.

Antioksidacijski obrambeni mehanizmi se dijele na male molekule koje djeluju nespecifično i na enzimatske kaskade.

Lipofilne male molekule koje štite staničnu membranu često se zovu i CBAs (engl. *chain – breaking antioxidants*). One djeluju na način da prekidaju autokatalitičku lančanu reakciju lipidne peroksidacije, a svrstavaju se u neenzimatski sustav za obranu od oksidacijskog stresa. Glavni stanični CBA-i su  $\alpha$ -tokoferol, L-askorbinska kiselina (vitamin C), glutation (GSH), mokraćna kiselina. GSH je osobito važan jer ujedno služi i kao supstrat za dva najbitnija antioksidacijska enzimatska sustava: glutation-peroksidazu (GPX) i glutation-S-transferazu (GST) [128].

Enzimatski sustav čine antioksidacijski enzimi koji kaskadnim reakcijama detoksificiraju oksidanse i time sprječavaju štetu na staničnim elementima. Najpoznatiji enzimi su superoksid dismutaza (SOD) i katalaza, koja razgrađuje vodikov peroksid do vode i kisika. Opisani elementi obrane uključuju prevenciju, eksciziju i popravak oštećenja nastalih ROS-om te drugim oksidansima. Oni su uključeni i u eliminaciju lipidnih peroksida u svrhu prekidanja autokatalitičke lančane reakcije lipidne peroksidacije te očuvanja cjelovitosti stanične membrane.

Važnost enzimatskog antioksidacijskog sustava očituje se u skupini enzima koja ima funkciju detoksifikacije i odstranjenja HNE-a iz stanica. To su glutation-S-transferaza, aldoza reduktaza i aldehid dehidrogenaza [69]. Učinkovite su u kontroli unutarstaničnih koncentracija HNE-a do kritične razine, kada je stanica preplavljena HNE-om i smrt je neizbježna.

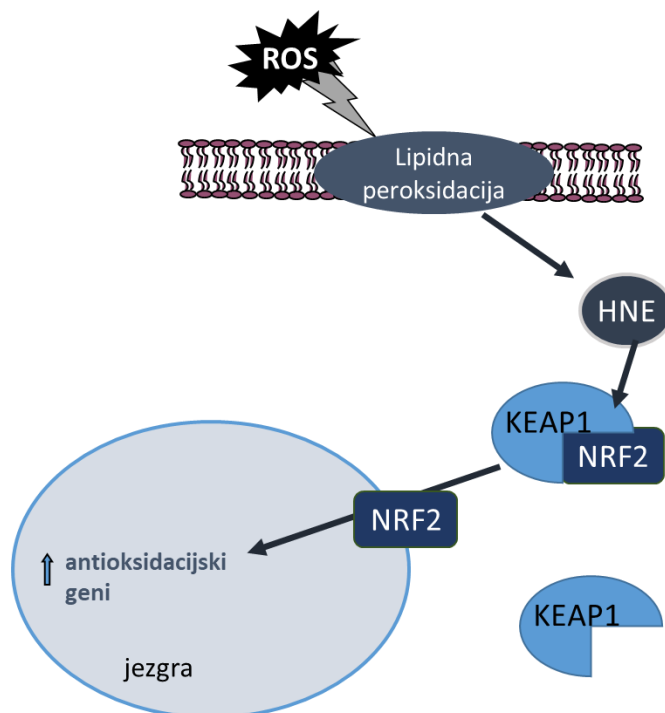
Glutation-S-transferaza katalizira konjugaciju HNE-a na glutation stvarajući molekulu topljivu u vodi, GS-HNE. Ovako se HNE neutralizira jer se putem RLIP76 (Ral-vezujućeg proteina), membranskog proteina, izbacuje iz citoplazme u izvanstanični prostor. Oko 80% GS-HNE-a se na taj način izbacuje iz stanice a 20-ak % pomoću MRP1 (engl. *Multidrug Resistance Protein 1*) [69,107]. Naravno, količina ovih enzima regulirana je njihovom transkripcijom i specifičnim transkripcijskim faktorima, među kojima svakako najvažnije mjesto ima NRF2 (engl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) [129].

## 2.6. NRF2

### 2.6.1. NRF2-KEAP1 put

Kako je spomenuto, glavni transkripcijski faktor koji se aktivira u uvjetima oksidacijskog stresa NRF2 i NRF2-KEAP1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) signalni put [129].

NRF2-KEAP1 je bZip (engl. *basic leucine zipper*) transkripcijski faktor s Cap „n“ Collar (CNC) strukturom [130]. U uvjetima homeostaze NRF2 je vezan za svoj represor KEAP1 i, kao takav podložan ubikvitin-ovisnoj razgradnji u proteasomima. No, u uvjetima oksidacijskog stresa, elektrofilni se vežu za cisteine KEAP1 te mu mijenjaju konformaciju, pri čemu dolazi do oslobađanja NRF2 (Slika 6). Slobodni NRF2 translocira se u jezgru u kojoj stvara heterodimere s malim Maf proteinima te se veže za ARE (engl. *antioxidant response element*) promotorskih regija ciljanih gena aktivirajući ih i na taj način štiti stanicu [131]. Ciljani geni koje aktivira NRF2 uključeni su u sintezu glutaciona (glutamat-cistein ligaza, katalitička podjedinica, GCLC i glutamat-cistein ligaza, modificirajuća podjedinica, GCLM); eliminaciju ROS-a (tiorredoksin reduktaza 1, Txnrd1 i peroksiredoksin 1, Prdx1); detoksifikaciju ksenobiotika (NAD(P)H dehidrogenaza (kinon) 1 (Nqo1) te obitelj glutation-S-transferaza, GST); i transport lijekova (obitelj Mrp, engl. *Multidrug resistance-associated protein*) [131].



Slika 6. Shema aktivacije NRF2 signalnog puta. HNE ili neki drugi elektrofilni reagiraju s KEAP1, koji nakon te interakcije mijenja konformaciju te otpušta NRF2. NRF2 se translocira u jezgru gdje potiče transkripciju antioksidacijskih gena.

### 2.6.2. Uloga oksidacijskog stresa i NRF2-KEAP1 puta u karcinogenezi

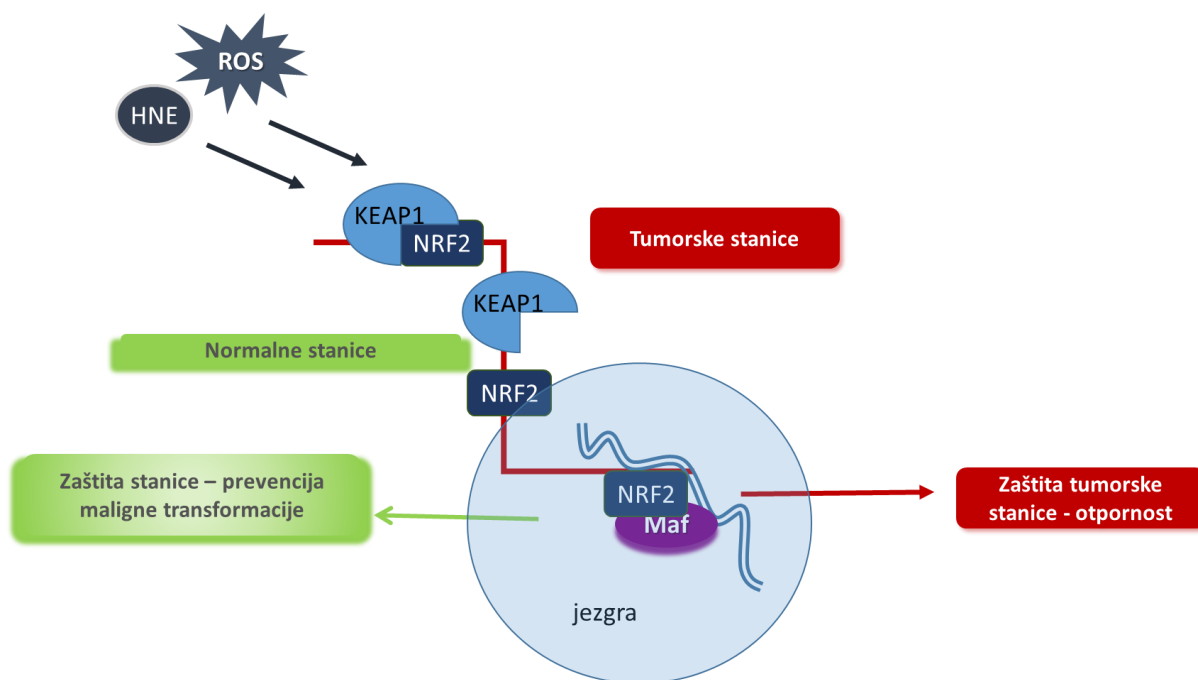
Dugo su se vremena reaktivne kisikove vrste (ROS), nastale kao posljedica oksidacijskog stresa, smatrale štetnim, prokarcinogenim faktorima u nastanku karcinoma. Na primjer, u tumorima čiji je nastanak povezan s infekcijom; karcinom cerviksa induciran humanim papiloma virusom, karcinom jetre induciran hepatitisom B, karcinom želuca induciran *Helicobacter pylori* infekcijom, kronična upala potiče nastanak ROS-a kao prve linije obrane protiv mikroba što u konačnici potiče nastanak karcinoma [132]. ROS čine slobodni radikali superoksidni anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) i hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ) te izrazito reaktivne molekule poput vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). I endogeni (mitohondrijski transportni lanac elektrona, ksantin oksidaza (XO), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza (NOX) peroksisomi i citokrom P450) i egzogeni izvori (ultraljubičasto zračenje, ionizirajuće zračenje, farmaceutici, okolišni faktori, industrijske kemikalije) doprinose njihovom stvaranju [133,134]. ROS su po prirodi vrlo reaktivni i kao takvi uzrokuju oksidaciju staničnih makromolekula (DNA, proteina, lipida) doprinoseći time kromosomskoj nestabilnosti, genskim mutacijama i/ili modulacijama

staničnog rasta [109,133–135]. Tumorske stanice mogu imati više razine ROS-a od normalnih stanica. One mogu preživjeti takve razine ROS-a budući da imaju promijenjen metabolizam te aktivne signalne puteve koje im pomažu u preživljenju i proliferaciji. Ti putevi uključuju aktivaciju antioksidacijskih mehanizama za smanjenje ROS-a, ali isto tako reprogramiranje metaboličkih puteva koji mogu generirati dodatan ROS te utjecati da stanice karcinoma postanu ranjivije na nadolazeći stres [129]. Nedavna istraživanja upućuju na važnu ulogu GSH i tioredoksina u karcinogenezi; GSH je bitniji u nastanku karcinoma, a u već postojećem karcinomu tioredoksin se pokazao kao ključan faktor koji uklanja štetne razine ROS-a te potiče progresiju karcinoma [136,137].

Potrebno je naglasiti dualnu ulogu antioksidacijskih mehanizama (endogenih i egzogenih) u kombinaciji s ROS-om u karcinogenezi. ROS su izrazito kratkoživi, a njihova oksidacija lipida generira nastajanje duže živućih molekula poznatih kao „drugi glasnici oksidacijskog stresa“ [69]. Jedna od tih molekula je reaktivni aldehid HNE. HNE pak može inducirati djelovanje NRF2 na dva načina: kovalentnim vezanjem na cisteinska vezna mjesta na KEAP1 i/ili aktivirajući NRF2 kroz aktivaciju kinaza kao što su PKC, ERK i PI3K [138–142]. Aktivacija NRF2 također potiče i metabolizam razgradnje HNE-a [129].

Sukladno dualnoj ulozi ROS-a i antioksidacijskih mehanizama je i dualna uloga NRF2 u karcinogenezi: zaštitna u ranim stadijima i štetna u kasnijim stadijima [129] (Slika 7.). Kada su ROS prisutni u niskim dozama, dovoljni su za održavanje homeostaze NRF2 za eliminaciju kako ROS-a, tako i karcinogena i drugih agenasa štetnih za DNA. U konačnici ovi procesi rezultiraju inhibicijom inicijacije tumora i nastanka metastaza. Podupirući to saznanje je i studija u kojoj je pokazana protektivna uloga NRF2 u karcinomima pluća [143]. Polimorfizam jednog nukleotida u humanoj NRF2 promotorskoj regiji (rs6721961) rezultirala je reduciranom ekspresijom NRF2 i posljedično povećala je rizik od nastanka karcinoma pluća u postojećih pa i nekadašnjih pušača [143].





Slika 7. Dualna uloga NRF2. NRF2 potiče transkripciju antioksidacijskih gena čime diže antioksidacijsku zaštitu stanice što kod normalnih stanica štiti stanice od maligne transformacije štiteći od oštećenja, dok kod tumorskih stanica štiti tumorsku stanicu od oštećenja terapijom (preuzeto i modificirano iz [129]).

U karcinomima je NRF2 obično pojačan, pomažući tako malignim stanicama da se odupru visokim razinama ROS-a te izbjegnu apoptozu aktivacijom metaboličkih i citoprotektivnih gena koji doprinose povećanoj staničnoj proliferaciji [130,144–148]. Do već dokazane povećane aktivnosti NRF2 u karcinomima dovode različiti mehanizmi: somatske mutacije u NRF2, KEAP1 ili CUL3, epigenetsko utišavanje KEAP1, regulacija NRF2 i KEAP1 posredovana s microRNA, poremećaj NRF2-KEAP1 interakcije zbog aberantno akumuliranih proteina, transkripcijski pojačana aktivnost NRF2 kroz onkogen-ovisni signalni put te modifikacija KEAP1 pomoću metaboličkih posrednika [130,144,145].

Nedavna istraživanja otkrila su važnost NRF2 u održavanju proliferacije u karcinomima pankreasa preko regulacije mRNA translacije [149]. Gubitak NRF2 doveo je do oštećenja autokrinog signalnog puta receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) te oksidacije specifičnih proteina translacijskog sustava što je rezultiralo poremećajem cap-ovisne i cap-neovisne mRNA translacije [149]. Stalna aktivacija NRF2 nađena je u humanoju leukemiji; u akutnoj mijeloičnoj leukemiji (AML) aktivacija NRF2 bila je rezultat uzvodne konstitutivne aktivacije nuklearnog faktora –  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), a ne somatske mutacije NRF2 ili njegovog

inhibitora KEAP1 [150]. Također, pokazana je povećana ekspresija NRF2 u karcinomima pluća ne-malih stanica kao što je planocelularni karcinom i adenokarcinoma s različitim ulogom lipidnih medijatora induciranih oksidacijskim stresom u ta dva tumora: izražajna uloga lipidne peroksidacije u adenokarcinomu, a endokanabinoidni sustav u planocelularnom karcinomu [151]. Nadalje, stanične linije karcinoma prostate, naročito DU145 linija, pokazale su različitu osjetljivost na HNE-om posredovanu inhibiciju staničnog rasta i apoptoze, očitovano posredstvom nižih razina KEAP1, više razine NRF2, GSH i GSTA4 i višu GSH/GST posredovanu HNE detoksifikaciju [152]. NRF2 je prepoznat i kao ključni regulator u rezistenciji na kemoterapeutike u stanju hipoksije preko ROS-NRF2-GCLC-GSH puta u stanicama karcinoma dojke [153]. Bolje razumijevanje medijatora oksidacijskog stresa s njihovim potencijalnim značenjem u klinici [154] zajedno s novim saznanjima o ulozi NRF2 te njegovih ciljnih gena mogla bi u budućnosti doprinijeti otvaranju mogućnosti za efikasnije i ciljanije terapije protiv karcinoma [129].

Specifična uloga NRF2 u karcinomima još je uvijek kontroverzna s obzirom da se NRF2 smatra i tumor supresorom kao i protoonkogenim faktorom (Slika 7). Neki istraživači predlažu da je njihova točna uloga u ovisnosti o stadiju tumorogeneze [148,155].

## **2.7. HIF-1 $\alpha$**

### **2.7.1. Funkcija HIF-1 $\alpha$ u tumorima**

Prosječni parcijalni tlak kisika u stanicama je 9-20 mmHg, odnosno 1,3-2,5%, dok je u mitohondrijima niži od 10 mmHg, odnosno oko 1,3% [156]. Stanice izložene hipoksiji reagiraju redukcijom sveukupne sinteze proteina, što vodi do kočenja proliferacije i posljedične smrti stanice što svakako značajno ovisi o težini i ukupnom trajanju hipoksije. Hipoksija je karakteristična za brzorastuće, agresivne solidne tumore, najčešće zbog strukturnih i funkcionalnih abnormalnosti tumorske mikrocirkulacije, velike udaljenost od najbliže krvne žile ili zbog reduciranog kapaciteta krvi za prijenos O<sub>2</sub> [157]. Uz to, hipoksija može inducirati i programiranu staničnu smrt (apoptozu), u normalnim i neoplastičnim stanicama. U nekim slučajevima proteomske promjene izazvane hipoksijom dovode do aresta staničnog ciklusa, diferencijacije, apoptoze i nekroze tumorskih stanica. Time možemo objasniti pojavu recidiva tumora, indolentne mikrometastaze i regresiju rasta koja je zabilježena kod nekih tumora. Međutim, agresivniji tumori pokazuju ubranu progresiju pa takvi karcinomi imaju mehanizme koji im pomažu da prebrode nutritivnu deprivaciju, izbjegnu nepovoljan okoliš i započnu nekontrolirani rast. Stoga, produžena hipoksija može dovesti do staničnih promjena koje rezultiraju agresivnijim fenotipom karcinoma i lošijom prognozom [156,157].

Paradoksalno, pojavom hipoksije i poremećajem redoks potencijala u stanici i mitohondrijima dolazi do razgradnje staničnih struktura i pojačane produkcije ROS, posebno pojavom apoptoze uzrokovane hipoksijom. Tumorske stanice vrlo često zbog brzog rasta i primarno slabe prokrvljenosti rastu u hipoksičnom okruženju, prilagođavajući svoj metabolizam niskoj razini kisika povećanjem transporta glukoze i glikolizom s ciljem očuvanja dostatne proizvodnje ATP-a (adenozin trifosfata)i/ili aktivacijom procesa neoangiogeneze. Tako npr. parcijalni tlak kisika u karcinomima dojke iznosi 10 mmHg, za razliku od prosječno 65 mmHg u zdravom tkivu dojke [157]. Ispod kritične energetske razine, hipoksija može rezultirati i nekrotičnom smrću stanice. Intratumorska hipoksija prepoznata je kao loš prognostički znak. Ključna molekula u regulaciji hipoksije je hipoksija-inducirani faktor 1 (engl. *Hypoxia inducible factor 1*, HIF-1) [9].

Brojni geni pojačano eksprimirani posredstvom HIF-1 i hipoksijom u mikrokolišu uključuju transportere glukoze, glikolitičke enzime i angiogenetske faktore rasta. HIF-1 je heterodimer sastavljen od podjedinica  $\alpha$  i  $\beta$ . Dok se podjedinica HIF-1 $\beta$  (engl. *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*, ARNT) stalno izlučuje u stanici, podjedinica HIF-1 $\alpha$  ima kratko vrijeme poluraspada i u uvjetima normalne razine kisika ne može se otkriti u stanicama. Kratko vrijeme poluraspada uzrokovano je kontinuiranim procesom vezanja ubikvitina i proteosomima posredovane degradacije. U uvjetima normalne koncentracije kisika u stanicama HIF-1 $\alpha$  je hidroksiliran pomoću prolin hidroksilaze (PHD 1, 2, 3) što omogućava njegovo prepoznavanje od strane pVHL (produkt von Hippel-Lindau tumor supresor gena) i posljedičnu ubikvitaciju te proteolitičku razgradnju [157].

Ti su procesi inhibirani hipoksijom i/ili defektima gena p53 koji u normalnim okolnostima dovode do stabilizacije HIF-1 $\alpha$  proteina [158]. Tijekom hipoksije protein HIF-1 $\alpha$  je stabiliziran zbog hipoksijom inhibirane prolin hidroksilaze. Budući da zbog toga izostaje hidrolacija HIF-1 $\alpha$ , na njega se ne može vezati VHL te ne dolazi do njegove proteolitičke razgradnje. To vodi do akumulacije HIF-1 $\alpha$  i u citoplazmi nakon čega se translocira u jezgru gdje tvori heterodimerni kompleks koji prepoznaje ciljne 5'-(A/G)CGTG-3' regije u DNA poznatu kao hipoksija odgovorni element (HRE). Heterodimerni HIF kompleks nastaje protein-protein interakcijom PAS domena HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  podjedinica. Za potpunu transkripcijsku aktivnost, HIF-1 se veže na p300/CREB. Oba HIF heterodimera sadrže po jednu helix-loop-helix (bHLH) domenu i dvije PER-ARNT-SIM (PAS1 i PAS 2) domene na N terminalnoj regiji. Te domene omogućavaju vezanje s DNA [159]. bHLH struktura omogućava heterodimerizaciju dok PAS domena omogućava vezanje DNA na HRE. HIF-1 $\alpha$  ima dvije TAD domene kojima se veže na von Hippel-Lindau (VHL) i p300/CBP čime se modificira transkripcijska aktivnost [159].

Vežanjem na DNA potiču aktivaciju brojnih gena i stimuliraju preživljenje stanice [160]. VHL posreduje i u razgradnji HIF-1 $\alpha$  preko kompleksa koji funkcionira kao E3 ubikvitin ligaza, a veže se izravno na HIF-1 $\alpha$  i aktivira njegovu proteasomalnu razgradnju (Jun).

### 2.7.2. HIF-1 $\alpha$ i ROS

Veća količina energije u stanici dobiva se procesom oksidativne fosforilacije gdje se glukoza razgrađuje do krajnjih produkata ugljičnog dioksida i vode. Smanjenjem količine kisika stanica pojačava glikolizu. Međutim, Warburg je primijetio da stanice raka češće koriste glikolizu kao izvor energije, čak i kada imaju dovoljno kisika, te imaju potrebu za povećanom količinom glukoze [161]. Obzirom da stanice karcinoma u početku rasta nemaju razvijenu mrežu kapilara one stanice žive u uvjetima hipoksije te ovise o anaerobnoj glikolizi kako bi stvorile većinu ATP-a [162]. Warburg je sugerirao da do ovog učinka dolazi zbog oštećenja u oksidacijskoj fosforilaciji, što je djelomično točno. Novija istraživanja pokazuju da npr. mutacije *TP53* gena, koje su vrlo česte kod velike većine karcinoma, mogu potaknuti Warburgov učinak. Protein p53 inhibira molekule zadužene za održavanje stabilnosti i permeabilnosti vanjske membrane mitohondrija, što za posljedicu ima otpuštanje citokrom c oksidaze, proteinskog kompleksa mitohondrija karakterističnog za oksidativnu fosforilaciju [163,164]. Suprotno tome, neka istraživanja su utvrdila da inhibicija glikolize u stanicama karcinoma dovodi do povećanja oksidativne fosforilacije [165]. Movahed i sur. sugeriraju da matične stanice karcinoma prvo povećavaju glikolizu, a u slučaju dužeg oksidacijskog stresa prelaze na metabolizam pentoza fosfata [166].

Ono što je ključno da produkti glikolize nisu samo izvor energije već i osnovnih građevnih molekula. Tako stanice u proliferaciji, čak i one koje nisu maligno promijenjen, imaju veću potrebu za glukozom, a povećana koncentracija glukoze ubrzava glikolizu [167].

Slijedom navedenog postaje jasno da ubrzani metabolizam i brza proliferacija, a k tome i nedostatak kisika zbog slabe opskrbljenosti dovode stanice karcinoma u hipoksiju. Dodatni negativni učinak stvara i poremećaj p53 pa stanice karcinoma moraju pojačati glikolizu za opstanak. U tom slučaju dolazi do aktivacije HIF-1 $\alpha$  koji igra važnu ulogu u regulaciji ROS-a. Povećana razina vodikovog peroksida aktivira HIF-1 $\alpha$  dok s druge strane, HIF-1 $\alpha$  posreduje u pretvaranju piruvata u laktat, umjesto metabolizma ciklusa limunske kiseline te na taj način smanjuje aktivnost mitohondrijskog respiratornog lanca i stvaranje novih ROS.

Većina stanica karcinoma ima povećanu razinu ROS-a koji vode do disfunkcije mitohondrija. Normalno se oko 2% kisika pretvori u ROS, kao nusprodukt mitohondrijske respiracije, a otpuštanjem elektrona (redukcijom) mitohondriji reguliraju količinu ROS. Međutim, prevelika

količina ROS oštećuje mitohondrije i inducira lipidnu peroksidaciju, čime se narušava struktura membrane mitohondrija. Procesom lipidne peroksidacije, pored ostalih, nastaju posebno reaktivni aldehidi koji su dovoljno reaktivni i stabilni da oštete stanicu, izazovu lančanu reakciju progresije oksidacijskog stresa, čime mogu izazvati dodatna oštećenja DNA koje mogu transformirati ili pak izazvati smrt stanice. Također, apoptoza potaknuta lipidnom peroksidacijom uzrokuje kompenzatornu regeneraciju pri čemu, zbog gubitka kontrole proliferacije, dolazi do razvoja tumora [73,77].

*In vivo* eksperiment Blouw i sur. [168] na modelima miševa pokazuje da rast i migracija stanica koje nisu imale HIF-1, izrazito ovisi o tumorskom mikrookolišu. Rast HIF-1 $\alpha$  negativnih astrocitomskih stanica značajno je varirao i ovisio o mjestu implantacije tumora. Subkutano implantiranim tumorima su rasli sporije od spontano nastalih tumora. Kada su stanice HIF-1 $\alpha$  negativnog astrocitoma rasle u fiziološkom okruženju moždanog parenhima pokazivale su veću proliferaciju kao i HIF-1 $\alpha$  pozitivni astroцитomi [168]. Fibroblasti iz okoliša koji izražavaju NF-KB, COX-2 ili HIF-1 utječu na razvoj epitelno-mezenhimalne tranzicije [169]. Isto tako, hipoksični okoliš stanica u proliferaciji pomaže u nastanku reaktivnih kisikovih vrsta, koji mijenjaju unutar i izvan stanični pH [165]. Povećanom kiselosti okoliša dolazi do promjene strukture stanične strome i olakšavanja invazivnijeg širenja karcinoma [170].

Primjećujemo da je HIF-1 $\alpha$  kompleksna molekula s brojnim funkcijama, a ipak još dosta nejasna. Iako je HIF-1 $\alpha$  ključna molekula u odgovoru na hipoksiju, ona koordinira s brojnim drugim molekulama. Između ostalih tu je i NRF2, transkripcijski faktor koji kontrolira izraženost anti-oksidacijskih gena. NRF2 sudjeluje kao inhibitor HIF-1 $\alpha$  [171].

Novi radovi upućuju da se dio gena aktiviranih preko NRF2 poklapa s genima aktiviranim preko HIF-1 $\alpha$ , i to uglavnom geni aktivirani u hipoksiji i geni koji aktiviraju glikolizu. Također sve više istraživanja pokazuje da je koordiniranu aktivacija signalnih puteva preko NRF2 i HIF-1 $\alpha$  nužna za preživljenje i progresiju tumora [171]. Osim toga HIF-1 $\alpha$  i NRF2 doprinose stvaranju matičnih stanica karcinoma [172].

### 2.7.3. HIF-1 $\alpha$ i karcinogeneza

Iz svega ranije navedenog je vidljivo da HIF-1 $\alpha$  igraju važnu ulogu u regulaciji metabolizma kisika u zdravlju i bolesti, a HIF-1 $\alpha$  je često aktiviran u karcinomima putem hipoksičnih i ne-hipoksičnih puteva. Bojni geni aktivirani geni HIF-1 $\alpha$  potiču stvaranje kisika u stanici ili aktivaciju alternativnih metaboličkih puteva koji ne zahtijevaju kisik, ali na žalost su uključeni i u rast tumora [173]. Stoga HIF-1 $\alpha$  može pospješiti preživljenje tumora pomoću nekoliko

preklapajućih mehanizama. Do danas je poznato oko 100 gena koji su direktno regulirani preko HIF-1 $\alpha$  [174].

U hipoksičnim uvjetima *in vitro*, kada je parcijalni tlak kisika niži od 10 mm Hg, HIF-1 $\alpha$  već za tri sata stabilizira učinke hipoksije u stanicama karcinoma [174]. Stabilizacija preko HIF-1 $\alpha$  u ovom okruženju dovodi do promjena u glikolizi, unosu hranjivih tvari, neutralizaciji ROS-a, angiogenezi, apoptozi i staničnoj migraciji što može pospješiti preživljenje i metastaziranje tumora. Već smo objasnili utjecaj HIF-1 $\alpha$  na metabolizam glukoze. Ta aktivacija se odvija uglavnom preko dva osnovna glikolitička enzima, fosfoglicerat kinaza 1 (PGK 1) i piruvat kinaza M2 (PKM2) i monokarboksilatni transporter (MCT4), čiju transkripciju aktivira HIF-1 $\alpha$ . Mutacije VHL gena u von Hippel-Lindau (VHL) sindromu uzrokuju konstitutivnu regulaciju HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ , što dovodi do razvoja tumora zbog prekomjerne ekspresije faktora rasta, poput vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF), faktora rasta  $\beta$  iz trombocita (PDGF  $\beta$ ) i transformirajućeg faktora rasta (TGF) - koji aktiviraju tirozin kinaze receptora. Mutacije u onkogenim genima kao što su p53, Rb, Bcl2, Myc, ARF i RAS, također stabiliziraju HIF1 $\alpha$ . Upala regulirana COX-2 signalnim putem izaziva aktivnost HIF-1 $\alpha$  česta je kod raka dojke. Kao daljnji dokaz da hipoksija nije potrebna za aktivnost HIF-1 $\alpha$  u karcinomu, mRNA HIF-1 $\alpha$  povišena je u preneoplastičnim lezijama dojke, debelog crijeva i prostate i ostaje povišena čak i kada se stanice uzgajaju u normoksičnim uvjetima [174].

Hipoksija je okidač za angiogenezu, ali se ona događa tek kada HIF-1 $\alpha$  aktivira transkripciju faktora kao što su VEGF, angiopoetin 2, stromalni faktor 1, COX- 2 i faktor matičnih stanica [174]. HIF-1 $\alpha$  također aktivira mehanizam sinteze masnih kiselina povećanjem količine enzima sintaze masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Synthase*, FAS) inače karakterističnu za hepatocite, a povećava i transport aminokiselina glutamina i leucina kroz membranu. Osim toga postoje naznake da je aktivacija HIF-1 $\alpha$  jedan od faktora epitelno-mezenhimalne tranzicije koja je preduvjet za nastanak matičnih stanica karcinoma, a utišavanjem HIF-1 $\alpha$  smanjuje se izraženost biljega matičnih stanica kao Oct4, Sox2, Nanog [169,172] .

HIF-1 je uključen u biologiju mnogih tumora s endokrinim svojstvima, uključujući karcinome dojke. Kod karcinoma dojke pojačana izraženost HIF-1 $\alpha$  uočena je u svim imunofenotipovima, neovisno o statusu receptora ER ili HER2. U velikoj retrospektivnoj studiji utvrđen je prediktivni značaj visoke razine HIF-1 $\alpha$  za rani relaps i metastatski rasap karcinoma dojke [173,175]. Studija Bosa i sur. [176] pokazala je kako ER pozitivni karcinomi pokazuju visoke razine HIF-1 $\alpha$  što odgovara i povišenim razinama proliferacijskog biljega Ki-67. Oni su potvrdili utjecaj estrogena na aktivaciju gena za HIF-1 $\alpha$  i njegov prognostički značaj za lošije preživljenje i pacijentica s negativnim limfnim čvorovima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Pacijentice

Istraživanje je provedeno retrospektivno na uzorcima karcinoma dojke 155 pacijentice koje su operirane i liječene u Klinici za tumore, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, u tijekom 2013. i 2014. godine, čiji su uzorci primarnih karcinoma dojke arhivirani u Odjelu za onkološku patologiju Klinike za tumore. Pacijentice koje su uključene u istraživanje prije onkikirurškog zahvata nisu prethodno prošle nikakav oblik onkološkog liječenja (hormonalnu, radio- ili kemoterapiju). Identitet pacijentica zaštićen je matičnim brojem pacijentice. Etičko povjerenstvo Klinike za tumore, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu, izdalo je dozvolu za provođenje istraživanja.

Iz arhivske baze podataka i povijesti bolesti pacijentica preuzeti su podaci o dobi pacijentica, a iz patohistoloških nalaza preuzeti su podaci o karakteristikama tumora: veličina i fokalnost tumora, histološki gradus, status hormonskih i HER-2 receptora i proliferacijskog biljega Ki-67 (iz kojih je određen imunofenotip), te zahvaćenost limfnih čvorova u pazušnoj jami.

Grupiranje prema veličini, tipu i stupnju diferenciranosti tumora napravljena je prema podacima važeće klasifikacije tumora dojke Svjetske zdravstvene organizacije, Lyon 2012 [15]. Prema veličini tumori su kategorizirani: pT1 tumori promjera do 2 cm, pT2 tumori većeg promjera od 2 cm a manjeg od 5 cm, pT3 tumori većeg promjera od 5 cm, pT4 tumori svih veličina s direktnim zahvaćanjem stijenke prsnog koša i/ili kože. Prema histološkom izgledu tumori su klasificirani kao klasični tip ili specijalni podtip (lobularni, tubularni, kribriiformni, medularni, metaplastični, apokrini, adenoid cistični, mukoepidermoidni, mucinozni, neuroendokrini, papilarni, mikropapilarni, inflamatorni i izrazito rijetki podtipovi). Stupanj diferenciranosti odredio se na temelju postotka tubularnih formacija, gradusa jezgre i mitotske aktivnosti unutar tumora, te su tumori podijeljeni u 3 skupine (gradus I, gradus II i gradus III). Konačno, karcinomi su po imunofenotipu tumora podijeljeni u pet skupina: hormon ovisni luminalni tip A, hormon ovisni luminalni tip B, hormon ovisni luminalni B i HER pozitivni, HER2 pozitivni tumori i trostruko negativni (estrogen receptor, progesteron receptor i HER2) tumori dojke.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzimanje i obrada uzoraka

Tumorsko tkivo koje je analizirano odstranjeno je tijekom kirurškog zahvata nakon čega je obrađeno standardnim histološkim postupkom. Patohistološka obrada uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu 48 sati, nakon čega se tkivo uklapa u parafin. Parafinske kocke dobivene na ovako opisan način mikrotomom su narezane na rezove debljine 5  $\mu\text{m}$  koji su korišteni za daljnu analizu ili imunohistokemijskog bojenja.

### 3.2.2. Imunohistokemijsko bojenje

Parafinski rezovi pripremljeni na prethodno opisan način prošli su rehidraciju tkiva. Prvo je rez tkiva deparafiniran u ksilenu tri puta po pet minuta te rehidriran do destilirane vode kroz silazni niz koncentracija etanola (apsolutni, 96%, 70%). Kako bi omogućili reakciju tkivnog antigena s istraživanim antitijelima, tkivo je potrebno termički obraditi. Za anti-NRF2 antitijelo termička obrada uzoraka provedena je u citratnom puferu pH 6.0 na temperaturi od 85 °C 30 minuta dok je za HIF-1 $\alpha$  termička obrada provedena na 97°C 40 minuta. Kako bi se inhibirale endogene peroksidaze tkivo je inkubirano 3% vodikovim peroksidom 5 minuta. Za anti-HNE antitijelo ovaj korak se provodi nakon primarnog antitijela kako vodikov peroksid ne bi izazvao dodatnu lipidnu peroksidaciju i time stvaranje novog HNE-a čime bi dobili lažno pozitivni rezultat. Nakon ispiranja puferom tkivo je inkubirano preko noći na 4 °C s pojedinim primarnim antitijelom: a) HIF-1 $\alpha$  razrjeđenje 1:50 (NB100-105, Novus Biologicals, USA); b) NRF2 razrjeđenje 1:100 (ab31163, Abcam, UK), c) HNE-histidinski konjugat, poklon dr. Georga Weaga. Primarno antitijelo je isprano puferom te je provedena inkubacija sekundarnim antitijelom konjugiranim s peroksidazom (K8010 Dako EnVision Flex High pH) u trajanju od 50 minuta. Imunokompleks antigen - primarno antitijelo - sekundarno antitijelo vizualizirano je reakcijom peroksidaze s diaminobenzidinom (DAB, Dako, Danska), a kontrastnim obojenjem hematoksilinom vidljive su sve histološke strukture.

### 3.2.3. Evaluacija imunohistokemijskih podataka

Imunohistokemijski preparati evaluirani su na intenzitet pozitiviteta te na postotak pozitivnih stanica. Kod HIF-1 $\alpha$ , NRF2 koji su transkripcijski faktori razlikovao se citoplazmatski i jezgri pozitivitet, budući da njihova lokacija u jezgri upućuje na njihovu aktivaciju. I HNE



pozitivitet je također raščlanjen na citoplazmatski i jezgreni. Uz analizu unutar stanične lokacije, analizirane su stanice tumora i strome.

### **3.3. Stanične linije tumora dojke**

#### 3.3.1. Uzgoj staničnih linija tumora dojke

Kao modele za diferencijaciju pacijentica po tipu tumora dojke, korištene su tri stanične linije tumora dojke: MCF7 estrogen pozitivna linija, SkBr3, HER<sup>2NEU</sup> pozitivna linija te SUM159 linija koja je trostruko negativna (estrogen receptor, progesteron receptor te HER<sup>2NEU</sup> negativna). Sve tri linije uzgajane su u Dulbecco's modified Eagles mediju (DMEM, SigmaAldrich, SAD) uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma (FCS, SigmaAldrich, SAD). Stanice su uzgajane u inkubatoru u vlažnoj atmosferi uz 5% CO<sub>2</sub> na 37 °C. Kad su postigle konfluentnost od otprilike 80% stanice su tripsinizirane otopinom tripsin/EDTA (0,25% i 0,02%), prebrojane na Burker Turkovoj komorici uz tripansko modriilo kako bi se razlikovale žive stanice od mrtvih. Nakon brojanja stanice su razrijeđene na željenu gustoću za pokus te su, kao takve korištene.

#### 3.3.2. Tretman vodikovim peroksidom

Kako bi se ispitao utjecaj vodikovog peroksida, stanice su se nasadile u pločice sa šest bunarića u gustoći  $1 \times 10^6$  stanica u 3 mL medija s 10% FCS-om te su ostavljene 24 sata kako bi se zalijepile na podlogu. Nakon 24 sata dodan je 100 mM vodikov peroksid na još 24 te su nakon trećeg dana tripsinizirane, centrifugirane kako bi se izolirali ukupni stanični proteini.

#### 3.3.3. Izolacija proteina

Talog stanice iz prethodnog poglavlja resuspendiran je u 500 µL PBS-a te je podvrgnut četiri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja kako bi se stanice lizirale. Sljedeće, da bi se odvojili proteini od većih staničnih molekula, lizati su centrifugirani na 14 000xg 15 minuta te je supernatant uzet za analizu proteina.

### 3.3.4. Kapljična analiza proteina i HNE-proteinskih konjugata

Budući je za analizu količine proteina potrebno ujednačiti koncentracije proteina, oni su se odredili metodom po Bradfordu [177]. Ukratko, priređena je serija razrjeđenja BSA (goveđi serumski albumin, SigmaAldrich, SAD) u PBS-u kao standard. Standardi i uzorci proteina ukapani su u volumenu od 5  $\mu$ L u mikrotitarsku pločicu, a na njih je zatim nakapano 200  $\mu$ L Bradfordovog reagensa (Biorad, SAD). Za analizu na dot-blotu koncentracija proteina u lizatima stanica podešen je prema uzorku s najmanje proteina. Dot-blot je izveden na sljedeći način: nitrocelulozna membrana (Biorad, SAD) aktivirana je 5 minuta u destiliranoj vodi. Zatim je složena aparatura za dot-blot te su bunarići isprani s 200  $\mu$ L PBS-a. Nakon ispiranja u bunariće su nakapani uzorci proteina i standardi za antitijela gdje je moguće, te su bunarići ponovno isprani dva puta s 200  $\mu$ L PBS-a. Nakon toga, aparatura je rastavljena, a membrana se inkubirana 1 sat u 2% otopini blotto-a (Biorad, SAD). Nakon završetka inkubacije, otopina je odlivena i membrana je inkubirana primarnim antitijelom (anti-HNE-His primarno monoklonsko mišje antitijelo, 1:10 preko noći, anit-NRF2 antitijelo, 1:100, Santa Cruz, preko noći). Nakon primarnog antitijela, membrana je isprana puferom za ispiranje četiri puta po pet minuta, nakon čega je inkubirana sa EnVision sekundarnim antitijelom (EnVision, 1:25, DAKO, Danska). Nakon ispiranja puferom za ispiranje četiri puta po pet minuta, membrana je inkubirana diaminobenzidinom kako bi se vizualiziralo vezanje antitijela (DAB, DAKO, Danska). Intenzitet signala analiziran je ImageJ programom [178].

### 3.4. Statistička analiza

Podaci su prikazani tablično i grafički. Sakupljeni podaci za sve kupine analizirani su statističkim programima Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD), MedCalc (inačica 15.8.0 MedCalc Software, Ostend, Belgija) te GraphPad 8.0 (Graphpad Software, SAD).

Kako bi se dobio uvid i povukle korelacije između imunohistokemijske izraženosti HIF-1 $\alpha$ , NRF2 i HNE-a rezultate smo rasporedili u skupine na dva načina. Prva je raspoređena po histološkom gradusu tumora u tri skupine; grI, grII i grIII. Druga je raspodjela po imunofenotipu karcinoma na Luminal A, Luminal B/HER2 negativni, Luminal B/HER2 pozitivni, HER2 pozitivni te Trostruko negativni. Rezultati imunohistokemijskog bojenja za potrebe statističke analize su binominalni: pozitivno i negativno. Bilo koji postotak obojenja jezgara smatra se pozitivnim.

Rezultati su prikazani srednjom vrijednošću, standardnom devijacijom i postotcima. Kolmogorov-Smirnovovim testom ispitana je normalnost raspodjele podataka.

Hi-kvadrat analizom je utvrđena povezanosti među skupinama, a snaga i smjer te veze Spearmanovim koeficijentom korelacije. Razlike među skupinama analizirane su dvosmjernom analizom varijance (two-way ANOVA). Za određivanje jačine korelacije korištena je klasifikacija prema Schoberu i suradnicima [151] pri čemu je raspon koeficijenta 0,3-0,69 umjerena korelacija, 0,7-0,89 jaka, a 0,9-1 vrlo jaka korelacija.

Sve  $p$  vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza razlika među odabranim skupinama pacijentica

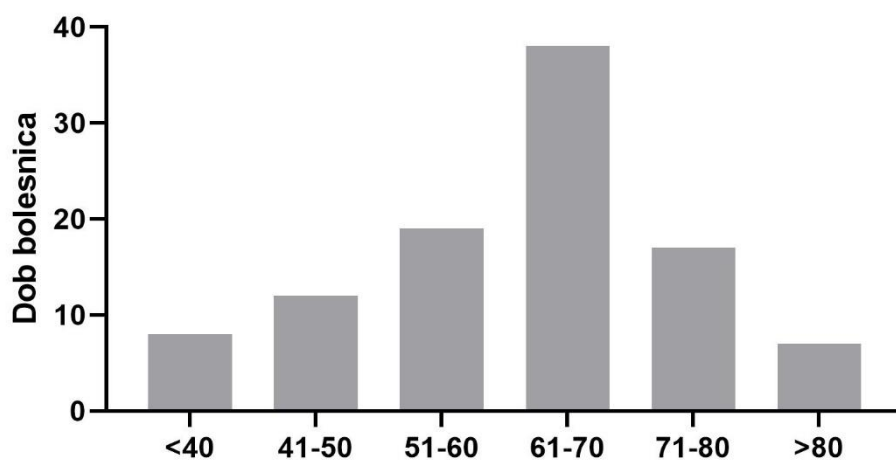
Ukupno je analizirano 155 uzoraka. U Tablici 2. navedene su osnovne patohistološke karakteristike karcinoma dojke uključenih u istraživanje.

Tablica 2. Prikaz patohistoloških karakteristika tumora i kliničke slike kod pacijentica

<b>Karakteristika</b>		<b>Broj slučajeva (%)</b> <b>N=155</b>
Veličina tumora	≤ 20 mm	91 (58,7%)
	> 20 mm	64 (41,3%)
Histološki gradus	I	36 (23,2%)
	II	53 (34,2%)
	III	66 (42,6%)
Ki-67	≤ 20%	51 (32,9%)
	> 20%	104 (67,1%)
Estrogenski receptori	pozitivni	109 (70,3%)
	negativni	46 (29,7%)
Progesteronski receptori	pozitivni	93 (60,0%)
	negativni	62 (40,0%)
HER2	pozitivni	46 (29,7%)
	negativni	109 (70,3%)
Imunofenotip	Luminalni A	40 (25,8%)
	Luminalni B/HER2-	39 (25,1%)
	Luminal B/HER2+	30 (19,4%)
	HER2 poz	16 (10,3%)
	TNBC	30 (19,4%)
Limfni čvorovi	pozitivni	81 (52,3%)
	negativni	74 (47,7%)

Prosječna dob pacijentica je 60,6 godina s medijanom dobi od 62 godine (u rasponu od 30-86 godina). Iz Slike 8 raspodjele pacijentica po dobnim skupinama vidljivo je da je većina pacijentica bila starija od 60 godina, ali bez statistički značajne razlike u dobi po istraživanih skupinama ( $p < 0,573$ ).

### Raspodjela bolesnica po dobi



Slika 8. Krivulja raspodjele pacijentica po dobi.

Prosječna veličina tumora bila je 20,1 mm, s medijanom 18 mm (u rasponu od 7 do 80 mm), a 29 tumora pripada u pT2 dok je jedan tumor imao pT3 i dva tumora pT4. Najviše je tumora gradusa III (42,6%), zatim gradusa II (34,2%), a najmanje gradusa I (23,2%). Većina tumora ima izražene hormonske receptore: estrogenski receptori pozitivni su u 70,3% a progesteronski receptori u 60,0% tumora te tako većina tumora pripada luminalnoj tip A luminalnoj tip B intrinzičkoj skupini. HER2 bio je pozitivan kod 29,7% tumora, od čega 19,4% u luminalnoj tip B, a 10,3% u HER2 pozitivnoj intrinzičkoj skupini.

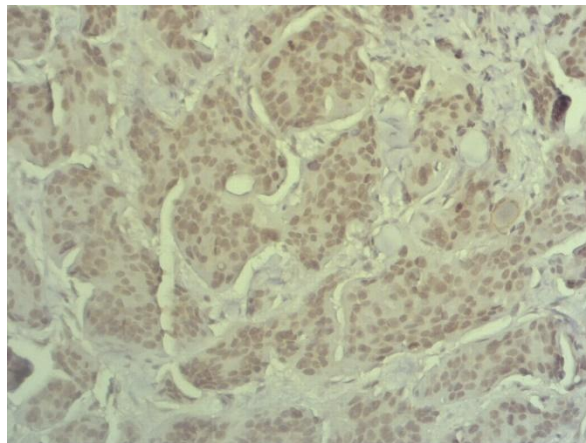
Kod 99 pacijentica (95,2%) učinjena je disekcija aksile te je u 52,3% zabilježeno lokalno širenje bolesti u limfne čvorove aksile. Tumor je nešto češće bio lokaliziran u desnoj dojci (55,8%) te većinom unifokalan (93,3%). Također je većina tumora pokazivala klasičnu histološku sliku dukalnog invazivnog karcinoma (engl. *not otherwise specified*, NOS) dok je

11 uzoraka pokazivalo tubularnu sliku, dva s apokrinom diferencijacijom te po jedan s neuroendokrinom, onkocitnom i mikropapilarnom histološkom slikom.

## 4.2. Imunohistokemijka prisutnost HIF-1 $\alpha$ , NRF2 i HNE-a

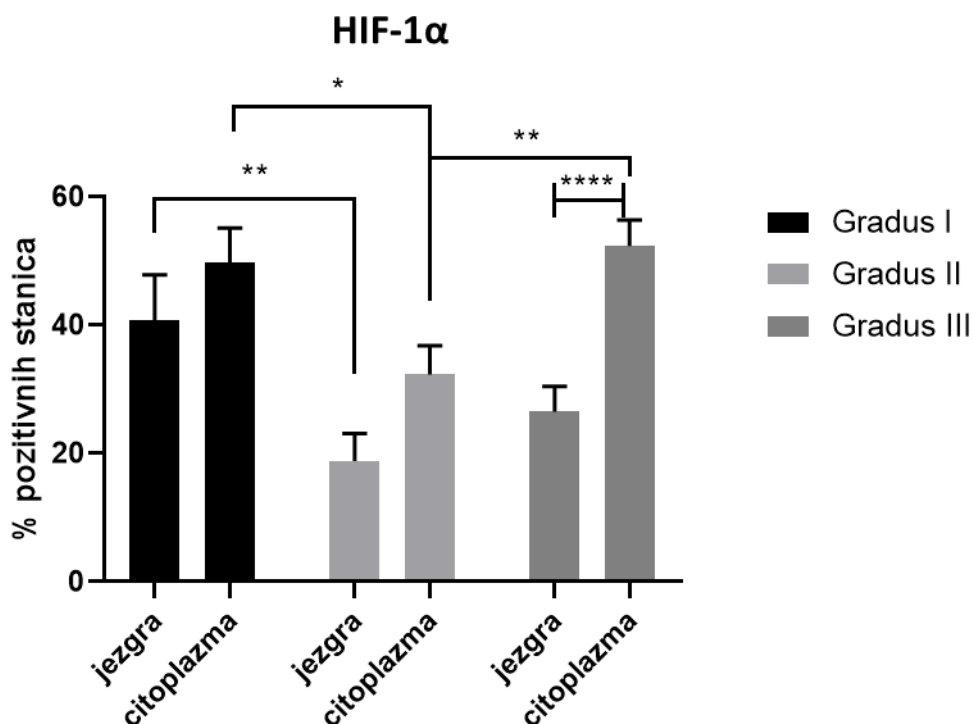
### 4.2.1. Analiza HIF-1 $\alpha$

HIF-1 $\alpha$  je transkripcijski faktor koji se nakon aktivacije translocira iz citoplazme u jezgru. Tako je 85 (54,8%) karcinoma pokazivalo pozitivan status HIF-1 $\alpha$  u jezgrama u rasponu od 3 do 100% (medijan 50%) dok 70 karcinoma ne pokazuje obojenje. Istovremeno je 120 karcinoma (77,4%) pokazivalo citoplazmatski pozitivitet HIF-1 $\alpha$ . U ukupnom uzorku 11 karcinoma (7,1%) uopće ne izražava HIF-1 $\alpha$ .



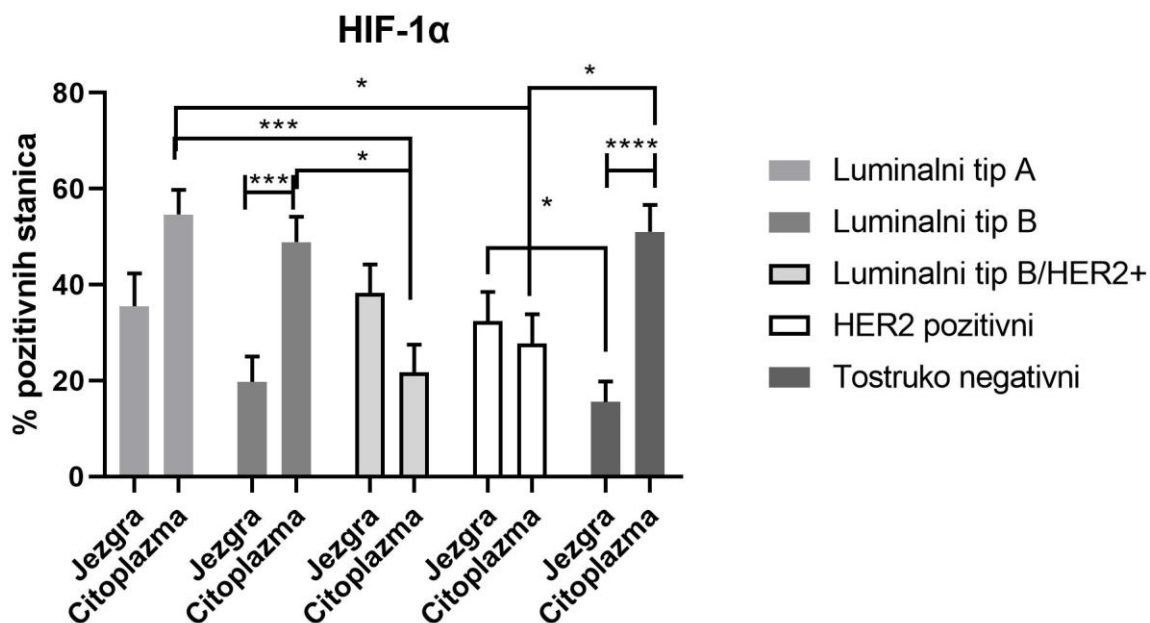
Slika 9. Imunohistokemijska izraženost HIF-1 $\alpha$  u jezgrama stanica karcinoma dojke (100x)

Primjer imunohistokemijske izraženosti HIF-1 $\alpha$  prikazana je na Slici 9, a analiza po gradusu tumora prikazana je na Slici 10. U tumorima dojke, uočava se trend smještanja HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi, ali je jedino kod tumora gradusa III statistički značajno ( $p < 0,001$ ). Tumori gradusa II imaju značajno snižen HIF-1 $\alpha$  u jezgri u odnosu na tumore gradusa I ( $p = 0,008$ ), dok tumori gradusa III imaju isti trend kao tumori gradusa II, ali nije statistički značajan. U citoplazmi tumori gradusa II imaju značajno snižen HIF-1 $\alpha$  pozitivitet u usporedbi s citoplazmom tumora gradusa I ( $p = 0,049$ ) i citoplazmom tumora gradusa II ( $p = 0,004$ ).



Slika 10. Intenzitet HIF-1 $\alpha$  u tumorima dojke raspoređenih po gradusu. Na grafovima su prikazane srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Kako bi se što bolje analizirala raspodjela HIF-1 $\alpha$ , analizirana je i njegoa raspodjela po imunofenotipu tumora, što je prikazano na Slici 11. Gledajući postotak pozitivnih jezgara i citoplazmi, luminalni tip B i trostruko negativni tumori imaju značajno povišen HIF-1 $\alpha$  pozitivitet u citoplazmi u odnosu na jezgru ( $p < 0,001$  i  $p < 0,001$ ). Pozitivitet HIF-1 $\alpha$  u jezgri statistički se značajno razlikuje kod luminalnog tipa B/HER2+ tumora u usporedbi s trostruko negativnim tumorima ( $p = 0,034$ ). Iako se vidi trend pada HIF $\alpha$  u jezgri kod luminalnih tipa B i trostruko negativnih tumora u odnosu na luminalni tip A, ti trendovi nisu statistički značajni. Za razliku od jezgre, postotak pozitivnih citoplazmi pokazuju pad kod HER2 pozitivnih i luminalnih tip B/HER2+ tumora u odnosu na luminalni A ( $p < 0,001$  i  $p = 0,029$ ), te HER2 pozitivnih u odnosu na luminalne tip A ( $p = 0,028$ ) i trostruko negativne tumore ( $p = 0,027$ ).

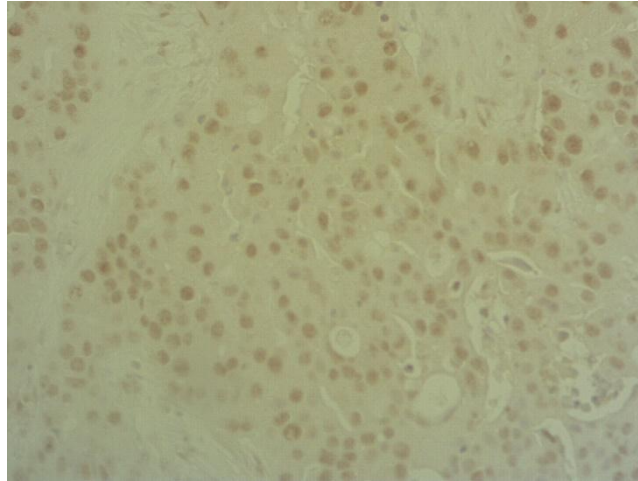


Slika 11. Intenzitet HIF-1 $\alpha$  u tumorima dojke rapoređenih po imunofenotipu. Na grafovima su prikazane srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.2.2. Analiza NRF2

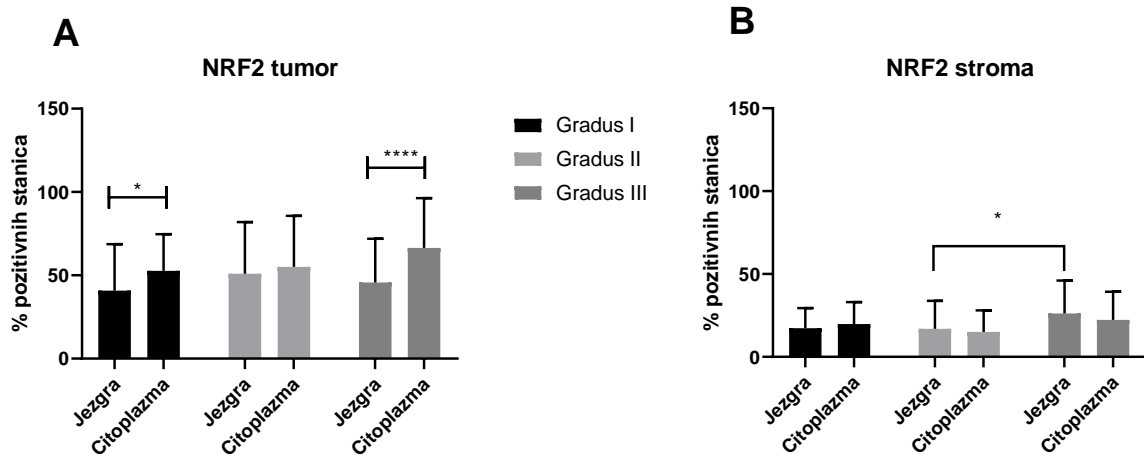
NRF2 je antioksidacijski transkripcijski faktor koji se nakon oksidacijske stimulacije translocira iz citoplazme u jezgru. Tako svi karcinomi osim jednog (99,9%) pokazuju pozitivan status NRF2 u jezgrama u rasponu od 3 do 100% (medijan 52,5%) Također gotovo svi karcinomi osim dva (77,4%) pokazuju citoplazmatski pozitivitet NRF2. U ukupnom uzorku svega jedan karcinom uopće ne izražava NRF2.





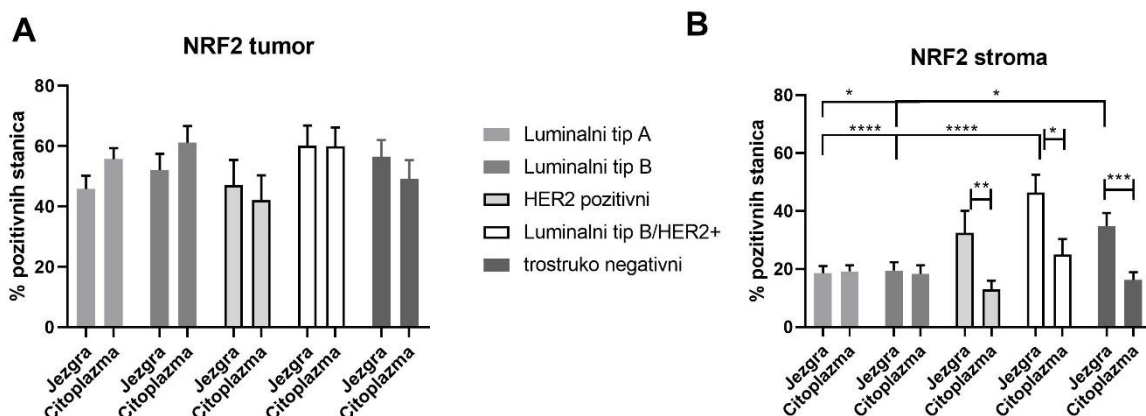
Slika 12. Imunohistokemijska izraženost NRF2 u jezgrama stanica karcinoma dojke (200x)

NRF2 pozitivitet (primjer Slika 12) analiziran je u stanicama strome i stanicama tumora, u jezgri i u citoplazmi (Slika 13). U stromi je statistički značajno manje NRF2 nego u tumoru, i u jezgri i u citoplazmi ( $p < 0,001$ ). U stanicama tumora značajno više NRF2 nalazi se u citoplazmi kod tumora gradusa I ( $p = 0,015$ ) i gradusa III ( $p < 0,001$ ). Usporedbom NRF2 u jezgrama i u citoplazmama tumora različitih gradusa nema statistički značajne razlike u odnosu na graduse. Nasuprot tome, u jezgrama stanica strome ima značajno više NRF2 kod tumora gradusa III u odnosu na tumore gradusa II ( $p = 0,044$ ).



Slika 13. Intenzitet NRF2 u tumorima (A) i stromi (B) dojke raspoređenih po gradusu. Na grafovima su prikazane srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

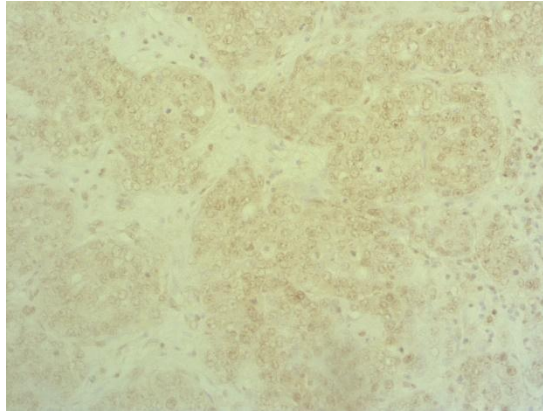
Kako bi se što bolje analizirala raspodjela NRF2, analizirana je i njegova raspodjela po imunofenotipu tumora (Slika 14). Među tumorima različitog imunofenotipa nema statistički značajne razlike u razini NRF2 ni u citoplazmi ni u jezgri. Međutim, stroma trostruko negativnih tumora ima značajno više NRF2 u jezgri nego luminalni tip A i luminalni tip B tumori ( $p=0,013$  i  $p=0,037$ ). Također, u jezgrama strome kod luminalnih tipa B/HER2+ tumora ima značajno više NRF2 nego u jezgrama strome kod luminalnih tipa A i tipa B tumora ( $p<0,001$  za oba). Kod luminalnih tipa A i tipa B tumora, NRF2 pozitivitet je jednak u citoplazmi i jezgri, dok je kod HER2, luminalnih tipa B/HER2+ i trostruko negativnih tumora značajno više pozitiviteta u jezgri nego u citoplazmi ( $p=0,004$ ,  $p=0,039$  i  $p<0,001$ ).



Slika 14. Intenzitet NRF2 u tumorima (A) i stromi (B) dojke raspoređenih po imunofenotipu. Na grafovima su prikazane srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$

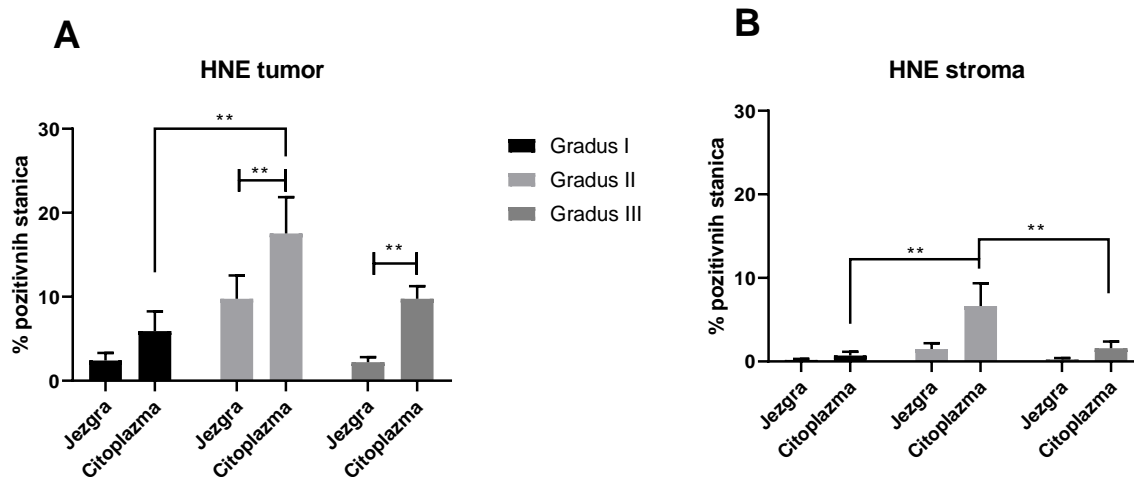
#### 4.2.3. Analiza HNE

Analiza HNE-a pokazala je pozitivnu reakciju na 70 karcinoma (45,1%) i to u jezgrama u rasponu od 1 do 70% uglavnom slabog do umjerenog intenziteta (medijan 3,5%) dok 85 karcinoma ne pokazuje obojenje. Istovremeno 88 karcinoma (56,8%) pokazuje citoplazmatski pozitivitet HIF-1 $\alpha$ . U ukupnom uzorku 10 karcinoma uopće ne izražava HNE.



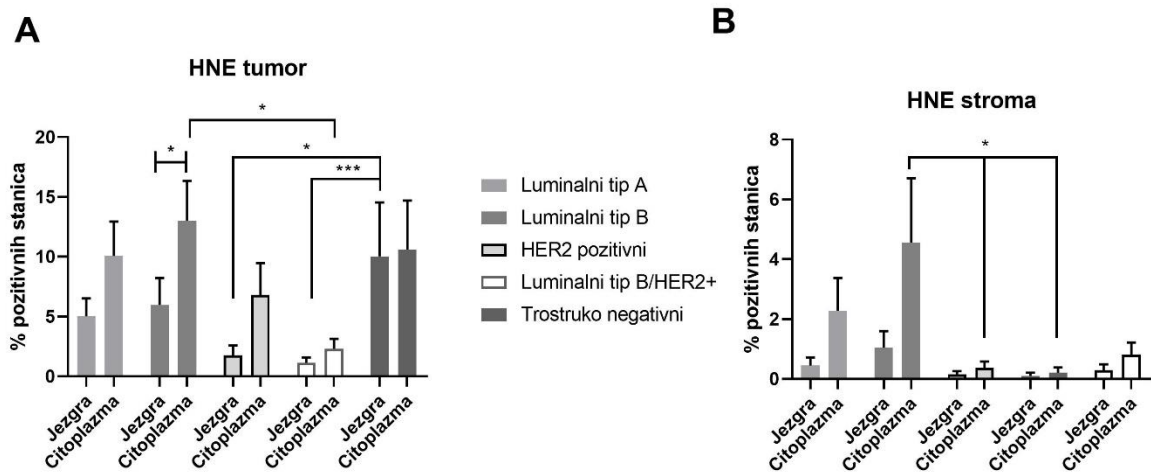
Slika 15. Imunohistokemijska izraženost HNE (100x)

Analiza HNE pozitiviteta (primjer Slika 15) po gradusu tumora prikazana je na Slici 16. Usporedbom postotaka pozitivnih jezgri i citoplazmi, stanice tumora gradusa II i III imaju značajno više HNE-a u citoplazmi nego u jezgri ( $p=0,001$ , te  $p=0,001$ ). Bez obzira na trend koji se uočava, tumori gradusa II imaju značajno više HNE-a u citoplazmi u usporedbi s tumorima gradusa I ( $p=0,004$ ). U stanicama strome nema razlika u pozitivitetu jezgre i citoplazme bez obzira na gradus tumora. Stanice strome kod tumora gradusa II imaju značajno viši citoplazmatski pozitivitet u odnosu na strome tumora gradusa I ( $p=0,002$ ) i gradusa III ( $p=0,009$ ).



Slika 16. Intenzitet HNE u tumorima dojke raspoređenih po gradusu. Na grafovima su prikazane srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica  $\pm$  SEM. \*\*  $p<0,01$

Kako bi se što bolje analizirala raspodjela HNE-a, analizirana je i njegova raspodjela po imunofenotipu tumora (Slika 17). Iako HER2 pozitivni tumori (i HER2 i luminalni tip B/HER2+) pokazuju manje HNE pozitivnih jezgri, statistički je značajan pad samo u odnosu na trostruko negativne tumore ( $p<0,001$  i  $p=0,015$ ). Kod citoplazmatskog pozitiviteta značajan pad se uočava između citoplazmi luminalnih tip B/HER2+ u odnosu na luminalni tip B tumora ( $p=0,014$ ). Zanimljivo, iako se uočava trend niskog pozitiviteta citoplazme strome kod HER2 pozitivnih, luminalni tip B/HER2+ i trostruko negativnih tumora, statistička značajnost se nalazi između citoplazme strome luminalnih tip B tumora u odnosu na HER2 pozitivni ( $p=0,038$ ) i luminalni tip B/HER2+ tumora ( $p=0,034$ ).



Slika 17. Intenzitet HNE u tumorima dojke raspoređenih po imunofenotipu. Na grafovima su prikazane srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,0001$

### 4.3. Analiza korelacija među parametrima

#### 4.3.1. Analiza korelacija po gradusu tumora

Korelacijski parametri određeni su nakon podjele po gradusu tumora te su prikazani u Tablicama 3, 4, i 5. Kod tumora gradusa I nisu prikazani odnosi dob pacijentice, BMI, veličina tumora, broj metastaza u limfnim čvorovima te Ki-67 (red u tablici) u odnosu na ostale parametre, te Ki-67, ER, PR i HER2 (stupac u tablici) u odnosu na sve parametre. Kod ovih

tumora nađena je umjerena korelacija između ER te dobi i BMI, Između pojavnosti HNE-proteinskih konjugata u jezgri tumorskih stanica s NRF2-om u jezgri i citoplazmi tumorskih stanica. Korelacije su nađene između HNE-a u jezgri i citoplazmi stanica strome i to vrlo jaka, te između NRF2 u jezgri tumorskih stanica s njihovom citoplazmom, te NRF2 u jezgri tumorskih stanica s citoplazmom stanica strome (umjerena korelacija), NRF2 u jezgri stanica tumora i strome (vrlo jaka) te konačno NRF2 u jezgri stanica strome s njihovom citoplazmom (umjerena).

Kod pacijentica s gradusom II nisu prikazani odnosi dob pacijentice, BMI, veličina tumora, broj metastaza limfnih čvorova, Ki-67, ER, PR i HER2 (red u tablici) te veličina tumora, broj metastaza limfnih čvorova, Ki-67, ER, PR i HER2 (stupac u tablici) u odnosu na sve parametre. Umjerene korelacije u skupini tumora gradusa II su sljedeće: dob s NRF2 u citoplazmi stanica strome, BMI s NRF2 u jezgri i citoplazmi strome, HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi s HNE-om u jezgri i citoplazmi tumorskih stanica, HNE u jezgri i citoplazmi stanica tumora s jezgrom i citoplazmom stanica strome, NRF2 u jezgri stanica tumora s citoplazmom stanica tumora i strome te s jezerom stanica strome. Vrlo jaka korelacija nađena je kod pojavnosti HNE-a u jezgri i citoplazmi stanica i tumora i strome.

Kod tumora gradusa III nisu prikazani odnosi dob pacijentice, BMI, veličina tumora, broj metastaza limfnih čvorova, Ki-67, ER, PR i HER2 (red u tablici) te dob pacijentice, veličina tumora, broj metastaza limfnih čvorova, Ki-67, ER, PR i HER2 (stupac u tablici) u odnosu na sve parametre. Kod tumora gradusa III je nađena umjerena korelacija NRF2 u jezgrama tumorskih stanica s citoplazmom stanica tumora te jezgrom i citoplazmom stanica strome. Jaka korelacija dobivena je između NRF2 u citoplazmi i jezgri stanica strome. Konačno, kod gradusa II postoji negativna umjerena korelacija između ER i Ki-67 s Spearmanovim faktorom korelacije  $\rho = -0,542$  i  $p = 0,001$ .

Tablica 3. Povezanost parametara kod tumora gadusa I

		Dob	HIF-1 $\alpha$ N	HIF-1 $\alpha$ C	HNE Tumor N	HNE Tumor C	HNE Stroma N	HNE Stroma C	NRF2 Tumor N	NRF2 Tumor C	NRF2 Stroma N
ER	$\rho$ $p$	<b>0,481 *</b> <b>0,005</b>									
PR	$\rho$ $p$	-0,171 0,340									
HIF-1 $\alpha$ N	$\rho$ $p$	<b>-0,405 *</b> <b>0,019</b>									
HIF-1 $\alpha$ C	$\rho$ $p$	-0,329 0,062	0,155 0,390								
HNE Tumor N	$\rho$ $p$	0,199 0,274	-0,202 0,268	-0,045 0,805							
HNE Tumor C	$\rho$ $p$	<b>0,515 *</b> <b>0,003</b>	<b>-0,353 *</b> <b>0,048</b>	-0,021 0,910	<b>0,635 *</b> <b>&lt;0,001</b>						
HNE Stroma N	$\rho$ $p$	0,080 0,665	-0,185 0,310	0,077 0,675	0,134 0,465	0,347 0,051					
HNE Stroma C	$\rho$ $p$	0,091 0,620	-0,194 0,288	0,074 0,687	0,145 0,428	0,355 0,046	<b>0,997 *</b> <b>&lt;0,001</b>				
NRF2 Tumor N	$\rho$ $p$	0,138 0,445	-0,161 0,370	-0,125 0,488	<b>0,544 *</b> <b>0,001</b>	0,305 0,090	-0,139 0,447	-0,126 0,492			
NRF2 Tumor C	$\rho$ $p$	0,248 0,164	-0,165 0,360	0,040 0,823	<b>0,546 *</b> <b>0,001</b>	<b>0,399 *</b> <b>0,024</b>	0,142 0,437	0,152 0,406	<b>0,682 *</b> <b>&lt;0,001</b>		
NRF2 Stroma N	$\rho$ $p$	0,173 0,336	-0,214 0,231	0,012 0,947	0,437 0,012	0,322 0,072	-0,080 0,663	-0,067 0,714	<b>0,763 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,464 *</b> <b>&lt;0,001</b>	
NRF2 Stroma C	$\rho$ $p$	<b>0,387</b> <b>0,026</b>	-0,043 0,811	-0,206 0,251	0,337 0,059	0,210 0,248	-0,248 0,171	-0,248 0,084	0,305 0,113	0,281 0,003	<b>0,498 *</b> <b>&lt;0,001</b>

\* statistički značajno  $p < 0,05$

Spearmanova korelacija: umjerena za  $\rho = 0,3-0,59$ ; Jaka za  $\rho = 0,6-0,89$ ; Vrlo jaka za  $\rho = 0,9-1$ , sve uz  $p < 0,05$

N – jezgra; C - citoplazma

Tablica 4. Povezanost parametara kod tumora gadusa II

		Dob	HIF-1 $\alpha$ N	HIF-1 $\alpha$ C	HNE Tumor N	HNE Tumor C	HNE Stroma N	HNE Stroma C	NRF2 Tumor N	NRF2 Tumor C	NRF2 Stroma N
HIF-1 $\alpha$ N	$\rho$ $p$	-0,146 0,417									
HIF-1 $\alpha$ C	$\rho$ $p$	0,009 0,962	<b>0,597 *</b> <b>&lt;0,001</b>								
HNE Tumor N	$\rho$ $p$	0,108 0,549	0,303 0,087	<b>0,467 *</b> <b>0,006</b>							
HNE Tumor C	$\rho$ $p$	0,141 0,432	0,172 0,339	<b>0,377 *</b> <b>0,031</b>	<b>0,831 *</b> <b>&lt;0,001</b>						
HNE Stroma N	$\rho$ $p$	0,145 0,421	0,209 0,244	0,147 0,413	<b>0,656 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,580 *</b> <b>&lt;0,001</b>					
HNE Stroma C	$\rho$ $p$	0,265 0,135	0,123 0,494	0,109 0,546	<b>0,657 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,667 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,819 *</b> <b>&lt;0,001</b>				
NRF2 Tumor N	$\rho$ $p$	0,198 0,270	0,031 0,862	0,310 0,079	0,122 0,500	0,197 0,272	0,064 0,722	0,117 0,516			
NRF2 Tumor C	$\rho$ $p$	0,053 0,771	0,124 0,492	0,241 0,177	0,161 0,370	0,287 0,106	-0,066 0,715	0,058 0,747	<b>0,695 *</b> <b>&lt;0,001</b>		
NRF2 Stroma N	$\rho$ $p$	<b>0,368 *</b> <b>0,035</b>	0,156 0,385	0,187 0,299	0,101 0,575	0,210 0,241	0,196 0,274	0,194 0,280	<b>0,564 *</b> <b>0,004</b>	<b>0,358 *</b> <b>0,041</b>	
NRF2 Stroma C	$\rho$ $p$	<b>0,442 *</b> <b>0,010</b>	0,031 0,866	0,096 0,595	0,075 0,677	0,244 0,170	0,024 0,895	0,182 0,311	<b>0,566 *</b> <b>0,001</b>	<b>0,538 *</b> <b>0,001</b>	<b>0,746 *</b> <b>&lt;0,001</b>

\* statistički značajno  $p < 0,05$

Spearmanova korelacija: umjerena za  $\rho = 0,3-0,59$ ; Jaka za  $\rho = 0,6-0,89$ ; Vrlo jaka za  $\rho = 0,9-1$ , sve uz  $p < 0,05$

N – jezgra; C - citoplazma

Tablica 5. Povezanost parametara kod tumora gadusa III

		HIF-1 $\alpha$ N	HIF-1 $\alpha$ C	HNE Tumor N	HNE Tumor C	HNE Stroma N	HNE Stroma C	NRF2 Tumor N	NRF2 Tumor C	NRF2 Stroma N
HIF-1 $\alpha$ C	$\rho$ $p$	0,002 0,993								
HNE Tumor N	$\rho$ $p$	0,026 0,886	-0,195 0,176							
HNE Tumor C	$\rho$ $p$	<b>-0,370 *</b> <b>0,034</b>	-0,210 0,234	<b>0,396 *</b> <b>0,023</b>						
HNE Stroma N	$\rho$ $p$	0,072 0,691	-0,023 0,869	0,270 0,128	0,265 0,130					
HNE Stroma C	$\rho$ $p$	-0,122 0,499	-0,064 0,718	0,149 0,407	0,211 0,232	<b>0,763 *</b> <b>&lt;0,001</b>				
NRF2 Tumor N	$\rho$ $p$	-0,066 0,716	0,210 0,233	-0,252 0,157	-0,244 0,232	-0,303 0,081	-0,337 0,051			
NRF2 Tumor C	$\rho$ $p$	0,068 0,705	0,185 0,295	-0,234 0,190	-0,039 0,825	0,021 0,904	0,032 0,857	<b>0,551 *</b> <b>0,001</b>		
NRF2 Stroma N	$\rho$ $p$	-0,243 0,174	0,236 0,179	-0,103 0,568	-0,051 0,776	-0,235 0,181	-0,187 0,289	<b>0,475 *</b> <b>0,005</b>	<b>0,398 *</b> <b>0,020</b>	
NRF2 Stroma C	$\rho$ $p$	-0,218 0,222	0,218 0,215	-0,186 0,300	-0,139 0,433	-0,282 0,105	-0,127 0,475	<b>0,583 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,464 *</b> <b>0,006</b>	<b>0,813 *</b> <b>&lt;0,001</b>

\* statistički značajno  $p < 0,05$

Spearmanova korelacija: umjerena za  $\rho = 0,3-0,59$ ; Jaka za  $\rho = 0,6-0,89$ ; Vrla jaka za  $\rho = 0,9-1$ , sve uz  $p < 0,05$

N – jezgra; C - citoplazma



#### 4.3.2. Analiza korelacija po imunofenotipu tumora

Kao i kod određivanja korelacija u odnosu na graduse tumora, korelacijski parametri određeni su i nakon podjele tumora po imunofenotipovima tumora te su prikazani u Tablicama 6. do 10. U tablicama nisu pokazani podaci za parametre koji ili nisu prisutni u tumorima (npr. HER2 kod luminalnih tip A i tip B tumora) ili nisu pokazali korelaciju, tj. Njihov koeficijent korelacije bio je manji od 0,4. Kod luminalnih tip A tumora nisu pokazani Ki-67, ER, PR i HER2, veličina tumora i broj metastaza. Kod ovih tumora nađena je umjerena korelacija između HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi i jezgri, HNE u citoplazmi i jezgri stanica i tumora i strome, te između NRF2 u jezgri tumorskih stanica sa njihovom citoplazmom kao i s NRF2 u jezgri stanica strome.

Kod luminalnih tip B tumora nisu prikazani odnosi PR, BMI, broj metastaza limfnih čvorova, Ki-67, u odnosu na sve parametre zbog nedostatka korelacije (manja od 0,4). Korelacije u ovoj skupini tumora su sljedeće: umjerene za dob s HNE u jezgri stanica tumora te u citoplazmi strome te dob s ER pozitivitetom; HNE citoplazmi stanica tumora s HNE-om u jezgri stanica tumora (umjerena) te sa HNE-om u citoplazmi (umjerena) i jezgri (jaka) strome i s ER pozitivitetom (mjerena), HNE u citoplazmi stanica tumora umjereno jako korelira s HNE-pozitivitetom jezgre i citoplazme strome, NRF2 u citoplazmi tumora te s veličinom tumora; HNE u citoplazmi i jezgri strome umjereno korelira s ER pozitivitetom dok NRF2 u jezgri strome korelira s NRF2 pozitivitetom jezgre i citoplazme strome.

Kod HER2 pozitivnih tumora nisu prikazani odnosi veličina tumora, broj metastaza limfnih čvorova, te ER i PR u odnosu na sve parametre. Kod ovih tumora nađena je umjerena korelacija dobi i HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi te HIF-1 $\alpha$  u jezgri s HNE-om u citoplazmi strome. HNE u jezgri tumora jako korelira s HNE-om u citoplazmi tumora te umjereno korelira s Ki-67, dok HNE u citoplazmi tumora umjereno korelira s NRF2 u jezgri tumora te Ki-67. HNE u jezgri strome jako korelira s citoplazmom strome, dok HNE u citoplazmi strome umjereno korelira s Ki-67. NRF2 u jezgrama tumora umjereno korelira s NRF2 u jezgri strome, dok NRF2 u citoplazmi strome jako korelira s citoplazmom.

Kod luminalnih tip B/HER2+ tumora nisu prikazani odnosi veličina tumora, broj metastaza limfnih čvorova, te ER i PR u odnosu na sve parametre. Kod ovih tumora nađena je negativna umjerena korelacija dobi i HIF-1 $\alpha$  te HNE-a u jezgrama tumora s NRF2 u citoplazmi tumora i strome je u jezgri tumora. HNE i NRF2 umjereno koreliraju u jezgri i citoplazmi tumora. NRF2 u jezgri strome umjereno korelira s NRF2 u jezgri i u citoplazmi tumora. NRF2 u citoplazmi strome, slično kao i u jezgri umjereno korelira s NRF2 u jezgri i citoplazmi tumora. NRF2 u

jezgri tumora korelira s veličinom tumora. Zanimljivo, ER ne daje korelacije, ali PR umjereno korelira s HNE-om u citoplazmi strome. BMI ima jako negativnu korelaciju s HIF-1 $\alpha$  u jezgri i citoplazmi, NRF2 u citoplazmi tumora te negativnu umjerenu korelaciju s brojem metastaza u limfnim čvorovima. BMI jako korelira s HNE-om u citoplazmi tumora te u jezgri i citoplazmi strome, a umjereno korelira s HNE-om u jezgri tumora. Također, BMI umjereno korelira s veličinom i ER, a vrlo jako korelira s PR.

Kod trostruko negativnih tumora nisu prikazani odnosi dobi pacijentica, ER, PR, HER2, te Ki-67 u odnosu na sve parametre. Kod ovih tumora nađena je negativna umjerena korelacija veličine tumora s HNE-om u jezgri tumora te između broja metastaza u limfnim čvorovima s HNE-om i citoplazmi i tumora i strome. Kod ovih tumora jaka korelacija nalazi se među jezgrama i citoplazmama tumor za HNE i NRF2 te stromi za HNE. Umjerena korelacija nalazi se za NRF2 u citoplazmi tumora s dobi, te NRF2 u jezgri strome s njenom citoplazmom te NRF2 u jezgri tumora, također NRF2 u citoplazmi strome umjereno korelira s NRF2 u citoplazmi tumora te s jezgrom strome. Veličina tumora umjereno korelira s HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi.

Tablica 6. Povezanost parametara kod luminalnih tip A tumora

		Dob	HIF-1 $\alpha$ N	HIF-1 $\alpha$ C	HNE Tumor N	HNE Tumor C	HNE Stroma N	HNE Stroma C	NRF2 Tumor N	NRF2 Tumor C	NRF2 Stroma N
HIF-1 $\alpha$ N	$\rho$ $p$	<b>-0,389 *</b> <b>0,013</b>									
HIF-1 $\alpha$ C	$\rho$ $p$	-0,287 0,076	<b>0,401 *</b> <b>0,011</b>								
HNE Tumor N	$\rho$ $p$	0,051 0,757	-0,193 0,232	0,101 0,539							
HNE Tumor C	$\rho$ $p$	0,202 0,211	-0,154 0,341	0,067 0,683	<b>0,650 *</b> <b>&lt;0,001</b>						
HNE Stroma N	$\rho$ $p$	0,050 0,759	-0,005 0,978	0,228 0,162	0,247 0,124	<b>0,390 *</b> <b>0,013</b>					
HNE Stroma C	$\rho$ $p$	0,106 0,516	-0,112 0,492	0,046 0,782	0,274 0,088	<b>0,476 *</b> <b>0,002</b>	<b>0,837 *</b> <b>&lt;0,001</b>				
NRF2 Tumor N	$\rho$ $p$	0,133 0,413	-0,223 0,167	-0,040 0,811	<b>0,329 *</b> <b>0,038</b>	0,128 0,431	-0,066 0,686	-0,112 0,491			
NRF2 Tumor C	$\rho$ $p$	-0,071 0,665	0,048 0,767	0,112 0,496	<b>0,341 *</b> <b>0,031</b>	0,181 0,262	0,021 0,898	0,029 0,857	<b>0,555 *</b> <b>&lt;0,001</b>		
NRF2 Stroma N	$\rho$ $p$	0,159 0,327	-0,017 0,918	0,060 0,716	0,165 0,309	0,059 0,718	-0,013 0,934	-0,067 0,682	<b>0,661 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,445 *</b> <b>0,004</b>	
NRF2 Stroma C	$\rho$ $p$	0,144 0,375	0,207 0,200	-0,130 0,430	0,161 0,321	0,045 0,784	-0,235 0,144	-0,222 0,168	0,196 0,226	0,323 0,042	<b>0,518 *</b> <b>0,001</b>

\* statistički značajno  $p < 0,05$

Spearmanova korelacija: umjerena za  $\rho = 0,3-0,59$ ; Jaka za  $\rho = 0,6-0,89$ ; Vrlo jaka za  $\rho = 0,9-1$ , sve uz  $p < 0,05$

N – jezgra; C - citoplazma

Tablica 7. Povezanost parametara kod luminalnih tip B tumora

		Dob	HIF-1 $\alpha$ N	HIF-1 $\alpha$ C	HNE Tumor N	HNE Tumor C	HNE Stroma N	HNE Stroma C	NRF2 Tumor N	NRF2 Tumor C	NRF2 Stroma N	NRF2 Stroma C
HIF-1 $\alpha$ N	$\rho$ $p$	-0,043 0,797										
HIF-1 $\alpha$ C	$\rho$ $p$	-0,079 0,633	<b>0,475 *</b> <b>0,002</b>									
HNE Tumor N	$\rho$ $p$	<b>0,439 *</b> <b>0,006</b>	0,056 0,740	-0,052 0,757								
HNE Tumor C	$\rho$ $p$	<b>0,372 *</b> <b>0,020</b>	-0,160 0,331	0,187 0,255	<b>0,681 *</b> <b>&lt;0,001</b>							
HNE Stroma N	$\rho$ $p$	<b>0,372 *</b> <b>0,020</b>	-0,024 0,883	0,051 0,758	<b>0,662 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,589 *</b> <b>&lt;0,001</b>						
HNE Stroma C	$\rho$ $p$	<b>0,423 *</b> <b>0,007</b>	-0,069 0,678	-0,004 0,983	0,710 0,000	<b>0,649 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,925 *</b> <b>&lt;0,001</b>					
NRF2 Tumor N	$\rho$ $p$	0,077 0,643	-0,193 0,239	0,123 0,454	0,226 0,172	0,302 0,062	-0,033 0,841	0,063 0,702				
NRF2 Tumor C	$\rho$ $p$	0,120 0,467	-0,244 0,135	<b>0,360 *</b> <b>0,024</b>	0,179 0,284	<b>0,408 *</b> <b>0,010</b>	0,001 0,997	0,073 0,661	<b>0,738 *</b> <b>&lt;0,001</b>			
NRF2 Stroma N	$\rho$ $p$	0,144 0,380	-0,160 0,330	0,231 0,157	0,116 0,490	0,278 0,087	0,162 0,324	0,168 0,308	<b>0,602 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,554 *</b> <b>&lt;0,001</b>		
NRF2 Stroma C	$\rho$ $p$	0,197 0,228	-0,280 0,084	0,098 0,554	0,112 0,502	0,210 0,199	-0,024 0,884	0,062 0,708	0,620 0,000	<b>0,583 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,772 *</b> <b>&lt;0,001</b>	
Veličina tumora	$\rho$ $p$	0,039 0,814	-0,015 0,929	0,310 0,055	0,084 0,614	<b>0,479 *</b> <b>0,002</b>	0,043 0,795	0,127 0,440	0,133 0,420	0,311 0,054	0,182 0,268	0,098 0,553
ER (%)	$\rho$ $p$	<b>0,491 *</b> <b>0,002</b>	-0,043 0,795	-0,268 0,099	<b>0,593 *</b> <b>&lt;0,001</b>	0,305 0,059	<b>0,403 *</b> <b>0,011</b>	<b>0,433 *</b> <b>0,006</b>	0,102 0,537	0,029 0,863	-0,018 0,916	0,005 0,974

\* statistički značajno  $p < 0,05$

Spearmanova korelacija: umjerena za  $\rho = 0,3-0,59$ ; Jaka za  $\rho = 0,6-0,89$ ; Vrlo jaka za  $\rho = 0,9-1$ , sve uz  $p < 0,05$

N – jezgra; C - citoplazma

Tablica 8. Povezanost parametara kod HER2 pozitivnih tumora

		Dob	HIF-1 $\alpha$ N	HIF-1 $\alpha$ C	HNE Tumor N	HNE Tumor C	HNE Stroma N	HNE Stroma C	NRF2 Tumor N	NRF2 Tumor C	NRF2 Stroma N	NRF2 Stroma C	Ki-67 (%)
HIF-1 $\alpha$ N	$\rho$ $p$	-0,051 0,857											
HIF-1 $\alpha$ C	$\rho$ $p$	<b>-0,530 *</b> <b>0,045</b>	-0,032 0,910										
HNE Tumor N	$\rho$ $p$	0,224 0,407	-0,313 0,251	0,023 0,936									
HNE Tumor C	$\rho$ $p$	0,139 0,606	-0,375 0,166	0,191 0,489	<b>0,867 *</b> <b>&lt;0,001</b>								
HNE Stroma N	$\rho$ $p$	0,140 0,750	-0,316 0,533	-0,095 0,867	0,452 0,125	0,339 0,188							
HNE Stroma C	$\rho$ $p$	0,358 0,192	<b>-0,462 *</b> <b>0,143</b>	-0,074 0,790	0,572 0,025	0,369 0,108	0,730 0,063						
NRF2 Tumor N	$\rho$ $p$	-0,211 0,446	0,026 0,928	0,135 0,626	<b>-0,562 *</b> <b>0,032</b>	<b>-0,625 *</b> <b>0,015</b>	-0,124 0,800	-0,118 0,681					
NRF2 Tumor C	$\rho$ $p$	0,103 0,714	-0,189 0,495	0,224 0,418	0,003 0,993	0,147 0,597	0,094 1,000	0,351 0,248	0,154 0,580				
NRF2 Stroma N	$\rho$ $p$	0,152 0,586	-0,163 0,556	0,228 0,408	-0,328 0,230	-0,205 0,459	-0,310 0,333	-0,200 0,481	<b>0,591 *</b> <b>0,022</b>	0,234 0,398			
NRF2 Stroma C	$\rho$ $p$	0,310 0,259	-0,213 0,440	0,203 0,463	-0,109 0,696	0,029 0,917	-0,220 0,600	0,086 0,752	0,358 0,189	0,360 0,186	<b>0,795 *</b> <b>0,001</b>		
Ki-67 (%)	$\rho$ $p$	0,300 0,257	-0,202 0,464	0,300 0,273	<b>0,505 *</b> <b>0,048</b>	<b>0,569 *</b> <b>0,024</b>	0,336 0,313	<b>0,491 *</b> <b>0,054</b>	-0,288 0,295	0,271 0,325	-0,269 0,329	-0,039 0,890	0,301 0,254

\* statistički značajno  $p < 0,05$

Spearmanova korelacija: umjerena za  $\rho = 0,3-0,59$ ; Jaka za  $\rho = 0,6-0,89$ ; Vrlo jaka za  $\rho = 0,9-1$ , sve uz  $p < 0,05$

N – jezgra; C - citoplazma

Tablica 9. Povezanost parametara kod luminalni tip B/HER2+ tumora

		HIF-1 $\alpha$ N	HIF-1 $\alpha$ C	HNE Tumor N	HNE Tumor C	HNE Stroma N	HNE Stroma C	NRF2 Tumor N	NRF2 Tumor C	NRF2 Stroma N	NRF2 Stroma C	Veličina tumora (%)	ER (%)
HIF-1 $\alpha$ C	$\rho$ $p$	-0,176 0,361											
HNE Tumor N	$\rho$ $p$	-0,227 0,244	0,213 0,277										
HNE Tumor C	$\rho$ $p$	-0,295 0,128	0,213 0,277	<b>0,589 *</b> <b>0,001</b>									
HNE Stroma N	$\rho$ $p$	-0,299 0,123	-0,159 0,420	0,258 0,176	0,307 0,106								
HNE Stroma C	$\rho$ $p$	<b>-0,430 *</b> <b>0,022</b>	0,038 0,849	0,094 0,628	<b>0,481 *</b> <b>0,008</b>	<b>0,668 *</b> <b>0,000</b>							
NRF2 Tumor N	$\rho$ $p$	-0,289 0,136	-0,100 0,611	-0,398 0,036	-0,355 0,064	-0,192 0,328	-0,196 0,318						
NRF2 Tumor C	$\rho$ $p$	-0,158 0,421	0,043 0,826	<b>-0,504 *</b> <b>0,006</b>	-0,349 0,069	-0,168 0,394	-0,018 0,927	<b>0,669 *</b> <b>&lt;0,001</b>					
NRF2 Stroma N	$\rho$ $p$	-0,218 0,266	-0,232 0,235	<b>-0,404 *</b> <b>0,033</b>	-0,287 0,138	-0,179 0,362	-0,178 0,365	<b>0,658 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,538 *</b> <b>0,003</b>				
NRF2 Stroma C	$\rho$ $p$	-0,220 0,261	0,164 0,403	<b>-0,416 *</b> <b>0,028</b>	-0,114 0,562	-0,072 0,715	0,084 0,670	<b>0,457 *</b> <b>0,013</b>	<b>0,503 *</b> <b>0,005</b>	<b>0,666 *</b> <b>&lt;0,001</b>			
Veličina tumora	$\rho$ $p$	-0,053 0,790	-0,091 0,644	-0,081 0,680	-0,163 0,408	0,215 0,272	0,025 0,901	<b>0,430 *</b> <b>0,022</b>	0,162 0,410	0,256 0,188	0,097 0,623		
PR(%)	$\rho$ $p$	<b>-0,506 *</b> <b>0,005</b>	0,045 0,817	0,018 0,924	0,153 0,428	0,296 0,119	<b>0,426 *</b> <b>0,021</b>	0,006 0,974	0,227 0,237	0,197 0,307	0,314 0,097	-0,096 0,622	0,101 0,597

\* statistički značajno  $p < 0,05$

Spearmanova korelacija: umjerena za  $\rho = 0,3-0,59$ ; Jaka za  $\rho = 0,6-0,89$ ; Vrlo jaka za  $\rho = 0,9-1$ , sve uz  $p < 0,05$

N – jezgra; C - citoplazma

Tablica 10. Povezanost parametara kod trostruko negativnih tumora

		Dob	HIF-1 $\alpha$ N	HIF-1 $\alpha$ C	HNE Tumor N	HNE Tumor C	HNE Stroma N	HNE Stroma C	NRF2 Tumor N	NRF2 Tumor C	NRF2 Stroma N	NRF2 Stroma C
HIF-1 $\alpha$ N	$\rho$ $p$	-0,013 0,945										
HIF-1 $\alpha$ C	$\rho$ $p$	0,094 0,622	-0,089 0,638									
HNE Tumor N	$\rho$ $p$	-0,041 0,832	0,105 0,580	-0,234 0,212								
HNE Tumor C	$\rho$ $p$	-0,054 0,779	-0,270 0,150	-0,043 0,823	<b>0,722 *</b> <b>&lt;0,001</b>							
HNE Stroma N	$\rho$ $p$	0,080 0,674	0,152 0,424	0,134 0,482	-0,245 0,192	-0,204 0,280						
HNE Stroma C	$\rho$ $p$	0,123 0,518	0,040 0,834	0,278 0,137	-0,288 0,123	-0,142 0,456	<b>0,838 *</b> <b>&lt;0,001</b>					
NRF2 Tumor N	$\rho$ $p$	-0,261 0,163	0,126 0,507	-0,164 0,386	0,204 0,280	-0,027 0,888	-0,069 0,715	-0,230 0,221				
NRF2 Tumor C	$\rho$ $p$	<b>-0,422 *</b> <b>0,020</b>	-0,120 0,528	-0,017 0,929	0,223 0,235	0,319 0,086	-0,187 0,324	-0,310 0,095	<b>0,708 *</b> <b>&lt;0,001</b>			
NRF2 Stroma N	$\rho$ $p$	-0,058 0,761	0,127 0,504	0,087 0,648	0,155 0,413	0,022 0,907	0,002 0,993	-0,109 0,567	<b>0,658 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,534 *</b> <b>0,002</b>		
NRF2 Stroma C	$\rho$ $p$	-0,245 0,191	-0,173 0,360	0,204 0,280	-0,004 0,981	0,258 0,168	-0,234 0,213	-0,149 0,431	0,271 0,148	<b>0,606 *</b> <b>&lt;0,001</b>	<b>0,541 *</b> <b>0,002</b>	
Veličina tumora	$\rho$ $p$	-0,110 0,563	-0,311 0,095	<b>0,451 *</b> <b>0,012</b>	<b>-0,486 *</b> <b>0,006</b>	-0,251 0,181	0,199 0,291	0,316 0,089	0,225 0,233	0,147 0,437	0,144 0,448	0,022 0,907
Metastaze u limfnim čvorovima	$\rho$ $p$	-0,306 0,106	-0,024 0,900	0,062 0,748	-0,223 0,245	<b>-0,412</b> <b>0,026</b>	-0,341 0,070	<b>-0,401</b> <b>0,031</b>	0,217 0,259	0,116 0,548	0,138 0,474	-0,006 0,976

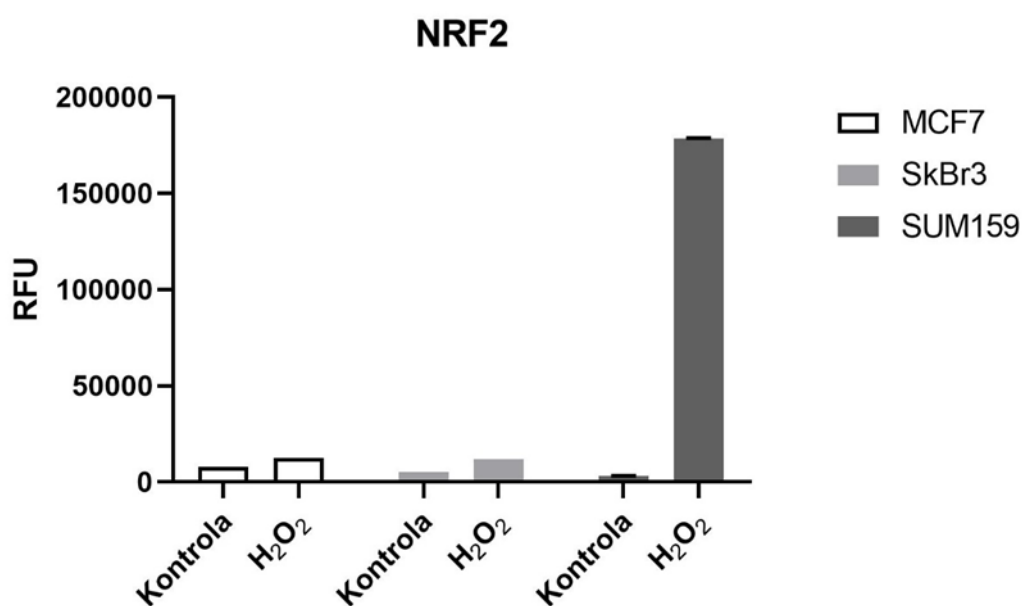
\* statistički značajno  $p < 0,05$

Spearmanova korelacija: umjerena za  $\rho = 0,3-0,59$ ; Jaka za  $\rho = 0,6-0,89$ ; Vrlo jaka za  $\rho = 0,9-1$ , sve uz  $p < 0,05$

N – jezgra; C - citoplazma

#### 4.4. Stanice

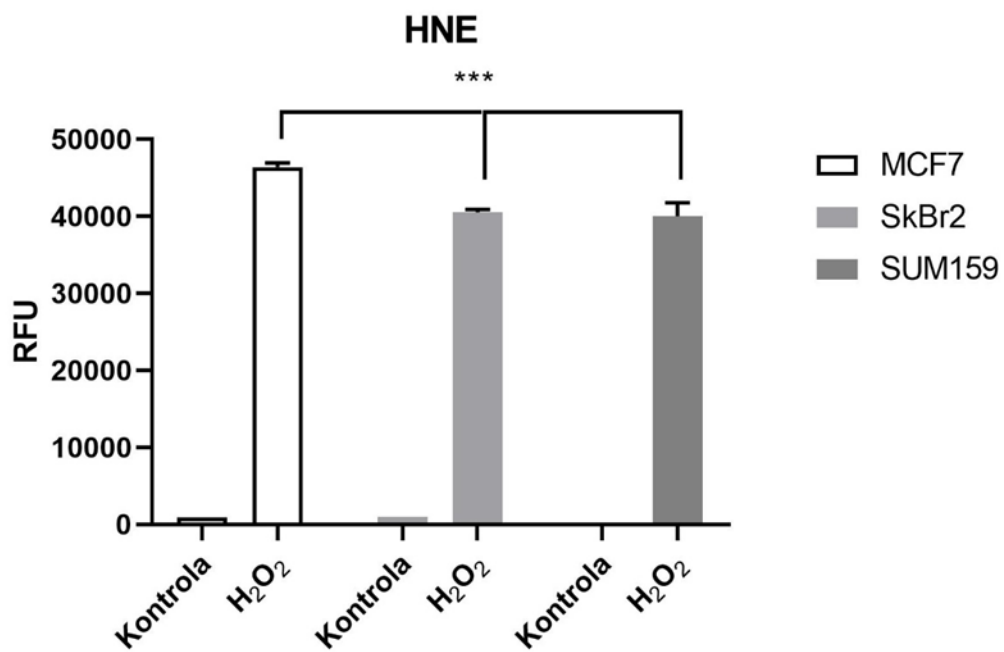
Kapljičnom analizom proteina NRF2 u tri stanične linije tumora dojke, MCF7, SkBr3 i SUM159 (Slika 18.) dobiveno je da MCF7 i SkBr3 linije ne mijenjaju značajno razinu NRF2 nakon izlaganja vodikovom peroksidu, dok SUM159 značajno povećava razinu NRF2 nakon tretmana.



Slika 18. Kapljična analiza razine NRF2 u tri stanične linije tumora dojke.

Analiza HNE-proteinskih konjugata u staničnim linijama tumora dojke prije i poslije izlaganja vodikovom peroksidu (Slika 19) pokazala je da vodikov peroksid značajno povišuje količinu HNE-proteinskih konjugata u svim staničnim linijama. Također, vodikov peroksid značajno povišuje količinu HNE-proteinskih konjugata u MCF7 staničnoj liniji u odnosu na SkBr3 i SUM159 ( $p < 0,001$ ).





Slika 19. Kapljična analiza razine HNE-proteinskih konjugata u tri stanične linije tumora dojke.

## 5. RASPRAVA

Karcinomi dojke još uvijek predstavljaju najzastupljeniji tip karcinoma kod žena, i najčešći su uzrok smrti žena u razvijenim zemljama [6]. U Hrvatskoj, karcinom dojke čini 22% svih novo dijagnosticiranih tumora u žena [51,179]. Problem kod karcinoma dojke leži u činjenici da, iako učestalosti karcinoma pada, to se odnosi na skupinu žena iznad 50 godina, dok je kod mlađih sve više oboljelih i tijekom bolesti je znatno agresivniji [18,50]. Jedna od velikih prepreka kod karcinoma dojke je njegova biologija, jer je karcinom dojke izrazito heterogena skupina tumora, pri čemu se razlikuju 24 histološka tipa i podtipa karcinoma dojke od kojih svaki ima određene histološke, histokemijske, imunohistokemijske i molekularne karakteristike čime ima mnogo faktora koji pridonose određenoj prognozi. Svakako, kao i kod svih tumora, metastaze i otpornost prema terapiji najveća su prepreka u uspješnom liječenju ove(ih) bolesti.

S obzirom na probleme kod uspješnog liječenja tumora i razvoja rezistencije na terapiju cilj ovog rada bio je odrediti kako hipoksija putem prekomjernog stvaranja ROS-a i posljedične lipidne peroksidacije utječe na antioksidacijsku zaštitu kod tumora dojke različitih gradusa i imunofenotipa. Naime, prilikom rasta, tumor se može naći u uvjetima hipoksije. Hipoksija uzrokuje promjene u metabolizmu, kao što su inhibicija  $\beta$ -oksidacije, promjene koje dovode do povećanog stvaranja ROS-a te stimulacija angiogeneze putem aktivacije HIF-1 $\alpha$  transkripcijskog faktora [180]. Navedeni događaji uzrokuju dodatnu prilagodbu tumorskih stanica novonastalim uvjetima te mogu posljedično utjecati i na druge faktore. Posebice se ističe povećanje ROS-a koji može izazvati lipidnu peroksidaciju čime se stvaraju stabilni, ali istovremeno reaktivni produkti s biološkom aktivnošću. Ovi aldehidi, a među njima se posebice ističe HNE, reagiraju sa staničnim signalnim proteinima pri čemu mijenjaju njihovu biološku aktivnost te time pokreću procese koji mogu voditi u adaptaciju na oksidacijski stres [181,182]. Iako su istraživanja pokazala povezanost između pojavnosti HIF-1 $\alpha$  te malignosti tumora dojke [183] nije u potpunosti poznato kako pojava HIF-1 $\alpha$  utječe na metabolizam masnih kiselina, oksidacijski stres te posljedično na lipidnu peroksidaciju i aktivaciju antioksidacijskog faktora NRF2.

Prije početaka svih analiza odabranih faktora ovisno o gradusu te o imunofenotipu tumora, načinjena je analiza pacijentica kako ne bi došlo do krive interpretacije rezultata. Prosječna dob pacijentica je 61,5 godina s medijanom dobi od 63 godine, a pacijentice su u rasponu od 31 do 86 godina, što odgovara literaturnim podacima [184]. Budući se tumori dijele prema histološkim podtipovima (duktalni, lobularni, medularni, papilarni, apokrini), histološkom gradusu i prema prisutnosti/odsutnosti određenih molekula/receptora na površini tumorskih stanica, prvenstveno se to odnosi na hormonske (estrogenske, ER, i progesteronske, PR) receptore u tumorskim stanicama, ali i na prisutnost pojačane izraženosti receptora za epidermalni faktor rasta, HER2, statističkim metodama je provjereno da nema razlike među skupinama po dobnoj raspodjeli. Svaki od faktora podjele tumora ima svoje kliničko ili prognostičko značenje, svi rezultati analizirani su prema podjeli po gradusu tumora i prema imunofenotipu tumora.

Nakon što se provjerila pravilna raspodjela pacijentica po skupinama, pristupilo se analizi raspodjele HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 transkripcijski faktor aktivira se i translocira u jezgru kod niske razine kisika, a sastoji se od dvije podjedinice, HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  [159]. HIF-1 $\beta$  podjedinica je konstitutivno eksprimirana, dok je HIF-1 $\alpha$  je inducirana razinom kisika. Dakle, u normoksigeniranim uvjetima, HIF-1 $\alpha$  je hidroksiliran na prolinu 402 i/ili na prolinu 564 enzimom PHD2 (engl. *prolyl hydroxylase domain protein 2*), koji koristi molekularni kisik i  $\alpha$ -ketoglutarat. Na hidroksilirani HIF-1 $\alpha$  se dalje veže von Hippel-Lindau tumor supresorski protein (engl. *von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*, VHL), čime se aktivira E3 ubikvitin ligaza i HIF-1 $\alpha$  se upućuje na razradnju u proteasomu [159]. U uvjetima hipoksije, nedostatak kisika i stvaranje ROS-a u mitohondrijima uzrokuju nemogućnost ubikvitinacije HIF-1 $\alpha$  te on ostaje u citoplazmi, aktivira se te se translocira u jezgru gdje započinje transkripciju svojih ciljnih gena. Stoga je bitno prilikom analize imunohistokemijskih bojenja razložiti lokalizaciju HIF-1 $\alpha$  u stanici. Rezultati upućuju na trend niže razine HIF-1 $\alpha$  u jezgri nego u citoplazmi, međutim značajna razlika je jedino kod tumora gradusa III (Slika 10.). Također, kod tumora gradusa II značajno je niža razina HIF-1 $\alpha$  u jezgri u usporedbi s tumorima gradusa I, te u citoplazmi u usporedbi s tumorima gradusa I i gradusa III. Ovi rezultati upućuju na moguću smanjenu aktivaciju HIF-1 $\alpha$  u tumorima dojke, pri čemu se HIF-1 $\alpha$  najviše aktivan kod tumora gradusa I, dok s povećanjem gradusa ne dolazi do njegove aktivacije i translokacije. Zanimljivo, HIF-1 $\alpha$  se povećava u tumorima gradusa III u usporedbi s gradusom II samo u citoplazmi, te ovo može ukazivati na hipoksične uvjete kod ovih tumora, uz poremećaj aktivacije.

Gledajući korelacijske odnose HIF-1 $\alpha$  (Tablice 3-5), dobivena je značajna negativna korelacija HIF-1 $\alpha$  s dobi pacijentica kod gradusa I. Ova je korelacija možemo reći i očekivana, obzirom da su pacijentice s karcinomima nižeg histološkog gradusa, a samim time i manje agresivnog fenotipa, nešto starije životne dobi s karcinomi koji su spororastući i slabe mitotske aktivnosti. Osim toga određivanje histološkog gradusa odgovara fenotipskoj manifestaciji karcinoma, čime dio karcinoma gradusa II najvjerojatnije ipak pripada gradusu I. Svakako je važno znati da i agresivniji imunofenotipovi karcinoma dojke kao što su HER2 pozitivni tip i trostruko negativni, mogu pokazivati histološki gradus I ili II, iako su u velikoj većini slučajeva oni ipak histološkog gradusa III, čak i kada su manji od 2 centimetra. Polimorfizam jezgre kao jedna od varijabli u procjeni histološkog gradusa ne pokazuje realno metaboličku i mitotsku aktivnost stanica karcinoma. Ista korelacija HIF-1 $\alpha$  s dobi zabilježena je i u skupini luminalnog tip A karcinoma koji najčešće odgovaraju gradusu I, dobro diferencirani karcinomi, niskog proliferacijskog indeksa i pozitivnog statusa hormonskih receptora.

Obzirom da literaturni podaci upućuju na značajnu ulogu HIF-1 $\alpha$  kod malignih tumora, posebice u segmentu metastaziranja [185], analizirana je njegova razina u odnosu na imunofenotip tumora (Slika 11). Analiza po imunofenotipu tumora pokazala je kako HER2 pozitivni i luminalni tip B/HER2+ imaju trend izjednačenja HIF-1 $\alpha$  u jezgri i citoplazmi, pri čemu je pozitivitet u citoplazmi niži nego kod ostalih tumora. Luminalni tip B i trostruko negativni tumori imaju značajno niži pozitivitet u jezgri u odnosu na citoplazmi, dok je kod luminalnih tip A tumora pirsutan isti trend, ali nije statistički značajan. Ovi rezultati upućuju da je potrebno tumore razvrstavati po imunofenotipu, čime se mogu povezati molekularne značajke tumora s ekspresijom pojedinih molekula. Iz rezultata može se povezati ekspresija HIF-1 $\alpha$  s HER2, pri čemu dolazi do aktivacije i translokacije HIF-1 $\alpha$  u jezgru, a što je karakteristično samo za HER2 pozitivne tumore.

Ovaj podatak je donekle neočekivan, jer se trostruko negativni karcinomi dojke smatraju hipoksičnim zbog česte prisutnosti nekroze u histološkim materijalima. Badowska-Kozakiewicz i Budzik su utvrdili značajno veću izraženost HIF-1 $\alpha$  u trostruko negativnim karcinomima dojke, nego u ostalim imunofenotipovima [186] što u ovom istraživanju nije slučaj. Kao i njihov rezultat, i u našem istraživanju detektirana je značajna korelacija izraženosti HIF-1 $\alpha$  s veličinom tumora, što se uklapa u sliku trostruko negativnih karcinoma dojke. Doduše, korelacija je bila značajna u slučaju citoplazmatske izraženosti HIF-1 $\alpha$  dok je jezgrena izraženost pokazivala tendenciju ka statističkoj značajnosti. Vjerujemo da bi analiza na većem broju uzoraka potvrdila ovaj rezultat.

Budući da hipoksija uzrokuje neravnotežu ROS-a pri čemu se aktivira HIF-1 $\alpha$ , praćena je razina glavnog transkripcijskog faktora koji se aktivira u uvjetima oksidacijskog stresa, NRF2 pri čemu dolazi do aktivacije NRF2-KEAP1 signalnog puta [129]. Slično kao i HIF-1 $\alpha$ , u uvjetima homeostaze NRF2 se nalazi u citoplazmi te je vezan za svoj represor KEAP1 i, kao takav podložan ubikvitin-ovisnoj razgradnji u proteasomima. Međutim, u uvjetima oksidacijskog stresa, elektrofilni (npr. ROS, HNE,...) se vežu za cisteine KEAP1 te mu tim interakcijama mijenjaju konformaciju, pri čemu nova konformacija nije u mogućnosti držati NRF2 vezan te dolazi do njegovog oslobađanja. Slobodni NRF2 translocira se u jezgru u kojoj stvara heterodimere s malim Maf proteinima te se veže za ARE (engl. *antioxidant response element*) promotorskih regija ciljanih gena aktivirajući ih i na taj način štiti stanicu [131]. Što se tiče razine NRF2 u tumorima, on može biti povišen, što se povezuje s visokim razinama ROS-a te izbjegavanjem apoptoze aktivacijom metaboličkih i citoprotektivnih gena [130,144–148]. Kako bi se istražila povezanost između NRF2 i tumora, ispitala se njegova pojavnost ovisno o gradusu tumora (Slika 13). Dodatno, kako bi se ispitao utjecaj tumora na okolno tkivo, analizirala se pojavnost NRF2 i u stromi. Razina NRF2 je značajno niža u stanicama strome nego u stanica tumora, ukazujući na povećanu potrebu tumorskih stanica za ovim transkripcijskim faktorom. Ovaj nalaz indirektno upućuje i na povećanu razinu oksidacijskog stresa u tumorskim stanicama za razliku od stanica strome te ova povećana razina oksidacijskog stresa utječe na transkripciju NRF2. NRF2 ne pokazuje statističku značajnost izraženosti u jezgrama i citoplazmama stanicama tumora ovisno o gradusu tumora. Međutim, mala, ali statistički značajna razlika u pozitivitetu između jezgre i citoplazme nalazi se kod stanica tumora gradusa I i gradusa III. Kod strome tumora uočava se lagani trend većeg pozitiviteta u jezgri nego u citoplazmi, iako nije statistički značajan niti za jedan gradus tumora. Za razliku od citoplazmi strome, kod jezgri stanica strome uočava se porast pozitiviteta kod tumora gradusa III u odnosu na stanice strome kod gradusa II. Analiza korelacija za NRF2, pokazala je značajnu izraženost NRF2 sa starijom dobi pacijentica u stromi kod nižih histoloških gradusa (Tablice 3-5). Nije sigurno pokazuje li u ovom slučaju NRF2 protektivni učinak, obzirom na njegov učinak inhibicije HIF-1 $\alpha$ , ili dolazi do aktivacije srodnih signalnih puteva koji mogu rezultirati tumorskom invazijom gdje NRF2 ima protektivni učinak na stanice tumora. Sličan učinak nije zabilježen kod analize po imunofenotipu (Tablice 6 - 10), osim značajne korelacije izraženog NRF2 u jezgri karcinoma s mlađom dobi pacijentica u trostruko negativnim karcinomima. Ovdje svakako možemo govoriti o njegovom utjecaju na mehanizme izbjegavanje apoptoze. Zanimljivo, kad se tumori razvrstaju po imunofenotipu, u stanicama tumora ne nalazi se nikakva razlika u pozitivitetu na NRF2.

Međutim, stanice strome pokazuju vrlo zanimljive rezultate (Slika 14). Stanice strome luminalnih tip A i luminalnih tip B tumora imaju jednaku razinu NRF2 u jezgri i citoplazmi, dok stanice strome HER2 pozitivnih, luminalnih tip B/HER2+ i trostruko negativnih tumora imaju značajno višu razinu NRF2 u jezgri u odnosu na citoplazmu. Također, ova tri imunofenotipa imaju značajno više NRF2 u jezgri nego stanice strome luminalnih tip A i tip B tumora. Ovaj nalaz je izrazito zanimljiv, iako je naoko suprotan literaturnom navodu, koji navodi da su NRF1 i NRF2 prvenstveno u epitelu stanica tumora dojke i ne nalaze se u stromi [187], treba naglasiti da je u našim rezultatima odvojeno analiziran pozitivitet u jezgri i citoplazmi do je u radu analiziran stanični pozitivitet. Kod stanica tumora pozitivno je oko 40% stanica, dok je kod strome taj broj niži te iznosi oko 20%. Međutim, kod stanica strome HER2 pozitivnih, luminalnih tip B/HER2+ i trostruko negativnih tumora jezgri pozitivitet je oko 40%. Slično ovim rezultatima je i rad na stanicama tumora prostate, koji je našao jednake razine NRF2 u stanicama tumora i strome kod tumorigeneze inducirane arsenom [188]. Međutim, kod tumora debelog crijeva situacija je drugačija. Naime, fosforilirani NRF2 (kao aktivna forma NRF2) Western blotom je dokazan u epitelnim stanicama tumora, dok u stanicama strome nije bio prisutan. Ovakva raspodjela NRF2 veže se uz povećanu ekspresiju MCT1 u stanicama tumora dok se istovremeno povećava MCT4 u strome čime se potiče promjena metabolizma stanica prema obrnutom Warburgovom učinku [189]. Svakako, situacija s NRF2 se dodatno komplicira uzevši u obzir kako je NRF2 glavni antioksidacijski transkripcijski faktor te njegova aktivacija potiče ekspresiju gena odgovornih za obranu od oksidacijskog stresa. U kontekstu tumora i upale, ovo znači da kronična upala koja prati tumore uzrokuje adaptaciju tumorskih stanica, čime se dalje može dovesti i do razvoja adaptacije na terapiju baziranu na oksidacijskom stresu. Svakako, NRF2 je izuzetno važan faktor koji utječe na izuzetno velik broj proteina s ulogom u prijenosu signala, kontrolom staničnog ciklusa, proliferaciju te se njegove interakcije još trebaju istražiti.

KEAP1, inhibitor NRF2, je i njegov glavni regulator. Regulacija KEAP1 se ostvaruje preko cisteina, koji služe kao senzori [138]. Naime, u uvjetima oksidacijskog stres, elektrofilni reagiraju s cisteinima KEAP1 te se stvaraju disulfidni mostovi. Ovi događaji uzrokuju promjenu konformacije KEAP1 te interakcija s NRF2 više nije moguća čime se on otpušta i translocira u jezgru. Kao što je već rečeno, elektrofilni uzrokuju ove konformacijske promjene. Uz ROS i druge se molekule vezati na KEAP1. Tako su reaktivni aldehidi jedni od regulatornih molekula koji aktiviraju NRF2. Reaktivni aldehidi, među kojima je HNE jedan od najistraživanijih i najznačajnijih, produkti su peroksidacije n6 višestruko nezasićenih masnih kiselina. Svoju

reaktivnost HNE ostvaruje preko tri reaktivne skupine: aldehidne, dvostruke veze te hidroksilne skupine. Upravo iz ovog razloga HNE se može reverzibilno vezati na proteine, posebice lizin, arginin, cistein i histidin [8] te na taj način modificirati njihovu aktivnost. Dakle, HNE ne inhibira proteine, već može povećati ili smanjiti njihovu aktivnost, ali i uzrokovati njihovu aktivaciju ili inhibiciju [105]. Upravo iz ovih razloga ne iznenađuje činjenica da HNE utječe na proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu [105]. Naravno, HNE se također može vezati i za cisteine KEAP1 te time uzrokovati otpuštanje i aktivaciju NRF2, te povratno, HNE aktivacijom NRF2 uzrokuje transkripciju gena odgovornih za svoju detoksikaciju [152]. Stoga je od interesa vidjeti koliko se HNE-a nalazi u pojedinim grupama tumora. Kao i kod prethodnih analiza, prvo se analizirala raspodjela HNE-a po gradusu tumora (Slika 16). Pokazalo se da tumori gradusa II i III imaju značajno više HNE-a u citoplazmi nego u jezgri tumora. Također, u citoplazmi tumora gradusa II ima značajno više HNE-a nego kod tumora gradusa I. Ovaj trend vrijedi i za tumore gradusa III iako nije statistički značajno. Stanice strome kod tumora dojke imaju izrazito malo HNE-a što može biti iz nekoliko razloga: jedna je mogućnost da je u stanicama strome HNE vezan većinom na cisteine (moguće glutation), a ne na histidin te nije vidljiv anti-HNE-histidinskim antitijelom, dok je druga mogućnost da stanice strome imaju smanjenu razinu n<sup>6</sup> višestruko nezasićenih masnih kiselina pa nema substrata za nastanak HNE-a. Treća je mogućnost da stanice strome nisu pod velikim oksidacijskim stresom. Stanice strome prate razinu HNE-a u tumorima, pa je najviša razina HNE-a u citoplazmama stanica tumora gradusa II, te je i u citoplazmama stanicama strome tumora gradusa II najviša razina HNE-a. Promatra li se raspodjela HNE po imunofenotipu tumora (Slika 17), slika se mijenja. Tako se u svim imunofenotipovima tumora osim u trostruko negativnim uočava trend niže razine HNE u jezgri, koja je jedino kod luminalnog tip B statistički značajna. Nadalje, najniže razine HNE-a su u jezgrama HER2 pozitivnih i luminalnih tip B/HER2+ tumora u usporedbi s trostruko negativnim tumorima. Tu bi trebalo naglasiti da HNE može reagirati s EGF receptorom, dimerizirati ga i time ga aktivirati [190]. EGF receptor se aktivira kada se EGF veže na EGF receptor te dolazi do dimerizacije i fosforilacije pri čemu se pokreće signalna kaskada EGF [190]. Budući da je HNE-EGFR konjugat dokazan imunoprecipitacijom, ne zna se točna kemija ove veze, tj. nije dokazano na koju je aminokiselinu vezan HNE. Moguće je da našim antitijelom HNE-EGFR konjugat nije vidljiv budući da monoklonsko antitijelo kojim je bojan preparat dokazuje isključivo HNE-histidinske konjugate, pa ostali konjugati HNE-a, koji su HNE-cistein, HNE-arginin i HNE-lizin, ostaju nevidljivi. HER2 pozitivni tumori imaju prekomjernu ekspresiju EGFR te su time posebno osjetljivi na stimulaciju rasta EGF-om. Niža razina HNE-a u ovim tumorima može biti rezultat ili niže razine lipidne peroksidacije ili da je

HNE vezan na receptor, ali na aminokiselinu koja nije histidin pa nije detektiran antitijelom. Druga opcija nije nevjerojatna budući da je glavni put detoksikacije HNE-glutationski konjugat koji se izbacuje iz stanice putem RLIP76 [191]. Također, kao što je već bilo spomenuto, HNE se veže i na cisteine KEAP1 čime aktivira NRF2. Dakle, HNE ima visoki afinitet vezanja na cistein, što je moguće i ciljna aminokiselina u EGFR.

Slično kao i kod NRF2, razina HNE-a je u stanicama strome izuzetno niska. Međutim, kod strome luminalnih tipa A i luminalnih tipa B tumora uočava se relativno viša razina HNE-a posebice u citoplazmi, međutim, statistički se razlikuje samo citoplazma strome luminalnih tipa B u odnosu na oba tipa HER2 pozitivna tumora.

Kako bi se dobila slika o ovisnosti HIF-1 $\alpha$ , NRF2 i HNE-a jedni o drugima provela se analiza korelacija. Kao i prethodne analize, tumori su se podijelili po gradusima (Tablice 3-5), te po imunofenotipu (Tablice 6-10). Kod tumora gradusa I i II nađena je umjerena pozitivna korelacija s dobi, što može ukazivati da je organizam starenjem izložen oksidacijskom stresu što posljedično utječe i diže razinu antioksidacijske zaštite čime i tumori kod ovih pacijentica imaju lagano povišenu antioksidacijsku zaštitu. Kod tumora gradusa I nalazi se korelacija razine HNE-a i NRF2 u jezgri i citoplazmi. Uzme li se u obzir da je NRF2 transkripcijski faktor koji aktivacijom ulazi u jezgru, za očekivati je da će stanice povećati ili smanjiti njegovu količinu ovisno o potrebi za njime. Znajući da HNE uzrokuje konformacijsku promjenu na KEAP1 u čime se NRF2 otpušta i translocira [152,192], ne čudi korelacija između količine HNE-a u tumoru s NRF2 u tumoru. Ono što je zanimljivo da se korelacija odnosi na HNE u jezgri s NRF2 i u citoplazmi i u jezgri, dok HNE u citoplazmi korelira samo s NRF2 u citoplazmi. Uočava se i korelacija između količine NRF2 u jezgrama stanicama tumora s jezgrama stanicama strome, što upućuje da je jednaka potreba za antioksidacijskim odgovorom i kod tumora i kod strome.

Kod tumora gradusa II uočava se vrlo jaka pozitivna korelacija između pojavnosti HIF-1 $\alpha$ , NRF2 i HNE-a u jezgri i citoplazmi, iz čega se zaključuje da dolazi do potrebe povećanog stvaranja transkripcijskih faktora (koji se aktiviraju prisustvom ROS-a), uz istovremenu aktivaciju i translokaciju u jezgru. Pojava je praćena porastom krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, HNE-a, a koji može biti uzrok aktivacije ovih faktora. Umjerena korelacija nalazi se za pojavnost HIF-1 $\alpha$  i HNE u citoplazmi. Međutim, za NRF2 ne nalazi korelacija s HNE-om iako je već pokazano kako se NRF2 može aktivirati i HNE-om [152].



Zanimljivo, što je veći gradus tumora, to je manji broj korelacija između strome i tumora za promatrane parametre. Ne smijemo zaboraviti da je tkivo dojke inače relativno dobro prokrvljeno te je parcijalni tlak kisika viši od 60 mmHg. Da bi se aktivirali mehanizmi hipoksije potrebna je niska razina kisika (<10 mmHg) [174]. Kako maligna transformacija nije brz proces jasno je da u ranim fazama rasta karcinomi imaju veću interakciju s okolinom. Tijekom vremena dolazi do promjene okoline djelovanjem karcinoma, raznih faktora rasta i matriks metaloproteinaza pomoću kojih stanice karcinoma remodeliraju mikrookoliš kako bi omogućile vlastito preživljenje i proliferaciju. Stoga je možda i logičan naš rezultat. Pa tako, korelacija tumor-stroma kod HNE-a odnosi se na graduse I i II, dok je kod HIF-1 $\alpha$  samo kod gradusa I. Ovi rezultati korelacije su zanimljivi budući da HNE, kao reaktivni aldehid, produkt lipidne peroksidacije, i biljeg razine oksidacijskog stresa, može aktivirati NRF2 [152], a u ovom slučaju ne nalazi se povezanost.

Kod tumora gradusa III dobiveno je manje korelacija nego kod gradusa I i II, međutim, kao i kod spomenutih, nalaze se korelacije između jezgre i citoplazme i kod stanica tumora i kod stanica strome za pojavnost HNE-a i NRF2. Umjerena negativna korelacija pokazana je za pojavnost HNE-a u citoplazmi stanica tumora s HIF-1 $\alpha$  u jezgrama tumora. Negativni trend, no neznačajan, uočava se kod tumora gradus III i za HNE u citoplazmi stanica strome, kao i za NRF2 u jezgri stanica tumora te u jezgri i citoplazmi stanica strome. Zanimljivo je spomenuti i negativnu korelaciju, koja nije statistički značajna između pojavnosti HNE-a i NRF2 u jezgrama tumora. Ovaaj iznenađujući trend može se objasniti antigenom koje prepoznaje anti-HNE antitijelo. Naime, to je monoklonsko antitijelo koje prepoznaje HNE vezan na histidin u proteinu, a NRF2 se aktivira vezanjem HNE-a cistein u KEAP1. Rezultat bojanja HNE-a ukazuje na nepovezanost HNE-a vezanog na histidin s NRF2, no to ne znači da ova veza nije beznačajna. Naime, HNE-histidinski konjugat ima biološki značaj budući je histidin često ima ulogu u regulaciji funkcije ili u samoj funkciji proteina [78,193]. Unatoč ovim razlikama vezanja HNE-a na cistein KEAP1 i antitijela na HNE-histidinske konjugate može se pretpostaviti da se HNE jednakim afinitetom veže za histidin cistein i lizin proteina, što su pokazali Hauck i suradnici [194]. Zanimljivo, prisutna je korelacija između NRF2 u stanicama strome i tumora slično kao i kod tumora gradusa I i gradusa II, čime možemo zaključiti da je potreba za aktivacijom ovog antioksidacijskog transkripcijskog faktora, tj. stres jednak kod tumora i strome.

Sljedeće je analizirana korelacija ovisno o imunofenotipu tumora. Kod luminalnih tip A tumora prisutna je umjerena i jaka pozitivna korelacija između pojavnosti HIF-1 $\alpha$ , NRF2 i HNE-a u

jezgri i citoplazmi stanica tumora. Kod ovog imunofenotipa tumora nije prisutna korelacija HIF-1 $\alpha$  niti s HNE-om niti s NRF2. HNE u citoplazmi stanica tumora korelira s pojavom HNE-a u jezgri i u citoplazmi stanica strome. NRF2 i u citoplazmi i u jezgri stanica tumora korelira s NRF2 u jezgri stanica strome. Dodatno, pojavnost HNE-a u jezgrama stanica tumora korelira s pojavnosti NRF2 u jezgrama i citoplazmi stanica tumora što potvrđuje vezu između oksidacijskog stresa u stanicama tumora i posljedične lipidne peroksidacije te aktivacije antioksidacijskog odgovora. Uz navedeno, rezultati ukazuju na povezanost oksidacijskog stresa u stanicama tumora i strome čime se aktivira i antioksidacijski odgovor putem NRF2 u tumoru i stromi.

Sljedeći trend luminalnih tip A tumora, luminalni tip B tumori također pokazuju korelaciju između jezgri i citoplazmi stanica tumora i strome za HIF-1 $\alpha$ , HNE te NRF2. Dodatno je zanimljivo što i HNE i NRF2 u jezgrama stanica tumora koreliraju s jezgrama stanica strome, te u citoplazmama stanica tumora koreliraju s citoplazmama stanica strome. Ovo upućuje da i tumor i stroma imaju jednaku potrebu za (aktivacijom) NRF2, i da se to vrlo vjerojatno odvija putem oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije. Pogledaju li se međusobne korelacije, NRF2 u citoplazmi tumora korelira s HIF-1 $\alpha$  i HNE-om u citoplazmi tumora. Ovu korelaciju ne prati i aktivacija NRF2 ili HIF-1 $\alpha$ , jer se ne uočava korelacija između njih u jezgri tumora. Za razliku od luminalnih tip A tumora, kod luminalnih tip B tumora HNE u jezgri tumora i strome te u citoplazmi strome korelira s količinom ER. U skladu s ovim rezultatima su i rezultat Balestrieri i sur. [195] koji su pokazali kako povišene vrijednosti TBARS-a (tiobarbiturna kiselina), derivata drugog reaktivnog aldehida, MDA, korelira s povećanom ekspresijom ER u ranim stadijima tumora dojke. Autori predlažu da bi izloženost visokim dozama hormona (estrogena) prije progresije tumora mogla biti uzrokom modifikacija signalnog puteva estrogena lipidnom peroksidacijom (tj. njenim krajnjim produktima). Zanimljivo, jedino kod luminalnih tip B tumora HNE u jezgri i citoplazmi stanica i tumora i strome korelira s dobi. Starenjem se kod ljudi povisuje razina oksidacijskih parametara te je jedna od teorija starenja da upravo nemogućnost nošenja organizma s oksidacijskim stresom uzrokuje starenje sa svim njegovim posljedicama [196]. Za tumore dojke se zna da maligniji oblici zahvaćaju mlađe žene, do starenjem raste broj ER pozitivnih s blažim tijekom bolesti, kao paradigma dolazi činjenica da učestalost tumora dojke znatno pada nakon 80-te godine života [197]. Također, na miševima je pokazano da biološko starenje koje vezano uz pojavu oksidacijskog stresa mijenja agresivnost tumora dojke [198].

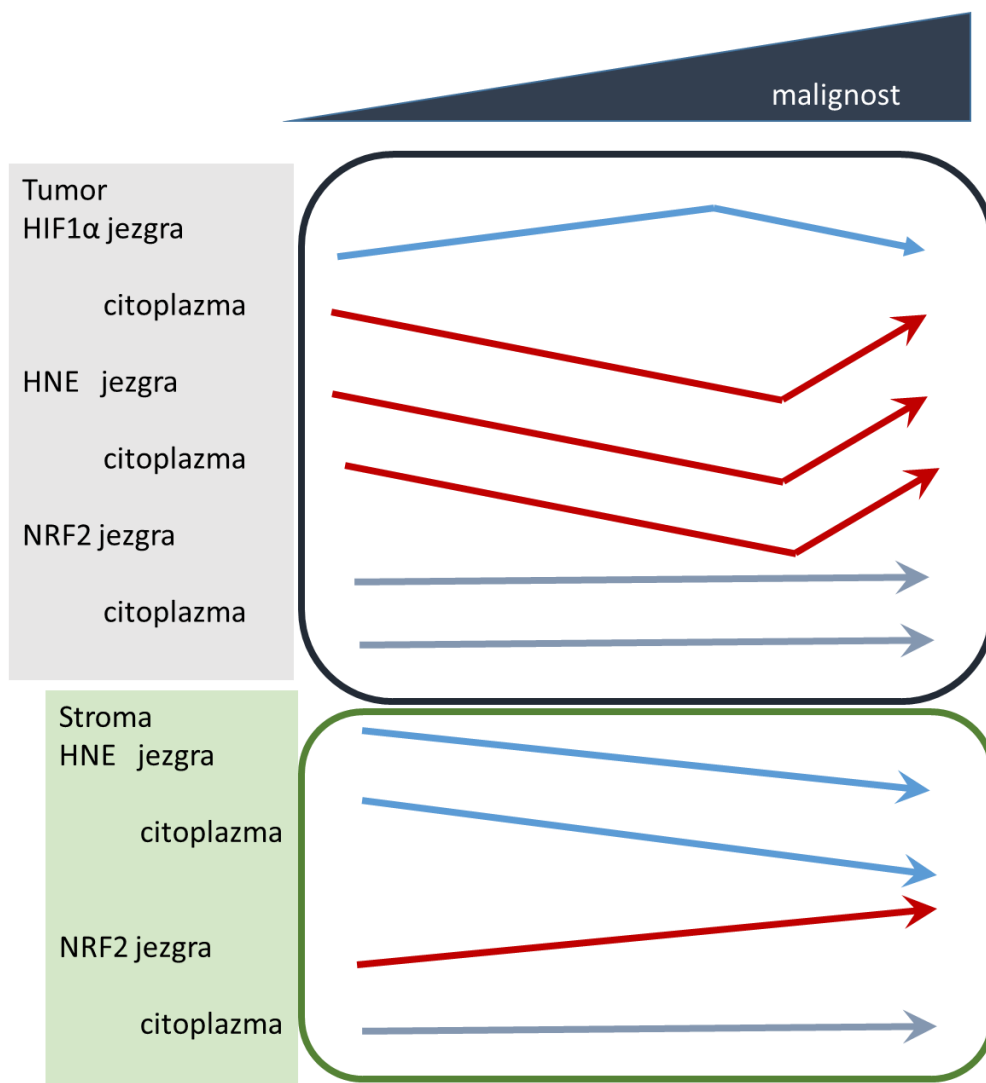
Kod HER2 pozitivnih tumora, dakle, ER i PR negativnih, samo s prekomjernom ekspresijom HER2 uočava se korelacija HNE-a u jezgrama i citoplazmama stanica tumora te korelacija

NRF2 u jezgrama i citoplazmama stanica strome. Gledajući korelacije između stanica strome i tumora, NRF2 u jezgrama stanica tumora korelira s jezgrama stanica strome. Također, uočava se korelacija između HNE-a u stanicama tumora i Ki67, faktora proliferacije. Zna se da HNE u niskim koncentracijama može potaknuti proliferaciju stanica [108] potičući aktivaciju nekoliko signalnih puteva, među kojima i EGFR. Moguće je da HNE potiče proliferaciju djelujući posredno ili neposredno na Ki67 ili na njegovu ekspresiju. Kod HER2 pozitivnih tumora nailazimo na negativnu korelaciju između NRF2 u jezgrama tumora te HNE-a u stanicama tumora (i u jezgri i u citoplazmi). Budući da HNE djeluje na KEAP1 mijenjajući mu konformaciju te tako direktno uzrokuje otpuštanje NRF2 [199] očekivali bi da viša razina HNE-a u citoplazmi uzrokuje otpuštanje NRF2 s KEAP1 te njegovu translokaciju u jezgru. Već je spomenuto da bi se HNE trebao ravnomjerno rasporediti po cisteinu, lizinu i histidinu u proteinima [194] međutim to ne mora nužno biti tako u svim uvjetima. HNE je reverzibilno vezan na ove aminokiseline te ovisno o uvjetima mikrookoliša (pogotovo ovisno o pH) može difundirati, vezati se jače ili slabije na određene aminokiseline [111]. Ovu negativnu korelaciju HNE-a s NRF2 prati i negativna korelacija između HNE-a u citoplazmi strome i HIF-1 $\alpha$  u jezgri tumora što možu upućivati na sličan način regulacije ova dva transkripcijska faktora regulirana ROS-om, odnosno narušenom redoks ravnotežom.

Tumori koji su luminalni tip B i istovremeno HER2 pozitivni pokazuju vrlo slične korelacije luminalnim tip B tumorima (za HNE i NRF2 između jezgri i citoplazmi u stanicama i tumora i strome) kao i korelacije između strome i tumora kod HNE-a i NRF2. Međutim, također se uočavaju sličnosti s HER2 pozitivnim tumorima kod negativne korelacije između HNE-a i NRF2 u jezgrama i citoplazmama stanica tumora i strome. U ovoj skupini se pojavila jedina značajna korelacija hormonskih receptora s istraživanim proteinima. HIF-1 $\alpha$  češće je izražen u jezgri karcinoma kod slabije izraženih receptora za progesteron (PR). Ovakav rezultat moguće je objasniti na razini raspodjele karcinoma u imunofenotip prilikom analize imunohistokemijske reakcije, obzirom da razina PR nije ključna u definiranju luminalnog tip B/HER2+ imunofenotipa, već je ključno da pozitivan status HER2 receptora uključuje i pozitivan receptor za estrogen u više od 1% stanica karcinoma. Istovremeno, već je poznato da HER2 pozitivni karcinomi dojke imaju slabije izražene PR, ali oni nemaju veliki klinički značaj, što bi se u biološkom kontekstu svakako trebalo uzeti u obzir. Također, uočava se negativna korelacija između HNE-a u citoplazmama stanica strome i HIF-1 $\alpha$  u jezgrama stanica tumora, a koja nije uočena u ostalim imunofenotipovima. Ovakvi rezultati očekivani su za ovu skupinu jer, gledano s molekularnog gledišta, ova skupina pokazuje najveću heterogenost. Kao

što je već rečeno, u ovu skupinu svrstavaju se svi HER2 pozitivni i ER pozitivni karcinomi neovisno o izraženosti PR ili indeksu proliferacije Ki-67.

Kod trostruko negativnih tumora uočava se korelacija između HIF-1 $\alpha$ , HNE i NRF2 u jezgrama u odnosu na citoplazme stanica tumora i strome. Gledajući odnos tumora i strome, za NRF2 se uočava korelacija u jezgrama te u citoplazmama. Kod ove skupine tumora, koja je najmalignija po prognozi uočava se pozitivna korelacija HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi tumora te negativna korelacija HNE-a u jezgri tumora s veličinom tumora, kao i negativna korelacija HNE-a u citoplazmama strome i tumora s brojem metastaza u limfnim čvorovima.



Slika 20. Shematski prikaz dobivenih rezultata

Konačno, kada se rezultati sagledaju skupno (Slika 20), vidi se da se NRF2, antioksidacijski transkripcijski faktor ne mijenja s malignošću tumora, ali istovremeno je prisutan u 50% do 60 posto tumorskih stanica, te se podjednako raspoređuje u jezgri i citoplazmi. Za razliku od njega, HNE pada kod HER2 pozitivnih tumora te ponovno raste kod trostruko negativnih tumora. Ovaj nalaz ukazuje da su tumori pod oksidacijskim stresom. Kombinira li se ovaj nalaz s nalazom NRF2 i HNE-a u stromi, dolazi se do izražene potrebe za antioksidacijskom zaštitom što se očituje povišenjem razine NRF2 u stromi sukladno povećanjem malignosti. Istovremeno u stromi pada razina HNE-a s malignosti. Iako bi očekivali povećanje HNE-a kao biljega oksidacijskog stresa, ovo nije suprotan nalaz. Naime, HNE se veže na KEAP1 i time oslobađa NRF2 od inhibicije te se translocira u jezgru i započinje transkripciju antioksidacijskih gena [129]. Među genima koji se transkribiraju su i geni potrebni za sintezu glutaciona, što znači da aktivacijom HNE-a on potiče i svoju detoksikaciju. Uzevši to u obzir, više razine NRF2 u stromi znači da su kod malignih tumora ove stanice pod kroničnim stresom te je njihova transkripcija prilagođena stresnim uvjetima te unatoč višoj razini NRF2 one imaju dovoljno antioksidansa za održavanjem nižih razina HNE-a, odnosno lipidne peroksidacije.

Jedna od zanimljivosti je da, unatoč stalnim i relativno visokim razinama NRF2 trostruko negativni tumori (najmaligniji) imaju porast HNE pozitiviteta. Moguće je da kod ovih tumora dolazi do oksidacijskog stresa kojeg stanice uspješno rješavaju. Jedna od mogućnosti, pogotovo obzirom na NRF2 je konjugacija HNE-a na glutation i njegovo izbacivanje iz stanice. Također, ovaj scenarij bi mogao objasniti porast NRF2 u stanicama strome kod ovih tumora jer bi HNE koji izbacuju tumori mogao biti poticaj za održavanje više razine NRF2 u stromi, čime pak posljedično dolazi do smanjenja unutar staničnog HNE- u stanicama strome.

Gledajući moguću interakciju HIF-1 $\alpha$  i HNE, vidimo suprotne trendove, smanjenje HNE-a prati povećanje HIF-1 $\alpha$  u jezgrama stanica tumora. Pokazano je da HNE može utjecati na stabilizaciju HIF-1 $\alpha$  te time potaknuti transkripciju njegovih gena [200]. Uloga HIF-1 $\alpha$  je u neoangiogenezi, a za HNE je pokazano kako potiče angiogenezu kod tumora dojke [201] stoga nije neobično da su HNE i HIF-1 $\alpha$  u korelaciji. Sumarno, rezultati upućuju na vrlo važnu vezu, često zanemarivanu u istraživanjima, a to je veza između tumora i strome. Zna se da tumor djeluje na stromu raznim faktorima te preko oksidacijskog stresa čime se posljedično potiče antioksidacijski odgovor strome. Ova interakcija ide do mjere da tumor mijenja normalne fibroblaste i adipocite u svojm okolišu te one postaju „tumor-pridruženi“ fibroblasti i adipociti [202,203]. Ove stanice prolaze takozvani obrnuti Warburgov učinak [204] po kojem tumorske

stanice potiču stanice strome, fibroblaste i adipocite na lučenje laktata i drugih metabolita kojima se potpomaže rast tumora. Dosadašnja istraživanja koncentrirala su se na pronalaženje biljega ovih stanica za moguću primjenu kao biomarkera [205]. Također, istraživanja su pokazala kako obrnuti Warburgov učinak prati prekomjerna transkripcija gena vezanih uz glikolizu, HIF ciljnih gena [206], NF $\kappa$ B ciljnih gena [207]. Dobiveni rezultati pokazuju da su i tumorske i stromalne stanice pod podjenakim oksidacijskim stresom i posljedičnom lipidnom peroksidacijom čime se potiče antioksidacijska zaštita putem NRF2 u stromi. Kako je NRF2 transkripcijski faktor za gene sintetskog puta glutaciona [208], moguće je da se time štite i tumor i stroma na način da stanice strome drže pod kontrolom izvanstanični oksidacijski stres. Ova mogućnost tumoru pruža lagani stimulans za proliferaciju niskim razinama oksidacijskog stresa, a bez oštećenja, što može voditi u rezistenciju na terapiju. Ovo je bitan faktor pogotovo kod trostruko negativnih tumora čija je terapija i bazirana na oksidacijskom stresu.

## 6. ZAKLJUČCI

HIF-1 $\alpha$  je značajno niži u jezgri nego u citoplazmi tumora gradusa III

1. HIF-1 $\alpha$  u jezgrama tumora gradusa I značajno je niži od tumora gradusa II, u jezgrama tumora gradusa III je sličan trend kao u tumorima gradusa II
2. HIF-1 $\alpha$  ima značajno najnižu razinu u citoplazmama tumora gradusa II
3. HIF-1 $\alpha$  je značajno niži u jezgri nego u citoplazmi luminalnog tip B i trostruko negativnih tumora, dok HER2 pozitivni i luminalni tip B/HER2+ imaju trend izjednačenja HIF-1 $\alpha$  u jezgri i citoplazmi
4. HER2 pozitivni i luminalni tip B/HER2+ imaju niži HIF-1 $\alpha$  pozitivitet u citoplazmi nego ostali tumori
5. NRF2 je značajno niži u jezgrama tumora gradusa I i gradusa III, dok je kod stanica strome značajno niži u jezgrama kod tumora gradusa II nego kod gradusa III
6. Nema razlike u razini NRF2 među jezgrama i citoplazmama tumora svih imunofenotipa
7. Stanice strome imaju jednaku razinu NRF2 pozitiviteta u jezgri i citoplazmi kod luminal A i luminal B tumora, dok je u jezgrama strome kod HER2 pozitivnih tumora, luminalni tip B/HER2+ i trostruko negativnih tumora povišen u odnosu na citoplazmu, i u odnosu na citoplazmu strome luminal A i luminal B tumora
8. Tumori gradusa II i III imaju značajno više HNE-a u citoplazmi nego u jezgri tumora
9. Stanice tumora gradusa II imaju značajno više HNE-a u citoplazmi od stanica tumora gradusa I
10. U stanicama strome je izrazito niski HNE pozitivitet, s time da kod tumora gradusa II imaju značajno viši pozitivitet u citoplazmi od stanica strome kod tumora gradusa I i III
11. Iako se u svim imunofenotipovima tumora osim u trostruko negativnim uočava trend niže razine HNE u jezgri u odnosu na citoplazmu, samo kod luminalnih tip B tumora ova je razlika statistički značajna
12. Najniže razine HNE-a su u jezgrama HER2 i luminalnih tip B/HER2+ tumora i značajno je različito prema trostruko negativnim tumorima, dok je u citoplazmama najniža razina HNE-a kod luminalnih tip B/HER2+ tumora i značajno je različito prema luminalnim tip B tumorima
13. U stanicama strome je izrazito niski HNE pozitivitet kod svim tumora različitih imunofenotipa, iako je u citoplazmama strome luminalnih tip A i luminalnih tip B

tumora statistički značajno viša razina HNE-a u usporedbi sa stromom HER2 pozitivnih i luminalnih tip B/HER2+ tumora

14. Gledajući odnos jezgra-citoplazma, HNE i NRF2 koreliraju kod svih gradusa tumora na ovoj relaciji i u tumoru i u citoplazmi, a HIF-1 $\alpha$  samo kod gradusa I, gledajući relaciju tumor stroma, NRF2 koreira kod svih radusa tmuora dok HNE korelira kod gradusa I i II, a HIF-1 $\alpha$  samo kod gradusa I
15. Gledajući međusobne donose pormatranih parametara, HNE- u jezgrama tumora korelira s NRF2 u jezgri i citoplazmi tumora, a HNE- u tumoru i HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi koreliraju kod tumora gradusa II
16. Kod svih imunofenotipova prisutna je korelacija jezgre i citoplazme prisutna je za HNE u tumoru i stromi te NRF2 u tumoru i stromi, a za HIF-1 $\alpha$  kod luminalnih tip A i luminalnih tip B tumora.
17. Kod luminalnih tip B tumora HNE u citoplazmi tumora korelira s NRF2 i HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi tumora te a veličinom tumora, dok HNE u stromi korelira s ER
18. Kod HER2 pozitivnih tumora HNE u citoplazmi strome je u negativnoj korelaciji s HIF-1 $\alpha$  u jezgri tumora, dok su HNE u tumoru i HNE u citoplazmi strome tumora u korelaciji s Ki-67.
19. Kod luminalnog tip B/HER2+ tumora HNE u jezgri tumora je u negativnoj korelaciji s NRF2 u stromi te u jezgri tumora.
20. Kod trostruko negativnih tumora veličina tumora je u pozitivnoj korelaciji s HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi, a negativnoj korelaciji s HNE-om u jezgrama tumora. Uz to HNE u citoplazmama i tumora i strome je u negativnoj korelaciji s brojem metastaza u limfnim čvorovima.



## 7. LITERATURA

1. WHO | Breast cancer Available online: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> (accessed on Sep 30, 2020).
2. Hall, J.E.; Guyton, A.C. *Guyton AC, Hall JE. Cortical and brain stem control of motor function In: Guyton AC, Hall JE, editors. Textbook of Medical Physiology. Eleventh ed. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders; 2011. p. 685-97; 12th ed.; Philadelphia, PA : Saunders/Elsevier, c2011, 2011; ISBN 9781437726749.*
3. Khan, S.A.; Rogers, M.A.M.; Obando, J.A.; Tamsen, A. Estrogen Receptor Expression of Benign Breast Epithelium and Its Association with Breast Cancer. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 993–997.
4. Oh, H.; Eliassen, A.H.; Beck, A.H.; Rosner, B.; Schnitt, S.J.; Collins, L.C.; Connolly, J.L.; Montaser-Kouhsari, L.; Willett, W.C.; Tamimi, R.M. Breast cancer risk factors in relation to estrogen receptor, progesterone receptor, insulin-like growth factor-1 receptor, and Ki67 expression in normal breast tissue. *npj Breast Cancer* **2017**, *3*.
5. Key, T.J.A.; Pike, M.C. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1988**, *24*, 29–43.
6. Fisher, B.; Costantino, J.P.; Wickerham, D.L.; Redmond, C.K.; Kavanah, M.; Cronin, W.M.; Vogel, V.; Robidoux, A.; Dimitrov, N.; Atkins, J.; et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1371–1388.
7. Izrailit, J.; Reedijk, M. Developmental pathways in breast cancer and breast tumor-initiating cells: therapeutic implications. *Cancer Lett.* **2012**, *317*, 115–26.
8. Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11*, 81–128.
9. Semenza, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **2000**, *88*, 1474–1480.

10. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Osnove histologije - Udžbenik i atlas*; 10th ed.; Školska knjiga, 2006; ISBN 978-953-0-31564-8.
11. Bocchinfuso, W.P.; Korach, K.S. Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1997, 2, 323–334.
12. Kumar, V.; Cotran, R.; Robbins, S. *Osnove patologije*; 5th ed.; Školska knjiga, 2000; ISBN 978-953-0-31510-5.
13. Jakić-Razumović, J. Bolesti dojke. In *Medicinska naklada. PATOLOGIJA, 4. izd.*; Damjanov, I., Seiwerth, S., Jukić, S., Nola, M., Eds.; Medicinska naklada, 2008 ISBN 978-953-176-676-0.
14. Boecker, W. *Preneoplasia of the breast : a new conceptual approach to proliferative breast disease*; Böcker, W., Ed.; Saunders Elsevier, 2006; ISBN 9780702028922.
15. *WHO Classification of Tumours of the Breast*; Lakhani, S., Ellis, I., Schnitt, S., Tan, P., van de Vijver, M., Eds.; 4th ed.; WHO Press, 2012; ISBN ISBN-13 9789283224334.
16. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, 100, 57–70.
17. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. a Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144, 646–74.
18. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **2019**, 69, 7–34.
19. Cancer Statistics Center Analysis Tool | American Cancer Society - Cancer Facts & Statistics Available online:  
[https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?\\_ga=2.216558614.1063151167.1585827338-1034209328.1573561306#!/data-analysis/module/IHmUxaax?type=barGraph](https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.216558614.1063151167.1585827338-1034209328.1573561306#!/data-analysis/module/IHmUxaax?type=barGraph) (accessed on Apr 2, 2020).
20. Decmann, A.; Patócs, A.; Igaz, P. Overview of Genetically Determined Diseases/Multiple Endocrine Neoplasia Syndromes Predisposing to Endocrine Tumors. *Exp. Suppl.* 2019, 111, 105–127.
21. Plevová, P. An update on inherited colon cancer and gastrointestinal polyposis. *Klin.*

- Onkol.* **2019**, *32*, 2S97-2S108.
22. Campian, J.; Gutmann, D.H. CNS tumors in neurofibromatosis. *J. Clin. Oncol.* 2017, *35*, 2378–2385.
  23. Ortiz, M. V.; Dunkel, I.J. Retinoblastoma. *J. Child Neurol.* **2016**, *31*, 227–236.
  24. Inoue, M.; Tsugane, S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. *Postgrad. Med. J.* 2005, *81*, 419–424.
  25. Zhang, H.Z.; Jin, G.F.; Shen, H.B. Epidemiologic differences in esophageal cancer between Asian and Western populations. *Chin. J. Cancer* 2012, *31*, 281–286.
  26. Hakulinen, T. *Cancer Incidence in Five Continents Vol. VII.*; Hakulinen, T., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 2000; Vol. 19; ISBN 92 832 2143 5.
  27. Gupta, S.; Wang, F.; Holly, E.A.; Bracci, P.M. Risk of pancreatic cancer by alcohol dose, duration, and pattern of consumption, including binge drinking: A population-based study. *Cancer Causes Control* **2010**, *21*, 1047–1059.
  28. Vanella, G.; Archibugi, L.; Stigliano, S.; Capurso, G. Alcohol and gastrointestinal cancers. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2019**, *35*, 107–113.
  29. Cogliano, V.J.; Baan, R.; Straif, K.; Grosse, Y.; Lauby-Secretan, B.; Ghissassi, F. El; Bouvard, V.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Freeman, C.; et al. Preventable exposures associated with human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, *103*, 1827–1839.
  30. Krówczyńska, M.; Wilk, E. Asbestos exposure and the mesothelioma incidence in Poland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*.
  31. Tronko, M.; Mabuchi, K.; Bogdanova, T.; Hatch, M.; Likhtarev, I.; Bouville, A.; Oliynik, V.; McConnell, R.; Shpak, V.; Zablotska, L.; et al. Thyroid cancer in Ukraine after the Chernobyl accident (in the framework of the Ukraine-US thyroid project). *J. Radiol. Prot.* **2012**, *32*, N65.
  32. Stawczyk, M.; Łakis, A.; Ulatowska, A.; Szczerkowska-Dobosz, A. Evaluation of risk of tanning addiction in a selected population of women aged 15-30. *Dermatology Rev. Dermatologiczny* **2011**, *98*, 305–311.
  33. Lewandowska, A.M.; Rudzki, M.; Rudzki, S.; Lewandowski, T.; Laskowska, B.

- Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2019, 26, 1–7.
34. Ng, S.P.; Pollard, C.; Kamal, M.; Ayoub, Z.; Garden, A.S.; Bahig, H.; Gunn, G.B.; Frank, S.J.; Skinner, H.D.; Phan, J.; et al. Risk of second primary malignancies in head and neck cancer patients treated with definitive radiotherapy. *Precis. Oncol.* **2019**, 3, 1–6.
  35. Gallagher, M.P.; Kelly, P.J.; Jardine, M.; Perkovic, V.; Cass, A.; Craig, J.C.; Eris, J.; Webster, A.C. Long-term cancer risk of immunosuppressive regimens after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, 21, 852–858.
  36. Bjerkehagen, B.; Smstuen, M.C.; Hall, K.S.; Skjeldal, S.; Smeland, S.; Foss, S.D. Why do patients with radiation-induced sarcomas have a poor sarcoma-related survival. *Br. J. Cancer* **2012**, 106, 297–306.
  37. Campbell, M.K.; Farrell, S.O. *Biochemistry*; Brooks/Cole, Cengage Learning, 2012; ISBN 0840068581.
  38. Ahmadi Ghezeldasht, S.; Shirdel, A.; Ali Assarehzadegan, M.; Hassannia, T.; Rahimi, H.; Miri, R.; Rahim Rezaee, S.A. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) oncogenesis: Molecular aspects of virus and host interactions in pathogenesis of adult T cell leukemia/lymphoma (ATL). *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2013, 16, 179–195.
  39. Chang, Y.; Moore, P.S.; Weiss, R.A. Human oncogenic viruses: Nature and discovery. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, 372.
  40. Park, J.Y.; Forman, D.; Waskito, L.A.; Yamaoka, Y.; Crabtree, J.E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-positive infections and global variations in gastric cancer. *Toxins (Basel)*. **2018**, 10.
  41. Cooper, G.M. *The Cell*; 2nd ed.; Sinauer Associates, 2000; ISBN ISBN-10: 0-87893-106-6.
  42. Weinberg, R.A. Tumor suppressor genes. *Science (80-. )*. **1991**, 254, 1138–1146.
  43. Blagih, J.; Buck, M.D.; Vousden, K.H. p53, cancer and the immune response. *J. Cell Sci.* 2020, 133.

44. Shaw, P.H. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol. Res. Pract.* **1996**, *192*, 669–675.
45. D’Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 2019, *43*, 582–592.
46. Damjanov, I.; Seiwerth, S.; Jukić, S.; Nola, M. *Patologija*; 5th ed.; Medicinska naklada: Zagreb, 2017; ISBN 978-953-176-813-9.
47. Wong, R.S.Y. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2011, *30*, 87.
48. Anderson, M.A.; Huang, D.; Roberts, A. Targeting BCL2 for the Treatment of Lymphoid Malignancies. *Semin. Hematol.* **2014**, *51*, 219–227.
49. Clark, S.K. Management of genetically determined colorectal cancer. *Surgeon* 2019, *17*, 165–171.
50. American Cancer Society *Statistics Breast Cancer Occurrence & Breast Cancer Risk Factors* ; 2019;
51. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424.
52. Šekerija, M.; Bubanović, L.; Novak, P.; Veltruski, J.; Glibo, M.; Stavinoha, M.; Sarajlić, G. *Osoblje Registra za rak Hrvatske i suradnici u izradi biltena: Croatian National Cancer Registry staff and technical associates*; Zagreb, 2017;
53. Borovečki, A.; Braš, M.; Brkljačić, B.; Canki-Klain, N.; Dedić Plavetić, N.; Grahovac, B.; Haller, H.; Jokić Begić, N.; Kirac, I.; Levanat, S.; et al. *Smjernice za genetičko savjetovanje i testiranje na nasljedni rak dojke i jajnika*; Zagreb, 2017;
54. Angus, L.; Smid, M.; Wilting, S.M.; van Riet, J.; Van Hoeck, A.; Nguyen, L.; Nik-Zainal, S.; Steenbruggen, T.G.; Tjan-Heijnen, V.C.G.; Labots, M.; et al. The genomic landscape of metastatic breast cancer highlights changes in mutation and signature frequencies. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 1450–1458.
55. Nik-Zainal, S.; Davies, H.; Staaf, J.; Ramakrishna, M.; Glodzik, D.; Zou, X.;

- Martincorena, I.; Alexandrov, L.B.; Martin, S.; Wedge, D.C.; et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* **2016**, *534*, 47–54.
56. Rakha, E.A.; Reis-Filho, J.S.; Baehner, F.; Dabbs, D.J.; Decker, T.; Eusebi, V.; Fox, S.B.; Ichihara, S.; Jacquemier, J.; Lakhani, S.R.; et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010, *12*.
57. Hammond, M.E.H.; Hayes, D.F.; Dowsett, M.; Allred, D.C.; Hagerty, K.L.; Badve, S.; Fitzgibbons, P.L.; Francis, G.; Goldstein, N.S.; Hayes, M.; et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010, *28*, 2784–2795.
58. Slamon, D.J.; Godolphin, W.; Jones, L.A.; Holt, J.A.; Wong, S.G.; Keith, D.E.; Levin, W.J.; Stuart, S.G.; Udove, J.; Ullrich, A.; et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (80-. )*. **1989**, *244*, 707–712.
59. Wolff, A.C.; Hammond, M.E.H.; Hicks, D.G.; Dowsett, M.; McShane, L.M.; Allison, K.H.; Allred, D.C.; Bartlett, J.M.S.; Bilous, M.; Fitzgibbons, P.; et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of American pathologists clinical practice guideline update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2014**, *138*, 241–256.
60. Koboldt; Dan A comprehensive atlas of breast cancer genomes Available online: <http://massgenomics.org/2012/09/a-comprehensive-atlas-of-breast-cancer-genomes.html> (accessed on Sep 9, 2020).
61. Perou, C.M.; Sørile, T.; Eisen, M.B.; Van De Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Ress, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslen, L.A.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**, *406*, 747–752.
62. Sorlie, T.; Tibshirani, R.; Parker, J.; Hastie, T.; Marron, J.S.; Nobel, A.; Deng, S.; Johnsen, H.; Pesich, R.; Geisler, S.; et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 8418–23.

63. Sotiriou, C.; Neo, S.Y.; McShane, L.M.; Korn, E.L.; Long, P.M.; Jazaeri, A.; Martiat, P.; Fox, S.B.; Harris, A.L.; Liu, E.T. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 10393–10398.
64. Sørli, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; Van De Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 10869–10874.
65. Halliwell, B.; Cross, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102*, 5–12.
66. Sies, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In *Oxidative stress*; Sies, H., Ed.; Academic Press: London, 1985; pp. 1–7.
67. Poli, G.; Schaur, R.J. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* *50*, 315–21.
68. Niki, E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *595*, 19–24.
69. Guéraud, F.; Atalay, M.; Bresgen, N.; Cipak, A.; Eckl, P.M.M.; Huc, L.; Jouanin, I.; Siems, W.; Uchida, K.; Gueraud, F.; et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 1098–124.
70. Valencia, A.; Abrantes, M.; Hasan, J.; Aranda, J.; Beharry, K. Reactive Oxygen Species, Biomarkers of Microvascular Maturation and Alveolarization, and Antioxidants in Oxidative Lung Injury. *React. Oxyg. Species* **2018**, *6*, 373.
71. Gutierrez, J.; Ballinger, S.W.; Darley-Usmar, V.M.; Landar, A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 924–32.
72. Chandra, J.; Samali, A.; Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 323–333.
73. Gago-Dominguez, M.; Castelao, J.E. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: Further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic. Biol. Med.*

- 2006, 40, 721–733.
74. Cepinskas, G.; Kvietys, P.R.; Aw, T.Y. Omega 3-lipid peroxides injure CaCo-2 cells: relationship to the development of reduced glutathione antioxidant systems. *Gastroenterology* **1994**, *107*, 80–6.
  75. Catalá, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *157*, 1–11.
  76. Vistoli, G.; De Maddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G. Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.* **2013**, *47 Suppl 1*, 3–27.
  77. Esterbauer, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 779S-785S; discussion 785S-786S.
  78. Zarkovic, N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24*, 281–291.
  79. Sovic, A.; Borovic, S.; Loncaric, I.; Kreuzer, T.; Zarkovic, K.; Vukovic, T.; Wäg, G.; Hrascan, R.; Wintersteiger, R.; Klinger, R.; et al. The carcinostatic and proapoptotic potential of 4-hydroxynonenal in HeLa cells is associated with its conjugation to cellular proteins. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 1997–2004.
  80. Allevi, P.; Anastasia, M.; Cajone, F.; Ciuffreda, P.; Sanvito, A.M. Structural requirements of aldehydes produced in LPO for the activation of the heat-shock genes in HeLa cells. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 107–16.
  81. Strohmaier, H.; Hinghofer-Szalkay, H.; Jörg Schaur, R. Detection of 4-hydroxynonenal (HNE) as a physiological component in human plasma. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **1995**, *11*, 51–61.
  82. Casini, A.; Galli, A.; Pignalosa, P.; Frulloni, L.; Grappone, C.; Milani, S.; Pederzoli, P.; Cavallini, G.; Surrenti, C. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J. Pathol.* **2000**, *192*, 81–9.
  83. Kikuta, K.; Masamune, A.; Satoh, M.; Suzuki, N.; Shimosegawa, T. 4-hydroxy-2, 3-



- nonenal activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 2344–51.
84. Parola, M.; Robino, G.; Marra, F.; Pinzani, M.; Bellomo, G.; Leonarduzzi, G.; Chiarugi, P.; Camandola, S.; Poli, G.; Waeg, G.; et al. HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.* **1998**, *102*, 1942–50.
85. Biasi, F.; Tessitore, L.; Zanetti, D.; Cutrin, J.C.; Zingaro, B.; Chiarotto, E.; Zarkovic, N.; Serviddio, G.; Poli, G. Associated changes of lipid peroxidation and transforming growth factor beta1 levels in human colon cancer during tumour progression. *Gut* **2002**, *50*, 361–7.
86. Jenner, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet (London, England)* **1994**, *344*, 796–8.
87. Yoritaka, A.; Hattori, N.; Uchida, K.; Tanaka, M.; Stadtman, E.R.; Mizuno, Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 2696–701.
88. Dandona, P.; Thusu, K.; Cook, S.; Snyder, B.; Makowski, J.; Armstrong, D.; Nicotera, T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet (London, England)* **1996**, *347*, 444–5.
89. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40.
90. Ames, B.N.; Shigenaga, M.K. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1992**, *663*, 85–96.
91. Szweda, L.I.; Uchida, K.; Tsai, L.; Stadtman, E.R. Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3342–7.
92. Uchida, K.; Stadtman, E.R. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross- linking reaction. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6388–6393.
93. Mitchell, A.E.; Morin, D.; Lamé, M.W.; Jones, A.D. Purification, Mass Spectrometric Characterization, and Covalent Modification of Murine Glutathione S-Transferases.

- Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 1054–1062.
94. Uchida, K.; Shiraishi, M.; Naito, Y.; Torii, Y.; Nakamura, Y.; Osawa, T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2234–42.
  95. Ji, C.; Amarnath, V.; Pietenpol, J.A.; Marnett, L.J. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release. *Chem Res Toxicol* **2001**, *14*.
  96. Okada, K.; Wangpoengtrakul, C.; Osawa, T.; Toyokuni, S.; Tanaka, K.; Uchida, K. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23787–93.
  97. Page, S.; Fischer, C.; Baumgartner, B.; Haas, M.; Kreusel, U.; Loidl, G.; Hayn, M.; Ziegler-Heitbrock, H.W.; Neumeier, D.; Brand, K. 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 11611–8.
  98. Ji, C.; Kozak, K.R.; Marnett, L.J. IkappaB kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18223–8.
  99. Yun, M.R.; Im, D.S.; Lee, S.J.; Park, H.M.; Bae, S.S.; Lee, W.S.; Kim, C.D. 4-Hydroxynonenal enhances CD36 expression on murine macrophages via p38 MAPK-mediated activation of 5-lipoxygenase. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 692–8.
  100. Suc, I.; Meilhac, O.; Lajoie-Mazenc, I.; Vandaele, J.; Jürgens, G.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A.; Ju, N.; Salvayre, R.; Ne, A.; et al. Activation of EGF receptor by oxidized LDL. *FASEB J.* **1998**, *12*, 665–71.
  101. Robino, G.; Parola, M.; Marra, F.; Caligiuri, A.; De Franco, R.M.; Zamara, E.; Bellomo, G.; Gentilini, P.; Pinzani, M.; Dianzani, M.U. Interaction between 4-hydroxy-2,3-alkenals and the platelet-derived growth factor-beta receptor. Reduced tyrosine phosphorylation and downstream signaling in hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40561–7.

102. Chiarpotto, E.; Domenicotti, C.; Paola, D.; Vitali, A.; Nitti, M.; Pronzato, M.A.; Biasi, F.; Cottalasso, D.; Marinari, U.M.; Dragonetti, A.; et al. Regulation of rat hepatocyte protein kinase C beta isoenzymes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal: A signaling pathway to modulate vesicular transport of glycoproteins. *Hepatology* **1999**, *29*, 1565–72.
103. Rossi, M.A.; Di Mauro, C.; Dianzani, M.U. Action of lipid peroxidation products on phosphoinositide specific phospholipase C. *Mol. Aspects Med.* **1993**, *14*, 273–9.
104. Natarajan, V.; Scribner, W.M.; Taher, M.M. 4-Hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in vascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *15*, 365–75.
105. Milkovic, L.; Cipak Gasparovic, A.; Zarkovic, N.; Gasparovic, A.C.; Zarkovic, N.; Cipak Gasparovic, A.; Zarkovic, N. Overview on major lipid peroxidation bioactive factor 4-hydroxynonenal as pluripotent growth-regulating factor. *Free Radic. Res.* **2015**, *49*, 850–60.
106. Alary, J.; Guéraud, F.; Cravedi, J.-P. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24*, 177–187.
107. Singhal, S.S.; Singh, S.P.; Singhal, P.; Horne, D.; Singhal, J.; Awasthi, S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *289*, 361–70.
108. Gasparovic, A.C.; Milkovic, L.; Sunjic, S.B.; Zarkovic, N. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 226–234.
109. Panieri, E.; Santoro, M.M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2253.
110. Stossel, T.P.; Mason, R.J.; Smith, A.L. Lipid peroxidation by human blood phagocytes. *J. Clin. Invest.* **1974**, *54*, 638–45.
111. Esterbauer, H.; Muskiet, F.; Horrobin, D.F. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 779S-785S; discussion 785S-786S.
112. Dianzani, M.U.; Barrera, G.; Parola, M. 4-Hydroxy-2,3-nonenal as a signal for cell function and differentiation. *Acta Biochim. Pol.* **1999**, *46*, 61–75.

113. Zarkovic, N.; Ilic, Z.; Jurin, M.; Schaur, R.J.; Puhl, H.; Esterbauer, H. Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal. *Cell Biochem. Funct.* **1993**, *11*, 279–86.
114. Zarković, N.; Zarković, K.; Schaur, R.J.; Stolc, S.; Schlag, G.; Redl, H.; Waeg, G.; Borović, S.; Lončarić, I.; Jurić, G.; et al. 4-Hydroxynonenal as a second messenger of free radicals and growth modifying factor. *Life Sci.* **1999**, *65*, 1901–4.
115. Oberley, T.D.; Toyokuni, S.; Szweda, L.I. Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 695–703.
116. Zanetti, D.; Poli, G.; Vizio, B.; Zingaro, B.; Chiarpotto, E.; Biasi, F. 4-hydroxynonenal and transforming growth factor-beta1 expression in colon cancer. *Mol. Aspects Med.* *24*, 273–80.
117. Juric-Sekhar, G.; Zarkovic, K.; Waeg, G.; Cipak, A.; Zarkovic, N. Distribution of 4-hydroxynonenal-protein conjugates as a marker of lipid peroxidation and parameter of malignancy in astrocytic and ependymal tumors of the brain. *Tumori* **2009**, *95*, 762–768.
118. Zarkovic, K.; Juric, G.; Waeg, G.; Kolenc, D.; Zarkovic, N. Immunohistochemical appearance of HNE-protein conjugates in human astrocytomas. *Biofactors* **2005**, *24*, 33–40.
119. Yelisyeyeva, O.; Cherkas, A.; Zarkovic, K.; Semen, K.; Kaminsky, D.; Waeg, G.; Zarkovic, N. The distribution of 4-hydroxynonenal-modified proteins in gastric mucosa of duodenal peptic ulcer patients. *Free Radic. Res.* **2008**, *42*, 205–11.
120. Marquez-Quiñones, A.; Cipak, A.; Zarkovic, K.; Fattel-Fazenda, S.; Villa-Treviño, S.; Waeg, G.; Zarkovic, N.; Guéraud, F. HNE-protein adducts formation in different pre-carcinogenic stages of hepatitis in LEC rats. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 119–127.
121. Semlitsch, T.; Tillian, H.M.; Zarkovic, N.; Borovic, S.; Purtscher, M.; Hohenwarter, O.; Schaur, R.J. Differential influence of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on the growth of human lymphatic leukaemia cells and human peripheral blood lymphocytes. *Anticancer Res.* *22*, 1689–97.

122. Borovic, S.; Cipak, A.; Meinitzer, A.; Kejla, Z.; Perovic, D.; Waeg, G.; Zarkovic, N. Differential sensitivity to 4-hydroxynonenal for normal and malignant mesenchymal cells. *Redox Rep.* **2007**, *12*, 50–4.
123. Kreuzer, T.; Zarković, N.; Grube, R.; Schaur, R.J. Inhibition of HeLa cell proliferation by 4-hydroxynonenal is associated with enhanced expression of the c-fos oncogene. *Cancer Biother. Radiopharm.* **1997**, *12*, 131–6.
124. Baradat, M.; Jouanin, I.; Dalleau, S.; Taché, S.; Gieules, M.; Debrauwer, L.; Canlet, C.; Huc, L.; Dupuy, J.; Pierre, F.H.F.; et al. 4-hydroxy-2(E)-nonenal metabolism differs in Apc *+/+* Cells and in Apc *Min/+* cells: It may explain colon cancer promotion by heme iron. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1984–1993.
125. Kreuzer, T.; Grube, R.; Wutte, A.; Zarkovic, N.; Schaur, R.J.; Proliferation, T.H.E.; Hela, O.F.; Cells, C. 4-Hydroxynonenal modifies the effects of serum growth factors on the expression of the c-fos proto-oncogene and the proliferation of HeLa carcinoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 42–9.
126. Zarkovic, N.; Jörg Schaur, R.; Puhl, H.; Jurin, M.; Esterbauer, H. Mutual dependence of growth modifying effects of 4-hydroxynonenal and fetal calf serum in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16*, 877–884.
127. Shearn, C.T.; Reigan, P.; Petersen, D.R. Inhibition of hydrogen peroxide signaling by 4-hydroxynonenal due to differential regulation of Akt1 and Akt2 contributes to decreases in cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 1–11.
128. Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Čipak, A.; Duburs, G.; Horáková, L.; Łuczaj, W.; Majekova, M.; Odysseos, A.D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E.; et al. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 1216–62.
129. Milkovic, L.; Zarkovic, N.; Saso, L. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 727–732.
130. Jaramillo, M.C.; Zhang, D.D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 2179–91.
131. Taguchi, K.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2

- pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* **2011**, *16*, 123–140.
132. De Luca, C.; Kharaeva, Z.; Korkina, L. Is there a role for antioxidants in the prevention of infection-associated carcinogenesis and in the treatment of infection-driven tumors? *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 120–35.
133. Milkovic, L.; Siems, W.; Siems, R.; Zarkovic, N. Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 6529–42.
134. Klaunig, J.E.; Kamendulis, L.M.; Hocevar, B.A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **2010**, *38*, 96–109.
135. Liou, G.Y.; Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 479–496.
136. Harris, I.S.; Treloar, A.E.; Inoue, S.; Sasaki, M.; Gorrini, C.; Lee, K.C.; Yung, K.Y.; Brenner, D.; Knobbe-Thomsen, C.B.; Cox, M.A.; et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 211–22.
137. Schumacker, P.T. Reactive oxygen species in cancer: a dance with the devil. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 156–7.
138. Levonen, A.-L.; Landar, A.; Ramachandran, A.; Ceaser, E.K.; Dickinson, D.A.; Zanoni, G.; Morrow, J.D.; Darley-Usmar, V.M. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* **2004**, *378*, 373–82.
139. Numazawa, S.; Ishikawa, M.; Yoshida, A.; Tanaka, S.; Yoshida, T. Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2003**, *285*, C334-42.
140. Huang, Y.; Li, W.; Kong, A.-N.T. Anti-oxidative stress regulator NF-E2-related factor 2 mediates the adaptive induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hydroxynonenal. **2012**, *2*, 40.
141. Gveric-Ahmetasevic, S.; Sunjic, S.B.S.B.; Skala, H.; Andric, L.; Stroser, M.; Zarkovic, K.; Skrablin, S.; Tatzber, F.; Cipak, A.; Jaganjac, M.; et al. Oxidative stress

- in small-for-gestational age (SGA) term newborns and their mothers. *Free Radic. Res.* **2009**, *43*, 376–84.
142. Łuczaj Wojciech; Gęgotek Agnieszka; Skrzydlewska Elżbieta Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 87–101.
143. Suzuki, T.; Shibata, T.; Takaya, K.; Shiraishi, K.; Kohno, T.; Kunitoh, H.; Tsuta, K.; Furuta, K.; Goto, K.; Hosoda, F.; et al. Regulatory Nexus of Synthesis and Degradation Deciphers Cellular Nrf2 Expression Levels. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 2402–2412.
144. Menegon, S.; Columbano, A.; Giordano, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol. Med.* **2016**, *22*, 578–593.
145. Kansanen, E.; Kuosmanen, S.M.; Leinonen, H.; Levonen, A.-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 45–9.
146. Geismann, C.; Arlt, A.; Sebens, S.; Schäfer, H. Cytoprotection “gone astray”: Nrf2 and its role in cancer. *Onco. Targets. Ther.* **2014**, *7*, 1497–1518.
147. Kim, J.; Keum, Y.S. NRF2, a Key Regulator of Antioxidants with Two Faces towards Cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2016.
148. Sporn, M.B.; Liby, K.T. NRF2 and cancer: The Good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer* 2012, *12*, 564–571.
149. Ponz-sarvisé, M.; Pappin, D.J.; Sonenberg, N.; Tuveson, D.A.; In, I.; Chio, C.; Jafarnejad, S.M.; Ponz-sarvisé, M.; Park, Y.; Rivera, K.; et al. NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer Article NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cell* **2016**, *166*, 1–14.
150. Abdul-Aziz, A.; MacEwan, D.J.; Bowles, K.M.; Rushworth, S.A. Oxidative stress responses and NRF2 in human leukaemia. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 454659.
151. Gęgotek, A.; Nikliński, J.; Žarković, N.; Žarković, K.; Waeg, G.; Łuczaj, W.; Charkiewicz, R.; Skrzydlewska, E. Lipid mediators involved in the oxidative stress and antioxidant defence of human lung cancer cells. *Redox Biol.* **2016**, *9*, 210–219.

152. Pettazzoni, P.; Ciamporcerio, E.; Medana, C.; Pizzimenti, S.; Dal Bello, F.; Minero, V.G.; Toaldo, C.; Minelli, R.; Uchida, K.; Dianzani, M.U.; et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity controls 4-hydroxynonenal metabolism and activity in prostate cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1610–8.
153. Syu, J.-P.; Chi, J.-T.; Kung, H.-N. Nrf2 is the key to chemotherapy resistance in MCF7 breast cancer cells under hypoxia. *Oncotarget* **2016**, *7*, 14659–72.
154. Frijhoff, J.; Winyard, P.G.; Zarkovic, N.; Davies, S.S.; Stocker, R.; Cheng, D.; Knight, A.R.; Taylor, E.L.; Oettrich, J.; Ruskovska, T.; et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *23*, 1144–70.
155. Shelton, P.; Jaiswal, A.K. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J.* **2013**, *27*, 414–23.
156. Vaupel, P.; Mayer, A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, *26*, 225–239.
157. Vaupel, P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *Oncologist* **2004**, *9*, 10–17.
158. Zhong, H.; De Marzo, A.M.; Laughner, E.; Lim, M.; Hilton, D.A.; Zagzag, D.; Buechler, P.; Isaacs, W.B.; Semenza, G.L.; Simons, J.W. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5830–5.
159. Semenza, G.L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2010, *20*, 51–56.
160. Ratcliffe, P.J.; O'Rourke, J.F.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* **1998**, *201*.
161. Hamanaka, R.B.; Chandel, N.S. Cell biology. Warburg effect and redox balance. *Science* **2011**, *334*, 1219–20.
162. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–33.



163. Endo, H.; Kamada, H.; Nito, C.; Nishi, T.; Chan, P.H. Mitochondrial Translocation of p53 Mediates Release of Cytochrome c and Hippocampal CA1 Neuronal Death after Transient Global Cerebral Ischemia in Rats. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 7974–7983.
164. Matoba, S. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science (80-. )*. **2006**, *312*, 1650–1653.
165. Lopez-Lazaro, M. The Warburg Effect: Why and How Do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen? *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 305–312.
166. Ghanbari Movahed, Z.; Rastegari-Pouyani, M.; Mohammadi, M. hossein; Mansouri, K. Cancer cells change their glucose metabolism to overcome increased ROS: One step from cancer cell to cancer stem cell? *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *112*, 108690.
167. Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 60–74.
168. Blouw, B.; Song, H.; Tihan, T.; Bosze, J.; Ferrara, N.; Gerber, H.-P.; Johnson, R.S.; Bergers, G. The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* **2003**, *4*, 133–146.
169. Giannoni, E.; Bianchini, F.; Calorini, L.; Chiarugi, P. Cancer Associated Fibroblasts Exploit Reactive Oxygen Species Through a Proinflammatory Signature Leading to Epithelial Mesenchymal Transition and Stemness. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 2361–2371.
170. Vito, A.; El-Sayes, N.; Mossman, K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells* **2020**, *9*, 992.
171. Toth, R.; Warfel, N. Strange Bedfellows: Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 (Nrf2) and Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) in Tumor Hypoxia. *Antioxidants* **2017**, *6*, 27.
172. Bi, Z.; Zhang, Q.; Fu, Y.; Wadgaonkar, P.; Zhang, W.; Almutairy, B.; Xu, L.; Rice, M.; Qiu, Y.; Thakur, C.; et al. Nrf2 and HIF1 $\alpha$  converge to arsenic-induced metabolic reprogramming and the formation of the cancer stem-like cells. *Theranostics* **2020**, *10*, 4134–4149.
173. Ryan, H.E.; Poloni, M.; McNulty, W.; Elson, D.; Gassmann, M.; Arbeit, J.M.; Johnson,

- R.S. Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  Is a Positive Factor in Solid Tumor Growth | Cancer Research. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4010–4015.
174. Liu, W.; Shen, S.M.; Zhao, X.Y.; Chen Dr., G.Q. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2012, *3*, 165–178.
175. Dales, J.-P.P.; Garcia, S.; Meunier-Carpentier, S.; Andrac-Meyer, L.; Haddad, O.; Lavaut, M.-N.N.; Allasia, C.; Bonnier, P.; Charpin, C. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$  predicts early relapse in breast cancer: Retrospective study in a series of 745 patients. *Int. J. Cancer* **2005**, *116*, 734–739.
176. Bos, R.; van Diest, P.J.; van der Groep, P.; Shvarts, A.; Greijer, A.E.; van der Wall, E. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related. *Breast Cancer Res.* **2004**, *6*.
177. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–54.
178. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 2012, *9*, 671–675.
179. Škerija, M.; Bubanović, L.; Novak, P.; Čukelj, P.; Lončar, J.; Štruc, K.; Veltruski, J. *Registar za rak Hrvatske, bilten br. 42*;
180. Huang, D.; Li, T.; Li, X.; Zhang, L.; Sun, L.; He, X.; Zhong, X.; Jia, D.; Song, L.; Semenza, G.L.; et al. HIF-1-mediated suppression of acyl-CoA dehydrogenases and fatty acid oxidation is critical for cancer progression. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 1930–1942.
181. Zarkovic, N.; Cipak, A.; Jaganjac, M.; Borovic, S.; Zarkovic, K. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J. Proteomics* **2013**, *92*, 239–47.
182. Schaur, R.J.; Siems, W.; Bresgen, N.; Eckl, P.M. 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules* **2015**, *5*, 2247–337.
183. Wang, Z.Z.; Shi, Q.; Wang, Z.Z.; Gu, Y.; Shen, Y.; Sun, M.; Deng, M.; Zhang, H.; Fang, J.; Zhang, S.; et al. Clinicopathologic correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1 $\alpha$  in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: An immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol. Res. Pract.*

- 2011**, 207, 505–513.
184. Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **62**, 10–29.
  185. Bailey, C.M.; Liu, Y.; Peng, G.; Zhang, H.; He, M.; Sun, D.; Zheng, P.; Liu, Y.; Wang, Y. Liposomal formulation of HIF-1 $\alpha$  inhibitor echinomycin eliminates established metastases of triple-negative breast cancer. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2020**, 102278.
  186. Badowska-Kozakiewicz, A.M.; Piotr Budzik, M. Triple-Negative Breast Cancer: Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  in Triple-Negative Breast Cancer with Metastasis to Lymph Nodes. In *Breast Cancer and Surgery*; IntechOpen, 2018.
  187. Sotgia, F.; Whitaker-Menezes, D.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Salem, A.F.; Tsigiros, A.; Lamb, R.; Sneddon, S.; Hult, J.; Howell, A.; Lisanti, M.P. Mitochondria “fuel” breast cancer metabolism: Fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 4390–4401.
  188. Xie, L.; Hu, W.Y.; Hu, D.P.; Shi, G.; Li, Y.; Yang, J.; Prins, G.S. Effects of inorganic arsenic on human prostate stem-progenitor cell transformation, autophagic flux blockade, and NRF2 pathway activation. *Environ. Health Perspect.* **2020**, *128*, 1–16.
  189. Diehl, K.; Dinges, L.-A.A.; Helm, O.; Ammar, N.; Plundrich, D.; Arlt, A.; Röcken, C.; Sebens, S.; Schäfer, H. Nuclear factor E2-related factor-2 has a differential impact on MCT1 and MCT4 lactate carrier expression in colonic epithelial cells: a condition favoring metabolic symbiosis between colorectal cancer and stromal cells. *Oncogene* **2018**, *37*, 39–51.
  190. Liu, W.; Akhand, a a; Kato, M.; Yokoyama, I.; Miyata, T.; Kurokawa, K.; Uchida, K.; Nakashima, I. 4-Hydroxynonenal Triggers an Epidermal Growth Factor Receptor-Linked Signal Pathway for Growth Inhibition. *J. Cell Sci.* **1999**, *112* ( Pt 1, 2409–17.
  191. Awasthi, Y.C.; Sharma, R.; Cheng, J.Z.; Yang, Y.; Sharma, A.; Singhal, S.S.; Awasthi, S. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24*, 219–230.

192. Lin, M.-H.; Yen, J.-H.; Weng, C.-Y.; Wang, L.; Ha, C.-L.; Wu, M.-J. Lipid peroxidation end product 4-hydroxy-trans-2-nonenal triggers unfolded protein response and heme oxygenase-1 expression in PC12 cells: Roles of ROS and MAPK pathways. *Toxicology* **2014**, *315*, 24–37.
193. Castro, J.P.; Jung, T.; Grune, T.; Siems, W. *4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases*; 2017; Vol. 111, pp. 309–315;.
194. Hauck, A.K.; Zhou, T.; Hahn, W.; Petegrosso, R.; Kuang, R.; Chen, Y.; Bernlohr, D.A. Obesity-induced protein carbonylation in murine adipose tissue regulates the DNA-binding domain of nuclear zinc finger proteins. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 13464–13476.
195. Balestrieri, M.L.; Dicitore, A.; Benevento, R.; Di Maio, M.; Santoriello, A.; Canonico, S.; Giordano, A.; Stiuso, P. Interplay between membrane lipid peroxidation, transglutaminase activity, and cyclooxygenase 2 expression in the tissue adjoining to breast cancer. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 1577–82.
196. Almeida, M.; Ambrogini, E.; Han, L.; Manolagas, S.C.; Jilka, R.L. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27438–48.
197. Benz, C.C.; Yau, C. Ageing, oxidative stress and cancer: Paradigms in parallax. *Nat. Rev. Cancer* 2008, *8*, 875–879.
198. Sáez-Freire, M. del M.; Blanco-Gómez, A.; Castillo-Lluva, S.; Gómez-Vecino, A.; Galvis-Jiménez, J.M.; Martín-Seisdedos, C.; Isidoro-García, M.; Hontecillas-Prieto, L.; García-Cenador, M.B.; García-Criado, F.J.; et al. The biological age linked to oxidative stress modifies breast cancer aggressiveness. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *120*, 133–146.
199. Siow, R.C.M.; Ishii, T.; Mann, G.E. Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox Rep.* **2007**, *12*, 11–15.
200. Li, Y.P.; Tian, F.G.; Shi, P.C.; Guo, L.Y.; Wu, H.M.; Chen, R.Q.; Xue, J.M. 4-Hydroxynonenal promotes growth and angiogenesis of breast cancer cells through HIF-

- 1 $\alpha$  stabilization. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 10151–10156.
201. Li, Y.-P.P.; Tian, F.-G.G.; Shi, P.-C.C.; Guo, L.-Y.Y.; Wu, H.-M.M.; Chen, R.-Q.Q.; Xue, J.-M.M. 4-Hydroxynonenal promotes growth and angiogenesis of breast cancer cells through HIF-1 $\alpha$  stabilization. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 10151–6.
202. Gieniec, K.A.; Butler, L.M.; Worthley, D.L.; Woods, S.L. Cancer-associated fibroblasts—heroes or villains? *Br. J. Cancer* 2019, *121*, 293–302.
203. Wu, Q.; Li, B.; Li, Z.; Li, J.; Sun, S.; Sun, S. Cancer-associated adipocytes: Key players in breast cancer progression. *J. Hematol. Oncol.* 2019, *12*.
204. Lu, J. The Warburg metabolism fuels tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2019, *38*, 157–164.
205. Pavlides, S.; Whitaker-Menezes, D.; Castello-Cros, R.; Flomenberg, N.; Witkiewicz, A.K.; Frank, P.G.; Casimiro, M.C.; Wang, C.; Fortina, P.; Addya, S.; et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 3984–4001.
206. Benita, Y.; Kikuchi, H.; Smith, A.D.; Zhang, M.Q.; Chung, D.C.; Xavier, R.J. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4587–4602.
207. Lovas, A.; Radke, D.; Albrecht, D.; Buket, Z.B.; Möller, U.; Habenicht, A.J.R.; Weih, F. Differential RelA- and RelB-dependent gene transcription in LT $\beta$ R-stimulated mouse embryonic fibroblasts. *BMC Genomics* **2008**, *9*.
208. Raghunath, A.; Sundarraj, K.; Nagarajan, R.; Arfuso, F.; Bian, J.; Kumar, A.P.; Sethi, G.; Perumal, E. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* **2018**, *17*, 297–314.

## 8. ŽIVOTOPIS

Tomislav Orešić rođen je 24. ožujka 1972. godine u Zagrebu. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja u današnjoj XVI. Gimnaziji u Zagrebu 1990, godine upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu.

U lipnju 1998. godine diplomira i stječe naziv doktora medicine te u kolovozu 1998. godine zapošljava se i započinje liječnički staž u Klinici za tumore KBC Sestara Milosrdnica u Zagrebu. Nakon završenog staža, u travnju 2000, godine, započinje sa specijalizacijom iz opće kirurgije te u listopadu 2004. godine polaže specijalistički ispit iz opće kirurgije. Potom 2008. godine započinje sa subspecijalizacijom iz uže specijalnosti opće kirurgije – plastične i rekonstruktivne kirurgije te potom u svibnju 2010, godine uspješno polaže subspecijalistički ispit iz plastične i rekonstruktivne kirurgije. U 2019. godini rješenjem Ministarstva zdravstva priznata mu je i subspecijalizacija iz kirurške onkologije.

Od početka 2020, godine voditelj je Genetskog savjetovališta i ambulante za nasljedni rak Klinike za tumore KBC Sestara Milosrdnica u Zagrebu.